



Ocorrência de *Bacillus cereus* na Indústria de Alimentos

Bruno Oliveira da Fonseca

Monografia em Engenharia de Alimentos

Orientadores:

Karen Signori Pereira, D. Sc.

Luciana Maria Ramires Éspér, D. Sc.

Agosto de 2011

OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Bruno Oliveira da Fonseca

Monografia em Engenharia de Alimentos submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Alimentos.

Aprovado por:

Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D. Sc.

Elisabete Barbosa de Paula Barros. M. Sc.

Alcides Ricardo Gomes de Oliveira. M. Sc.

Orientado por:

Karen Signori Pereira, D. Sc.

Luciana Maria Ramires Ésper, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ –Brasil

Agosto de 2011

Fonseca, Bruno Oliveira.

Ocorrência de *Bacillus cereus* na indústria de alimentos/ Bruno Oliveira da Fonseca. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2011.

vii, 136p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2011.

Orientador(es): Karen Signori Pereira e Luciana Maria Ramires Éesper,

1. *Bacillus cereus*. 2. Intoxicação Alimentar. 3. Esporos Bacterianos. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Karen Signori Pereira e Luciana Maria Ramires Éesper. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Aos meus familiares,

Às professoras,

Aos meus amigos,

pela força, confiança e apoio para realização desse trabalho.

Resumo da Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Alimentos.

OCORRÊNCIA DE *Bacillus cereus* NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Bruno Oliveira da Fonseca

Agosto, 2011

Orientadores: Prof^ª. Karen Signori Pereira

Prof^ª. Luciana Maria Ramires Éspér

Bacillus cereus é um agente bacteriano de grande importância na indústria de alimentos, seja por seu caráter como deteriorador, seja pela capacidade de causar enfermidades quando de sua ingestão e/ou suas toxinas. Além disso, por ser um microrganismo esporulado, possui resistência a diversos agentes empregados na indústria de alimentos como controladores do crescimento microbiano: elevadas temperaturas, pH baixo, agentes químicos, etc. A contaminação dos alimentos por células de *Bacillus cereus* ocorre principalmente devido às condições inadequadas de manuseio e armazenamento dos mesmos, que acabam favorecendo a germinação de esporos e o desenvolvimento das células vegetativas do microrganismo. Dessa forma, o principal mecanismo de controle de *B. cereus* em alimentos é a prevenção do seu desenvolvimento. Medidas preventivas como controle de temperatura, de umidade e higiênico-sanitário devem ser adotadas pelos estabelecimentos produtores de alimentos, afim de impedir e/ou limitar o desenvolvimento bacteriano nos alimentos e Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar um vasto levantamento bibliográfico acerca das características do microrganismo, bem como sua importância como agente patogênico na indústria alimentícia.

SUMÁRIO

<u>INTRODUÇÃO</u>	1
CAPÍTULO I: <u>CARACTERIZAÇÃO DE <i>Bacillus cereus</i></u>	6
I.1 – Características Gerais	6
I.2 - Condições de crescimento e desenvolvimento	6
I.3 – Taxonomia	8
I.4 - Testes Bioquímicos	10
I.5 - Características diferenciais das espécies	11
I.6 - Problemática dos testes bioquímicos	13
I.7 - Caracterização molecular	14
I.8 - Meios de isolamento	15
I.9 – Esporos	18
I.10 – Biofilmes	25
CAPÍTULO II: <u>PATOGENICIDADE</u>	27
II.1 -Toxinas diarréicas	30

II.2-Toxina Emética.....	36
 CAPÍTULO III: <u>PREVALÊNCIA EM ALIMENTOS</u>.....	40
 III.1 - Leite e derivados.....	42
III.1.1 - Leite Cru.....	44
III.1.2 - Leite Pasteurizado.....	45
III.1.3 - Laticínios.....	48
 III.2 - Bancadas e Superfícies.....	51
 III.3 - Carnes e Derivados.....	54
 III.4 – Arroz.....	56
 III.5 - Alimentos Desidratados.....	58
 III.6 - Alimentos prontos pra consumo, in natura e condimentos.....	61
 CAPÍTULO IV: <u>EPIDEMIOLOGIA E SURTOS</u>.....	66
 IV.1 - Quantidades ingeridas.....	66
 IV.2 - Dificuldade de diagnósticos.....	69
 IV.3 - Alimentos Associados.....	73
 IV.4 - Hábitos alimentares.....	74
 IV.5 – Causa.....	75
 IV.6 - Surto epidemiológicos.....	76

IV.6.1 - Surtos Diarreicos.....	79
IV.6.2 - Surtos Eméticos.....	83
 CAPÍTULO V: <u>CONTROLE DA INCIDÊNCIA DE <i>Bacillus cereus</i></u>	86
 V.1 –Higienização.....	86
V.2 - Controle de Umidade.....	87
V.3 - Controle de temperatura.....	88
V.4 - <i>Clean-In-Place</i>	90
V.5 - Outras formas de controle.....	91
V.6 - Estudo dos Surtos.....	92
V.7 - Percepção e Fiscalização.....	93
V.8 – Política de Prevenção.....	94
 CAPÍTULO VI: <u>CONCLUSÃO</u>	96
 <u>REFERÊNCIAS</u>	98

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos tem-se intensificado a preocupação do consumidor com a qualidade dos alimentos e com sua saúde. Os setores produtivos também tem dado atenção especial para tal questão, já que, para se manterem competitivos no mercado, seus produtos precisam atender as expectativas dos consumidores. Daí surge o conceito do alimento seguro ou segurança alimentar, que é entendida como a garantia do consumidor em adquirir um alimento que possua como característica intrínseca a sanidade, bem como tenha atributos nutricionais e sensoriais desejáveis (BENEVIDES; LOVATI, 2004).

Entre as qualidades que se espera de um alimento está a isenção de microrganismos nocivos ao homem, no entanto a obtenção de alimentos absolutamente isentos de contaminação pode não ser possível. Dessa forma, todo o esforço deve ser dirigido ao controle dos fatores que possibilitem reduzir os riscos de contaminação nos alimentos (SCHLUNDT, 1999; JAY et al., 2005).

Desde a obtenção da matéria-prima até o tipo de estocagem, a qualidade de um produto alimentício pode ser comprometida por vários fatores. Em todos os alimentos, as condições inadequadas de manuseio e armazenamento acabam por contaminá-los e os consumidores ao ingerirem esses alimentos contaminados, muitas vezes são acometidos pelas doenças transmitidas por alimentos, que acarretam prejuízos para sua saúde, e em geral tais consumidores nem sequer sabem que o causador da sua enfermidade foi causada pela ingestão de um alimento (FREITAS et al., 2004).

Doença Transmitida por Alimentos, designada comumente como DTA, é definida como aquela usualmente de natureza infecciosa ou tóxica, causada por agentes que invadem o organismo através da ingestão de alimentos (WHO, 2002). Segundo a

Resolução RDC nº 12 (2001) do Ministério da Saúde, Doença Transmitida por Alimento é aquela “causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente ou de seu produto tóxico” (ANVISA, 2001).

Essas doenças de origem alimentar causadas por microrganismos podem ser divididas em três grupos: intoxicação (ou toxinose), infecção e toxinfecção. As intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas nos alimentos durante a proliferação intensa dos microrganismos patogênicos, presentes no alimento. As infecções alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos, os quais aderem à mucosa do intestino humano e proliferam-se, podendo haver a produção de toxinas que alteram o funcionamento das células do trato intestinal. (FRANCO; LANDGRAF, 2006). Já a toxinfecção alimentar é resultante da ingestão de quantidades aumentadas de bactérias na forma vegetativa que liberam toxinas no trato gastrointestinal, causando irritação e inflamação, porém sem colonizarem o mesmo. (ABERC, 2003). Em todos os três grupos de DTA, enquadram-se entre outras bactérias, *Bacillus cereus*.

As DTA's podem ocorrer de forma individual (casos) ou em surtos. Os surtos são caracterizados quando duas ou mais pessoas apresentam sintomas semelhantes após a ingestão de um mesmo alimento, sendo que qualquer tipo de alimento pode originar tal surto (SILVA-JÚNIOR, 2008; PARDI, 2006).

A Organização Mundial de Saúde considera que as doenças transmitidas por alimentos são um problema de saúde pública, uma vez que geram custos econômicos elevados, assim como problemas sociais. As DTA's atingem um grande número de indivíduos em todo o mundo, causando prejuízos não somente à saúde do consumidor,

mas também gastos com tratamentos médicos, perdas emocionais, incapacidade laboral temporária, absenteísmo escolar, perda da credibilidade do estabelecimento ou empresa, indenizações e até a prisão dos responsáveis, entre outras penalidades. (SILVA, 1999; NASCIMENTO, 2000). Segundo Mead et al. (1999), mais de 200 doenças conhecidas são transmitidas através dos alimentos, o que torna constante a preocupação internacional com tal questão, visto que acarretam sérias consequências para a saúde pública dos países.

No Brasil a notificação de surtos de DTA é obrigatória, porém, como algumas doenças se manifestam de forma leve, não sendo necessário acompanhamento médico, e como as pessoas afetadas desconhecem a possibilidade de denúncia, existe pouca notificação dos surtos de DTA no país. O número de casos estimados de doenças transmitidas por alimentos é desproporcional às notificações existentes, o que expõem ainda mais a imprecisão quanto ao perfil epidemiológico das DTA no Brasil, onde informações sobre a inocuidade dos alimentos ainda são incipientes (DAMASCENO et al., 2002; SVS/MS, 2003).

Apesar da dificuldade de se obter dados representativos sobre as doenças de origem alimentar no país, é consenso entre pesquisadores que sua incidência tem requerido atenção pública, principalmente as originadas em estabelecimentos que preparam e servem alimentos ao consumidor, os serviços de alimentação (SALAY, 2007). Estima-se que esta cadeia produtiva seja responsável por originar mais de 50% dos surtos de DTA de origem bacteriana no Brasil (GENTA et al., 2005). A falta de treinamento de mão-de-obra e a manipulação excessiva de grandes lotes de alimentos, por exemplo, são apenas alguns dos fatores que se associam à origem dos surtos nesses locais. Segundo pesquisa conduzida por Van-Amsonet al. (2003), alguns fatores contribuintes para surtos de DTA ocorridos no estado do Paraná, no Brasil, entre os

anos de 1978 e 2000, foram: matéria-prima contaminada antes do preparo (75,8%), manipuladores contaminados (44,2%), equipamentos contaminados (34%) e contaminação cruzada (28,4%) (a soma dos percentuais excede 100% porque diversos fatores contribuíram para cada surto).

Além disso, há outros fatores que contribuem para um maior número de surtos originados em serviços de alimentação e restaurantes no Brasil, como por exemplo as mudanças no estilo de vida e nos padrões de consumo da população. Essas mudanças, decorrentes principalmente da participação da mulher no mercado de trabalho e da concentração populacional nos grandes centros urbanos, têm contribuído para o aumento no consumo de alimentação fora dos lares residenciais e consequentemente gerado um aumento no número de estabelecimentos de produção e comercialização de refeições, acarretando dessa maneira a possibilidade de mais surtos de DTA ocorrerem (PIRES et al., 2002).

Um dos contaminantes mais implicados em alimentos envolvidos em surtos de DTA é o *Bacillus cereus*, que é uma bactéria patogênica produtora de toxinas (toxinas diarreicas e a toxina emética). Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da importância desse microrganismo como agente patogênico alimentar, visto que é uma bactéria com capacidade de contaminar várias matérias-primas e alimentos, além de sobreviver à maior parte dos tratamentos térmicos devido à sua capacidade de produção de esporos termorresistentes (ALONSO et al. 2008).

Os alimentos estão contaminados por *Bacillus cereus* habitualmente, devido a sua ampla distribuição no meio ambiente, porém em baixos números. Sua presença em pequenas quantidades ($<10^3$ células por grama de alimento) não constitui um problema, já que a ingestão dessas reduzidas populações não causa qualquer tipo de enfermidade no homem (ICMSF, 1996). Somente quando o microrganismo alcança concentrações

maiores que 10^5 cel/g é que irá representar um perigo potencial à saúde humana, visto que nessas condições há o indicativo do crescimento ativo e da proliferação do microrganismo no alimento (GERMANO; GERMANO, 2008).

Nas indústrias de alimentos, nos serviços de alimentação e em ambientes domésticos, *B. cereus* pode ter seu desenvolvimento favorecido nos alimentos em razão de diversos fatores. Entre os principais pode-se citar a deficiência das condições higiênico-sanitária dos manipuladores de alimentos, equipamentos, utensílios e locais de produção, processos de produção inadequados, falta de controle de temperatura durante o preparo, armazenagem, pós-preparo e distribuição dos alimentos, dentre outros (BENEVIDES; LOVATI, 2004). Bramorski et al. (2005) consideram que o controle da temperatura durante as etapas de produção e distribuição dos alimentos ao consumo é um dos fatores mais importantes na garantia de qualidade dos produtos processados. De forma genérica, o principal mecanismo de controle de *B. cereus* em alimentos é a prevenção do seu desenvolvimento, seja através do controle da germinação dos esporos, da população inicial em matérias primas, ou da multiplicação em alimentos preparados prontos para o consumo (GERMANO; GERMANO, 2008).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar um vasto levantamento bibliográfico acerca das características do microrganismo, bem como sua importância como agente patogênico na indústria alimentícia.

CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus cereus*

I.1 - Características Gerais

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família Bacillaceae, com características morfológicas e propriedades fisiológicas bem definidas. As células têm a forma de bastonetes (bacilos) com extremidades arredondadas e possuem grandes dimensões comparadas a outros microrganismos (comprimento superior a 3 µm, inferior a 5 µm, com diâmetro médio de 1,2 µm). Apresentam-se agrupados em cadeias curtas e/ou longas, geralmente são móveis, graças a um conjunto de flagelos peritríquios, e são formadores de esporos elipsoidais, na posição central ou subterminal, sem intumescimento do esporângio. Foram isolados originalmente em 1887, por Frankland e Frankland (ICMSF, 1996).

I.2 - Condições de crescimento e desenvolvimento

As linhagens de *B. cereus* possuem características variadas de crescimento e sobrevivência. As células vegetativas desenvolvem-se sob condições aeróbias ou anaeróbias (GRANUM; BAIRD-PARKER, 2000). Algumas linhagens são psicrótróficas, sendo capazes de crescer a 4 °C, enquanto a maioria das linhagens são mesófilas e podem crescer entre 15°C e 55°C. A temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 40°C. (GILBERT, 1979).

Assim como a temperatura, o pH mínimo para o crescimento varia conforme a linhagem e depende do agente acidificante do meio. O microrganismo consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 5,0 e 9,3. Ambientes com pH 5,1, resultante da presença de 0,1% de ácido acético, ou meios com valor de pH 5,6, quando acidificados com ácido lático, podem inibir o crescimento da bactéria. A taxa específica de

crescimento máxima atinge-se em ambientes com valores de pH entre 6,0 e 7,0. Já a atividade de água mínima está compreendida entre 0,92 e 0,95 para o crescimento do *B. cereus*, havendo inibição para concentrações superiores a 7,5% de NaCl (ICMSF, 1996; JAY et al., 2005; DOYLE; BEUCHAT, 2007).

São capazes de metabolizar diversos carboidratos, como glicose, frutose, trealose, sacarose, maltose, manose, m-inositol, lactose, entres outros, com produção de ácido. Possuem a capacidade de sintetizar enzimas extracelulares específicas para hidrolisar amido, caseína e gelatina (GOEPFERT et al., 1972, KONEMAN et al., 2001). Não produzem indol, são catalase positiva e oxidase variável. Não fermentam manitol e tem um sistema ativo de fosfolipases (lecitinase) (JOHNSON; NELSON; BUSTA, 1983).

Uma das características mais peculiares de *B. cereus* é sua habilidade de produzir esporos resistentes ao calor, conferindo ao microrganismo a sobrevivência em inúmeros habitats, incluindo alimentos e seus locais de processamento (RYU; BEUCHAT, 2005). Além da resistência térmica, os esporos apresentam resistência a outros fatores de estresse ambiental, como valores de pH extremos e produtos químicos (RYU; KIM; BEUCHAT, 2005).

A germinação dos esporos ocorre com relativa facilidade quando os mesmos encontram condições favoráveis. As temperaturas que favorecem essa germinação situam-se entre 5 e 50°C, e os tempos de geração podem variar entre 26 e 57 min., a temperaturas próximas de 30°C (JOHNSON et al., 1983; DUFRENNE et al., 1994).

I.3 - Taxonomia

A taxonomia pertinente ao gênero *Bacillus* ficou bem definida quando Smith et al. citados por Goepfert et al. (1972) e Harmon (1992), propuseram uma divisão do gênero em três grupos (Grupos I, II e III). As características morfológicas dos esporos e esporângios produzidos pelas bactérias foram os critérios utilizados para tal divisão. O grupo I foi caracterizado pelas espécies cujos esporos não apresentavam distensão do esporângio. Os grupos II e III agrupavam as espécies com esporos que distendessem o esporângio, distinguindo-se um do outro pela forma dos esporos, sendo elipsoidais para o grupo II e cilíndricos para o grupo III.

O grupo I foi subdividido posteriormente, proposta essa feita por Gordon (1973), baseando-se nas dimensões das células vegetativas. Células com comprimento maior que 0,9 µm e produtoras de glóbulos lipídicos formaram o Grupo IA, no qual faz parte o *B. cereus*. Além deste, o grupo era composto ainda por *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides* e *Bacillus thuringiensis*. O Grupo IB foi formado por espécies com células menores que 0,9 µm, não produtoras de glóbulos lipídicos, entre eles estão *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus coagulans* (GORDON, 1973; GRANUM; BAIRD-PARKER, 2000).

A classificação das espécies do grupo IA vem sendo discutida por diversos pesquisadores, que alegam que tais espécies são fortemente similares e estão intimamente relacionadas, distinguindo-se de *B. cereus* por apenas uma característica bioquímica cada espécie. Assim sendo, a diferenciação bioquímica de *B. mycoides* para *B. cereus* se dá pelo crescimento rizóide em meio sólido, o *B. anthracis* diferencia-se pela patogenicidade em animais (hemólise de sangue) e o *B. thuringiensis* é diferenciado de *B. cereus* pela produção de cristais proteicos tóxicos para insetos.

Alguns autores, como Smith et al. (1946; 1952) citados por Goepfert et al. (1972) e Kramer e Gilbert (1989), consideram que *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* são variedades de *B. cereus*, em vez de espécies distintas. Para comprovar tal fato, diversas pesquisas foram então desenvolvidas.

Estudos realizados por Kaneko et al. (1978) mostraram uma forte homologia de DNA, para *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis*, na faixa de 36% de G+C semelhantes. Já Honda et al. (1991) encontraram similaridade biológica, físico-química e imunológica entre hemolisinas produzidas por cepas de *B. thuringiensis* e *B. cereus*. Grande homologia também foi constatada por Carlson et al. (1994), que conduziram análises sobre a diversidade genética entre 24 cepas de *B. cereus* e 12 de *B. thuringiensis*, obtendo como resultado compatibilidades entre as espécies. A existência de cepas mutantes desta última citada foi relatada por Drobniewski (1993), que afirmou que devido a essas espécies não produzirem cristais, a distinção para *B. cereus* torna-se praticamente impossível. Ahmed et al. (1995), após realizarem estudos de fagotipagem, obtiveram evidências da estreita relação entre tais espécies. Estudos envolvendo análises de sequências genética realizados por Ash et al. (1991) e Bourque et al. (1995) sugerem a mesma ideia, de considerar *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* subespécies de uma mesma espécie. Helgason et al. (2000), utilizando sequenciamento genômico através de método baseado em PCR, verificaram similaridade dos genomas das três espécies citadas, em que menos de 5% dos seus códigos de DNA apresentaram divergência. Demais trabalhos têm sugerido que tais espécies (*B. cereus*, *B. anthracis*, e *B. thuringiensis*) deveriam ser consideradas como membros de uma única espécie, designada *Bacillus cereus sensu lato* (Daffonchio et al., 2000; Bavykin et al., 2004).

No entanto, outros estudos têm obtido discriminação genética suficiente entre as três espécies em questão, que garantem afirmar que tais bactérias são consideradas

espécies distintas (Chang et al., 2003; Radnedge et al., 2003). Segundo Damgaard et al. (1996), agrupar *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* em somente uma espécie, ou considerá-los espécies diferentes (que é a preferência da maioria dos pesquisadores) é bastante questionável e polêmico, pois as diferenciações entre elas existem, apesar de serem muito restritas para permitir a definição de espécies independentes. Atualmente não há um consenso entre os autores quanto ao fato de se essas bactérias deveriam ser consideradas espécies separadas ou variações específicas de uma única espécie (Villa Bôas et al., 2007).

I.4 - Testes Bioquímicos

Para a identificação e diferenciação das espécies do grupo no qual o *B. cereus* está presente, são utilizados testes bioquímicos. De acordo com esses testes, *B. cereus* possui as seguintes características: Gram positivo, produz catalase, lecitinase, acetoina (acetilmetilcarbinol) e hemolisina, é móvel, capaz de utilizar glicose de forma anaeróbica, não fermenta manitol em ágar gema de ovo polimixina vermelho fenol, reduz nitrato a nitrito, decompõe L-tirosina, cresce na presença de 0,001% de lisozima, não produz cristais de toxina e é negativo para crescimento rizóide (BENNETT; BELAY, 2001).

Um comparativo das características bioquímicas que diferenciam *B. cereus* e outras espécies é mostrado no Quadro 1.

Quadro 1: Características bioquímicas de *Bacillus cereus* e outras espécies

Características	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. anthracis</i>
Reação de Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Motilidade	+/-	+/-	-	-
Redução de nitrito	+	+/-	+	+
Decomposição da tirosina	+	+	+/-	-
Resistência a lisozima	+	+	+	+
Reação lecitinase	+	+	+	+
Utilização de glicose anaerobicamente	+	+	+	+
Reação de VP	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-
Hemólise	+	+	+	-
Crescimento rizoide	-	-	+	-
Produção de cristais paraesporais	-	+	-	-

^a: 90 a 100% das cepas positivas ^c: 50% das cepas positivas

^b: 90 a 100% das cepas negativas ^d: maioria das cepas negativas

+: teste positivo

- : teste negativo

FONTE: Rhodehamel e Harmon (1998)

I.5 - Características diferenciais das espécies

A principal característica que diferencia *Bacillus thuringiensis* de *Bacillus cereus* é a síntese de proteínas em forma de cristais, que se acumulam na periferia dos esporos em um dos polos da célula, durante a fase de esporulação (PEFERÖEN, 1997). Esses cristais, formados por uma ou várias proteínas com massa variável entre 27 a 140 kDa (BERHNARD et al., 1997), são altamente tóxicos e específicos, e por isso são produzidos industrialmente como inseticida biológico, pois afetam larvas de insetos como lepidópteros, dípteros e coleópteros, sendo inócuo para a maioria dos organismos. (MONNERAT; BRAVO, 2000; SIEGEL, 2001).

O mecanismo de toxicidade nos insetos ocorre da seguinte forma: as proteínas que constituem os cristais, chamadas de endotoxinas ou *Insecticidal Crystal Proteins*(ICPs), são convertidas proteoliticamente em polipeptídeos menores no trato digestivo das larvas suscetíveis, causando a lise osmótica devido à formação de poros na membrana do intestino, originada pela associação dos polipeptídeos a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino dos insetos. (SCHNEPF et al., 1998).

Já *Bacillus mycoides*, também chamado de *Bacillus cereus* var. *mycoides*, apresenta características bioquímicas bem semelhantes às de *B. cereus*, diferenciando-se somente pelo crescimento rizoide e a não produção de toxinas. (RHODEHAMEL; HARMON, 1998).

Bacillus anthracis, por sua vez, distingue-se bioquimicamente de *B. cereus* pela ausência de atividade hemolítica em ágar sangue, como também a patogenicidade em animais. O microrganismo produz uma exotoxina protéica complexa, com atividades

tóxicas e imunizantes diferentes, e quando as células são inoculadas em animais, leva-os ao óbito em até 72 horas (SPENCER, 2003).

No homem, a toxina produzida por *Bacillus anthracis* manifesta-se de três maneiras, de acordo com a forma de “invasão” dos esporos das células. Uma das formas é cutânea, caracterizada por edema e necrose na pele (SPENCER, 2003). Já a forma gastrointestinal pode originar úlcera de orofaringe, causando febre, náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia sanguinolenta, após a disseminação da bactéria das lesões pré-existentes na mucosa para o sistema linfático (MOCK; MIGNOT, 2003), levando a linfadenopatia (crescimento de linfonodos). Tem-se ainda a forma mais grave da doença, a inalatória, que causa edema, necrose e hemorragia, incluindo sintomas como febre, dispnéia, estridor, hipoxemia e hipotensão, que ocorre devido à produção de exotoxinas pelas células, após a germinação de esporos previamente inalados, onde os mesmos atingem os alvéolos pulmonares, sendo fagocitados e transportados via linfática (MOCK; FOUET, 2001).

I.6 - Problemática dos testes bioquímicos

Os testes bioquímicos utilizados para identificação das espécies do grupo de bactérias *B. cereus* apresentam alguns aspectos desfavoráveis (D'AUBERT et al., 1980; PRIEST, 1981; 1993; RHODEHAMEL; HARMON, 1998). Estes testes podem ser problemáticos devido às reações distintas que algumas cepas podem apresentar, isto é, várias cepas de uma mesma espécie podem indicar reações variáveis em suas características bioquímicas. Apesar das limitações, os testes bioquímicos são amplamente utilizados para a identificação do microrganismo até hoje.

Além disso, propriedades sorológicas e de sensibilidade a fagos também apresentam variabilidade, uma vez que as características sorológicas não são bem

definidas dentro do gênero *Bacillus*. Apesar disso, a pesquisa de antígenos flagelares e somáticos das células vegetativas ou antígenos dos esporos são usados como base para a caracterização sorológica (STADHOUDERS, 1992). Os antígenos somáticos, localizados na parede celular e no protoplasma, respectivamente termoestáveis e termolábeis, apresentam reações cruzadas frequentemente entre linhagens. No entanto, o maior grau de especificidade entre as cepas é atribuído aos antígenos flagelares e dos esporos (MIKAMI et al., 1990; DROBNIEWSKI, 1993), apesar do método de tipificação sorológica flagelar falhar para cepas de *B. cereus*, devido ao compartilhamento de alguns antígenos flagelares semelhantes com *B. thuringiensis* (STADHOUDERS, 1992).

I.7 - Caracterização molecular

As busca por métodos para aperfeiçoar a diferenciação de *B. cereus* começou então a ser pesquisada e desenvolvida, baseada na análise de componentes genéticos das células de espécies do grupo IA. (HARMON, 1992; ZOTOLA, 1997; NOTERMANS; BATT, 1998). Dentre as técnicas desenvolvidas, tem-se como exemplo: fagotipagem (AHMED et al., 1995), análise de plasmídeo (NISHIKAWA et al., 1996), amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) (STEPHAN, 1996) e reação de polimerase em cadeia, conhecido como PCR (MARTAR et al., 1996).

Pesquisas realizadas por Lechner et al. (1998) basearam-se nas diferenças entre as sequências genéticas específicas dos microrganismos estudados (membros mesófilos e psicrotróficos do grupo de *B. cereus*) para sugerir uma nova espécie, capaz de crescer a temperaturas entre 4 e 7°C, mas não a 43°C, chamada *Bacillus weihenstephanensis*. Nesse estudo, os autores utilizaram PCR para o gene *csp A* para a identificação da espécie.

O desenvolvimento de *primers* específicos para identificação do grupo IA, foi obtido por Hansen et al. (2001), e não seriam necessários procedimentos de isolamento ou enriquecimento, pois os mesmos poderiam ser utilizados na detecção direta das bactérias. A técnica de PCR combinada com a restrição da endonuclease (PCR-RE), foi utilizada por Manzano et al. (2003), na qual dois *primers* específicos para espécies do gênero *Bacillus* foram utilizados para a amplificação, com a finalidade de diferenciar *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*. Após a obtenção dos *amplicons*, foi feita uma digestão por três enzimas restritivas diferentes, sendo verificados perfis eletroforéticos adequados para a diferenciação entre as espécies. Os autores relatam ainda que haveria a possibilidade de se usar a técnica diretamente em amostras de alimentos com população mista de bactérias.

I.8 - Meios de isolamento

Diversos métodos podem ser utilizados para isolar *B. cereus* em alimentos. A maioria dos procedimentos para detectar e enumerar a bactéria é feito pelo método de semeadura direta em placas. O método do número mais provável (NMP) também é usado, porém só é recomendado quando são esperadas contagens abaixo de 10 microrganismos/g de material. No método de contagem em placas, que envolve o espalhamento em superfície, o meio de cultura mais utilizado é o chamado MYP, sigla de *Mannitol Yolk Polymyxin*, constituído por ágar, manitol, gema de ovo e polimixina B-sulfato; a polimixina serve como um agente seletivo, inibindo a microbiota acompanhante, enquanto a gema de ovo e o manitol são usados como agentes diferenciais (MANTYNEN; LINDSTROM, 1998; PENG et al., 2001; SILVA et al., 2007).

A reação da gema de ovo pelas colônias de *B. cereus*, demonstra a produção de lecitinase, evidenciada pelo halo denso e opaco de precipitação de lecitina. Já o manitol, que não é fermentado pelas bactérias, confere ao halo em volta da colônia uma coloração rósea leitosa (RHODEHAMEL; HARMON, 1998; SILVA et al., 2007).

Os responsáveis pelo desenvolvimento do meio MYP alegam que, colônias planas, sem brilho, de bordas ligeiramente onduladas, com 3 a 6 mm de diâmetro, rodeados de halo denso e branco de precipitação de lecitina, contra fundo róseo arroxeado intenso do meio, são contadas como presumíveis unidades (células ou esporos) de *B. cereus* (MOSSE et al., 1967)

À princípio, a maioria dos meios desenvolvidos para isolar o microrganismo baseia-se na reação de lecitinase (envolvendo a precipitação de lecitina, hidrólise essa associada às fosfolipases C produzidas pela bactéria) e na incapacidade de fermentação do manitol (VARADARAJ, 1993). Assim como indicadores de pH, alguns agentes seletivos são utilizados nos meios, como polimixinas, cloreto de lítio e actidiona, com a finalidade de inibir o crescimento de outros microrganismos nos mesmos. A polimixina-B, por exemplo, apresenta efeito bactericida contra Gram-negativos e interfere na estrutura de membranas citoplásmicas (VAN NETTEN; KRAMER, 1992). Os autores relatam ainda que, para facilitar a identificação das colônias, o espalhamento do inóculo em superfície deve ser feita de modo que permita a formação característica das mesmas.

Um levantamento acerca dos vários meios seletivos e/ou diferenciais, usados para o isolamento de *B. cereus*, foi realizado por Hutchinson e Kramer (1978) citados por Vallin (1999), sendo os principais: ágar-sangue (HAUGE, 1955); ágar-LiCl, gema de ovo extrato de carne, polimixina B (DONOVAN, 1958); ágar-manitol, gema de ovo, vermelho de fenol, polimixina (MOSSE et al., 1967), conhecido como meio MYP, já citado; ágar-gema de ovo modificada, polimixina B (KIM; GOEPFERT, 1971), também

conhecido como Meio KG, largamente utilizado até hoje; ágar-manitol, gema de ovo, púrpura de bromocresol (meio BC de Kendall) (GILBERT; TAYLOR, 1976); manitol, gema de ovo, vermelho de fenol com ou sem polimixina (SSA, 1976), ágar-lecitina (CHRISOPE; FOX; MARSHALL, 1976).

Os criadores do meio KG relatam que o meio MYP não é eficiente em impedir o desenvolvimento de microrganismos fermentadores de manitol, pois o mesmo permite que grandes quantidades de espécies manitol-positivas se desenvolvam, fato evidenciado pela coloração amarela no meio, a qual dificulta ou mesmo impede a visualização de colônias manitol-negativas. Como características diferenciais, o meio KG estimula a formação de esporos livres dentro de poucas horas e utiliza em sua composição vermelho de fenol, visando acentuar a reação de Iecitinase (KIM; GOEPFERT, 1971).

Além destes, outro meio amplamente utilizado, descrito por Holbrooke Anderson (1980), é o meio PEMBA (*Polymyxin Pyruvate Egg yolk Mannitol bromothymol Blue Agar*). Segundo os autores, é possível realizar rapidamente a detecção e identificação de pequenos números de *B. cereus* em alimentos. Um dos seus constituintes diferenciais é o piruvato, usado para reduzir o espalhamento das colônias, intensificar a reação de lecitinase e facilitar a germinação.

Alguns estudos realizados para comparar a eficiência dos meios, verificaram que a diferenciação de colônias da bactéria era melhor obtida no meio MYP, do que em PEMBA. Além disso, relatos apontam que o primeiro meio permite identificar o patógeno com um número menor de testes adicionais (HARMONet al.,1984). Trabalhos envolvendo análise de leite e alimentos desidratados mostram que não houve diferença alguma no isolamento das colônias entre os meios MYP, PEMBA e ágar-sangue não seletivo (Peterz et al., 1985). Entretanto, sérias restrições ao meio PEMBA são relatadas

por Rusul e Yaacob (1995), que afirmam que somente 42,3% de 459 colônias presuntivas do microrganismo foram confirmadas.

Os meios mais difundidos atualmente, na rotina analítica de *B. cereus*, são MYP e PEMBA, indicados como os principais meios seletivos por apresentarem maior e mais fácil recuperação do microrganismo (VAN NETTEN; KRAMER, 1992; SCHULTEN et al., 2000; SILVA et al., 2007).

I.9 - Esporos

Os esporos bacterianos são estruturas fundamentais para a manutenção e dispersão dos microrganismos no ambiente. No caso de *B. cereus*, os esporos apresentam propriedades que tornam sua disseminação e sobrevivência assegurada em diversos alimentos, destacando-se a elevada resistência ao calor, às variações de temperatura e de pH, e aos processos de desidratação e irradiação (GOEPFERT et al., 1972; GILBERT, 1979; KRAMER; GILBERT, 1989; KOTIRANTA et al., 2000). Além dessas propriedades, a excelente capacidade de adesão do esporo confere ao microrganismo a ocorrência frequente em grande variedade de alimentos crus e processados, constituindo um problema importante para as indústrias de alimentos (ANDERSSON et al., 1995).

Os esporos são formados por uma capa externa e protetora, um córtex intermediário e um protoplasto interno. A natureza desidratada do protoplasto do esporo está relacionada com a resistência ao calor, e até certo ponto aos produtos químicos, segundo pesquisas. Em geral, os esporos de bactérias podem ser 100.000 vezes mais resistentes a agentes químicos, se comparados às células vegetativas (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1992).

Devido a características hidrofóbicas, os esporos aderem-se facilmente a materiais usados corriqueiramente nas indústrias de alimentos e cozinhas, como o aço inoxidável, utilizados em superfícies de bancadas, equipamentos e tubulações (HUSMARK; SIK, 1990; ANDERSSON et al., 1995; JULLIEN et al., 2003). Os esporos aderidos nas superfícies, ou até mesmo células vegetativas de *B. cereus*, podem contribuir para o aparecimento de biofilmes (WIJMAN et al., 2007).

Nos alimentos, os principais parâmetros que interferem ou modificam a resistência térmica dos esporos são: o pH, a temperatura de armazenamento e de esporulação, a atividade de água e a concentração de sais (principalmente cloreto de sódio). A concentração de cloreto de sódio parece ser o fator que apresenta menor influência sobre a resistência térmica dos esporos, de acordo com Leguerinel et al. (2000).

Outra propriedade conferida pelos esporos das bactérias é a resistência térmica, que apresenta dados variados, segundo pesquisas. Os diferentes resultados encontrados para valores D, a diferentes temperaturas, de *B. cereus* pelos autores deve-se principalmente às condições dos experimentos (relacionados à composição dos substratos e às matrizes utilizadas) e às peculiaridades de cada linhagem.

Rajkowski e Mikolajcik (1987) registraram variações de D_{100} para esporos de *B. cereus* entre 0,6 e 27 min, em água desmineralizada; Dufrenne et al. (1994) encontraram D_{90} situados entre 4,6 e 200 min (em tampão fosfato pH 7,0). Em leite, o valor D_{95} pode variar de 1,8 a 3 minutos; Em água destilada D_{100} é de 5,5 minutos, mas em caldo de arroz situa-se entre 4,2 e 6,3 minutos (ICMSF, 1996).

Mazas et al. (1995) estudaram a resistência térmica de esporos de *B. cereus* e constataram que o meio de esporulação influencia os valores D, mas não o valor z. Os

autores verificaram que para cada linhagem, havia um melhor meio de esporulação, evidenciando a variabilidade e especificidade da bioquímica de cada linhagem.

Em relação aos esporos de cepas produtores de toxina, há significativa diferença quanto à resistência térmica apresentada por eles. Estudos mostraram que esporos de cepas eméticas são mais resistentes, por não sofrerem destruição a 100°C por 30 min ou a 105°C por 5 min, enquanto esporos de cepas produtoras de enterotoxinas são inativados (SHINAGAWA, 1993).

Devido à elevada resistência térmica por parte dos esporos, há a possibilidade deles sobreviverem a tratamentos térmicos empregados na produção de alimentos, como leites e produtos lácteos (SANCHEZ, 2005). Como consequência, os esporos sobreviventes germinam, depois de encontrarem condições apropriadas e, com o desenvolvimento das células, o alimento torna-se contaminado. Outro aspecto relevante é que os processos térmicos eliminam concomitantemente a microbiota competitiva, favorecendo ainda mais a presença de *B. cereus* (ANDERSSON et al., 1995).

Processos como a pasteurização funcionam como ativadores da germinação, potencializando a mesma, o que é evidenciado pelo aumento da velocidade de germinação e da proporção de esporos germinados pós-pasteurização (BIOCHER; BUSTA, 1983; COOK; PIERSON, 1983). Outros tipos de tratamentos (químicos ou físicos) também podem desencadear a ativação dos esporos, porém o aquecimento, por ter maior potencial, é um dos mais estudados (SANCHEZ, 2005).

A inativação de esporos de *B. cereus*, assim como a destruição de células vegetativas, foi estudada por diversos autores, os quais procuravam comparar a eficiência de diferentes tratamentos térmicos, comumente aliados a tratamentos com pressão.

Hanson, Wendorff e Houck (2005) a fim de avaliar os efeitos das combinações de tempo e temperatura sobre a população microbiana de leite, aplicaram em amostras do produto quatro tratamentos térmicos diferentes: 63°C/30min, 72°C/15seg, 76°C/15seg, e 82°C/30min. Após o armazenamento resfriado das mesmas a temperaturas de 6 ou 10°C por 14 dias, os autores atestaram que as maiores contaminações por *Bacillus*spp.foram nas amostras submetidas a 72°C e 76°C por 15seg, comparadas às submetidas à 63°C por 30min. O tratamento mais eficiente foi o de 82°C por 30min, pois as amostras não apresentaram contaminações por *Bacillus* spp., inclusive *B. cereus*.

Na África do Sul, pesquisa desenvolvida por Dusmalisile, Witthuhn e Britz (2005) avaliou a eficiência de quatro tratamentos térmicos, também envolvendo leite. Foram empregadas nas amostras obtidas do comércio local, as seguintes condições: 63°C por até 30 minutos, 72°C até 10 minutos e 90°C até 10 minutos, seguidos de envase, e pasteurização pós-envase a 80°C por 30 minutos, para determinar a destruição de classes específicas de microrganismos previamente inoculados nas amostras de leite, entre eles *Bacillus cereus*. Os resultados mostraram que todos os tratamentos destruíram os microrganismos esperados, contudo, *B. cereus* foi o único sobrevivente antes do envase, permanecendo viável também após tratamento térmico pós-envase. Em qualquer condição avaliada, nenhuma foi eficiente contra células de *B. cereus*, sendo que as cargas iniciais (inoculações de 10⁴ UFC/ml e 10⁵ UFC/ml) foram consideradas variáveis importantes no processo de destruição dos microrganismos, visto que as maiores cargas levaram mais tempo para serem destruídas.

Para que haja a recuperação das células após o tratamento térmico, algumas condições específicas devem ser seguidas. A “*Food and Drug Administration*” (FDA) recomenda uma temperatura de incubação de 35°C por até 14 dias para recuperar

microrganismos contaminantes em testes de esterilidade comercial (RHODEHAMEL; HARMON, 1998). Para embalagens de leite UHT (*ultra high temperature*), a incubação é de 35 a 37°C por até 7 dias, segundo Resolução - RDC nº 12 de 2/01/2001, de Padrões Microbiológicos para Leite UHT e derivados, do Ministério da Saúde (ANVISA, 2001). Os esporos tratados termicamente geralmente são recuperados com temperaturas mais baixas em relação àqueles sem tratamento térmico.

Em relação aos meios de isolamento, Mossel et al. (1967) relatam que o meio por eles desenvolvido, MYP, foi o que mais recuperou colônias de *B. cereus* frente a outras formulações testadas, sendo eficaz mesmo em baixas concentrações (10 UFC/ml). O mesmo foi certificado por Johnson et al. (1982) durante estudos sobre a germinação e resistência térmica de esporos do microrganismo. Os autores afirmam que estes se desenvolveram melhor e mais rapidamente em meio MYP quando comparado com o meio TSB (*Trypticase Soy Broth*). No entanto, Gonzales et al. (1995), ratificando relatos de Rajkowski e Mikolajcik (1987), atestaram que o melhor meio de cultura para recuperar esporos injuriados da bactéria é o meio NA (*Nutrient Agar*), em comparação com TSA (*Trypticase Soy Agar*), PCA (*Plate Count Agar*) e MA (*Milk Agar*).

A faixa de temperatura para que haja a germinação dos esporos situa-se entre 5 e 50°C, sendo os tempos de geração variáveis entre 26 e 57 min (JOHNSON et al., 1983). Notermans e Batt (1998) alegam que os esporos germinam facilmente quando encontram condições favoráveis, alcançando níveis de recuperação próximos de 100%, ocorrendo num processo rápido, dentro de 30 minutos em algumas cepas.

A respeito da resistência do microrganismo e seus esporos frente a outros fatores, como agentes químicos e variações de pH, diversos estudos específicos foram realizados. São exemplos: testes envolvendo o efeito preservante de aditivos alimentares, como lactatos de sódio e cálcio (ARANet al., 2001), a verificação da

eficácia de sanitizantes na remoção de biofilmes (PENG et al., 2002), a influência do pH e temperatura de armazenagem na preservação de alimentos minimamente processados (VALERO et al., 2002), entre outros.

O pH é um dos parâmetros mais influentes na resistência do esporos. Quanto mais ácido é o meio de germinação, menos termorresistentes tornam-se os esporos (GONZÁLESet al., 1996). Geralmente, os microrganismos são mais resistentes ao calor quando estão em um alimento cujo pH é ótimo ao seu desenvolvimento, no caso de *B. cereus* próximo de 7,0. O tratamento térmico em alimentos ácidos pode ser mais brando quando comparado a alimentos próximos a neutralidade (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Segundo os autores, o pH apresenta efeito sobre a termorresistência de esporos do microrganismo. Seus relatos apontam tempos de sobrevivência pelas células da bactéria (quando submetidas à temperatura de 100 °C) de 11 minutos para pH de 6,8 e 7,6, enquanto que, para pH 4,4, é de 2 minutos, o que indica a resistência térmica menor para valores de pH ácidos, conforme mostra o Quadro 2.

Quadro 2: Efeito do pH sobre a termorresistência de esporos de *Bacillus cereus*, submetidos à temperatura de 100 °C.

pH	Tempo de sobrevivência (minutos)
4,4	2
5,6	7
6,8	11
7,6	11
8,4	9

FONTE: Fraziere Westhoff (1993)

Outros trabalhos para analisar a influência do pH foram realizados, como o efeito sobre a temperatura de esporulação (COUVERT et al., 1999), a ação de diferentes ácidos orgânicos sobre a inativação térmica (LEGUERINEL et al., 2001), além da influência sobre o crescimento, quando combinada a gradientes de cloreto de sódio (PETERS et al., 1991) e presença de etanol (LANCIOTTI et al., 2001).

A influência da atividade água, temperatura e pH sobre valores D de esporos de *B. cereus* foram testadas por Gaillard et al. (1998), após a realização de várias combinações desses parâmetros. Os dados encontrados indicam uma estreita relação entre tais parâmetros com as propriedades de resistência do esporo do microrganismo. Comparando-se valores D para temperatura de 95°C e pH de 6,5 por exemplo, o valor D era de 3,386 minutos, para Aw de 1,0, enquanto que para Aw de 0,86, o valor D foi de 13,842 minutos. Os autores concluíram que, para uma mesma temperatura e pH, a resistência das células microbianas aumenta, conforme a atividade água é decrescida, verificando ainda que: para uma mesma temperatura e atividade água, os valores D diminuem de acordo com a diminuição do pH; e para um mesmo valor de atividade água e pH, quanto maior a temperatura, menor o valor D. No Quadro 3 podem ser observados alguns valores encontrados pelos autores.

Quadro 3: Influência da temperatura (T°C), atividade água (Aw) e pH sobre valores D de esporos de *B. cereus*.

		Valor D (minutos)		
T°C	Aw	pH 6.5	pH 5.5	pH 4.5
105	1.00	0.151	0.093	0.084
105	0.95	0.278	0.126	0.150
105	0.86	1.282	0.808	0.475

95	1.00	2.386	1.040	0.511
95	0.95	2.870	1.658	0.892
95	0.86	13.842	14.513	7.776
85	1.00	63.398	13.085	5.042
85	0.95	72.253	30.540	16.286
85	0.86	68.909	91.540	33.910

FONTE: Gaillard; Legherinel; Mafart (1998)

O efeito da pressão hidrostática sobre a viabilidade dos esporos foi investigada por Raso et al. (1998), numa tentativa de encontrar métodos de controle microbiológico menos agressivos para serem aplicados à indústria. Os autores verificaram que o estímulo à germinação provocado pela pressão hidrostática, fez com que os processos de inativação térmica de esporos tornassem-se mais eficazes, num processo sob condições mais brandas.

I.10 – Biofilmes

B. cereus desempenha um papel destacado entre os contaminantes de superfícies, já que possui esporos e células com grande habilidade de aderência a aço inoxidável e outros materiais. Com a multiplicação das células aderidas, pode haver a formação de biofilmes nas superfícies de contato com alimentos, os quais são excepcionalmente resistentes aos produtos de higienização. Logo, por se tornarem uma fonte de contaminação, células aderidas em bancadas e superfícies representam um grave problema para unidades de processamento de alimentos, pois comprometem a qualidade e segurança do produto final (KUMAR; ANAND, 1998; PENG et al., 2001).

Os esporos de *Bacillus* spp. têm sido relatados por possuírem uma maior facilidade para aderir em superfícies de aço inoxidável, do que células vegetativas, o

que se deve as suas propriedades hidrofóbicas. Diversos tipos de microrganismos podem formar os biofilmes, inclusive *B. cereus*, que está presente em 12,4% da microflora constituinte de biofilmes de plantas comerciais de laticínios (POULSEN, 1999; RYU; BEUCHAT, 2005; WIJMAN et al., (2007).

O termo “biofilme” pode ser descrito como uma matriz biologicamente ativa, formada por células microbianas e substâncias extracelulares, em associação com uma superfície sólida (BAKKE et al., 1984, citados por KUMAR E ANAND, 1998). Outros autores definem biofilme como um “consórcio funcional de microrganismos aderidos a uma superfície, embebido em substâncias poliméricas extracelulares, produzidas pelos próprios microrganismos” (COSTERTON et al. 1987, citados por KUMAR E ANAND, 1998).

Uma vez formado, esses biofilmes acabam se comportando como um “ninho” de esporos, sendo responsáveis pela formação e lançamento destes no ambiente, inclusive em locais de produção de alimentos (HUSMARK; SIK, 1990; HUSMARK; RÖNNER, 1992; ANDERSSON et al., 1995; ANDERSSON et al., 1998).

O processo de formação do biofilme ocorre quando os microrganismos (em forma de células viáveis ou de esporos) depositam-se em superfícies sólidas, pois são atraídos por estas conterem partículas de nutrientes essenciais à sua viabilidade e ao seu crescimento. Nas superfícies de equipamentos, bancadas e utensílios, ricos em nutrientes, as células (e os esporos, após passarem pelo processo de germinação) começam a se multiplicar e formar colônias suficientemente grandes para englobar materiais orgânicos e inorgânicos, formando assim o filme microbiano (KUMAR; ANAND, 1998).

CAPÍTULO II: PATOGENICIDADE

Além da produção de enzimas extracelulares, responsáveis pelo desenvolvimento de deterioração em alimentos, *Bacillus cereus* tem a capacidade de produzir toxinas. Estas toxinas são responsáveis pelo efeito patogênico do microrganismo, podendo causar diferentes tipos de enfermidades ao homem. Essas enfermidades causadas pela bactéria manifestam-se principalmente através de gastroenterites, as quais são adquiridas após a ingestão de alimentos contaminados. Há um constante desafio aos profissionais responsáveis pelo controle higiênico dos alimentos, devido a essa capacidade do microrganismo produzir toxinas, que podem levar a surtos, o que evidencia a importância do patógeno nas indústrias alimentícias (ROBINSON; PHILL, 1987; COLLINS, 1997).

Os dois principais tipos de toxinas produzidas por *B. cereus* e que são responsáveis por casos de doenças transmitidas por alimentos (denominadas de síndrome diarréica e síndrome emética) são as toxinas diarréicas (ou enterotoxinas), termolábeis, e a toxina emética, termoestável (VARNAM; EVANS, 1991).

A síndrome diarréica é desencadeada pelas toxinas diarréicas e caracteriza-se por um período de incubação de 8 a 16 horas. Seus principais sintomas são dores abdominais, cólicas e diarréia intensa, com duração de 12 a 24 horas, febre e vômito são raros. Esses sintomas de intoxicação alimentar são semelhantes aos da intoxicação causada por *Clostridium perfringens* (SPIRA; GOEPFERT, 1975; MELLING et al., 1976; TURNBULL, 1976; PARRY; GILBERT, 1980; JOHNSON, NELSON; BUSTA, 1982; KRAMER; GILBERT, 1989; VARNAM; EVANS, 1991; GRANUM, 1994; 1997). As toxinas diarréicas são produzidas no trato intestinal após a ingestão de células vegetativas ou esporos de *B. cereus* (DROBNIEWSKI, 1993; GRANUM, 1994). Vários alimentos, incluindo produtos cárneos, pescados, leite, vegetais crus ou cozidos foram

associados à síndrome diarréica (GERMANO; GERMANO, 2008; FRANCO; LANDGRAF, 2006). A produção da toxina foi observada também em feijões, purê de bananas e carne (IVERS; POTTER, 1977). Para o desenvolvimento da síndrome diarréica é necessária a ingestão de alimentos com populações maiores que 10^5 cel/g ou ml, o que tem sido relatado na maioria dos casos de intoxicação diarréica por *B. cereus*, segundo citações de Kramer e Gilbert (1989) e Shinagawa (1990).

A síndrome emética, desencadeada pela toxina emética, tem um curto período de incubação variando de 1 a 6 horas, causando inicialmente náuseas, em seguida vômito e mal-estar. Estes sintomas persistem durante 24 horas. Os sintomas deste tipo de intoxicação alimentar são semelhantes aos da intoxicação causada por toxinas estafilocócicas. (SPIRA; GOEPFERT, 1975; MELLING et al., 1976; TURNBULL, 1976; PARRY; GILBERT, 1980; JOHNSON; NELSON; BUSTA, 1982; VARNAM; EVANS, 1991). A toxina emética é pré-formada no alimento (GRANUM, 1994) e segundo Becker et al. (1994), a síndrome emética é causada geralmente pelo consumo de arroz, produtos lácteos desidratados ou alimentos infantis, contaminados com números elevados de células de *B. cereus*, maiores que 10^7 cel/g. Também foi verificada a produção da toxina em diversos outros alimentos, porém em alimentos farináceos contendo cereais foi comprovada a sua síntese em altas concentrações, principalmente em arroz (AGATA et al., 2002). Esse tipo de alimento é quase exclusivamente o responsável pelos surtos eméticos. No entanto, outros alimentos ricos em amido, como batatas, massas e produtos de queijo, também já foram implicados. As misturas para alimentos como molhos, pudins, sopas, e massas folhadas e saladas são frequentemente relacionadas a surtos alimentares (JAY et al., 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2006).

O Quadro 4 apresenta um resumo das principais características das síndromes emética e diarréica causadas por *B. cereus*.

Quadro 4: Características das enfermidades transmitidas por alimentos relacionadas à *Bacillus cereus*.

Característica	Síndrome Diarréica	Síndrome Emética
Dose infectante	$10^5 - 10^7$	$10^5 - 10^8$
Produção das toxinas	No intestino delgado do hospedeiro	Pré-formada nos alimentos
Tipo de toxina	Protéica	Cadeia polipeptídica
Período de incubação	8 à 16 h (ocasionalmente > 24 h)	1 à 6 horas
Duração da doença	12 à 24 h (ocasionalmente vários dias)	6 à 24 horas
Sintomas	Dor abdominal, diarreia aquosa e ocasionalmente náusea	Náusea, vômito e mal-estar

FONTE: Granum e Lund (1997)

Outras enfermidades, não relacionadas à toxinfecção alimentar, porém de interesse clínico, caracterizam-se como infecções localizadas ou sistêmicas. Estas manifestações, no qual fosfolipases e hemolisinas produzidas pelo microrganismo assumem papel patogênico auxiliar, são pouco comuns quando comparadas com as formas gastrentéricas. Entre as infecções, podem-se citar: bacteremia e septicemia, infecções do sistema nervoso central e do aparelho respiratório, endoftalmite, queratite e panoftalmite (referentes a doenças oculares extremamente agressivas, que podem levar à cegueira em menos de 24 horas), osteomielite, periodontite, endocardite, infecções cutâneas primárias, urinárias, ou de feridas ortopédicas. Estas infecções ocorrem especialmente em pessoas imunodeprimidas, neonatos, toxicodependentes e pacientes com história de feridas traumáticas ou cirúrgicas (BONVENTRE; JOHNSON, 1970;

GOEPFERT et al., 1972; IVERS; POTTER, 1977; KRAMER; GILBERT, 1989; DROBNIEWSKI, 1993; FERMANIAN et al., 1994, 1996; KOTIRANTA et al., 2000; PINNA et al., 2001; RAJKOWSKI; BENNETT, 2003; EHLING-SCHULZ, FRICKER; SCHERER, 2004a; BHUNIA, 2007).

A produção de toxinas por parte de *B. cereus* está vinculada a uma série de fatores. O primeiro e o mais importante deles é a presença ou não dos genes codificadores de determinadas toxinas, ou seja, nem sempre as cepas produzem as toxinas, somente quando possuem genes específicos para tal. Outros fatores de influência são: tipo de alimento onde o microrganismo se encontra, temperatura, tipo de tratamento térmico e pH dessa matriz (HANSEN; HENDRIKSEN, 2001).

As toxinas produzidas por *B. cereus* são classificadas em quatro grupos: enterotoxinas, hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase, fosfatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) e toxina emética (GRANUM, 1994; KOTIRANTA et al., 2000). As enterotoxinas são produzidas e secretadas em sua maioria durante o crescimento vegetativo dos microrganismos, principalmente durante o final da fase logarítmica ou exponencial (FERMANIAN et al., 1996; HANSEN; HENDRIKSEN, 2001). A toxina emética, ao contrário destas, é produzida durante a fase estacionária e é liberada durante a esporulação da bactéria, na fase de lise celular (NOTERMANS; BATT, 1998).

II.1 - Toxinas diarreicas

São conhecidas cinco enterotoxinas associadas à diarreia. Duas são compostas por complexos proteicos triplos: Hemolisina BL (HBL) e Enterotoxina Não Hemolítica (NHE). As outras três toxinas possuem apenas uma cadeia peptídica: citoxina K (citK), enterotoxina T (BcET) e enterotoxina FM (EntFM) (CHOMA et al., 2002). Entretanto,

acredita-se que HBL é o fator de virulência primário em *B. cereus* (GRANUM; LUND, 1997).

A Hemolisina BL (HBL) é uma enterotoxina composta por três componentes, denominados B, L₁ e L₂ (com pesos moleculares de 35, 36 e 45kDa, respectivamente), e foram descritos inicialmente por Beecher e MacMillan (1991). A fração B, codificada pelo gene *hblA* sequenciado por Heinrichs et al. (1993), é a componente de ligação à célula alvo, enquanto as frações L₁ e L₂, codificadas pelos genes *hblD* e *hblC*, sequenciados por Ryan et al. (1997), têm função lítica (HANSEN; HENDRIKSEN, 2001). Este complexo enterotoxigênico requer os três componentes para tornar máximas as atividades hemolítica, citotóxica, dermonecrótica, a ação de permeabilidade vascular e o acúmulo de fluido em alças intestinais de coelho (BEECHER et al., 1995). Supõe-se que o mecanismo de ação da hemolisina HBL seja pela formação de poros na membrana da célula-alvo provocando a lise osmótica (LUND et al., 2000).

ANHE (Enterotoxina Não Hemolítica) também é composta por três frações: A, B e C, com pesos moleculares de 45, 39 e 105 kDa e codificados pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente, todos sequenciados por Granum et al. (1999). Assim como a enterotoxina HBL, a enterotoxina NHE também está associada com intoxicações alimentares, precisando das três frações para ter sua máxima toxicidade em ensaios com células Vero (african green monkey kidney) e com culturas de células Caco-2 (human intestinal epithelial cells) (LUND, GRANUM, 1996; HANSEN; HENDRIKSEN, 2001; RAJKOWSKI; BENNETT, 2003; LINDBÄCK, FAGERLUND, RODLAND; BHUNIA, 2007).

Codificada pelo gene *bceT*, a Enterotoxina T é uma proteína de 41 kDa, que apresenta toxicidade às células Vero (HANSEN; HENDRIKSEN, 2001). Apesar de

apresentar características citotóxicas, a enterotoxina T não está ainda comprovadamente associada a intoxicações alimentares (CHOMAEt al., 2002).

Outra toxina que não apresenta associações com intoxicações alimentares é a enterotoxina FM (MCKILLIP, 2000), apesar de algumas experiências em laboratório mostrarem que a enterotoxina FM purificada causa acúmulo de líquido em alça ileal de coelhos. É uma proteína codificada pelo gene *entFM*, com peso molecular de 45 kDa (RAJKOWSKI; BENNETT, 2003; BHUNIA, 2007).

Já a citoxina K, uma proteína de 34 kDa, foi implicada em surtos de doença com diarreia sanguinolenta e mortes por enterite necrótica associadas a *B. cereus* (RAJKOWSKI; BENNETT, 2003; EHLING-SCHULZ et al., 2006; BHUNIA, 2007). Um estudo realizado com a CytK demonstrou que a toxina é altamente citotóxica em ensaios com células epiteliais intestinais (HARDY et al., 2001).

As toxinas formadas por proteínas simples - enterotoxinas T, EntFM e CytK – tiveram seus genes codificadores caracterizados e sequenciados por Agata et al. (1995a), Asano et al. (1997) e Lund et al. (2000), respectivamente.

As toxinas diarréicas são proteínas produzidas numa faixa de temperatura entre 18°C e 43°C, e pH entre 6,0 e 8,5, com um pH ótimo de produção situado entre 7,0 e 7,5 (JOHNSON, 1984). São substâncias termolábeis, sensíveis à tripsina, quimiotripsina, pepsina e pronase (SPIRA; GOEPFERT, 1972; JOHNSON, 1984), inativadas quando submetidas a temperaturas superiores a 56°C por cinco minutos (IVERS; POTTER 1977; VARNAN, 1991), porém estáveis a 45°C/30 min (JOHNSON, 1984). Para que o microrganismo sintetize as enterotoxinas, é necessária a presença de glicose (SPIRA; SILVERMAN, 1979), havendo inibição na presença de 1,5% de cloreto de sódio ou 1000 mg/l de nitrato de sódio (AZEREDO, 1998). A capacidade de

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

Estudos sobre letalidade das enterotoxinas de *B. cereus* mostram que elas são causadoras de citotoxicidade, podem contribuir para o acúmulo de líquido na alça ileal ligada de animais experimentais, alteram a permeabilidade vascular e causam ainda dermonecrose e a morte de ratos (JOHNSON; BONVENTRE, 1967). Conforme estes estudos e de acordo com outros que tiveram como objetivo o isolamento e caracterização das toxinas diarréicas, estas vieram a receber diversas designações. Outros termos para identificar as toxinas puderam então ser utilizados: agente diarréico, fator de acúmulo de fluidos, fator de permeabilidade vascular, toxinas dermonecróticas, ou mesmo enterotoxinas (JOHNSON, 1984; BENNETT et al., 1993; GRANUM, 1994; 1997).

Pesquisas sobre o mecanismo de ação das toxinas são escassas e por isso pouco se conhece sobre tal (SEARS; KAPER, 1996). Acredita-se que as toxinas diarréicas quando ingeridas, atuam estimulando o sistema AMP cíclico (adenilato ciclase) nas células da mucosa intestinal, provocam também o acúmulo de sais e eletrólitos (Na^+ e Cl^-) e interferem na absorção de glicose, dificultando-a, e de aminoácidos, acarretando consequente acúmulo de fluido (TURNBULL, 1976; KRAMER; GILBERT, 1989; MÄNTYNEN; LINDSTRÖM, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 2006). Outros estudos apontam a ocorrência de lise celular (BEECHER; MCMILLAN, 1991).

A detecção das toxinas diarréicas pode ser realizada através de diferentes métodos, entre eles: ensaios de citotoxicidade em culturas celulares, ensaios biológicos, métodos clássicos de imunoprecipitação, métodos baseados em PCR ou pela

utilização de *kits* comerciais baseados em princípios de antigenicidade e técnicas de imunoensaio (KNIEHL et al., 2003).

Estão disponíveis dois *kits* comerciais que detectam as toxinas diarreicas em alimentos ou cultura do microrganismo, sendo ambos largamente utilizados em pesquisas (devido à rapidez e praticidade dos testes). O primeiro é o *kit* denominado BCET-RPLA (*B. cereus Enterotoxin - Reversed Passive Latex Agglutination*) da OxoidTM, em que se usa a técnica de aglutinação passiva reversa em látex e detecta-se o componente L₂ da HBL. A detecção, segundo seus fabricantes, é de 1 ng/ml (BEECHER; WONG, 1994; BUCHANAN, 1994; DOYLE, 2007). O outro *kit* é o BDE-VIA (*Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin - Visual Immunoassay*) da TecraTM (Bioenterprises Pty. Ltd. Roseville, NSW, Austrália), um ensaio imunoabsorvente “enzima associado” e detecta principalmente a fração A, proteína de peso molecular 45 kDa da NHE (BEECHER; WONG, 1994; DAY, 1994; LUND; GRANUM, 1996; DOYLE, 2007). Esse *kit* foi desenvolvido por Burrell et al. (1991) para uso direto em amostras de alimentos, após simplificado procedimento de extração, com limite mínimo de detecção entre 2 a 5 ng/ml.

Relatos de Griffiths (1990) e Van Netten et al. (1990) mostram que o *kit* BCET-RPLA é usado desde 1990, quando inclusive os autores atestaram positividade para produção de toxinas por cepas psicrotóxicas de *B. cereus*, fato certificado anos mais tarde por Dufrenne et al. (1994), porém utilizando o *kit* TECRATM BDE-VIA. Para que haja a detecção das toxinas pelo *kit* BCET-RPLA, Baker e Griffiths (1995) apontam a necessidade de contagens de células do patógeno maiores que 10⁷ UFC/g ou ml de alimento.

Autores como Notermans e Tatini (1993) consideram o *kit* da TECRATM BDE-VIA superior ao RPLA, em relação à detecção da enterotoxina. A comparação entre os

dois *kits* foi feita por Rusul e Yaavob (1995), a fim de determinar qual deles detectava melhor as toxinas produzidas por 194 cepas de *B. cereus* isolados de alimentos. Como resultado, os autores encontraram positividade em 91,8% para a detecção com o BDE-VIA e 84,5% para o RPLA, com 155 cepas apresentando resultados positivos para ambos os *kits* (79% do total de cepas). Com os resultados verificados, esses pesquisadores puderam ratificar Granum et al. (1993a), afirmando que o *kit* RPLA também apresenta resultados confiáveis na detecção de enterotoxina, seja em alimentos ou em meios de cultura.

Diversas pesquisas foram desenvolvidas envolvendo a comparação dos *kits* comerciais de detecção das enterotoxinas com outros métodos. Em sua maioria, os estudos confirmaram a eficiência dos *kits* em relação aos demais métodos, como PCR e os ensaios de citotoxicidade (BUCHANAN; SCHULTZ, 1992; CHRISTIANSSON, 1993; GRANUM et al., 1993a; NOTERMANS; TATINI, 1993; DAY et al., 1994; BUCHANAN; SCHULTZ, 1994; DUFRENNE et al., 1994; RUSUL; YAACOB, 1995; FERMANIAN et al., 1996; ANDERSSON et al., 1998a; IN'T VELD et al., 2001).

Em relação aos métodos biológicos, pode ser citado o ensaio da alça ligada de coelho, onde ocorre o acúmulo de fluidos após a injeção de filtrados de cultura do microrganismo no intestino dos animais (JOHNSON et al., 1982). Outro método é o teste da permeabilidade vascular, no qual são injetados os filtrados de cultura de forma subcutânea na pele de cobaias, havendo a seguir uma coloração artificial do local, que apresenta manchas cinzas ou azuis quando a reação é positiva.

Por último, têm-se as técnicas de identificação molecular baseadas em PCR, que são cada vez mais utilizadas como ferramenta para rastrear possíveis fontes de contaminação de *B. cereus* toxigênicos, em consequência da capacidade da

caracterização de grande parte dos genes codificadores das enterotoxinas (GHELARDI et al., 2000; HANSEN; HENDRIKSEN, 2001).

II.2 - Toxina Emética

A toxina emética consiste em um peptídeo cíclico também chamado de cereulídeo, com uma estrutura circular de 3 ou 4 repetições de aminoácidos e/ou oxiácidos (DOYLE, 2007). Segundo Agata et al. (1994), a toxina é um dodecadepsipeptídeo de fórmula molecular $C_{57}H_{96}O_{18}N_6$, porém descrita por Suwan et al. (1995) como um depsipeptídeo de 36 aminoácidos ou oxiácidos.

A toxina suporta o aquecimento à temperatura de 126°C por 90 minutos, sendo, portanto, altamente termoestável. Possui massa molecular de 1,2 kDa, e apresenta também estabilidade a valores de pH que vão de 2,0 a 11,0, não sendo sensível à ação de enzimas proteolíticas, como tripsina e pepsina, o que explica a resistência destas toxinas às condições do estômago (JOHNSON, 1984; KRAMER; GILBERT, 1989; GRANUM et al., 1993b; GRANUM, 1994; GRANUM; LUND, 1997; NOTERMANS; BATT, 1998).

Macacos submetidos a testes com a toxina (durante oito meses) não desenvolveram resistência à mesma, sugerindo sua baixa antigenicidade (MELLING et al., 1978); A toxina emética possui ainda propriedades hepatotóxicas e de toxicidade mitocondrial, pois ocasiona alterações na mitocôndria de células Hep-2 (AGATA et al., 1995b; MIKKOLA et al., 1999; HOORNSTRA et al., 2003). Já Mikami et al. (1994) caracterizaram a toxina como sendo de efeito citostático e não hemolítico.

Seu mecanismo de ação ocorre com a ligação da toxina emética ao receptor 5-HT₃, havendo então o estímulo das vias aferentes do nervo vago, provocando assim o vômito (GRANUM, 1994; NOTERMANS; BATT, 1998).Granum et al. (1995)

reportam a toxina como uma “neurotoxina sem sítio de ação conhecido”, logo, de acordo com relatos de Sears e Kaper (1996), as neurotoxinas atuam nos neurotransmissores, gerando a resposta emética.

Granum et al. (1995) sugeriram, ainda, que provavelmente a toxina emética é liberada com a finalidade de degradar produtos do meio em que cresce. Para alguns autores, o tipo de alimento utilizado como substrato pela cultura pode influenciar na produção dessa toxina (FINLAY et al., 2000; AGATA et al., 2002; HÄGGBLÖM et al., 2002; JÄÄSKELÄINEN et al., 2003).

A detecção da toxina emética é feita principalmente através de reações com primatas (DOYLE, 2007), na qual a toxina é fornecida em rações para macacos Rhesus, provocando vômito entre 1 a 5 horas após a ingestão. Os métodos biológicos para detectar essa toxina não são aplicáveis. De acordo com o ensaio de íleo ligado de coelho, não ocorre acúmulo de fluidos na parte inoculada do intestino, comprovando o teste como sendo negativo; assim como os testes de permeabilidade vascular e de necrose em coelhos (VARNAM, 1991).

Ao contrário da toxina diarréica, bastante estudada e relatada, há uma escassez de pesquisas voltadas para a toxina emética, não existindo testes disponíveis comercialmente para a detecção da mesma (KOTIRANTA et al., 2000; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

Alguns testes de laboratório confirmam a ação tóxica da toxina emética através da constatação de alterações nas mitocôndrias de células HEp-2, ocasionadas pela toxina (AGATA et al., 1995b). Esses testes são chamados de teste de citotoxicidade em células HEp-2, onde a toxina provoca a vacuolização das mitocôndrias, o que pode ser observado ao microscópio óptico (EHLING-SCHULZ et al., 2004a; JÄÄSKELÄINEN,

2008). No teste de metabolização do MTT, a citotoxicidade em células HEp-2 modificado é mais sensível. É baseado na redução do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il 2,5-difenil tetrazólio bromídeo (MTT), que detecta a desidrogenase mitocondrial, considerada um indicador de viabilidade celular (JÄÄSKELÄINEN, 2008).

Outros testes utilizados podem ser citados, como o da inibição da motilidade em esperma de porcos. Nesse teste, a lesão mitocondrial por conta da toxina emética inibe a motilidade dos espermatozóides, visto que estes são dependentes do funcionamento das mitocôndrias. Isso só ocorre porque a membrana plasmática dos espermatozóides de porcos tem um baixo conteúdo em esteróides, sendo altamente permeável a moléculas hidrofílicas, como a toxina emética. A inibição da motilidade também pode ser observada através de microscópio óptico (EHLING-SCHULZ et al., 2004a; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

Andersson et al. (1998b) desenvolveram um teste também fundamentado em ensaio de motilidade espermática. Neste teste foram observadas a perda de motilidade e expansão mitocondrial dos espermatozoides frente à ação da toxina.

Os testes de citotoxicidade em células HEp-2, de metabolização do MTT e de inibição da motilidade em esperma de animais são difíceis de serem executados rotineiramente e, além disso, não detectam exclusivamente a toxina emética, pois também são sensíveis a outras toxinas mitocondriais como a gramicina (EHLING-SCHULZ et al., 2004a).

A toxina emética também pode ser identificada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) combinada com espectrofotometria de massa (EM), por ser facilmente solúvel em solventes orgânicos. Este é um método quantitativo e preciso, contudo necessita de uma lenta preparação das amostras, os equipamentos são

caros e há necessidade de pessoal com formação específica (EHLING-SCHULZ et al., 2004a; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

Já o PCR é um método de identificação da presença do gene necessário para a produção da toxina. Contudo a detecção do gene *per se* não indica se a bactéria efetivamente a produz e se esta está presente nos alimentos em concentrações suficientes para causar doença (EHLING-SCHULZ et al., 2004a; JÄÄSKELÄINEN, 2008).

Conforme citado, o desenvolvimento de métodos rápidos de detecção da toxina emética tem encontrado dificuldades e limitações. Ensaio mais utilizados comumente, como os conduzidos em macacos Rhesus são laboriosos ou inadequados para aplicação em análises de rotina, pois apresentam baixa sensibilidade, reprodutibilidade e viabilidade. O baixo potencial antigênico da toxina também contribui para a falta de êxito em se encontrar testes viáveis e rápidos para detecção da mesma (AGATA et al., 1994; FINLAY et al., 1999; MCKILLIP, 2000; AGATA et al., 2002; HORWOOD et al., 2004).

CAPÍTULO III: PREVALÊNCIA EM ALIMENTOS

A distribuição de esporos e células vegetativas de *B. cereus* ocorre na natureza de forma ampla. Os mesmos são encontrados em solo, sedimentos, poeira, água, plantas e pêlos de animais. Uma grande variedade de alimentos tem sido apontada como habitat frequente do patógeno, como cereais e seus derivados, leite e laticínios, carnes e derivados, vegetais, ervas, produtos desidratados, condimentos, etc. (GOEPFERT et al., 1972; GILBERT, 1979; JOHNSON, 1984; BENNET; BELAY, 2001; GUVEN; MUTLU; AVCI, 2006; SVENSSONE et al., 2006).

Nos alimentos, o acúmulo de células do microrganismo depende de alguns fatores, como: populações de outros microrganismos inicialmente presentes, natureza do alimento e principalmente das condições em que o mesmo permanece. O nível de contaminação geralmente encontrado nos alimentos, em circunstâncias normais, é menor que 10^2 UFC/g, o que é considerado aceitável, visto que a população mínima para desencadear toxinfecções alimentares é de 10^5 UFC/ g ou ml. Portanto, em condições normais do alimento, essa bactéria pode ser considerada inócua. (ICMSF, 1996; SOTO et al., 2005),

Em pesquisa conduzida por Nygren (1962), citado por Kramer e Gilbert (1989), envolvendo 3.888 amostras de variados alimentos, a contaminação pelo microrganismo foi de 51,6% em ingredientes, 43,8% em sobremesas e 52,2% em produtos de carne e vegetais. Na década de 70, estudos realizados sobre a ocorrência da bactéria em alimentos industrializados, constataram a presença do mesmo em farinhas e amidos, sopas, leite em pó, queijos e produtos desidratados (UBOLDI-EIROA et al. 1975; DELAZZARI et al. 1978;). Células de *B. cereus* foram encontradas com populações de até 10^5 UFC/g, por Iacona et al. (1987), que analisaram 250 amostras de cinco tipos de alimentos desidratados (pó para sobremesas, mousses, sopas, polenta pré-cozida e purê

de batatas). Já Cantoni e Bresciani (1987) evidenciaram baixa prevalência da bactéria ($5,5 \times 10^3$ UFC/g) em diferentes alimentos analisados. Das 614 amostras utilizadas, os autores certificaram que os alimentos mais implicados foram queijo e condimentos (com 10% dessas amostras contaminadas) e hortaliças (14% delas contaminadas).

No Brasil, Rabinovitch et al. (1985) realizaram estudos com diversos tipos de alimentos, analisando 114 amostras de 18 grupos de alimentos, industrializados ou não, crus ou cozidos (sendo 13 dessas amostras provenientes de 3 casos de intoxicação alimentar, envolvendo pelo menos 57 pessoas). As contagens encontradas estavam entre 10^2 e 6×10^3 UFC/g, sendo as maiores contaminações em carnes e produtos cárneos cozidos, leite em pó, fermentos biológicos e condimentos em pó.

Entre 1991 e 2000, a análise de um total de 10.310 amostras de alimentos por um laboratório oficial do Ministério da Saúde na República de Chipre, revelou a prevalência de *B. cereus* em 97,3% delas, com níveis de contaminações de até 10^3 UFC/g; entretanto, somente 1% do total apresentou contaminação igual ou superior a 10^4 UFC/g (ELEFThERIADOU et al., 2002). Esse trabalho envolveu alimentos comuns adquiridos no mercado local, em ambientes normalmente frequentados pela população e por grande número de turistas, como leite e derivados, sanduíches, alimentos prontos para o consumo, carnes curadas, peixes, sobremesas, sucos concentrados, cremes e misturas de vegetais.

Em uma pesquisa conduzida na Espanha e Holanda por Van Netten et al. (1990) com 1.700 amostras pertencentes a 16 classes de alimentos, *B. cereus* foi isolado em 15 classes, com populações entre 10 e 10^2 UFC/g, com frequência variável entre 1 e 42% nas classes. Na Holanda, Te Giffel et al. (1996) analisaram 229 amostras, incluindo alimentos chineses, doces, produtos de panificação, leite, carne, ervas e condimentos, e

detectaram a presença presuntiva de *B. cereus* em 48% das amostras, contendo entre 10^2 e 10^6 UFC/g.

III.1- Leite e derivados

B. cereus é apontado como um importante risco potencial para a saúde dos consumidores, quando presente em leite e derivados. Os esporos presentes no leite antes do tratamento térmico são resistentes à pasteurização e, com a sobrevivência dos mesmos a altas temperaturas, pode haver então a germinação no leite já pasteurizado, com proliferação do microrganismo. Dessa forma, podem ocorrer problemas tecnológicos, que alteram as características do leite e ainda, ao alcançar certos níveis, determinam a ocorrência de toxinfecções.

O microrganismo é considerado um dos principais responsáveis por causar problemas de deterioração microbiana na indústria de laticínios e sua presença tem sido observada rotineiramente na mesma. Os efeitos indesejáveis que *B. cereus* pode provocar em laticínios são a agregação da camada lipídica em leite pasteurizado (“*bitty cream*”) e a coagulação da caseína sem redução do pH (“*sweet curdling*”), ambos causados por ação de enzimas produzidas pela bactéria (ANDERSSON et al., 1995). Alguns autores creditam a deterioração do leite pasteurizado, acondicionado em refrigeração, graças a *B. cereus*, apontando-o como a bactéria esporogênica mais importante na alteração do mesmo (SUTHERLAND; MURDOCH, 1994; LANGEVELD et al., 1996).

A importância de *B. cereus* para a indústria de leite e derivados deve-se, também, a outros fatores como a capacidade de adesão dos esporos (que podem em grande parte permanecer aderidos mesmo após o processo de limpeza das instalações), a formação de biofilmes nos equipamentos, e ao isolamento de cepas psicotróficas produtoras de

toxinas (CHRISTIANSSON et al., 1989; VAN NETTEN et al., 1990; DUFRENNE et al., 1994; ZOTTOLA, 1994; SVENSSON et al., 1999).

Ainda que relatos de intoxicações associadas ao consumo de leite e seus produtos contaminados tenham sido raros, uma série de relatos, feitos em diversos países entre 1916 e 1988, consideraram *B. cereus* como um contaminante comum nesses tipos de alimentos (BECKER et al., 1994).

A presença constante de esporos no leite recebido na indústria é devido à contaminação do leite cru já na fazenda. A principal rota de contaminação do leite cru ocorre durante o pastejo dos animais, quando os pêlos são contaminados com fezes e solo; também são fontes de contaminação a poeira e ração contendo altíssimas contagens do microrganismo. Aliado a isso, a alta capacidade de adesão dos esporos de *B. cereus* aos equipamentos de ordenha e às mais variadas superfícies dos equipamentos utilizados nas indústrias de laticínios contribuem para contaminar o leite. A identificação das fontes de contaminação se mostra importante, por ser parte imprescindível dentro de um programa de controle das bactérias patogênicas em uma indústria (ANDERSSON et al., 1995; SVEENSON et al., 2006).

Hileman (1940), Thomas et al. (1950) e Jayne-Williams e Franklin (1960) citados por Sanchez (2005), desenvolveram estudos sobre possíveis fontes de contaminação de leite por organismos formadores de esporos, principalmente espécies de *Bacillus*. Foram analisadas amostras de solo, água, animais, currais, ração, equipamentos de ordenha, bolsas de transporte e linhas de processo. Como resultado, foram encontradas, entre outras espécies, linhagens mesofílicas e termofílicas de *B. cereus*, com níveis máximos de 10^5 UFC/ml, suficiente para produção de toxinas. Segundo Lin et al., (1998) e Svensson et al. (1999), *B. cereus* também pode estar no leite pasteurizado a partir de focos de contaminação dentro do ambiente da indústria,

além dos esporos presentes no leite cru. Borges et al. (2001) relataram que a não destruição dos esporos na pasteurização, representam além de um problema sanitário, um problema econômico.

III.1.1 - Leite cru

Martin et al. analisaram amostras de leite cru oriundas de fazendas nos EUA, em 1962, e constaram que *B. cereus* estava presente em 37% das amostras. Também nos EUA, Ahmed et al. (1983) reportaram o microrganismo em 3,75% das amostras de leite cru. Meer et al. (1991), encontraram cepas psicrófilas do patógeno em mais de 80% das amostras, ao analisarem, também, leite cru. Te Giffel et al. (1995) ao investigarem possíveis fontes de contaminação do leite cru em propriedades rurais na Irlanda, identificaram *Bacillus cereus* em todas as amostras analisadas (ar, solo, grama, camas de animais, alimentos, água de beber e fezes dos animais presentes). Demonstraram ainda a possível contaminação por linhagens psicrófilas, sendo 43% das amostras contaminadas com cepas capazes de crescerem a 7°C.

No Canadá, Lin et al. (1998) analisaram 232 amostras de leite em vários pontos durante o processamento do mesmo, inclusive leite cru, com a finalidade de rastrear fontes de contaminação por *B. cereus*, em uma planta processadora de leite pasteurizado. Os resultados encontrados mostraram baixa prevalência de células do microrganismo no leite cru (menos de 50 UFC/ml), entretanto altas concentrações de esporos foram detectadas no mesmo, na faixa de 10^5 UFC/ml. Essas contagens foram similares às contagens de células vegetativas no leite pasteurizado, sugerindo que a maior fonte de contaminação do leite pasteurizado vem a ser esporos do patógeno presentes no leite cru. No total, 10% das amostras estavam contaminadas. Segundo os autores, a contaminação pós-pasteurização através das linhas de processamento ou ambiental, teria pouca importância na contaminação do produto, a menos que a própria

matéria prima utilizada contamine o ambiente de processamento do leite, levando a um ciclo vicioso de contaminação.

III.1.2 - Leite Pasteurizado

A pasteurização empregada em leite e laticínios é acometida de uma peculiaridade um tanto indesejável, que é a “seleção” de cepas de *B. cereus*. Linhagens psicrófilas podem sobreviver ao tratamento térmico e germinar, desenvolvendo-se, então, durante o armazenamento refrigerado do leite (RYU; BEUCHAT, 2005; RYU; KIM; BEUCHAT, 2005; LINDSAY; VON HOLY, 2006). Em pesquisas sobre alterações ocorridas em leite pasteurizado, Choudhery e Mikolajcik (1970) apontaram a pasteurização como uma ativação térmica dos esporos do microrganismo presentes no leite cru, pois ocorria a germinação deles logo após o tratamento térmico.

Coghill e Juffs (1979) identificaram *B. cereus* em amostras de leite pasteurizado, na Austrália, reportando crescimento psicrófilo de células da bactéria às temperaturas de 4° e 7°C. A conservação do leite por 14 dias a 7°C levou cepas psicrófilas a atingirem populações excedendo 10⁶UFC/ml, segundo Mikolajcik e Simom (1978). Na literatura existe um relato, de Franklin (1970), que cita o isolamento de uma cepa ultraresistente de *B. cereus*, sobrevivendo em creme de leite processado a 140°C por 2 segundos. Este fato foi considerado surpreendente, sendo muito rara sua sobrevivência a temperaturas de 145-150°C.

Algumas cepas mesófilas (temperatura ótima entre 37 e 45°C) e outras poucas psicrófilas (temperatura ótima 10°C) foram relatadas por Westhoff e Dougherty (1981), durante a investigação da ocorrência de cepas de *Bacillus*, isoladas de leite UHT. Houve a identificação de *B. cereus* e *B. subtilis*, no entanto a maioria dessas cepas apresentou traços bioquímicos e fisiológicos atípicos. Em trabalho realizado nos EUA, a bactéria

foi detectada em 8.3% de amostras de leite pasteurizado, por Ahmed et al. (1983), que constataram níveis de contaminação entre 10 e 10^3 UFC/ml. Silveira et al. (1989) encontraram o patógeno em 28,7% das 430 amostras analisadas de amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C, na cidade de São Paulo.

Na Escócia, Griffiths e Phillips (1990) verificaram espécies do gênero *Bacillus* em leite recentemente pasteurizado, e encontraram aproximadamente 70% das amostras do produto contaminadas, identificando mais de 15% das culturas isoladas como *B. cereus*. Em 1992, no Canadá, ao estudar a ocorrência de *Bacillus* spp. em amostras de leite cru e pasteurizado, Griffiths constatou que, de 150 amostras analisadas, 105 (70%) apresentaram uma microbiota representativa do gênero *Bacillus*. Após o isolamento, houve a detecção de cepas de *B. cereus* em 37,3% das amostras de leite cru e 36,5% das de leite pasteurizado (GRIFFITHS, 1992). Larsen e Jorgensen (1997) ao estudarem na Dinamarca presença da bactéria em leite pasteurizado, verificaram que 56% de 458 amostras examinadas estavam contaminadas pela mesma. A investigação de 334 amostras de leite pasteurizado semi-desnatado realizada por Te Giffel et al. (1997), constatou a presença presuntiva de *B. cereus* em 40% das amostras, com contagens variando de 50 a 5×10^3 UFC/ml. Notermans et al. (1997) reportaram a contaminação de leite pasteurizado em 5% das amostras analisadas, com uma ocorrência de 10^4 a 10^5 UFC de *B. cereus*/ml.

Rezende et al. (2000) analisaram 120 amostras de leite UHT de quatro marcas diferentes produzidas no Brasil, e encontraram espécies do grupo do *B. cereus* em 34,1% delas. Identificaram ainda o microrganismo em 14,2% das amostras recém-adquiridas e em 21,7% das amostras refrigeradas (após a permanência sob refrigeração por 48 horas), com contagens de até $3,8 \times 10^4$ UFC/ml, sugerindo então a necessidade de melhorias nas condições higiênico-sanitárias adotadas. Estudo realizado por Cardoso

(2000) com análise de 240 amostras de leite comercial pasteurizado (tipos A, B e C), identificou *B. cereus* presente em 48,3% das amostras analisadas. Foram detectados níveis baixos de contaminação, na faixa de 10^2 UFC/ml, com maior ocorrência no leite tipo C, que teve 67,5% das amostras positivas, não havendo detecção de cepas psicotróficas nas amostras analisadas. Bahout (2000), em estudo com 60 amostras de leite UHT no Egito, verificou a presença de *Bacillus* spp. em 18,3% e *B. cereus* em 29,2% destas.

Em São José do Rio Preto/SP, Vidal-Martins, Rossi Jr. e Rezende-Lago (2005) avaliaram 110 amostras de leite UHT coletadas do comércio local, e encontraram positividade para *B. cereus* em 11,8% das amostras, com contagens de mesófilos entre 10^2 e 10^6 UFC/ml. Em 2006, Vidal-Martins et al. (2006), pesquisaram um total de 300 amostras de leite (60 de leite cru, 60 de leite pasteurizado e 180 de leite UHT) quanto à presença do patógeno, em diferentes fases do fluxograma de produção do leite UHT. As bactérias foram isoladas em 36 amostras de leite cru (58%), 55 de pasteurizado (91%) e 27 de UHT (15%), totalizando uma contaminação de 39% das 300 amostras analisadas. As cepas isoladas foram analisadas quanto à produção de enterotoxinas, e pôde-se constatar que 48,3% delas foram positivas. No caso, em 50% das cepas isoladas de leite cru, 20,8% de pasteurizado e 75% de UHT.

Amostras de leite UHT caprino foram investigadas quanto à presença do microrganismo por Santos et al. (2007), que utilizaram amostras de leite integral, *light*, achocolatado e leite em pó. Das 600 amostras analisadas, 12,6 % foram confirmadas como *B. cereus*, sendo que dessas, a contaminação foi de 19% nas 200 amostras de leite UHT integral, 5,0% nas 100 de UHT achocolatado, 6,0% nas 100 de UHT *light* e 12% nas 200 de leite em pó.

Estudos envolvendo a investigação de *B. cereus* em leite fluido, a capacidade de germinação dos seus esporos e posterior multiplicação da bactéria após emprego de tratamento térmico foi averiguada por Watanuki (2008). Das 75 amostras de leite oriundas comercialmente de Piracicaba/SP, 46 (61,3%) mostraram-se inicialmente contaminadas, isto é, antes do tratamento térmico de fervura, com contagens médias de $7,2 \times 10^2$ UFC/ml para leite cru, $8,4 \times 10^2$ UFC/ml para leite tipo B, $1,3 \times 10^4$ UFC/ml para tipo C, e menor que 10 UFC/ml para tipo A e UHT. A contaminação foi de 40% em amostras de leite cru, 80% em leite tipo C e 88% tipo B, não sendo detectada nas amostras de leite pasteurizado tipo A e UHT. Os autores concluíram que a contaminação pós pasteurização pode ter ocorrido devido a esporos do patógeno provenientes do leite cru (matéria-prima excessivamente contaminada). Tais esporos sobrevivem e são ativados durante a pasteurização comercial (70-75°C durante 15 segundos), com consequente germinação e posterior multiplicação no leite. Após serem submetidas ao processo de fervura, algumas amostras foram mantidas por até 12 horas a temperatura ambiente e outras foram refrigeradas pelo mesmo período. As amostras de leite cru e pasteurizados tipos B e C apresentaram populações entre 10^4 e 10^5 UFC/ml, porém as refrigeradas à 7°C, não apresentaram população bacteriana elevada, fato que realça a necessidade de rápido resfriamento do leite após a fervura e manutenção do mesmo a temperatura de refrigeração. Nas amostras de leite UHT não havia presença do patógeno, o que evidenciou a eficácia do processo de ultrapasteurização do leite tipo longa vida analisado.

III.1.3 - Laticínios

A ocorrência de *B. cereus* em produtos lácteos vem sendo investigada desde a década de 80, quando se atribuiu a leite em pó a fonte de intoxicação de um surto emético ocorrido nos EUA, segundo Holmes et al. (1981).

Em Taiwan, Ahmed et al. (1983) analisaram 40 amostras de leite cru, pasteurizado e produtos lácteos como queijo e sorvetes. A maior ocorrência do microrganismo ocorreu em sorvete, com 48% de amostras contaminadas, sendo bastante isolado também em queijo Cheddar, apesar de encontrado em baixas concentrações. Na Índia, Kamat et al. (1987) analisaram produtos adquiridos em mercados de Bombaim, incluindo leite pasteurizado, leite em pó e produtos lácteos, encontrando *B. cereus* em todas amostras, e em 87% das amostras de sorvetes; as contagens variaram entre 10^3 e 10^5 UFC/g. Wong et al. (1988), na China, encontraram a bactéria em 52% das amostras de sorvete e 29% de leite em pó, com populações médias entre 15 e 280 UFC/g, examinando um total de 293 produtos de laticínios. Também na Índia, Pillai et al. (1993) detectaram o microrganismo em 9 de 75 amostras de "Lassi", um tipo de coalhada doce muito comum na região.

Em estudo conduzido por Granum et al. (1993a), foi verificado que 85 colônias isoladas de produtos lácteos apresentavam cepas enterotoginênicas (59%) e psicrotróficas (15%) de *B. cereus*, em alimentos como leite desnatado, leite semi-desnatado e creme de leite. Na Austrália, Rangasamy, Iver e Roginski (1993) investigaram 91 amostras de leite e produtos lácteos, quanto à presença da bactéria, e encontraram-na em 26,4% das amostras analisadas, exceto em amostras de leite UHT.

No Brasil, Rocha (2004) pesquisou a presença microrganismo durante o processamento de queijos Minas Frescal, numa indústria de Campinas, analisando amostras de leites, superfícies das instalações e produto final. Foram detectadas nas 13 amostras de leite cru e pasteurizado, populações de células e esporos da bactéria de até 7×10^5 UFC/ml e 3×10 esporos/ml no leite cru, e de $2,5 \times 10^4$ UFC/ml e $1,9 \times 10^4$ esporos/ml no leite pasteurizado. Das 120 amostras coletadas de superfícies das instalações, equipamentos e utensílios da linha de produção do queijo, após os

procedimento de limpeza e sanitização da planta, foram encontradas populações desde menores que 1 UFC/cm² variando até 1,5x10⁵ UFC/cm², sendo verificada a presença do patógeno em todos os ambientes de produção. Na análise do produto final, as contaminações alcançaram níveis máximos de 1,3x10⁷ UFC/g, num total de 25 queijos Minas Frescal analisados.

Rezendo-Lago et al. (2007) estudaram a ocorrência de cepas de *B. cereus* com capacidade enterotoxigênica em 120 amostras de leite, sendo 30 de leite cru, 30 de leite em pó, 30 de leite pasteurizado e 30 de leite UHT. Os resultados encontrados indicaram a presença do microrganismo em 58,3% do total de amostras analisadas, sendo 73,3% de leite em pó, 50% de leite cru, 96,7% de leite pasteurizado e 13,3% de leite UHT. Em relação à detecção das enterotoxinas, a técnica da alça ligada de coelho e teste de aumento de permeabilidade vascular indicaram presença destas respectivamente em 15,7% e 5,6% das 89 amostras de leite analisadas. Já o uso da técnica de aglutinação passiva em látex demonstrou a produção das enterotoxinas em 51,2% das 43 amostras analisadas.

III.2. - Bancadas e Superfícies:

A adesão de esporos de *B. cereus* e formação de biofilme em ambientes onde se processam alimentos são temas da maioria dos estudos relacionados à ocorrência do microrganismo (SVENSSON et al., 1999; GUINEBRETIERE; NGUYEN-THE, 2003; GUINEBRETIERE et al., 2003; JULLIEN et al., 2003). De modo geral, as áreas de preparo de frutas, hortaliças e cereais representam os locais com maiores contaminações microbianas (RÊGO et al., 1997; MENDES et al., 2004).

Alguns estudos em ambientes de unidades de alimentação e bancadas de processamento de alimentos foram realizados em vários países, com a finalidade de

verificar a presença do microrganismo. No Japão, Ueda et al. (1992) constataram que 55% das bactérias encontradas no ar, em plantas de beneficiamento de arroz, foram identificadas como *B. cereus*. Na Itália, a detecção do microrganismo em ambientes de 12 serviços de alimentação ocorreu em 24% de 307 amostras coletadas (MOSSO et al., 1996). No Brasil, a análise de bancadas de cozinhas industriais em São Paulo, relatadas por Silva-Júnior (2008), demonstrou a presença de espécies do grupo de *B. cereus* em 25% das amostras. O isolamento do microrganismo feito em amostras de ar, coletadas em pontos ambientais de um restaurante institucional e de uma unidade de alimentação hospitalar, na cidade de Campinas, resultou em contagens em todas as amostras analisadas, sendo a máxima de 38 UFC/m³ de ar (Azeredo et al., 2001). Bancadas de alimentos foram indicadas como a provável causa de um surto diarreico provocado pelo microrganismo, ocorrido na Itália, envolvendo 173 pessoas (GHELARDI et al., 2002).

Estudos desenvolvidos por Mendes et al. (2004), em Viçosa, avaliaram superfícies de 24 bancadas e utensílios de inox de uma cozinha institucional, utilizados para o preparo de alimentos. A contaminação pelo patógeno foi confirmada em 27% das análises, com contagens de até 60 UFC/cm². Os resultados obtidos pelos autores mostram que a simples detecção do microrganismo, em etapas posteriores à higienização e anteriores às operações de manipulação dos alimentos, indicam que procedimentos de sanitização durante todas as etapas do processamento devem ser adotados, com o objetivo de se evitar que a bactéria se prolifere no ambiente onde os alimentos são processados e consequente os contamine. A contaminação cruzada é frequentemente relatada como fator responsável pela ocorrência de diferentes doenças de origem alimentar (BRYAN, 1988; SILVA-JR, 2008). Segundo Azeredo (1998), uma contaminação inicial de 1,0 UFC/g após um período de 8 horas, em condições propícias de desenvolvimento, pode transformar-se em população de 10⁵ UFC/g (suficiente para

causar intoxicação alimentar), de acordo com o tempo de geração de aproximadamente 30 minutos de algumas linhagens do patógeno.

Milagres (2004) também investigou a contaminação do ar e de superfícies em 5 unidades de alimentação e nutrição na cidade de Viçosa (MG), realizando 144 amostragens, sendo 72 no ar e outras 72 em superfícies de bancadas. Como resultado, encontrou o patógeno em 61,8% do total de amostras, em todos os pontos ambientais analisados, de todos os restaurantes. As amostras de ar apresentaram-se contaminadas em 72%, em níveis de até 50 UFC/m³, e as de bancadas, contaminadas em 53%, com níveis máximos de $6,3 \times 10^4$ UFC/250cm².

Em Campinas, pesquisa conduzida em restaurantes institucionais procurou determinar a contaminação por *B. cereus* em amostras de alimentos e dos ambientes das linhas de processamento de pratos cárneos, coletadas em diferentes etapas. A análise de 17 amostras do ar ambiente apontou que 82,3% delas estavam contaminadas, com contagens entre 2,0 e 20,0 UFC/m³, enquanto a contaminação de superfícies sucedeu-se em 51,7% das 29 amostras de superfícies analisadas. Nas amostras de carne assada, a detecção da bactéria ocorreu em 14% das 50 amostras, apresentando populações variando entre 10² UFC/g e $2,4 \times 10^3$ UFC/g, e em condimentos e temperos a contagem variou de 10 a $5,0 \times 10^2$ UFC/g, apresentando-se em 73% das 15 amostras analisadas (SOARES et al., 2005). O potencial enterotoxigênico de 54 isolados também foi analisado, sendo verificada positividade em 85,2% deles.

A identificação do microrganismo em superfícies de bancadas e amostras de ar ambiente também foi realizada em restaurantes institucionais em 2008. Os estudos mostram que das 90 amostras de ar, 84,4% estavam contaminadas (2,0 UFC/m³ à 38,4 UFC/m³) e, das 96 de superfícies de bancadas e de equipamentos, a contaminação foi de 44,8% delas (contagens máximas de 2,2 UFC/cm²) (SOARES et al., 2008). A

investigação do potencial enterotoxigênico realizada no mesmo estudo, mostrou que 14,3% dos 70 isolados foram positivos para os três genes da HBL e 12,8% foram positivos para os três genes da NHE; genes estes codificadores das respectivas enterotoxinas responsáveis por casos de intoxicação alimentar.

Dufrenneet al. (1994) isolaram o microrganismo a partir de diferentes alimentos e ambientes, e constataram que todas as 30 cepas isoladas apresentavam a capacidade de produzir enterotoxinas. No Brasil, uma pesquisa realizada sobre a ocorrência de cepas toxicogênicas de *Bacillus cereus* em alimentos, indicou que das 155 cepas isoladas dos alimentos analisados, 67,7% foram positivas para HBL e 99,4% para NHE (ARAGON-ALEGROet al., 2008).

A avaliação de superfícies de preparo de saladas e legumes, quanto à presença do patógeno, foi realizada em 23 restaurantes *self-service* de Itumbiara, Goiás. Cerca de 50% dos estabelecimentos demonstraram deficiência quanto aos seus procedimentos higiênico-sanitários, uma vez que 48,5% do total de amostras de superfícies de bancadas analisadas foram positivas para a presença do microrganismo. As contaminações máximas foram por volta de 2,20 UFC/cm² (BRITOet al., 2008).

A contaminação por *B. cereus* pode ser reduzida através do controle dos microrganismos em alimentos e dos equipamentos utilizados no processamento. É essencial um programa efetivo de limpeza e sanificação nas indústrias de alimentos, como ferramenta para inativar os microrganismos, prevenir o acúmulo das células microbianas e a formação de eventuais biofilmes nas superfícies dos equipamentos. Sendo assim, pode-se assegurar um produto seguro para o consumidor (NORTJÉet al., 1989; PENG; TSAI; CHOU, 2002).

III.3 - Carnes e Derivados

Devido à ocorrência de surtos diarréicos provocados pela ingestão de carnes e produtos cárneos contaminados por *B. cereus*, alguns pesquisadores têm relatado a importância da identificação do patógeno e seus esporos nesse tipo de alimento (BACHHIL; JAISWAL, 1988; BORCH; ARINDER, 2002)

A presença do microrganismo em carne fresca mais uma vez deve-se ao grau de contaminação da carcaça pelo solo e pela água utilizada para lavagem, ou ainda pelo manuseio inadequado das mesmas nos locais de abate e armazenamento. A intensidade da contaminação da carne depende da eficiência das medidas higiênicas adotadas em todas as operações de abate, armazenamento e distribuição do alimento (ROÇA, 2004).

Konuma et al. (1988) realizaram estudos sobre a contaminação por *B. cereus* em amostras de produtos cárneos, carne crua e aditivos, coletadas em diferentes cidades do Japão. A análise do total de 1.963 amostras mostrou a presença da bactéria em 18,3% dos produtos cárneos e em 6,6% de carne crua, geralmente com níveis inferiores a 10^2 UFC/g. Com relação aos produtos cárneos, os hambúrgueres foram os que apresentaram a maior contaminação, com 45,5% das amostras positivas. Entre os aditivos analisados, amido e concentrados proteicos receberam destaque, com contaminações próximas de 39% das amostras, e contagens entre 10^2 e 10^4 UFC/g, confirmando o fato de que os aditivos também podem vir a ser fontes contaminantes para produtos cárneos.

Asplund et al. (1988) constataram o microrganismo presente em salsichas, com populações de até 10^6 UFC/g durante os meses de verão. Kamat et al. (1989) em estudo feito em Bombaim, na Índia, verificaram amostras de peixe, produtos cárneos e condimentos, identificando células da bactéria respectivamente em 40%, 80% e 30% das amostras.

No Brasil, pesquisas realizadas por Almeida e Schneider (1983) em Campinas, com produtos elaborados com carne moída, adquiridos comercialmente, constataram contaminação por *B. cereus* em 40% das amostras de croquetes e 90% das amostras de almondegas, com contagem superiores a 10^3 UFC/g. Vasconcelos e Iaria (1991) detectaram o microrganismo em 10% das amostras de linguiça fresca, oriundas de feiras livres, em São Paulo.

Iacona et al. (1995) ao investigarem a prevalência de bactérias mesófilas e esporuladas em carcaças e hambúrgueres de frango, indicaram a contaminação por *B. cereus* em ambos os tipos de amostras. A identificação do patógeno também foi verificada em amostras de embutidos à base de carne (linguiça e salame), em pesquisa realizada na África do Sul, por Nortjé et al. (1999). Apesar de a contagem ter sido baixa, 10^2 UFC/g, os autores enfatizaram a necessidade da implementação de métodos para prevenir o microrganismo em alimentos proteicos.

Pedroso et al. (1999) investigaram quibes e almôndegas em diversas etapas do preparo, em uma cozinha hospitalar, observando a contaminação por *B. cereus* em ambos os alimentos. Os resultados da investigação mostram que mesmo após o tratamento térmico de 4 min a 82,3°C para almôndegas e 6 min a 95°C para quibes, as contagens foram em torno de 10^2 UFC/g, com os alimentos já prontos para o consumo. Já Souza et al. (2000) observaram a bactéria em 43,3% das amostras analisadas de carne bovina moída in natura, provenientes de açougues de Macapá.

Segundo Borch e Arinder (2002) e Pardi et al. (2006), devido à ocorrência de *B. cereus* no interior do intestino de animais ser estimada em torno de 33%, é indispensavelmente importante avaliar e assegurar que produtos a base de carne, especialmente preparações prontas para o consumo, sejam produzidas de acordo com o padrões de qualidade e inocuidade.

III.4 - Arroz

A investigação quanto à presença de *B. cereus* tem ocorrido com alta frequência em arroz e suas preparações. Esse alimento é usado também como substrato em diversos estudos experimentais para avaliação do crescimento do microrganismo e da produção de toxina. Os grãos de arroz são contaminados em diferentes etapas de sua produção, ocorrendo durante a colheita, transporte, beneficiamento e armazenagem. Apesar da atividade de água ser baixa no grão, a contaminação ocorre basicamente por esporos do microrganismo (Vijayalakshmi et al. 1981, citado por Azeredo, 1998).

Na Índia, Vijayalakshmi et al. (1981) encontraram contagens entre 2×10 e 9×10^5 UFC/g, em 66% de amostras analisadas de arroz cru e 100% de amostras de arroz cozido, na qual estes foram previamente coletados em ambientes domésticos e analisados dentro de 3 a 4 h após o preparo. Chung e Sun (1986) constataram na China que 11 de 12 amostras de arroz polido cru continham *B. cereus*, e concluíram que o patógeno pode ser considerado parte integrante da microbiota natural de arroz. O fato foi confirmado anos mais tarde por Fang et al. (2003), que justificaram ser usual o isolamento da bactéria nesse alimento. Kamat et al. (1989) verificaram a contaminação pelo microrganismo em todas as amostras de arroz cru analisadas, provenientes comercialmente na cidade de Bombaim, na Índia. Segundo Shah et al. (1996), o arroz pode ser considerado um dos mais importantes veículos de intoxicações por *B. cereus*.

Azeredo (1998) realizou estudos sobre a contaminação pelo microrganismo em 60 amostras de três tipos de arroz obtidos no comércio local de Viçosa/MG. A bactéria foi detectada em 50% das amostras de arroz polido, 10% das de arroz parboilizado e chegou a 100% em arroz integral, com contagens variando entre 10^2 e $1,76 \times 10^3$. No mesmo estudo, o autor investigou a sobrevivência e desenvolvimento de suspensões inoculadas (provenientes das células isoladas das amostras) em meios de arroz,

preparados de forma similar a um restaurante. Após a cocção, a 97,5°C por 40 minutos, houve significativa redução das populações (de dois a três ciclos logarítmicos), e a seguir diferentes métodos de armazenamento foram testados (com temperaturas entre 10 e 45°C). Os resultados indicaram que as maiores taxas de crescimento ocorreram entre 30 e 35°C, na qual houve um aumento das populações de células do microrganismo em cinco ciclos logarítmicos, após nove horas.

Em Campinas, pesquisas desenvolvidas por Vallim (1999) sobre a contaminação de arroz em restaurantes do tipo *self-service*, mostraram que 19% das 42 amostras de arroz cozido estavam contaminadas por *B. cereus*. Nichols et al. (1999) encontraram preparações de arroz cozido com contaminações em níveis pouco acima de 10^4 UFC/g, observado em restaurantes, especialmente os orientais. Os autores atribuíram as contagens elevadas do patógeno à utilização de temperaturas impróprias para o armazenamento do arroz depois de cozido. Sperber (2001) relata que altos níveis de contaminação tornam as preparações um perigo expressivo para os consumidores. Sarrías et al. (2002) analisando arroz cru, com casca e polido, fizeram o isolamento de cepas presuntivas do microrganismo em 61 amostras, porém não observaram contagens superiores a 10^2 UFC/g.

Finlay et al. (2002) investigaram o crescimento e a produção de toxina emética em arroz cozido, estudando três cepas mesófilas, sob temperaturas de 8 à 30°C. Resultados obtidos mostraram que a germinação de esporos, o desenvolvimento da célula e a produção de toxina ocorreram a 15°C, com detecção da toxina após 48 horas de incubação, na qual a contagem foi entorno de 10^6 UFC/g. A detecção também ocorreu nas temperaturas de 20 e 30° no tempo de 24 horas, quando as populações eram maiores que 10^7 UFC/g. Agata et al. (2002) observaram a produção da toxina emética em vários alimentos, inclusive arroz, através da inoculação de cepas eméticas de *B.*

cereus em 14 amostras de diferentes alimentos. Incubadas no arroz cozido por 24 horas às temperaturas de 20°C, 30°C e 35°C, a produção de toxina emética ocorreu em todas as temperaturas, sendo mais expressiva a 30°C e 35°C, com populações da bactéria de até 10^7 e 10^8 UFC/g, respectivamente.

Para minimizar os riscos de multiplicação de *B. cereus* em arroz cozido, deve-se evitar o hábito de mantê-lo à temperatura ambiente para posterior consumo. Além disso, o arroz deve ser cozido em pequenas quantidades, para uso imediato após o preparo. Essas medidas preventivas ao serem adotadas poderiam impedir que o microrganismo alcançasse níveis perigosos, podendo gerar surtos alimentares (BRYAN et al., 1997; JERMINI et al., 1997).

III.5 - Alimentos Desidratados

Alguns levantamentos feitos no Brasil revelaram a frequente detecção do microrganismo em alimentos desidratados, especialmente farináceos. Seu isolamento pode ser obtido de vários tipos desses produtos, como ovos, legumes, fórmulas infantis e sopas, pois as células e particularmente, os esporos, sobrevivem ao processo de desidratação (VARNAM, 1991; HOBBS; ROBERTS, 1998).

Uboldi-Eiroa et al. (1975) avaliaram microbiologicamente alimentos desidratados como farinhas e amidos, e observaram que fubá apresentou a maior prevalência de *B. cereus*: 45% das amostras. Os autores relataram, ainda, que o patógeno foi o microrganismo mais encontrado nessa classe de alimentos. Em trabalho com 805 amostras de alimentos desidratados (farinhas, sopas, leite integral, leite desnatado). Delazzari et al. (1978) constataram contaminação em 20,4% das amostras, com contagens maiores que 10^3 cel/g em 15,9% das amostras contaminadas, onde *B. cereus* esteve mais presente em amostras de farinha de milho (90%). Leitão et al. (1983)

encontraram o patógeno em 26,9% das amostras, em análise de alimentos desidratados. Já a verificação em sementes de leguminosas e cereais, em *kits* para germinação doméstica, realizadas por Harmon et al. (1987), mostrou que 57% de 98 amostras estavam contaminadas, onde as populações alcançaram 10^5 UFC/g em trigo, quando os brotos estavam em processo de germinação.

Pesquisas desenvolvidas com amostras de fubá de milho, comercializadas em Goiânia/GO, apontaram que das 100 amostras analisadas, 23% estavam contaminadas pelo microrganismo. Segundo os autores, o processamento tecnológico do fubá está ligado à prevalência da bactéria nas amostras, visto que 39,1% das contaminações ocorreram em amostras de fubá pré-cozido e 60,9%, em amostras de fubá comum. O tipo de tratamento térmico ao qual foi submetido o fubá cozido, eventualmente teria reduzido o teor de microrganismos no mesmo (OLIVEIRA et al., 1988).

A prevalência do patógeno também foi estudada em macarrões comerciais, o microrganismo esteve presente em 70,9 %, das amostras. A contaminação foi de 58,3% para macarrões com ovos e 87,5% para macarrões sem ovos, sendo que 72,3% do total de amostras apresentaram contagens variando entre 10 a 10^3 UFC/g. Os autores relataram que o procedimento de cocção do macarrão (100°C por 10 minutos), é bastante eficaz contra bactéria, uma vez que houve considerável redução de células do mesmo. Contudo, o alimento preparado demonstrou ser um excelente substrato para o desenvolvimento de eventuais esporos, evidenciada pelo tempo de geração médio de 45,9 min a 30°C. Logo, uma população inicial de 10^2 UFC/g, após 12,8 horas nas mesmas condições, passaria a 10^7 UFC/g, suficiente o bastante para causar intoxicações alimentares (MC-KNIGHT et al., 1990).

Estudos conduzidos por Yusuf et al. (1992) na Nigéria, indicaram contaminação em 98% das amostras de farinhas e féculas analisadas, com contagens de até 7×10^6

UFC/g em farinha de mandioca. A maioria das amostras obteve níveis de contaminação variando entre 10^3 e 10^5 UFC/g, apesar de 8% das cepas isoladas serem reveladas como sendo *B. mycoides*. Na Malásia, Rusul e Yaacob (1995) encontraram *B. cereus* em todas as 39 amostras de alimentos desidratados analisados, apresentando contagens entre 10^2 e 10^6 UFC/g.

Alimentos infantis (na forma de concentrados para reconstituição) foram analisados por Becker et al. (1994), que coletaram 261 amostras em 17 países. Como resultado, os autores encontram contaminação pelo microrganismo em 54% das amostras, a maioria delas (90% das contaminadas) apresentou contagens de apenas 10 UFC/g, algumas chegando até $6,0 \times 10^2$ UFC/g. Esse tipo de alimento requer atenção especial, por ser consumido com frequência, por pessoas altamente suscetíveis (crianças ou pessoas debilitadas), devido à maior vulnerabilidade desses consumidores.

A investigação acerca do desenvolvimento de cepas psicrótróficas e presença de toxinas em cereal desidratado à base de arroz foram verificadas por Jaquette e Beuchat (1998), onde o produto foi reconstituído para alimentação infantil. Os resultados obtidos mostraram que esporos de *B. cereus* estavam presentes em baixas quantidades no alimento analisado. Entretanto, após a reconstituição do mesmo com leite ou suco, células se desenvolveram em temperaturas abaixo de 8°C , e houve a produção de toxina a 30°C , em 24 horas.

No Brasil, 23 amostras de café torrado e moído comercializadas no município do Rio de Janeiro foram analisadas quanto à presença do patógeno. Os resultados mostraram que 56% delas estavam contaminadas, e, segundo os autores, essa ocorrência pode estar ligada inicialmente ao campo, ou seja, na fase de pré-colheita do café. Durante o cultivo, se aproveitam os grãos brocados (danificados por pragas), o que

favorece a entrada de microrganismos, e os que caem no solo, estabelecendo dessa forma o contato com a bactéria ou seus esporos (SOUZA; ABRANTES, 2009).

III.6 - Alimentos prontos pra consumo, in natura e condimentos

A ocorrência de *B. cereus* em produtos prontos para o consumo é cada vez mais comum devido principalmente às más condições a qual esses alimentos são armazenados e manipulados. O acondicionamento em determinadas faixas de temperaturas favorece o desenvolvimento do patógeno nos mesmos, e, além disso, algumas cepas adaptam-se bem em temperaturas de refrigeração (FANG et al., 2003).

Relatos de Carlin et al. (2000a) mostram que alimentos cozidos e resfriados contendo vegetais, cada vez mais populares na Europa, apesar de serem pasteurizados e armazenados sob refrigeração a temperaturas entre 2 e 4°C, têm sido associados regularmente a intoxicações atribuídas a *B. cereus*. Segundo o autor, além desses alimentos industrializados, outros tipos de alimentos, como os vegetais e legumes, também são uma fonte frequente de contaminação por bactérias esporuladas, como *B. cereus*. Carlin et al. (2000b) realizou estudos envolvendo amostras de purês de diversos legumes (brócolis, cenoura, batata, abobrinha e ervilha fresca), e detectaram o patógeno em 100% das amostras analisadas, após as mesmas terem sido pasteurizadas e refrigeradas por 20 dias em temperaturas entre 4 e 10°C.

No Brasil, hortaliças minimamente processadas foram objetos de estudos de Rosa et al. (2001), que analisaram amostras provenientes de supermercados de Belo Horizonte/MG e de Campinas/SP; detectando o microrganismo em 33,3% das amostras. Pires et al. (2002) investigando alimentos envolvidos em surtos por *B. cereus*, ocorridos em Recife, detectaram células da bactéria em 19,2% das amostras de alimentos prontos para o consumo (bobó de camarão, panqueca de carne, batata sauté, frango e carne

bovina cozida). Fang et al. (2003) analisando alimentos prontos para o consumo em Taiwan, identificou *B. cereus* em 49,8% das amostras, algumas contagens chegaram a ser superiores a 10^5 UFC/g em algumas das amostras (1,3%). Alguns produtos prontos, como sushi e sanduíches, armazenados a 18°C, apresentaram contaminação em 62,5% das amostras.

Em pesquisa desenvolvida por Guinebretière et al. (2003), cepas psicrotróficas do microrganismo foram isoladas em purês de abobrinha, após pasteurização das amostras. Os autores observaram populações próximas de 10^8 UFC/g, após o armazenamento por cinco dias a 20-25°C. Valero et al. (2003) estudaram cepas psicrotróficas de *B. cereus* em substratos vegetais, afim de avaliar a influência do pH, tratamento térmico e temperatura de armazenamento. Os resultados obtidos mostraram que durante o armazenamento em pH 5,0 com temperatura abaixo de 8°C, o crescimento do microrganismo foi inibido por 60 dias. Já com temperatura de armazenamento em torno de 12°C, é necessário um tratamento térmico de branqueamento mais drástico no início do processo, para reduzir a população inicial.

Em São Paulo, Hanashiro et al. (2004) estudando contaminação em alimentos prontos para consumo comercializados por vendedores ambulantes, verificaram presença de *B. cereus* em 12,5% das amostras, com contagens próximas de 10^3 e 10^4 UFC/g. Doces industrializados comercializados por ambulantes, em Seropédica e Itaguaí, foram analisados por Gomes et al., (2004), que constataram o microrganismo presente em 20% das 200 amostras analisadas. O isolamento ocorreu em 11,11% das 90 amostras de doces de abóbora e em 27,27%, das 110 de amendoim. Vasconcellos (2006) examinaram 20 amostras de barras de cereais e 10 de cereais matinais obtidas em supermercados de Pelotas, e detectaram a bactéria em 10% de ambas as amostras. As contagens foram em torno de $1,8 \times 10^2$ UFC/g para barra de cereais e de $1,0 \times 10^4$

UFC/g para cereal matinal. Segundo o autor, as quantidades encontradas nas barras de cereais, apesar de atenderem às exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (máximo de $5,0 \times 10^2$ UFC/g), representam um risco para a saúde dos consumidores. Barras de cereais *lights* e *não-lights*, comercializadas em Campinas, também foram averiguadas microbiologicamente por Ramos e Soares (2008). Os autores constataram contaminação por *B. cereus* somente em uma amostra (5%) das 20 analisadas, numa população de 8×10^3 UFC/g. A caracterização microbiológica de sanduíches naturais comercializados na cidade de Maceió/AL, demonstrou que, do total de 40 amostras analisadas, 15% estava contaminada pelo microrganismo (SOUZA et al., 2009).

Já a contaminação de alimentos in natura tem sido relatada em diversas pesquisas no Brasil. Um trabalho desenvolvido com vendedores ambulantes de água de coco, em Salvador, avaliou a qualidade microbiológica do mesmo e constatou níveis da bactéria chegando a $1,62 \times 10^5$ UFC/ml (LEITE et al., 2000). Estudo semelhante realizado com ambulantes no interior do Estado de São Paulo, conduzido por Hoffmann et al. (2002), identificaram o patógeno em amostras de água de coco com níveis de contaminação de 10 UFC/ml. Outros produtos frescos, como os vegetais, foram estudados por Valero et al. (2002), que detectaram *B. cereus* em todas as amostras analisadas de pepinos e em 90% das amostras de tomate. Os frutos apresentaram contagens entre 10^2 e $7,8 \times 10^3$ UFC/g, levando os autores a concluir que o patógeno pode representar um problema para as indústrias de processamento, havendo riscos associado ao seu consumo pelos consumidores. Em São Luiz (MA), a análise do perfil microbiológico de caldo de cana revelou a presença do microrganismo em 6,6 % das 30 amostras coletadas do comércio local da cidade (Nascimento et al., 2006).

Em relação aos condimentos, a contaminação por *B. cereus* é relatada com frequência por pesquisadores. Na África do Sul, Baxter e Holzapfel (1982) obtiveram contagens do microrganismo entre 10^2 e 10^6 UFC/g, observadas em 14 de 20 amostras de condimentos e aditivos, como pimenta do reino, páprica, coentro, manjerição e farinha de soja. Aditivos utilizados na produção de carnes (condimentos, amido e concentrados proteicos) foram investigados por Shinagawa et al. (1988) quanto a presença do patógeno: os autores constataram que 43%, das mais de 200 amostras, estavam contaminadas. Malmsten et al. (1991) na Finlândia, detectaram a bactéria na maior parte da 200 amostras de ervas aromáticas desidratadas, com populações em torno de 4×10^3 UFC/g, e relatam que após dois anos de estocagem, essa contagem não foi alterada significativamente.

Células de *B. cereus* estavam presentes em 76,6% das amostras de condimentos preparados (compostos de sal, alho, noz-moscada, cravo, coentro, orégano, pimenta em pó e em pasta) utilizados na produção de mortadela, segundo análises de Pereira et al. (1999), com níveis de contaminação média de 4,60 Log. Os autores reportaram que os valores encontrados caracterizavam o produto como impróprio para consumo e potencialmente capaz de causar toxinfecção alimentar, de acordo com a Portaria 451/97 do Ministério da Saúde. Froehlich e Giombelli (2002) durante análise de amostras de pimenta-do-reino moída, provenientes do comércio de duas cidades brasileiras (Viçosa/MG e São Paulo/SP) encontraram 85% das amostras contaminadas pelo microrganismo, alcançando níveis de contaminação de até $1,9 \times 10^8$ UFC/g. Já trabalhos de Souza et al. (2002), realizados em Recife, mostraram a detecção em amostras de canela, colorífico, cominho e pimenta-do-reino, comercializados localmente em supermercados e feiras livres, identificando *B. cereus* em 16,7% das amostras.

Os alimentos industrializados são classificados, de forma equivocada, como de baixo risco para seus consumidores, devido ao tipo de preparo e tratamento que recebem. Contudo, a idéia de que estes alimentos não veiculam agentes infecciosos é errada, uma vez que possuem em sua composição matérias-primas que favorecem o desenvolvimento de microrganismos, inclusive *B. cereus* (LUCCA et al., 2002). A presença da bactéria em alimentos preparados prontos pra consumo, comercializados sob refrigeração, ou nos alimentos in natura, mesmo que em baixos números, podem contribuir significativamente para a contaminação final do produto, chegando ao consumidor impróprios para o consumo, podendo, portanto, gerar surtos de toxinfecções alimentares (GUINEBRETIERE et al., 2003; CARLIN et al., 2000a, 2000b).

CAPÍTULO IV - EPIDEMIOLOGIA E SURTOS

As doenças transmitidas por alimentos causadas por *B. cereus* são relatadas em diversos estudos epidemiológicos, onde os casos de surtos por intoxicação pelo patógeno apresentam-se em uma distribuição mundial (Gilbert, 1979; Johnson, 1984; Becker et al., 1994). Vários países têm registrado estes surtos desde 1950, como Dinamarca, Itália, Hungria, Suécia, Polônia, Romênia, Alemanha, Canadá, países do norte e leste da Europa (Gilbert, 1979). Kramer & Gilbert (1989) relatam que os surtos alimentares ocasionados pelo microorganismo ocorridos em todo o mundo podem chegar a 25% do total, entre os de etiologia conhecida.

Alguns países da Europa fazem uso de testes de identificação desta bactéria em seus sistemas de vigilância sanitária, na tentativa de diagnosticar o agente nos surtos. Por conta dessa facilidade no diagnóstico e devido a um maior número de identificação nos surtos, pôde-se constatar que o microorganismo representa uma das principais causas de doença gastrointestinais de origem alimentar (Becker et al., 1994; Simone et al., 1997, citados por Azeredo, 1998).

IV.1 - Quantidades ingeridas

Conforme já citado, existem duas formas clínicas distintas das doenças de origem alimentar relacionados à bactéria: a síndrome diarreica e a síndrome emética (Kramer; Gilbert, 1989). Para que haja o desenvolvimento dessas síndromes, o microorganismo deve alcançar determinadas quantidades nos alimentos ingeridos, o que é discutido por alguns pesquisadores.

Segundo Granum & Lund (1997), os surtos diarreicos ocorrem após ingestão de alimentos com contagens entre 10^5 e 10^7 células/g, havendo, porém, relatos de surtos

com contagens menores. Entretanto, não há relatos na literatura sobre a quantidade de alimento ingerido para que a síndrome diarreica ocorra.

A contaminação dos alimentos em casos de surtos eméticos pelo microorganismo é relatada com níveis altos, variando entre 10^4 e 10^9 UFC/g, com média de 10^7 UFC/g (Gilbert, 1979; Kramer; Gilbert, 1989; Drobniowski, 1993). A detecção da toxina emética em alimentos relacionados à síndrome foi observada por Agata et al. (2002), que relataram concentrações de 0,01 a 1,28 µg de toxina por grama de alimento. Notermans & Batt (1998) citam um trabalho reportando contagens do microorganismo em alimentos envolvidos em casos de síndrome emética ocorridos no Reino Unido, na média de 10^7 UFC/g, com variações entre 10^3 UFC/g e 10^{10} UFC/g. Os autores relatam que para os casos de síndrome diarreica, o valor médio também é de 10^7 UFC/g, com a variação um pouco diferente, de 10^3 a 10^8 UFC/g.

Apesar de baixas concentrações do microorganismo terem sido encontradas em alimentos responsáveis por incidentes de toxinfecção, da ordem de 10^2 a 10^3 UFC/g segundo Rabinovitch et al. (1985), alguns autores, como Ahmed et al. (1983) e Johnson (1984), defendem a ideia de uma concentração padrão mínima para a ocorrência de intoxicações alimentares por *B. cereus*, como sendo de 10^5 UFC/g de alimento.

IV.2 - Dificuldade de diagnósticos

A ocorrência e a notificação de surtos de intoxicação alimentar ocasionados pelo patógeno é subestimada em todo o mundo. Diversos fatores contribuem para a subestimação dos surtos, que acabam não sendo registrados e notificados. O principal problema envolve o diagnóstico inadequado das enfermidades, pois os sintomas provocados pelas síndromes causadas pela bactéria são semelhantes às síndromes

ocasionadas por outros microrganismos, não sendo possível algumas vezes distinguir estas enfermidades sintomaticamente.

Os sintomas relacionados à síndrome diarréica (dor abdominal, diarréia intensa, raramente náuseas e vômitos, durando de 12 a 24 horas) são semelhantes à intoxicação causada por *Clostridium perfringens* (Kotiranta et al., 2000). Já a síndrome emética apresenta sinais clínicos semelhantes aos encontrados na enfermidade causada por *Staphylococcus aureus* (náusea, vômito, eventualmente diarréia, com manifestação do quadro de 1 a 5 horas após o consumo da toxina, persistindo por até 24 horas) (Christiansson, 1992; Kotiranta et al., 2000). Dessa forma, os quadros diarréico e emético associados ao microrganismo, podem ser atribuídos a outros patógenos veiculados por alimentos, fazendo com que o número real das doenças seja desconhecido, e o número de casos registrados em diversos países seja baixo (Ehling-Schulz et al., 2004b).

Partindo da premissa da realização do diagnóstico baseada nos sintomas e períodos de incubação, *Bacillus cereus* poderia ter sido responsável por inúmeros surtos de intoxicação alimentar durante a década de 50, 60 e 70, que tiveram agentes etiológicos desconhecidos ou não identificados (Dauer, 1961; Morrís, 1981). Estudos realizados no Brasil envolvendo um surto ocorrido em dois restaurantes, em Campinas, poderiam ter identificado tanto *B. cereus* como *C. perfringens* como responsáveis pelas intoxicações. Estas suspeitas ocorreram porque os sintomas apresentados pelas pessoas afetadas foram condizentes com as doenças atribuídas a esses microrganismos: diarréia, dores abdominais, náuseas e vômitos em alguns casos. A investigação dos alimentos envolvidos (carne e maionese preparados na véspera) através de análises microbiológicas seria uma forma de detectar se o microorganismo em questão estava

realmente envolvido, entretanto não foi realizada, segundo os relatos de Salzberg et al. (1982).

Além dos sintomas semelhantes, os casos de intoxicação emética e diarreica atribuídos ao patógeno também são passíveis de subestimação devido ainda, aos seus períodos de incubação e de duração serem curtos, o que leva as vítimas a não procurarem atendimento médico e não registrarem a ocorrência da doença (Terranova; Blake, 1978; Kramer; Gilbert, 1989). Aliado a isso, o acometimento de pequenos números de pessoas, em ambientes domésticos, contribui para deficiências nos registros de surtos, tanto na literatura como em estatísticas oficiais (Granum, 1997). Notermans & Batt (1998) atentaram para o fato de que somente quando vários indivíduos são implicados simultaneamente é que se suspeita e se relata um surto, onde os casos individuais são geralmente negligenciados, o que pode contribuir para uma deficiência de dados estatísticos de surtos.

Além disso, as toxinfecções alimentares devida a bactéria não são doenças de declaração obrigatória, o que pode agravar ainda mais subestimação de casos de surtos. Os procedimentos para tal variam entre países, havendo portanto um maior número de registros nos países do norte da Europa (Granum; Lund, 1997; Kotiranta et al., 2000; Ehling-Schulz; Fricker; Sherer, 2004b).

A maneira como se procede a investigação para identificar o patógeno pode resultar em diagnósticos equivocados. Segundo Rajkowsky & Mykolajcik (1987), os laboratórios não pesquisam a presença de *B. cereus* de forma rotineira ou não executam os testes necessários para identificar a bactéria durante a ocorrência de um surto. O mesmo problema ocorre quanto à identificação das toxinas. Algumas análises laboratoriais de rotina investigam somente a toxina diarreica, não se atentando para a

detecção da toxina emética, que é prejudicada pela ausência de métodos e kits comerciais de identificação (Pirhonen et al., 2005).

Atrelado a isso, a falta de estrutura e conhecimento específico dos técnicos da Vigilância Sanitária e Epidemiológica local, para concluir a investigação dos surtos e falta de investimentos para melhorar as condições da realização da investigação, são outros fatores que contribuem para a subestimação do número de surtos (Ranthum, 2002).

Independente do sistema de vigilância, muitos casos não são notificados pelas mais diversas razões, como por exemplo, a não realização do ato de coletar amostras de fezes do paciente, para análise pelo serviço de saúde responsável, a não comunicação do resultado do exame ao Serviço de Saúde Pública, e até mesmo a ausência da investigação do surto. O descarte do alimento suspeito, que deveria ser analisado para a pesquisa do patógeno causador da doença, também constitui um fator complicador na correta investigação de um surto.

A realização de testes e análises microbiológicas específicas, para cada microrganismo possivelmente envolvido no surto, seria uma das estratégias para a confirmação definitiva do causador das toxinfecções alimentares. O correto diagnóstico é extremamente importante, pois a ocorrência de casos relacionados à *B. cereus* com maior gravidade tem aumentado recentemente, incluindo uma morte devido à ingestão de alimentos contaminados com a toxina emética e três mortes causadas por citotoxina K, uma toxina diarreica, ambas produzidas pelo microorganismo (Lund et al., 2000; Ehling-Schulz et al., 2004b).

IV.3 - Alimentos Associados

Os surtos do tipo diarreico e eméticos estão diretamente ligados ao consumo de uma grande variedade de alimentos contaminados. Nos casos de intoxicação diarreica, são relatados alimentos como vegetais, saladas, legumes cozidos, carnes cozidas, leite, sorvete, pudins, sopas de carne, de legumes e molhos. Segundo Valero et al. (2002), incluem com maior frequência, os alimentos ricos em proteínas. Os surtos por intoxicação emética são quase todos relacionados aos alimentos amiláceos, incluindo arroz (quase exclusivamente) e outros, tais como macarrão, queijo e cremes (Shinagawa, 1993)

Pratos cárneos foram frequentemente envolvidos, durante a década de 60, em casos de doenças transmitidas por alimentos na Hungria, devido ao uso intenso de condimentos na culinária desse país, possivelmente contaminados pelo microorganismo (Andersson et al., 1995; Ahmed et al., 1983). Outros países como Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Holanda e Japão, tiveram casos de surtos ocasionados pelo patógeno, relacionados principalmente a laticínios, produtos cárneos, condimentos e produtos da culinária chinesa.

IV.4 - Hábitos alimentares

Percebe-se que a predominância do tipo de doença alimentar associada ao microorganismo difere de país para país, estando relacionado aos hábitos alimentares da população. A síndrome diarreica é relatada com mais frequência na Europa e América do Norte, em países como Hungria, Finlândia, Bulgária e Noruega (Kramer; Gilbert, 1989; Doyle, 2007).

A síndrome emética é mais comum em países onde há um maior consumo de arroz, como no Japão, Índia, Coreia e Tailândia, sendo também comumente relatado no

Reino Unido (Kramer; Gilbert, 1989; Doyle, 2007). Aliás, no Japão, a forma emética da toxinfecção é reportada como sendo aproximadamente 10 vezes mais frequente que a forma diarreica (Granum; Lund, 1997; Kotiranta et al., 2000; Ehling-Schulz et al., 2004b).

IV.5 – Causa

Os surtos ocorrem principalmente devido a fatores que facilitam o desenvolvimento da bactéria nos alimentos. Entre as principais causas pode-se citar a exposição do alimento a temperaturas impróprias (o microorganismo permanece tempo suficiente na temperatura ótima para se desenvolver), a manipulação inadequada dos mesmos, as condições indevidas de higiene dos ambientes e instalações, e ainda o consumo de alimentos crus (Panisello et al., 2000).

Alimentos preparados com muita antecedência e que são deixados à temperatura ambiente, constituem um meio ideal para a multiplicação de *B. cereus* (Gilbert, 1979; Johnson, 1984; Kramer; Gilbert, 1989; Notermans; Batt, 1998).

Dessa forma, um grande número de surtos eméticos relacionados ao consumo de arroz, por exemplo, poderiam ser evitados, caso os restaurantes orientais adotassem medidas para evitar a contaminação pelo patógeno. Nesses estabelecimentos, o arroz é cozido em grandes volumes e armazenado à temperatura ambiente, sendo utilizadas apenas pequenas porções de cada vez.

IV.6 - Surtos epidemiológicos

As informações sobre a ocorrência de surtos epidemiológicos ocasionados pelo microorganismo expõem a grande quantidade de pessoas que tem sido afetada pelas intoxicações alimentares e a grande variabilidade de alimentos implicados em tais.

Relatos apontam que entre os anos de 1966 e 1979, aproximadamente 5.300 surtos de intoxicação alimentar foram registrados pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos, onde 19 deles foram atribuídos à *B. cereus*, sendo 10 surtos de síndrome diarréica, (afetando ao todo mais de 100 pessoas) e 9 surtos de síndrome emética (Terranova; Blake, 1978; Morrís, 1981).

A bactéria foi responsável, entre os anos de 1973 e 1985, por surtos alimentares registrados em diversos países: 17,8% na Finlândia, 11,5% na Holanda, 2,2% no Canadá, 0,8% na Escócia, 0,7% na Inglaterra e País de Gales, e 0,7% no Japão. (Kramer; Gilbert, 1989). No Brasil, levantamentos de dados feito por Van-Amson et al. (2003), atribuíram ao microrganismo 6,3% dos 1195 surtos ocorridos no estado do Paraná, entre os anos de 1978 e 2000.

Na Malásia, em 1981, 144 pessoas foram atingidas por um surto ocorrido em um albergue estudantil. O alimento incriminado foi macarrão frito, que apresentou populações da bactéria de $2,3 \times 10^6$ céls/g (Rampal; Jegathesan; Lim, 1984). No mesmo ano, em Cingapura, um surto levou a hospitalização de 19 militares, que desenvolveram os sintomas da intoxicação alimentar devido ao patógeno após terem ingerido arroz frito no acampamento militar (Tay; Goh; Tan, 1982). No período entre 1985 e 1989, na Holanda, a incidência do patógeno em surtos foi de 18% dos episódios (Becker et al., 1994). O microorganismo foi considerado o maior causador de surtos no país entre os anos de 1991 e 1994, sendo responsável por 17,9% dos 2630 notificados. (Simone et al., 1997; Notermans; Batt, 1998).

Um surto envolvendo funcionários de um hospital nos EUA, em 1985, afetou 160 pessoas, que manifestaram todos os sintomas das síndromes ocasionadas pelo microorganismo (diarreia, dores abdominais, náuseas e vômitos). Os alimentos incriminados foram arroz e frango, presentes nas refeições servidas no local, porém

preparadas em estabelecimento externo (Baddour et al., 1986). Em um outro surto ocorrido no país em 1989, 140 convidados que assistiam a uma recepção de casamento foram afetados. A investigação apontou a galinha servida no evento como o veículo de contaminação pelas bactérias e constatou que as instalações do restaurante utilizado para preparar os alimentos eram insuficientes do ponto de vista higiênico sanitário. (Slaten; Oropeza; Werner, 1992). O patógeno foi ainda o agente causal de aproximadamente 2,2 % dos 970 surtos de etiologia conhecida ocorrido no EUA, no período compreendido entre 1988 e 1992, chegando a afetar 433 pessoas (Notermans; Batt, 1998).

No Canadá, dois surtos envolvendo contaminação de *B. cereus* em leite são relatados segundo o BCCDC (Centro de Controle de Doenças British Columbia, 2002). Em 1988, o consumo de milkshake em um fastfood atingiu 36 pessoas, e foram encontrados no produto contagens do microrganismo acima de 10^5 UFC/g. Um ano depois, em 1989, leite consumido em uma escola por 74 pessoas, levou a um surto onde o alimento apresentou contagens maiores que 10^6 UFC/g. No Reino Unido, em 1991, um surto ocorrido em uma Universidade atingiu 139 pessoas, que consumiram carne de porco assada contaminada pelo patógeno. A análise das amostras de restos do alimento indicou a presença de células em quantidades maiores que 10^5 UFC/g (Luby et al., 1993). Relatos de O'Brien et al. (2002) mostram que o microrganismo foi associado a quase 3% dos 1.426 surtos registrados, entre 1992 e 1999 no Reino Unido.

Cepas psicrotróficas da bactéria também foram relatadas como causadoras de surtos alimentares, ocorrendo na Espanha (um caso) e na Holanda (dois casos), envolvendo o consumo de bacalhau, torta de vegetais e leite, respectivamente (Van-Neiten et al., 1990).

Segundo pesquisa conduzida por Crerar et al. (1996), entre os anos de 1980 e 1995 ocorreram na Austrália 68 surtos de DTAs de origem bacteriana, no qual *B. cereus* esteve envolvido em 5 deles (7,3%). Em Taiwan, estudos desenvolvidos por Pan et al. (1997), verificaram que o patógeno foi o responsável por 18% dos surtos de doenças de origem alimentar de etiologia conhecida (104 dos 555), no período entre 1986 a 1995, onde houve um total de 852 surtos registrados pelo Departamento de Saúde do país. O levantamento de outros autores mostra ainda que os surtos na cidade ocorreram principalmente em ambientes domésticos e escolas, no período de 1991 a 2000 (Chang; Chen, 2003).

Em um surto relatado na Espanha em 1995 afetando 425 pessoas em um lar de idosos, o isolamento da bactéria ocorreu em diversos alimentos analisados, onde as populações variaram entre 3×10^6 e $5,6 \times 10^6$ UFC/g (González et al., 1998). Em outro caso de surto envolvendo 6 crianças e 1 adulto em uma creche nos EUA, em 1998, a investigação microbiológica mostrou que não havia presença do microorganismo nos alimentos suspeitos, consumidos pelos pacientes (hambúrguer e batata frita). No restaurante onde se preparavam as refeições, o patógeno também não foi identificado em nenhuma etapa da produção, manipulação ou transporte dos alimentos, estando o restaurante condizente com as normas vigentes. Contudo, detectou-se a contaminação pela bactéria em arroz colorido (utilizado para atividades didáticas), manipulado pelas crianças antes das suas refeições, na qual o mesmo foi hidratado, permanecendo algumas horas naquele estado. Foram encontradas contagens de $5,6 \times 10^5$ UFC/g e acreditou-se que a contaminação cruzada do arroz para as mãos das crianças, e posteriormente para os alimentos ingeridos tenham sido os responsáveis pelas intoxicações (Briley; Teel; Fowler, 2001). Em 1999, o estudo de um surto notificado no Canadá, apontou ser a maionese usada para preparar salada de batata, servida em uma festa, o alimento veiculador das intoxicações alimentares ocasionadas pelo

microrganismo. Vinte e cinco pessoas que consumiram o alimento durante o evento apresentaram os sintomas das síndromes, sendo que as contagens nos alimentos foram de 10^3 cel/g (Gaulin; Viger; Fillion, 2002).

Segundo o Relatório sobre surtos de doenças transmitidas por alimentos, elaborado pelo Centro Nacional de Epidemiologia da Espanha, entre os anos de 1994 e 2003, 56 surtos alimentares no país foram devido à bactéria, afetando 158 pessoas somente no ano de 2003. (Instituto de Saúde/Ministério da Ciência e Inovação da Espanha, 2003). Já nos Estados Unidos, de acordo com os dados consultados na Lista Anual e do Banco de Dados On-line, dos surtos por doenças de origem alimentar, no período compreendido entre 1990 e 2008 ocorreram 107 surtos provocados por *B. cereus*, onde um total de 2369 pessoas foram afetadas (Centro de Controle de Doenças e Prevenção/Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, 2008). No período entre 2004 e 2008, conforme pesquisa nos Relatórios Anuais sobre DTA na Austrália, dos 588 surtos registrados no país, 65% foram de etiologia conhecida. Ao todo foram 6 surtos (9,3%) envolvendo a bactéria em questão, que atingiu 146 pessoas (OzFoodNet - Departamento de Saúde da Austrália, 2008). Na Europa, verificou-se a ocorrência de 34.496 surtos de DTA, (aproximadamente 80% de etiologia conhecida) no período entre 2004 e 2009, através de pesquisa realizada nos Relatórios sobre tendências e origens dos surtos de origem alimentar nos Estados Membros da União Europeia. Destes, *B. cereus* foi o responsável por 311 (1,12%), envolvendo quase 5550 pessoas (EFSA - Autoridade de Segurança Alimentar da União Européia, 2009).

Países como o Brasil, apresentam relativa escassez de dados acerca de intoxicações de doenças de origem alimentar provocadas pelo microorganismo, porém sua relevância epidemiológica é grande. Entre os anos de 1987 e 1993, segundo dados da Vigilância Sanitária de Campinas-SP, ocorreram 53 surtos de enfermidades

transmitidas por alimentos na cidade, sendo comprovados em laboratório 19 deles. O patógeno foi o causador de 13 surtos comprovados (68,4%), sendo que os alimentos preparados em serviços de alimentação foram implicados em 14 deles (73,6%), e os preparados em residências e confeitarias em 3 (15,8%) e 2 (10,5%) surtos respectivamente. (Passos; Kuaye, 1996). Segundo dados da Divisão de Vigilância Epidemiológica, da Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, ocorreram 34 surtos ocasionados pela bactéria no estado, no período compreendido entre 1987 e 2002, correspondendo a 2,1% dos 1617 surtos investigados. (DVE/CEVS/SES-RS, 2008). No estado de Minas Gerais, estudos conduzidos por Martins-Vieira et al. (1998) mostraram que *B. cereus* foi o responsável por 3,5% dos surtos de toxinfecções alimentares no período entre 1991 e 1998. Já entre os anos de 1994 e 1997, a investigação de 78 surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (55% comprovados em laboratório) no Distrito Federal, apontou o microrganismo como causador de 7% dos surtos com comprovação laboratorial (Reis; Faria, 1998). No período entre 1998 e 2001, estudos conduzidos por Câmara (2002) indicam que, no estado do Mato Grosso do Sul, 10,3% dos 39 surtos confirmados em laboratório estavam relacionados à bactéria. Surtos ocorridos em Recife/PE, na mesma época (1998 a 2001), envolvendo trabalhadores de indústrias localizadas na Região Metropolitana, tiveram os alimentos suspeitos analisados. Os resultados mostraram que o patógeno esteve presente em 19,2% das amostras de alimentos, do total de 26 coletadas de diferentes tipos de preparações prontas para consumo, alimentos estes implicados nos 11 surtos ocorridos da época (Pires et al., 2002).

Na cidade de Maceió/AL, um levantamento feito acerca do perfil epidemiológico dos surtos de toxinfecção alimentar mostrou que, no período de 2000 à 2004, dos 10 surtos notificados no município, 50% foi ocasionado pelo microrganismo (Bello-Filho; Froehlich; Souza, 2008). Pesquisa conduzida por Pizzolitto,

Pizzolitto&Simões (2007) sobre os agentes etiológicos associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos, em três regiões turísticas do Estado de São Paulo, mostram que a capital foi a região com mais casos de surtos por *B. cereus*. Ao todo foram 7 dos 327 ocorridos (ou 2,1%) no período de 2002 à 2005, que afetou 62 pessoas. Dados disponibilizados pela Diretoria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do estado de Santa Catarina apontam que a bactéria foi responsável por 6% dos surtos (19 dos 331 notificados) durante os anos de 2006 e 2009, o que corresponde a 3ª maior causa dos surtos alimentares ocorridos no estado (DIVE/SES-SC, 2009). No estado de São Paulo, o levantamento de dados divulgados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica, da Secretaria Estadual de Saúde, indica a ocorrência de um total de 3688 surtos de intoxicação alimentar no estado nos últimos 10 anos (período entre 2000 e 2010), sendo apenas 1302 de etiologia conhecida (35,3%). O patógeno foi o causador de 31 desses surtos, afetando 926 pessoas. Nota-se também a ocorrência de 20 surtos associados à intoxicação mista tanto por *Bacillus cereus* quanto por outro microorganismo (*Staphylococcus aureus* ou *Clostridium perfringens*), afetando 936 pessoas. Ao todo, o microorganismo esteve envolvido em 51 surtos alimentares (3,91%) no estado no determinado período, atingindo diretamente 1862 pessoas (CVE/SES-SP, 2010).

De acordo com a Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, realizada pelo Departamento de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil, entre os anos de 1999 e 2009 ocorreram 6.349 surtos no país. Destes, 3088 tiveram o agente etiológico conhecido (48,7%), onde 219 foram ocasionados por *B. cereus* (7,0%), o que corresponde a 5ª maior causa dos surtos alimentares (atrás de *Salmonella* spp, *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli* não sorotipada e Hepatite A) (COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS, 2009).

A quantidade de notificações feita no Brasil está relacionada com o nível de implantação do sistema de VE-DTA (Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos) nos municípios: Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Santa Catarina foram os que apresentaram o maior registro de surtos, pois há melhor implantação do sistema de VE-DTA nos municípios desses estados (COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS, 2009). Esse sistema, implantado em 1999 no país, em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e o Instituto Pan-Americano de Alimentos da OPAS, tem como objetivo geral reduzir a incidência das DTA no Brasil. A investigação epidemiológica de surto de DTA é de responsabilidade do órgão municipal de saúde. O Município que não dispõe de condições para promover a investigação epidemiológica de surto de DTA deve comunicar o fato à Secretaria de Estado da Saúde (SES), que o apoiará na realização da investigação. Da mesma forma, compete à Secretaria de Vigilância em Saúde (do Ministério da Saúde) o apoio às SES, particularmente em surtos de grande magnitude ou complexidade (SVS/MS, 2005).

Contudo, o perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no país ainda é pouco conhecido. Os números registrados de surtos alimentares ainda estão longe de representar a realidade e uma das razões é a falta de notificação dessas ocorrências. A baixa notificação aos órgãos da Saúde torna duvidosa qualquer estatística apresentada relativa a surtos e denota a necessidade de se estabelecer um melhor sistema de vigilância e de notificação das doenças causadas por alimentos (Ranthum, 2002).

IV.6.1 - Surtos Diarreicos

Surtos diarreicos têm atingido inúmeras pessoas em todo o mundo, segundo relatos de Shinagawa (1990), que cita a ocorrência de no mínimo 230 surtos, no período

de 1950 a 1976, em diversos países no norte da Europa e na América do Norte, todos causados por *Bacillus cereus*.

No ano de 1950, na Noruega, houve o registro do primeiro caso relacionado a toxinfecção alimentar provocada pelo patógeno, que foi largamente estudado. A relação entre a síndrome diarreica e *B. cereus* foi corroborado após a investigação de quatro surtos de natureza bastante similar, que atingiram cerca de 600 pessoas no país. Um dos surtos, envolvendo pacientes e funcionários de um hospital com sintomas clássicos da síndrome, originou-se devido ao consumo de sobremesa de creme de baunilha, preparada previamente e armazenada à temperatura ambiente. As análises microbiológicas do alimento apresentaram contagens do microorganismo da ordem de 10^7 a 10^8 UFC/g, sendo verificado ainda no amido de milho utilizado como ingrediente no preparo dos alimentos, concentrações de esporos acima de 10^4 UFC/g (Johnson, 1984; Andersson et al., 1995). Para confirmar o surto, Hauge ingeriu 200 ml de cultura com concentração de 10^6 células/ml, após isolar e promover o desenvolvimento da bactéria. Depois de 13 horas, o pesquisador apresentou dores abdominais e diarreia intensa, com duração de 8 horas (Doyle, 2007).

A partir desse caso clássico, diversos surtos diarreicos foram relatados nas décadas de 50 e 60 em vários países, como Estados Unidos e Japão, e a maioria dos países no norte e leste da Europa, entre eles: Noruega, Dinamarca, Suécia, Holanda, Alemanha, Itália, Hungria, Polônia e Rússia (Gilbert, 1979; Kramer, Gilbert, 1989; Brett, 1998).

Na Hungria, entre os anos de 1960 e 1968, atribuiu-se a *Bacillus cereus* a terceira maior causa dos surtos de intoxicação alimentar no país. Um surto ocorrido ainda em 1958, afetou 65 pessoas após o consumo de sopa de legumes com alto índice de contaminação pelo patógeno. Outros 35 surtos ocorridos no período atingiram

aproximadamente 800 pessoas, que apresentaram sempre sintomas da síndrome diarreica, onde a ingestão de pratos cárneos em geral foram os alimentos associados (Gilbert, 1979; Kramer; Gilbert, 1989).

Até a década de 70, os surtos de intoxicação diarreica devido à *B. cereus* foram melhores relatados na literatura europeia do que nos Estados Unidos, ocorrendo relativamente poucos registros neste país. Somente em 1969 foi relatado o primeiro caso bem documentado de surto diarreico ocasionado pelo microrganismo, envolvendo 15 pessoas com sintomas da síndrome, após a ingestão de produto cárneo, com concentrações do patógeno em torno de 10^7 cel/g (Midura et al., 1970). Um estudo de outro surto nos EUA, onde a bactéria foi identificada como agente infeccioso, envolveu 49 pessoas idosas atendidas pelo serviço social local, todas com sintomas de diarreia. Análises microbiológicas identificaram células da bactéria nas sobras das refeições servidas e ainda nas fezes das vítimas (Jephcott et al., 1977). Em 1977, a ocorrência de um surto diarreico com pacientes de um hospital afetou 28 pessoas, que ingeriram carne de peru contaminada pelo microorganismo, apesar das concentrações encontradas nos alimentos incriminados terem sido baixas, apenas 10^3 cel/g (Gianella et al., 1979, Becker et al, 1994). Em um surto de intoxicação pelo patógeno, estudado por Portnoy, Goepfert&Harmon (1976), o alimento incriminado foram brotos de vegetais germinados domesticamente. Os autores relatam que o microorganismo estava presente nas sementes não germinadas, que são vendidas comercialmente em kits, na qual a proliferação da bactéria ocorreu somente quando houve a germinação dos brotos. Os níveis de contaminação chegaram a 10^7 células/g e as vítimas apresentaram sintomas como cólicas abdominais e diarreia.

Após a década de 70, os surtos por intoxicação alimentar nos Estados Unidos começaram a ser mais relatados pelos órgãos e mais estudados pelos pesquisadores,

apesar dos levantamentos epidemiológicos dessas doenças serem deficientes. Apenas 2,9% do total de surtos alimentares ocorridos no país foram atribuídos a *B. cereus*, no período compreendido entre 1972 e 1982. Nessa mesma época, Canadá e Holanda registravam respectivamente 7,3% e 22,4% surtos notificados causados pelo microorganismo (Kramer; Gilbert, 1989).

Na Noruega, relatos sobre um surto diarreico atribuído ao microorganismo afirmam que algumas pessoas desenvolveram longos períodos de incubação, superior a 24 horas, sendo necessária a hospitalização de algumas delas. O patógeno foi verificado em concentrações de 10^4 UFC/g nos alimentos implicados (Granum, 1994). Um episódio ocorrido no Japão envolvendo leite chamou a atenção pela identificação de ambas as toxinas (emética e diarreica) no alimento. Como consequência, um grande número de casos de intoxicação foi registrado (Shinagawa, 1993). Leite foi ainda incriminado como veículo em surtos de diferentes países, como Canadá (1 surto), Holanda (3 surtos) e Inglaterra (1 surto), segundo relatos de Notermans e Batt (1998).

Em um surto de toxinfecção pelo patógeno ocorrido no Município de Ibiúna/SP em 2003, 120 operários de uma empresa empreiteira da região foram hospitalizados após apresentarem diarreia e cólicas abdominais, além de náuseas e vômitos (Soto et al, 2005). Outro estudo recente relata que no ano de 2010, na Coreia do Sul, 193 trabalhadores de uma empresa foram afetados após a realização de um almoço, onde todos desenvolveram os sintomas da síndrome diarreica. A investigação epidemiológica apontou como a causa do surto os materiais utilizados pelas pessoas (pratos, colheres, palitos e panos de prato), que estariam contaminados por células da bactéria, possivelmente após terem sido limpos com água contaminada (Choi et al., 2011).

IV.6.2 - Surtos Eméticos

Os surtos alimentares devido à toxina emética produzida por *B. cereus* começaram a ser relatadas e registradas na Inglaterra, a partir do ano de 1971. Somente nesse ano, 5 incidentes de surtos foram provocados pela bactéria, sendo o arroz preparado em restaurantes chineses o alimento incriminado. Em um desses casos, onde 13 pessoas foram afetadas, as análises dos alimentos associados mostraram ser alta a contaminação pelo patógeno (Mortimer; Mccann, 1974; Kramer, Gilbert, 1989).

Segundo dados do Laboratório Central de Saúde Pública da Inglaterra, 18 surtos em razão da síndrome emética ocorreram entre 1971 e 1973 no Reino Unido, todos envolvendo arroz frito ou cozido (Perry, 1974). O microorganismo foi o responsável ainda por um total 192 surtos ocorridos no período de 1972 a 1984, na Inglaterra, principalmente no verão. O número de pessoas afetadas passou de 1000, e as preparações de arroz foram os alimentos mais incriminados, em cerca de 95% dos casos (Kramer, Gilbert, 1989). Alguns autores consideram que no Reino Unido, a forma emética de intoxicação é predominante, sempre relacionado ao consumo de arroz cozido ou frito (Shinagawa. 1993).

O primeiro registro de surto emético no Canadá foi feito em 1973, segundo relatos de Lebfreve et al. (citados por Kramer & Gilbert, 1989). Após esse caso, publicações no FoodborneDiseaseReporting Centre (Centro de Informação de DTA) vieram mencionar periodicamente a síndrome no país. O microorganismo foi considerado um dos quatro principais agentes causadores de doenças de origem alimentar, devido à ocorrência de 107 surtos, entre 1975 e 1984, onde a maioria dos alimentos incriminados foram preparações de arroz e a forma predominante da intoxicação foi a emética (Todd, 1992). Nos Estados Unidos, o CDC registrou os primeiros surtos de intoxicações eméticas em 1974, todos causados pela ingestão de arroz, carne e vegetais contaminados

pelo patógeno, afetando um total de 35 pessoas durante aquele ano (Terranova; Blake, 1978). Outros alimentos como macarrão e queijo foram apontados como veículos de um surto ocorrido no país, relatado por Holmes et al. (1981), situação tal que 8 pessoas desenvolveram náuseas e vômitos após realizarem um almoço em um bar.

Um surto ocorrido em uma indústria na Finlândia, em 1976, mostrou que *B. cereus* foi o causador da intoxicação emética. Os indivíduos envolvidos apresentaram os sintomas clássicos da síndrome (náusea e vômito), após o consumo de refeições contendo arroz cozido, carne e vegetais, com altas contagens do patógeno (Raevuori, 1976). A intoxicação emética pela bactéria e o consumo de arroz em restaurantes asiáticos estão ligados a 23% dos surtos ocorridos na Austrália, segundo dados epidemiológicos levantados por Davey (1985). O autor relata ainda que a rapidez do aparecimento e do desconforto dos sintomas é o motivo principal do número maior de registros da síndrome emética pelas autoridades locais em relação à síndrome diarreica.

No período entre 1982 e 1986, no Japão, atribuiu-se ao patógeno um total de 73 surtos alimentares, que afetou ao todo 1323 pessoas, ocorrendo na maioria das vezes durante a época de verão. O arroz foi novamente o veículo principal de contaminação nos casos (73%), seguido de macarrão (16%), tradicionais da culinária japonesa. Quase 95% dos surtos apresentaram a forma emética de intoxicação (Shinagawa, 1990). No ano de 1991, foram registrados um dos maiores números de casos de intoxicação ocasionados pelo microorganismo, com 2364 pessoas atingidas, sendo a maioria dos surtos do tipo emético (Shinagawa, 1993).

Na Inglaterra e País de Gales, entre 1992 e 1996, arroz foi o alimento diretamente relacionado com 29 surtos eméticos ocorridos, que atingiu 164 pessoas no total (Souza et al, 2003). Um caso envolvendo 152 competidores de ski, com idade entre 16 e 19 anos, ocorreu na Noruega, em 1995. Na ocasião, o consumo de carne cozida foi

o responsável pela intoxicação emética provocada pela bactéria (Doyle, 2007). Já num caso fatal de intoxicação alimentar, um surto emético ocorrido na Bélgica em 2003 afetou 5 crianças de uma família, que consumiram salada de macarrão contaminada pelo patógeno. As contagens encontradas no alimento foram altas, na faixa de 10^7 a 10^8 UFC/g, acarretando graves complicações nas crianças, na qual uma delas faleceu devido à insuficiência hepática (Dierick et al, 2005).

CAPÍTULO V: CONTROLE DA INCIDÊNCIA DE *Bacillus cereus*

O controle de *Bacillus cereus* em alimentos baseia-se na prevenção de seu desenvolvimento, uma vez que é difícil, senão impossível, impedir-se por completo a sua presença nas matérias-primas. Durante a produção, manipulação e distribuição dos produtos alimentícios, deve haver um controle higiênico nos mesmos de forma rigorosa, por meio de normas e técnicas, que visem manter os alimentos seguros do ponto de vista microbiológico,(BENEVIDES; LOVATI, 2004).

Este conjunto de regras e normas faz parte do programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF),que são medidas que devem ser adotadas pelas indústrias de alimentos a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos alimentícios com os regulamentos técnicos. Dessa forma, o programa de BPF deve fazer com que determinado padrão de identidade e qualidade de um produto e/ou serviço seja alcançado, assegurando que estes produtos cheguem ao consumidor em condições higiênico-sanitárias adequadas (ANVISA, 2004).

V.1 - Higienização

Em geral, tanto para as indústrias de alimentos quanto para serviços de alimentação, um dos pontos cruciais para controlar a incidência do microrganismo está relacionado com a higienização. Os estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos precisam desenvolver, implementar e manter procedimentos padronizados de higienização para suas instalações, equipamentos e utensílios. Essa operação quando realizada com frequência e de forma efetiva, deve garantir a manutenção das condições higiênico-sanitárias apropriadas dos estabelecimentos e minimizar o risco de contaminação dos alimentos por *B. cereus* (ANVISA, 2002). Segundo Mendes et al. (2004), a simples detecção do microrganismo, em etapas posteriores à higienização e

anteriores às operações de manipulação dos alimentos, reforça a importância de procedimentos adequados de sanitização durante todas as etapas do processamento dos alimentos, de forma que previna a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar causadas pelo patógeno.

Basicamente, o processo de higienização é dividido em duas etapas: a limpeza e a sanitização. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos aderidos às superfícies, constituídos por proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais. Deve ser realizada inicialmente uma pré-lavagem, para reduzir a quantidade desses resíduos alimentares, que chega a remover até 90% do material solúvel presente, e a seguir devem ser utilizados produtos (detergentes alcalinos e/ou ácidos) para degradar e dissolver resíduos orgânicos e inorgânicos, incluindo ainda uma posterior operação de enxague, necessária para eliminar o excesso de detergente e carrear os resíduos remanescentes. Já a etapa de sanitização, objetiva Os mais utilizados na indústria alimentícia para eliminar células de *B. cereus* são o hipoclorito de sódio e os compostos de quaternário de amônio, os quais devem obedecer às instruções do fabricante quanto ao modo de uso e aplicação, diluição e tempo de contato (ANDRADE; MACEDO, 1996; PENG; TSAI; CHOU, 2002; MÜRMANN et al., 2004).

V.2 - Controle de Umidade

Para alimentos como cereais, as medidas preventivas para o controle do patógeno iniciam-se ainda no campo, na etapa de colheita dos grãos, visto que pode haver exposição dos mesmos a *B. cereus* já nessa fase do processo, através de água, poeira, solo, etc. Podem ocorrer também contaminações durante todas as etapas de processamento dos grãos, uma vez que, os esporos do microrganismo, por serem termorresistentes, podem germinar e então se multiplicarem rapidamente (ICMSF, 1996).

A principal ferramenta para prevenção do patógeno nos cereais é o controle de umidade. A composição microbiana desse tipo de alimento está relacionada com a umidade, principalmente na etapa de armazenamento dos grãos. O aumento da umidade viabiliza o desenvolvimento do microrganismo. Logo, o teor máximo de umidade deve ser de 13% para armazenamento, por exemplo, de trigo, milho, cevada e arroz durante um curto período de tempo (seis meses dependendo da temperatura) (LACA et al., 2006).

Portanto, se armazenados convenientemente, os cereais limitam o crescimento de *B. cereus*, pois apresentam uma atividade de água baixa (0,80 – 0,87), visto que para o crescimento dessa bactéria a atividade água mínima é de 0,93 (JAY et al., 2005).

V.3 - Controle de temperatura

Em relação aos alimentos preparados em serviços de alimentação e em residências, o controle de temperatura torna-se a principal forma de prevenção quanto ao desenvolvimento do microrganismo. As condições que favoreçam a proliferação deste patógeno devem ser evitadas, isto é, os alimentos prontos para consumo devem ser mantidos em temperaturas abaixo de 15° ou acima de 55°C, e armazenados no máximo por períodos de 2 a 3 horas à temperatura ambiente. Quando os alimentos são convenientemente cozidos e consumidos imediatamente após a cocção, são inócuos. Caso tenham que ser armazenados, devem ser resfriados rapidamente para permanecerem inócuos (ICMSF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2008; FRANCO; LANDGRAF, 2006).

O processo de cocção dos alimentos pode funcionar algumas vezes como um ativador térmico dos esporos de *B. cereus*, apesar de destruir suas células vegetativas. Em seguida, com o resfriamento lento e o armazenamento de grandes quantidades de

alimentos a temperaturas entre 10 e 50°C, há uma indução da germinação dos esporos, que se desenvolvem e contaminam o alimento. Portanto, é fundamental manter os alimentos preparados em temperaturas adequadas durante o processo de conservação, no intuito de inibir a proliferação microbiana (MÜRMANN et al., 2004).

Além disso, é necessária uma constante verificação das condições dos equipamentos utilizados para a conservação dos alimentos a frio, pois um equipamento com temperatura de funcionamento inadequada pode interferir na qualidade dos produtos armazenados (MÜRMANN et al., 2004). Em ambientes domésticos, por exemplo, uma geladeira deve alcançar temperaturas entre 8°C e 10°C na parte inferior, e de 0°C a -2°C na parte superior. No congelador, temperaturas mais baixas devem ser obtidas, compreendidas entre -1°C e -4°C (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998); enquanto um freezer doméstico deve manter temperaturas de -20°C (PELCZAR et al. 1996). Logo, os alimentos devem ser submetidos a determinadas temperaturas, de acordo com suas especificidades e com o mínimo de oscilação possível. Entretanto o que se observa frequentemente são a negligência e a desinformação de proprietários e funcionários, quanto à importância do controle da temperatura dos equipamentos de frio, pois muitas vezes são necessários investimentos em novos equipamentos, na sua manutenção, e/ou treinamentos de funcionários responsáveis por este setor, que acaba não acontecendo (BRAMORSKI et al., 2005).

Nas indústrias de laticínios, a utilização de sistemas de refrigeração possui grande relevância para limitar o desenvolvimento de *B. cereus*, desde a ordenha, passando pelo processamento do leite, até chegar ao consumidor. A adoção de medidas que evitem a germinação de esporos do microrganismo é essencial para garantir a qualidade do leite e seus derivados, assim como procedimentos higiênico-sanitários adequados durante as etapas de obtenção e transporte da matéria-prima. A manutenção

desse alimento em condições de temperatura abaixo de 10°C deve ser respeitada, para que haja a inibição do desenvolvimento do patógeno, tanto durante as etapas de beneficiamento como após o tratamento térmico empregado no leite pela indústria (ICMSF, 1996).

V.4 - *Clean-In-Place*

Outro fator inerente à indústria de laticínios, e demais locais processadores de alimentos, é a formação de biofilmes em superfícies de equipamentos, no qual o próprio alimento pode atuar como fonte primária de células vegetativas de *Bacillus cereus* e seus esporos. De maneira geral, a formação de biofilmes microbianos é indesejável sob diversos aspectos na indústria de alimentos. Eles podem entupir tubulações, atrasar o tempo de processamento dos produtos, causarem corrosão do aço inoxidável, reduzir a transferência de calor, etc(ANDRADE; MACEDO, 1996; PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003, 2004).

Para a prevenção de biofilmes, algumas indústrias empregam um processo denominado *Clean-In-Place* (CIP), que é um sistema automático e permanente de limpeza de equipamentos e tubulações, no qual os mesmos são higienizados sem desmontagem. Esse sistema funciona bombeando agentes alcalinos e ácidos a partir de tanques e, através da circulação das soluções, podem ser higienizadas tubulações, válvulas, bombas, centrífugas, pasteurizadores, evaporadores, dentre outros. O processo oferece diversas vantagens, tais como permitir um controle eficiente do fluxo, concentração, temperatura e tempo de contato das soluções circuladas, acarretando num tempo de higienização menor e na diminuição com gastos de água. Logo, a partir de um determinado tempo de utilização, esse sistema torna-se econômico, apesar de ter um custo inicial elevado. (ANDRADE; MACEDO, 1996; BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006).

O sistema CIP é utilizado principalmente pelas indústrias de laticínios, e para que seja eficiente deve envolver basicamente quatro etapas: 1º) pré-enxágue com água (numa vazão suficiente para gerar um regime turbulento a fim de remover resíduos grosseiros), circulação de detergente alcalino (geralmente hidróxido de sódio), que possam decompor depósitos de proteínas, emulsificar e saponificar resíduos de gordura, além de hidratar as superfícies e eventuais partículas sólidas; 2º) enxágue com água (novamente com vazão suficiente para gerar um regime turbulento para remover possíveis resíduos); 3º) circulação de detergente ácido (geralmente ácido nítrico), para remover resíduos inorgânicos como o fosfato de cálcio; 4º) enxague final, com água de boa qualidade numa vazão que possibilite a geração de regimes turbulentos para remoção de resíduos remanescentes. Em alguns casos, faz-se uso de uma etapa adicional, com o uso de sanitizantes. (RIBEIRO-FURTINI, 2005; BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006).

V.5 - Outras formas de controle

Em relação aos esporos do microrganismo, pode-se limitar a entrada destes nas indústrias de laticínios, primeiramente através de orientação aos fornecedores de leite sobre as Boas Práticas ainda na ordenha. Outro passo necessário é o monitoramento sobre a quantidade de esporos no leite in natura durante a recepção na indústria, através da identificação dos fornecedores cuja matéria-prima possua níveis baixos ou aceitáveis de populações da bactéria, para que se mantenha um padrão de boa qualidade nos alimentos processados.

Segundo Doyle et al. (2007), esporos de *B. cereus* em alimentos seriam destruídos pelo processamento de esterilização em autoclave (sob pressão), aplicação de tratamento térmico equivalente ou irradiação, no entanto, alguns destes processos poderiam inviabilizar a comercialização dos produtos, por causarem alterações das

características sensoriais nos mesmos. De acordo com Hornstra et al., (2007), a implementação de uma etapa indutora da germinação dos esporos do patógeno, antes da etapa de sanitização, seria uma maneira de aumentar a eficiência destes agentes químicos, visto que a suscetibilidade do microrganismo a estes aumenta. Os autores verificaram que, quando a germinação é induzida antes da sanitização, há redução do número de sobreviventes em três ciclos logarítmicos, enquanto o tratamento alcalino, quando realizado sozinho, não demonstra efeito sobre a viabilidade de esporos de *B. cereus*.

Para outros tipos de alimentos, como os congelados prontos ou semi-prontos, armazenados em temperaturas inferiores a 5°C, ou ainda os processados com tratamentos térmicos subletais, outros fatores além da temperatura devem ser usados para evitar a multiplicação de células da bactéria, como pH e atividade de água, entre outros (SCHLUNDT, 1999).

V.6 - Estudo dos Surto

Sobre os surtos de toxinfecção alimentar provocados por *B. cereus*, é importante lembrar que as investigações devem ser cuidadosas quanto aos alimentos veiculadores, sendo que os estudos ambientais, das áreas de produção e preparo, devem ser feitos da forma mais detalhada possível. O isolamento e identificação correta da bactéria são as provas principais da causa de um surto e devem ser realizados no alimento suspeito e nas fezes dos pacientes. Caso necessário, fezes dos manipuladores dos alimentos também podem ser examinadas, além de mãos, nariz e garganta, que podem ser submetidos a teste *swab* (HOBBS: ROBERTS, 1998).

As notificações dos surtos devem ser realizadas o mais breve possível, pois dessa forma as amostras podem ser coletadas e examinadas rapidamente, facilitando o

início das investigações. As equipes responsáveis por uma investigação devem ser compostas por profissionais das áreas de vigilância epidemiológica e sanitária, e quando necessário por profissionais da área de laboratório, assistência e educação em saúde. Além da investigação, esses profissionais têm como obrigação propor medidas de intervenção e controle, e registrar as informações obtidas através de relatórios, informes e boletins, de acordo com normas da Secretária de Vigilância em Saúde (SVS / MS, 2003).

V.7 - Percepção e Fiscalização

A percepção dos consumidores quanto à inspeção e fiscalização dos produtos e perante a segurança de alimentos deve ser melhor desenvolvida, seja por eles próprios, seja através de campanhas de conscientização e educação elaboradas pelos órgãos devidos, tendo em vista que ambos são afetados por problemas relacionados à saúde pública, pelos prejuízos financeiros com gastos médicos e com remédios, por dias de trabalho perdidos, etc. Apesar da escassez de informações da real magnitude dessas consequências para a saúde e para a economia, devem ser realizados, por parte das autoridades, investimentos no adequado controle e programas de prevenção das DTA's no país e no mundo.

Ao adquirir um alimento, industrializado ou não, o consumidor espera que ele seja confiável, inócuo à saúde, nutritivo, saboroso, agradável à visão e que tenha sido preparado de forma adequada aos requisitos determinados por legislação própria. Em contrapartida, quando os alimentos apresentam-se em má qualidade higiênico-sanitária, o consumidor deve atentar para tal fato e agir de forma correta pela reivindicação de seus direitos. Uma das ferramentas que deve ser utilizada por eles, contra os abusos e descasos praticados pelas empresas e pelos prestadores de serviços, é o Código de

Defesa do Consumidor, que visa à proteção aos seus direitos, instituído por lei (GÓES, 2000).

A legislação sanitária federal regulamenta em caráter geral todas as medidas relacionadas a seguranças dos alimentos e sua produção. O cumprimento dessa legislação, pertinente aos produtores/industrializadores de alimentos (como a Portaria nº 1428 (1993), Portaria nº 326 (1997), Resolução RDC nº 12 (2001), Resolução RDC nº 275 (2002) e Resolução RDC nº 216(2004)), deve ser avaliada de forma efetiva através de fiscalização e investigação pelos órgãos públicos devidos.

O monitoramento pelas agências reguladoras para assegurar que as indústrias alimentícias estejam de fato produzindo alimentos inofensivos é primordial, entretanto o controle de *B. cereus* nos mesmos deve partir indubitavelmente da indústria, que deve ser responsável em preparar alimentos não prejudiciais à saúde do consumidor. Segundo a legislação brasileira, programas como o de Boas Práticas de Produção e Fabricação são obrigatórios, no entanto diversas empresas e principalmente microempresas desconhecem-nos, além de afirmarem que têm problemas financeiros para implantar tais sistemas (SALAY, 2007), o que deve ser mais bem inspecionado pelos órgãos de fiscalização, como a ANVISA.

V.8 – Política de Prevenção

Portanto, a fim de reduzir o número de doenças e surtos provocados pela bactéria, é primordial que uma boa política de prevenção seja instituída nas indústrias, em serviços de alimentação e em residências, por meio da informação, da educação e da motivação, sobretudo dos manipuladores de alimentos. Orientações quanto aos cuidados necessários na conservação, manipulação e consumo dos mesmos, quanto às Boas Práticas de Fabricação e também aos riscos que os alimentos contaminados

representam, devem ser difundidos também para população em geral, tendo sempre em vista a promoção e manutenção da saúde dos consumidores. Segundo Bourgeois et al. (1988), todo incremento de consciência coletiva em matéria de higiene não pode ser mais do que benéfico para a saúde, além do que, a prevenção é a melhor forma de cura, a mais eficaz e a menos custosa.

Assim sendo, adotando-se as devidas medidas preventivas, que visem eliminar ou reduzir a contaminação por *Bacillus cereus* em alimentos, as indústrias poderão fornecer alimentos inócuos aos seus consumidores, que estarão livres das doenças transmitidas por alimentos causadas pelo microrganismo.

CAPÍTULO VI: CONCLUSÃO

Diante dos dados expostos no presente trabalho, percebe-se quão importante são as medidas preventivas para o controle de *Bacillus cereus* em alimentos, uma vez que esses microrganismos têm a capacidade de produzir toxinas responsáveis por surtos de doenças transmissíveis por alimentos. Além disso, o patógeno assume importância na indústria alimentícia devido à sua capacidade em produzir enzimas extracelulares que determinam o potencial de deterioração em alimentos, como também são capazes de formar esporos resistentes aos tratamentos térmicos empregados pelas indústrias.

É indispensável que as medidas preventivas relacionadas ao controle de *B. cereus* sejam adotadas e executadas de maneira correta e efetiva. A implantação dessas séries de normas e procedimentos, que fazem parte do programa chamado Boas Práticas de Fabricação, devem ser considerados de suma importância para os estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos, por visarem a garantia de um alimento seguro e próprio para o consumo.

A alta prevalência da bactéria nos mais diversos alimentos citados, reflete o grau de descaso quanto ao microrganismo, dada a sua real magnitude como patógeno. Nota-se também através do grande número de surtos gerados, que a legislação sanitária não está sendo devidamente fiscalizada ou aplicada, pois há um vasto número de pessoas sendo atingidas devido a ingestão de alimentos contaminados.

Percebe-se que formas mais claras e fáceis de diagnóstico relacionado às síndromes devem ser elaboradas, como também uma maneira mais rápida e eficaz para comunicação e relatos dos surtos ocasionados pelo microrganismo.

Portanto, de acordo com os dados levantados no presente trabalho (alta prevalência de *B. cereus* em alimentos, elevado número de casos de enfermidades e

desurto gerado) torna-se evidente a necessidade de se dar uma maior atenção à área de segurança alimentar, monitorando constantemente as condições higiênico-sanitárias acerca da manipulação, dos locais de produção e das indústrias de alimentos, tendo sempre em vista manter o controle microbiológico nos mesmos, e assim fazer com que a contaminação pelo patógeno seja minimizada a níveis aceitáveis, reduzindo então as consequências relacionadas ao consumo de alimentos contaminados pelo microrganismo.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

AHMED, A.H.; MOUSTAFA, M. K.; MARTIN, E.H.; Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. **Journal of Food Protection**, v. 46, n. 2, p. 126-128, 1983.

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

ALMEIDA, R.C.C.; SCHNEIDER, I.S. Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas, vendidos ao varejo no município de Campinas. **Higiene Alimentar**, v. 2, n. 1/2, p. 37-41, 1983.

ALONSO, C.E. de S. **Pesquisa de cereulide em isolados do grupo *Bacillus cereus***. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2008.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência Agrotécnicas**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

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

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

ANDERSSON, M. A.; MIKKOLA, R.; HELIN, J.; ANDERSSON, M. C.; SALKINOJA-SALONEN, M.A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores.**Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1338-1343, 1998b.

ANDRADE, N.J. de; MACEDO, J.A.B. de. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; PALCICH, G.; LOPES, G. V.; RIBEIRO, V. B.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.71, n. 10, p. 2115-2118, 2008.

ARAN, N. The effect of calcium and sodium lactates on growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in a “sous-vide” beef goulash under temperature abuse. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.117-123, 2001.

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

ASH, C.; COLLINS, M. D. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequence of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. **FEMS Microbiology Letters**,v. 94, n. 1-2, p. 75-80, 1992.

ASH, C.; FARROW, J. A.; DORSC, M.; STEKEBRAND, E.; COLLINS, M. D. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 343-346, 1991.

ASPLUND, K.; NURMI, E.; HILL, P.; HIRN, J.The inhibition of the growth of *Bacillus cereus* in liver sausage.**International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 349-352, 1988.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE REFEIÇÕES COLETIVAS (ABERC). **Manual ABERC de Práticas de elaboração e Serviço de Refeições para Coletividades**. 8ª ed. São Paulo: ABERC, 2003. 288p.

AUSTRÁLIA.Department of Health.OzFoodNet.**Monitoring the Incidence and Causes of Diseases Potentially Transmitted by Food in Australia: Annual Report of Ozfoodnet Network** (Ano 2004 a 2008). Pesquisado em: 09 junho 2011.

AZEREDO, R.M.C. **Estimativa de riscos relacionados à contaminação de preparações de arroz por *Bacillus cereus***. 1998. 142 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Campinas, 1988.

AZEREDO, R.M.C; SOARES, C.M.; KUAYE, A.Y.; LEITÃO, M.F.F. Detecção e avaliação da incidência de *Bacillus cereus* em amostras de ar, coletadas em Unidades de Alimentação e Nutrição. **Revista de Higiene Alimentar**, v.15, n.80- 81, p. 143-144, 2001.

- BACHHIL, V. N.; JAISWAL, T. N. *Bacillus cereus* in meats: incidence, prevalence and enterotoxigenicity. **Journal of Food Science and Technology**, v. 25, n. 6, p. 371-372, 1988.
- BADDOUR, L.M.; GAIA, S.M.; GRIFFIN, R.; HUDSON, R.A. hospital cafeteria-related food-borne outbreak due to *Bacillus cereus*: unique features. **Infection Control**, v. 7, n.9, p. 462-465, 1986.
- BAHOUT, A.A. Prevalence of *Bacillus* species in UHT milk. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.42, p. 47-53, 2000.
- 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.
- BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, v. 3, 317 p, 1998.
- BAXTER, R.; HOLZAPFEL W.H.A microbial investigation of selected spices, herbs, and additives in South Africa. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 570-574, 1982.
- BECKER, H.; SCHALLER, G.; WIESE, W. V.; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n. 1, p.1-15, 1994.
- BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1778-1784, 1991.
- BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4423-4428, 1995.
- BEECHER, D. J.; WONG, A. C. L. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.12, p. 4614-4616, 1994.
- BELLO FILHO, O. de S.; FROELICH, Â.; SOUZA, E.C. Surtos de toxinfecções alimentares notificados no município de Maceió, AL, no período de 2000 a 2004. **Higiene alimentar**, v. 22, n. 166/167, p. 134-137, 2008.
- BENEVIDES, C. M. J., LOVATTI, R. C. C., Segurança alimentar em estabelecimentos processadores de alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n 125, p. 24-27, 2004.
- BENNETT, R. W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: APHA (American Public Health Association). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4^o ed., Washington: APHA, 2001. Chap. 32, p. 311-316.
- BENNETT, R.W.; MURTHY, G.; KAYLOR, L.; COX, S.; HARMON, S.M. Biological characterization and serological identification of *Bacillus cereus* diarrhoeal factor. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 105-120, 1993.

BHUNIA, A. K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In: BHUNIA, A. K. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**. 1ª Ed, New York: Springer, 2008. cap. 7, p. 135-147.

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

BONVENTRE, P.F.; JOHNSON, C.E. *Bacillus cereus* toxin. In: Microbial Toxins, vo.III, Bacterial protein toxins, Academia Press, New York, p. 415-435, 1970.

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

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

BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J. **Microbiologia Alimentaria: Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria**, v. 1. Zaragoza: Ed. Acribia S.A, 1988, p. 64.

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

BRAMORSKI, A.; VASCONCELLOS, K.S.; THEILACKER, C.; SARDAGNA, C.; GARCIA, G.F. Avaliação dos equipamentos de refrigeração e congelamento dos maiores supermercados do município de Blumenau, SC. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n 133, p. 20-23, 2005.

BRASIL, Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de janeiro de 2001. Seção 1.

BRASIL, Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre **Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação**. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de setembro de 2004. Seção 1.

BRASIL, Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o **Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos produtores/industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos produtores/industrializadores de Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 06 de novembro de 2002. Seção 01.

BRASIL. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova **Regulamento Técnico sobre Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos**

Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 de agosto de 1997, Seção 1.

BRASIL. Portaria nº1428, de 26 de novembro de 93, do Gabinete do Ministro do Ministério da Saúde. Aprova **Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos e Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para Serviços e Produtos na Área de Alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, 02 de dezembro de 1993. Seção 1.

BRASÍLIA. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, ano 5, n. 6, 2005. 7p.

BRASÍLIA. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2009. 16p.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A.J. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 254- 262, 2006.

BRETT, M.M. Kits for detection of some bacterial food poisoning toxin: problems pits alls and benefits. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.84, p.1105-1185, 1998.

BRILEY, R.T.; TEEL, J.H.; FOWLER, J.P. Nontypical *Bacillus cereus* Outbreak in a Child Care Center. **Journal of Environmental Health**, v. 63, n.7, p. 9-11, 21, 2001.

BRITISH COLUMBIA CENTRE FOR DISEASE CONTROL – BCCDC. **Milk safety Notes**. 28 June, 2002. Disponível em: <www.bccdc.ca/NR/rdonlyres/34B36D22-D767-4140-B032-35FE8AAD409F/0/Outbreak_Bacillus_Milk.pdf>, Acesso em: 26 maio 2011.

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

BRYAN, F.L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 8, p. 663-673, 1988.

BRYAN, F.L.; JERMINI, M.; SCHMITT, R.; CHILUFYA, E.N.; MICHAEL, M.; MATOBA, A.; MFUME, E.; CHIBIYA, H. Hazard associated with holding and reheating foods at vending sites in a small town in Zambia. **Journal of Food Protection**, v.60, n. 4, p. 391-398, 1997.

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

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

BURRELL, P.; FARR, L.; BATES, J.; TAN, A.A rapid enzyme immunoassay for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin in food and culture supernatants. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 6, p.xxii, 1991.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de toxinfecções alimentares no Estado do Mato Grosso do Sul, no período de 1998-2001**. 2002. 79 p. Trabalho realizado para a obtenção do grau de Especialista. Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser. Campo Grande, 2002. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/ct/pdf/sonia_aparecida.pdf>, Acesso em: 09 junho 2011.

CANTONI, C.; BRESCIANI, C.M. Frequenza di *B. cereus* negli alimenti. **Industrie Alimentari**, p. 641-646, 1987.

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

CARLIN, F.; GIRARDIN, H.; PECK, M.W.; STRINGER, S.C.; BARKER, G.C.; MARTINEZ, A.; FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ, P.; WAITES, W.M.; MOVAHEDI, S.; VAN LEUSDEN, F.; NAUTA, M.; MOEZELAAR, R.; DEL TORRE, M.; LITMAN, S. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2/3, p. 117-135, 2000a.

CARLIN, F.; GUINEBRETIERE, M.H.; CHOMA, C.; PASQUALINI, R.; BRACONNIER, A.; NGUYEN-THE, C. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purees. **Food Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 153-165, 2000b.

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

CHANG, J.M.; CHEN, T.H. Bacterial foodborne outbreak in central Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 11, n.1, p. 53-59, 2003.

CHOI, K.B.; LIM, H.S.; LEE, K.; HA, G.Y.; JUNG, K.H.; SOHN, C.K. Epidemiological investigation for outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus* among the workers at a local company in 2010. **Journal of preventive medicine and public health**, v. 44, n.2, p. 65-73, 2011.

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

CHOUDHERY, A.K.; MIKOLAJCIK, E.M. Activity of *Bacillus cereus* Proteinases in milk. **Journal Dairy Science**, v.53, 11.3, p.363-366, 1970.

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

CHRISTIANSSON, A. The toxicology of *Bacillus cereus*. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 275, p. 4-8, 1992.

CHUNG, K.T.; SUN, H.L. Distribution and characteristics of *Bacillus cereus* isolated from rice in Taiwan. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 51, p. 1208-1212, 1986.

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

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

COUVERT, O.; LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p. 57-62, 1999.

CRERAR S.K.; DALTON C.B.; LONGBOTTOM H.M. KRAA E. Foodborne disease: current trends and future surveillance needs in Australia. **Medical Journal of Australia**, v. 165, n. 11-12, p. 672-675, 1996.

DAMASCENO, K.S.F.S.C.; ALVES, M.A.; FREIRE, I.M.G.; TÔRRES, G.F.; AMBRÓSIO, C.L.B.; GUERRA, N.B. Condições higiênico-sanitárias de "self-services" do entorno da UFPE e das saladas cruas por eles servidas. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 74-78, 2002.

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

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

DAUER, C.C. 1960 Summary of disease outbreaks and a 10-year resumé. **Public Health Rep.**, v. 76, n. 10, p. 915-922, 1961.

DAVEY, G.R. Food-poisoning in New South Wales: 1977-84. **Food Technology in Austrália**, v. 37, n. 10, p. 453-456, 1985.

DAY, T. L.; TATINI, S. R.; NOTERMANS, S.; BENNET, R. W. A comparison of ELISA and RPLA for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 11, p 9-13, 1994.

DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M.; UBOLDI-EIROA, M.N. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, n. 60, p. 31-40, 1978.

DIERICK, K.; COILLIE, E.V.; SWIECICKA, I.; MEYFROIDT, G.; DEVLIEGER, H.; MEULEMANS, A.; HOEDEMAEKERS, G.; FOURIE, L.; HEYNDRIKX, M.; MAHILLON, J. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*- associated food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4277-4279., 2005.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 3ª ed. Washington: ASM Press, 2007.

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

DUFRENNE, J.; SOENTORO, P.; TATINI, S.; DAY, T.; NOTERMANS, S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 99-109, 1994.

DUSMALISILE, P.; WITTHUHN, R.C.; BRITZ, T.J. Impact of different pasteurization temperatures on the survival of microbial contaminants isolated from pasteurized milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.2, p.74-82, 2005.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; GRALLERT, H.; RIECK, P.; WAGNER, M.; SCHERER, S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 1, 20 p., 2006.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 48, n. 7, p. 479-487, 2004a.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 2, p. 189-195, 2004b.

ELEFThERIADOU, M.; VARNAVA-TELLO, A.; METTA-LOIZIDOU, M.; NIKOLAOU, A.S.; AKKELIDOU, D. The microbiological profile of foods in the Republic of Cyprus: 1991-2000. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 463-471, 2002.

ESPAÑA. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Epidemiología. **Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (excluye hídricos)**. España, 1994-2003. Disponível em: <<http://www.isciii.es/htdocs/pdf/Informedebrotesalimentarios.pdf>>. Acesso em: 07 junho 2011.

EUA. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. **Foodborne Outbreak Online Database, United States (Ano 1998 a 2008)**. Pesquisado em: 07 junho 2011.

EUA. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. **Annual Listing of Foodborne Disease Outbreaks, United States (Ano 1990 a 1998)**. Pesquisado em: 07 junho 2011.

FANG, J.T.; WEI, Q.K.; LIAO, C.W.; HUNG, M.J.; WANG, T.H. Microbiological quality of 18° C ready-to-eat food products sold in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 241-250, 2003.

FERMANIAN, C.; FREMY, J.M.; CLAISSE, M. Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strains of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 414-418, 1994.

FERMANIAN, F.; LAPEYRE, C.; FRÉMY, J. C. et al. Production of diarrheal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p.345-358, 1996.

FINLAY, W. J. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, n.5, p. 385-389, 2000.

FINLAY, W. J. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1811-1812, 1999.

FINLAY, W.J.J.; LOGAN, N.A.; SUTHERLAND, A.D. *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 423-430, 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia de Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microrganismos patogênicos de importância em alimentos**. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2006. cap. 4, p. 41-43.

FRANKLIN, J.G. Spores in milk: Problems associated with UHT processing. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 33, p.180-191, 1970.

FRAZIER, W. C. & WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4ª ed. Zaragoza: Acribia, 1993, 681.

FREITAS, J.F. de; DAMASCENO, K.S.F. da S.C.; CALADO, C.L. de A.; Rotulagem de alimentos lácteos: A percepção do consumidor. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 125, p. 17-23, 2004.

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

GAULIN, C.; VIGER, Y.B.; FILLION, L. An outbreak of *Bacillus cereus* implicating a part-time banquet caterer. **Canadian Journal of Public Health**, v. 93, n. 5, p. 353-355, 2002.

GENTA, T. M. S., MAURÍCIO, A. A., MATIOLI, G. Avaliação das Boas Práticas através de *check-list* aplicado em restaurantes *self-service* da região central de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 27, n 2, p. 151-156, 2005.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. **Agentes bacterianos de toxinfecções**. In: Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2008, cap.12.

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

GIANELLA, R.A.; BRASILE, L. A hospital food-borne outbreak of diarrhea caused by *Bacillus cereus*: clinical, epidemiologic, and microbiologic studies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 139, n. 3, p. 366-370, 1979.

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

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

GOES, J. A. W. Proteção e defesa do consumidor. Cidadania *versus* consumo. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 73, p. 21-27, 2000.

GOMES, L.P.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, G.; BARONI, F. de A.; SOUZA, M.M.S. de. *Bacillus cereus* em amostras de doces industrializados comercializados por ambulantes nos municípios de Seropédica e Itaguaí – RJ. **Revista Universidade Rural**, v. 24, n.2, p.181-184, 2004.

GONZALES, I.; GONZALEZ, I.; LOPEZ, M.; MAZAS, M.; GONZALEZ, J.; BERNARDO, A. The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n. 5, p.548-554, 1995.

GONZÁLEZ, I.; LÓPEZ, M.; MAZAS, M., Bernardo, A.; Martín, R. Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p.341-347, 1996.

GONZÁLEZ, P.P.; GONZÁLEZ, J.P.R.; MIMOSO, N.C.; COLODRERO, C.G. Epidemic outbreak in a home for the aged caused probably by *Bacillus cereus*. **Atención Primaria**, v. 22, n. 10, p. 649-654, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J., 1^a ed. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 1997, p. 327-336.

GRANUM, P. E.; TOMAS, J. M.; ALOUF, J. E. A survey of bacterial toxins involved in food poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 129-144, 1995.

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

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

GRIFFITHS, M. W.; PHILLIPS, J. D.; MUIR, D. D. Development of flavour defects in pasteurized double cream during storage at 6°C and 10°C. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 34, n. 4, p. 142-146, 1981.

GUINEBRETIERE, M. H.; GIRARDIN, H.; DARGAIGNARATZ, C.; CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 223-232, 2003.

GUVEN, K.; MUTLU, M. B.; AVCI, O. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey. **Journal of Food Safety, Westport**, n. 26, p. 30-40, 2006.

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

HANASHIRO, A.; MORITA, M.; MATTE, G. R.; MATTE, M. H.; TORRES, E. A. F. S. Microbiological quality of selected street foods from a restricted area of São Paulo city, Brazil. **Food Control**, v. 16, n. 5, p. 439-444, 2005.

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

HANSEN, B. M.; LESER, T. D.; HENDRIKSEN, N. B. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 2, p. 209-213, 2001.

HANSON, M.L.; WENDORFF, W.L.; HOUCK, K.B. Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. **Journal of Food Protection**, v. 68, n.7, p.1484-1486, 2005.

HARDY, S. P.; LUND, T.; GRANUM, P. E. CytK toxin of *Bacillus cereus* from spores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, p. 47-51, 2001.

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

HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A.; McCLURE, F.D. Comparison of selective plating media for enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 1, p. 65-67, 1984.

HARMON, S.M.; KAUTTER, D.A.; SOLOMON, H.M. *Bacillus cereus* contamination of seeds and vegetable sprouts grown in a home sprouting kit. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 1, p. 62-65, 1987.

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

HELGASON, E.; OKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A., FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KOLSTØ A-B. *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, June, 2000.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.

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

HOLBROOK, R.; ANDERSON, J.M. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 26, p. 753-759, 1980.

HOLMES, J.R.; PLUNKETT, T.; PATE, P.; ROPER, W.L.; ALEXANDER, W.J. Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. **Archives of Internal Medicine**, v. 141, n. 6, p. 766-767, 1981.

HONDA, T.; SHIBA, A.; SEO, S.; YAMAMOTO, J.; MATSUYAMA, J.; MIWATANI, T. Identify of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 63, n. 2/3, p. 205-209, 1991.

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

HORNSTRA, L.M.; LEEUW, P.L.A de; MOEZELAAR, R.; WOLBERT, E.J.; VRIES, Y.P. de; VOS, W.M. de; ABEE, T. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p.367-371, 2007.

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

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

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

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

IACONA, V.A.; SIMONETTA, A.; BASILICO, J.C. Incidência de *Bacillus cereus* em alimentos desidratados en polvo. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 19, n. 4, p. 145-152, 1987.

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

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - ICMSF. *Bacillus cereus*. In: Characteristics of microbial pathogens.

London: Blackie Academic & Professional, 1996. chap. 2, p. 20-35. (Microorganisms in foods, 5).

IVERS, J. T.; POTTER, N. N. Production and stability of hemolysin, phospholipase C lethal toxin of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**, v. 40, n. 1, p. 17-22, 1977.

JÄÄSKELÄINEN, E. **Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food**. 2008, 74 p. Academic dissertation in Microbiology. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Division Microbiology. University of Helsinki, Helsinki, 2008.

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

JAQUETTE, C.B.; BEUCHAT, L.R. Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1629-1635, 1998.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. Modern food microbiology. 7th ed. New York: Springer, 2005. 790p.

JEPHCOTT, A.E.; BARTON, B.W.; GILBERT, R.J.; SHEARER, C.W. An unusual outbreak of food-poisoning associated with meals-on-wheels. **The Lancet**, v. 310, n. 8029, p. 129-130, 1977.

JERMINI, M.; BRYAN, F.L.; SCHMITT, R.; MWANDWE, C.; MWENYA, J.; ZYUULU, M.H.; CHILUFYA, E.N.; MATOBA, A.; HAKALIMA, A.T.; MICHAEL, M. Hazard and critical control points of food vending operations in a city in Zambia. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 3, p. 288-299, 1997.

JOHNSON, C.E.; BONVENTRE, P.F. Lethal toxin of *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 2, p. 306-316, 1967.

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

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

JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L. and BUSTA, F.F. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1268-1271, 1982.

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

KÄFERSTEIN, F.K.; MOTARJEMI, Y.; BETTCHER, D.W. Foodborne disease control: a transnational challenge. **Emergency Infection Disease**, v. 3, p. 503-510, 1997.

KAMAT, A.S.; NENE, S.P.; NERKAR, D.P.; NADKARNI, G.B. The nature of toxins produced by *Bacillus cereus* BIS-59. **Journal of Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 71-81, 1987.
KAMAT, A.S.; NERKAR, D.P.; NAIR, P.M. *Bacillus cereus* in some Indian foods, incidence and antibiotic, heat and radiation resistance. **Journal Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 31-41, 1989.

KANEKO, T. NOZAKI, R.; AIZAWA, K. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Immunology**, v. 22, p. 639-641, 1978.

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

KIM, H.U.; GOEPFERT, J.M. Efficacy of a fluorescent-antibody procedure for identifying *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 708-713, 1972.

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

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

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

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

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p. 9-27, 1998.

LACA, A.; ZOE, M.; DIAZ, M.; WEBB, C.; PANDIELLA, S. S. Distribution of microbial contamination within cereal grains. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 4, p.332-338, 2006.

LANCIOTTI, R.; SINIGAGLIA, M.; GARDINI, F.; VANNINI, L.; GUERZONI, M.E. Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. **Food Microbiology**, v.18, n. 6, p. 659-668, 2001.

LANGEVELD, L.P.M.; VAN SPRONSEN, W.A.; VAN BERESTEIJN, E.C.H.; NOTERMANS, S.H.W. Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 723-726, 1996.

LARSEN, H. D.; JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p. 179-186, 1997.

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

LEGUERINEL, I.; COUVERT, O.; MAFART, P. Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 223-227, 2000.

LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.29-34, 2001.

LEITÃO, M.F.F.; UBOLDI-EIROA, M.N.; DELAZARI, I. Contaminação de matérias primas e alimentos semi-processados de origem vegetal por esporos de bactérias. I. *Bacillus* spp mesófilos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.20, n. 1, p. 39-54, 1983.

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

LIN, S.; SCHRAFT, H.; ODUMERU, J. A.; GRIFFITHS, M. W.; Identification of sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n.3, p. 159-171, 1998.

LINDBÄCK, T.; FAGERLUND, A.; RØDLAND, M.S.; GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* enterotoxin. **Microbiology**, v. 150, n. 12, p. 3959- 3967, 2004.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. What food professionals should know about bacteria biofilms. **British Food Journal**, v.108, n.1, p. 27-37, 2006.

LUBY, S.; JONES, J.; DOWDA, H.; KRAMER, J.; HORAN, J. A large outbreak of gastroenteritis caused by diarrheal toxin-producing *Bacillus cereus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 6, p. 1452-5, 1993.

LUCHESI, R. H.; BORGES, J.T.S.; MAIA, L.H.; FREITAS, A.S. Identificação dos pontos críticos de controle na preparação de carne bovina assada, em unidades de alimentação e nutrição. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.119, p. 23-28, 2004.

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

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

MALMSTEN, T.; PÄÄKKÖNEN, K.; HYVÖNEN, L. Packaging and storage effects on microbiological quality of dried herbs. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 873-875, 1991.

MÄNTYNEN, V.; LINDSTRÖM, K. A Rapid PCR-Based DNA Test for Enterotoxigenic *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.5, p. 1634-1639, 1998.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 249-254, 2003.

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

MARTIN, J. H.; STAHLY, D. P.; HARPER, W.J.; GOULD, I.A. **Spore-forming microorganisms in selected milk supplies**. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 16, [S.I.], 1962. Anais... 1962, C(Section VIII:1), p.259-304.

MARTINS-VIEIRA, M. B. C.; DIAS, R. S.; SOUZA, J. M., SILVANA, M. C. C., SILVA, S. O., FERNANDES, S. H. **Evolução dos surtos de toxinfecção alimentar no estado de Minas Gerais, no período entre agosto de 1991 a agosto de 1998**. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5, 1998, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia-SP, 1998, p. 71.

MAZAS, M.; GONZALES, I.; LOPEZ, M.; GONZALES, J.; SARMIENTO, R. M. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 30, p.609-620, 1995.

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

MC-KNIGHT, I.C.S.; LEITÃO, M.F.F.; LEITÃO, R.F.F. *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.

MCMEEKIN, T.A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D.S.; OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, D.A.; ROSS, T.;

SALTER, M.; SOONTRANON S. Quantitative microbiology: A basis for food safety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 541-549, 1997.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; Linda F. McCaig, Joseph S. Bresee, Craig Shapiro, Patricia M. Griffin, and Robert V. Tauxe. Food-Related illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 62, n. 7, p. 9, 1999.

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

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

MIDURA, T.; GERBER, M.; WOOD, R.; LEONARD, A.R. Outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus*. **Public Health Reports**, v. 310, n. 8029, p. 129-130, 1977.

MIKAMI, T.; HIRAOKA, K.; MURAKAMI, T.; BOON-LONG, J.; MATSUMOTO, T.; SUZUKI, M. Detection of common flagella antigen in *Bacillus cereus* by monoclonal antibody. **Microbiology and Immunology**, v. 34, n. 8, p. 709-714, 1990.

MIKAMI, T.; HORIGAWA, T.; MURAKAMI, T.; MATSUMOTO, T.; YAMAKAWA, A.; MURAYAMA, S.; KATAGIRI, S.; SHINAGAWA, K.; SUZUKI, M. An improved method for detecting cytostatic toxin (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, n. 1/2, p. 53-58, 1994.

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

MIKOLAJCIK, M.E.; SIMOM, T.W. Heat resistant psychrotrophic bacteria in raw milk and their growth at 7°C. **Journal of Food Protection**, v.41, n.2, p.93-95, 1978.

MILAGRES, R.C.R.M. *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição: avaliação da contaminação do ar e da superfície de trabalho. 2004. 73 p. Tese realizada para a obtenção do título de Magister Scientiae. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

MONNERAT, R.S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. V. 3, p.163-200.

MORRIS, J.G, JR. *Bacillus cereus* food poisoning. **Archives International of Medicine**, v. 141, n. 6, p. 711, 1981.

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

- MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 650-653, 1967.
- MOSSO, C.; GUGLIELMINI, N.; LANZETTI, A. Capacità di *B. cereus* de crescere e produrre enterotossina ed attività di diversi disinfettante. **Industrie Alimentari**, v.35, n.352, p. 1073-1075, 1996.
- MÜRMANN, L.; DILKIN, P.; KOWALSKI, C.H.; ALMEIDA, C.A.; MALLMANN, C.A. Temperatura de conservadores a frio em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de Santa Maria/RS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n 124, p 30-34, 2004.
- NASCIMENTO, A.; MOUCHREK-FILHO, V.E.; MOUCHREK-FILHO, J.E.; MARTINS, A.G.L. de A; MARINHO, S.V.; BARBOSA, R.S. Perfil microbiológico do caldo de cana comercializado na cidade de São Luís, MA. **Higiene alimentar**, v. 20, n. 141, p. 83-86, 2006.
- NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas por alimentos. **Revista Nutrição em Pauta**, v. 8, n. 40, p. 22-26, 2000.
- NISHIKAWA, Y.; KRAMER, J. M.; HANOKA, H.; YASUKAWA, A. Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis and HEP-2 vacuolation factor analysis in the epidemiological investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1/3, p. 149-159, 1996.
- NORTJÉ, G. L.; NEL, E.; JORDAN, E.; NAUDÉ, R. T.; HOLFZAFEL, W. H.; GRIMBEEK, R. J. A microbiological survey of fresh meat in the supermarket Trade. Part 1: Carcasses and contact surfaces. **Meat Science**, v. 25, p. 81-97. 1989.
- NORTJÉ, G. L.; VOSTER, S. M.; GREEBE, R. P.; STEYN, P. L. Occurrence of *Bacillus cereus* and *Yersinia enterocolitica* in South Africa retail meats. **Food Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 213-217, 1999.
- NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 84, n. S1, p. 51s-61s, 1998.
- NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; TE GIFFEL, M.; PEETERS WEEM, P. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. **Food Microbiology**, v.14, 143-151, 1997.
- NOTERMANS, S.; TATINI, S. Characterization of *B. cereus* in relation to toxin production. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 47, n. 2, p. 71-77, 1993.
- O'BRIEN, S. J.; ELSON, R.; GILLESPIE, I. A.; ADAK, G. K.; COWDEN, J. M. Surveillance of foodborne outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992-1999: contributing to evidence-based food policy? **Public Health**, v. 116, p. 75-80, 2002.

OLIVEIRA, A. M.; GONÇALVES, M. O; SHINOHARA, N. K. S.; STAMFORD, T. L. M.; Manipuladores de alimentos: um fator de risco. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n.114/115, 2003, p. 12.

OLIVEIRA, M.P. de; SANT'ANNA, D.S.M.; MESQUITA, A.J. de; RIBEIRO, I.L. Enumeração de *Bacillus cereus* em Fubá de Milho (*Zea mays* L.). **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 89-96, 1988.

PAN, T.M.; WANG, T.K.; LEE, C.L.; CHIEN, S.W.; HORNG, C.B. Food borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.5, p. 1206-1262, 1997.

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

PARDI, C.M; SANTOS, I.F; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: UFG e Eduff, 2006. 624p.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; BROOKS, J.D. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n.1, p. 110-116, 2004.

PARKAR, S.G.; FLINT, S.H.; BROOKS, J.D. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli: potential consequences for cleaning. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 553-560, 2003.

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

PEDROSO, D.M.M.; IARIN, S.T.; GAMBA, R.C.; HEIDTMANN, S.; RALL, V.L.M. Critical Control Points for meat balls and kibbe preparations in a hospital kitchen. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n.4, p. 347-355, 1999.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 524 p, 1996.

PENG, H.; FORD, V.; FRAMPTON, E. W.; RESTAINO, L. Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. **Food Microbiology**, v. 18, p. 231-238, 2001.

PENG, J.S., TSAI, W.C., CHOU, C.C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 105-111, 2001.

PENG, J.S.; TSAI, W.C.; CHOU, C.C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1/2, p. 11-18, 2002.

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

PERRY, J. Food poisoning from fried rice. **Environment Health**, v. 3, n. 50-51, 1974.
PETERS, A. C.; THOMAS, L.; WIMPENNY, W. T. Effects of salt concentration on bacterial growth on plates with gradients of pH and temperature. **FEMS Microbiology Letters**, v.77, p.309-314, 1991.

PETERZ, M.; WIBERG, C.; NORBERG, P. Comparison of media for isolation of *Bacillus cereus* from foods. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 11, p. 969-970, 1985.

PILLAI, R.A.V.; KHAN, M.M.H.; REDDY, V.P. Incidence of aerobic spore formers in Iassi. **Journal of Food Science and technology**, v. 30, n. 2, p. 141- 142, 1993.

PINNA, A.; SECHI, L. A.; ZANETTI, S. et al. *Bacillus cereus* keratitis associated with contact lens wear. **American Academy of Ophthalmology**, p.1830-1833, 2001.

PIRES, E.F.; SHINOHARA, N.K.S; RÊGO, J.C do; LIMA, S.C. de; STAMFORD, T.L.M. Surtos de toxinfecções alimentares em unidades de alimentação e nutrição. **Higiene Alimentar**, v. 6, n. 101, p. 20-24, 2002.

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

PIRHONEN, T. I.; ANDERSSON, M. A.; JÄÄSKELÄINEN, E. L.; SALKINOJA-SALONEM, M. S.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; JOHANSSON, T. M. -L. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. **Food Microbiology**, v. 22; n. 1, p. 87-91, 2005.

PIZZOLITTO, N.; PIZZOLITTO, E.L.; SIMÕES, M.J.S. Espectro de agentes etiológicos associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos em núcleos receptores turísticos de três regiões geográficas do Estado de São Paulo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p. 301-310, 2007.

PORTNOY, B.L.;GOEPFERT, J.M.; HARMON, .SM.An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts. **American Journal of Epidemiology**, v. 103, n. 6, p. 589-594, 1976.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie**, v.32, n.6, p.321-326, 1999.

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

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

RABINOVITCH, L.; VICENTE, M.M.A.; GUAYCURÚS, T.V.; FREITAS, J.P.G.V.; MESQUITA, R.P. Avaliação da incidência e da toxicidade de amostras de *Bacillus cereus* em diferentes classes de alimentos comercializados e consumidos no Estado do Rio de Janeiro. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 1-9, 1985.

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

RAEVUORI, M.; KIUTAMO, T.; NISKANEN, T.; SALMINEN, K. An outbreak of *Bacillus cereus* food -poisoning in Finland associated with boiled rice. **Journal of Hygiene**, v. 76, p. 319-327, 1976.

RAJKOWSKI, K. T.; BENNETT, R. W. *Bacillus cereus*. In: MILIOTIS, M. D.; BIER, J. W. (Eds.) International Handbook of Foodborne Pathogens. 1ª Edição, Marcel Dekker, Inc., New York, 2003.

RAJKOWSKY, K.T.; MIKOLAJCIK, E.M. Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 3, p. 99-205, 1987.

RAMPAL L.; JEGATHESAN M.; LIM Y.S. An Outbreak of *Bacillus cereus* Food Poisoning in a School Hostel, Klang. **Medical Journal of Malaysia**, v. 39, n. 2, p. 116-122, 1984.

RANGASAMY P.N.; IYER M.; ROGINSKI H. 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.

RANTHUM, M. A. **Subnotificação e alta incidência de doenças veiculadas por alimentos e seus fatores de risco: causas e consequências no município de Ponta Grossa – Paraná**. 2002. 101p. Tese (Trabalho realizado para a obtenção do grau de Mestre). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro, 2002.

RASO, J.; NIETO, M. M.; CÁNOVAS, G. B. et al. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p.125-132, 1998.

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

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

RESENDE, D.S.; SILVA, C.R.M. da; MORAIS, G.R.; MELO, P.de C.; DOLINGER, E. J.O.V.; BRITO, D.V.D.de; **Deteção de *Bacillus cereus* na superfície de preparo de legumes e saladas em restaurantes de auto-serviço em Itumbiara-GO**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25, 2009, Porto de Galinhas.

Anais Eletrônicos... Porto de Galinhas-PE, 2009. Disponível em: <<http://sbmicrobiologia.org.br/pdf/cdsbm/resumos/R0645-1.html>>. Acesso em: 13 maio 2011.

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

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

RIBEIRO-FURTINI, L.L. **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência**. 2005. 80p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2005.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual de Saúde. Divisão de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância Epidemiológica das DTA no Rio Grande do Sul**, 2008. 35p.

ROCHA, J.A.K. **Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo minas frescal**. 2005. 77p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

ROSA, O.O.; CARVALHO, E.P.; BEERLI, K.M.; DIONÍZIO, F.L.; RIBEIRO, A.C.; PÁDUA, L.M. **Deteção de *Bacillus cereus* em hortaliças minimamente processadas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 6, 1991, Guarapari. Higiene Alimentar, São Paulo-SP, v. 15, n. 80/81, p. 142, 2001.

RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 2ª ed. London: Blackwell Scientific, 1992. 639 p.

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.

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

RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Biofilm Formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2614–2622, 2005.

RYU, J.H.; KIM, H; BEUCHAT, L.R. Spore formation by *Bacillus cereus* in broth as affected by temperature, nutrient availability, and manganese. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 8, p. 1734-1738, 2005.

SALAY, E. Consumo alimentar fora do domicílio: implicações para pesquisas em segurança alimentar e nutricional. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**. 2005. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/2005/09/14.shtml>>, acesso em: 10 junho 2011.

SALZBERG, S.P.; MASSAGUER, P.R.; SERRANO, A.M. Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. **Revista de Microbiologia**, v.13, n. 1, p.26-30, 1982.

SANCHEZ, C. P. P. **Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT**. 2005. 255 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Investigação de surtos de DTA em Santa Catarina**, 2009. 17p.

SANTOS, A.B.; LOPES, J.; KOIAYMA, N.T.G.; POIATTI, M.L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; CORDEIRO, P.C. ***Bacillus cereus* em leite UHT caprino: caracterização bioquímica e molecular-PCR**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2007, Londrina. Anais Eletrônicos... Londrina-PR, 2007. Disponível em: <<http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/tecnologia-produtos-origem-animal/3146-Bacillus-cereus-leite-ugt-caprino-caracterizacao-bioquimica-molecular-pcr.html>>. Acesso em: 13 maio 2011.

SANTOS, R.C. A inspeção de alimentos e segurança nacional. **Revista CFMV**, Brasília, v. 1, n. 3, p. 24, 1995.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Estadual de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos notificados ao CVE (Tabelas de surtos - Ano 2000 a 2010)**. São Paulo. Pesquisado em: 06 junho 2011.

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

SCHLUNDT, J. Principles of food safety risk management. **Food Control**, n. 10, p. 299-302, abr. 1999.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 167- 215, 1996.

SHAH, R.C.; WADHER, B.J.; BHOOSREDDY, G.L. Incidence and characteristics of *Bacillus cereus* isolated from Indian foods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 249-250, 1996.

SHANK, F.R. The regulatory environment past and future - Incentive or impediment to developments in food science and technology: A perspective from FDA. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 2, p. 207-214, 1994.

SHINAGAWA, K. Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, p. 125- 142, 1990.

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

SHINAGAWA, K.; KONUMA, H.; TOKUMARU, M.; TAKEMASA, N.; HASHIGIWA, M.; SHIGEHISA, T.; LOPES, C.A.M. Enumeration of aerobic spore-formers and *Bacillus cereus* in meat product additives. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 8, p. 648-650, 1988.

SIEGEL, J.P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* - based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.77, p.13-21, 2001.

SILVA JR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 6ª ed. São Paulo: Varela; 2008, 625 p.

SILVA, J. A. As novas perspectivas para o controle sanitário dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 65, p. 19-25, 1999.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, A. R. *Bacillus cereus*. In: Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. cap. 11, p. 149-160.

SILVEIRA, V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M. A. B.; SARUWTARI, J.H.; CHICOUREL E.L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 49, n. 1, p. 19-25, 1989.

SIMONE, E.; GOOSEN, M.; NOTERMANS, S.H.W.; BORGDORFF, M.W. Investigations of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991 to 1994. **Journal of Food Protection**, v. 60, n.4, p.442-446, 1997.

SLATEN, D.D.; OROPEZA R.I.; WERNER, S.B. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning - are caterers supervised sufficiently. **Public Health Reports**, v. 107, n. 4, p. 477-480, 1992.

SOARES, C.M.; AZEREDO, R.M.C. de; KUAYE, A.Y. Análise da contaminação de preparações cárneas por *Bacillus cereus* em serviços de alimentação. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 169-175, 2005.

SOARES, C.M.; VALADARES, G.F.; AZEREDO, R.M.C. de; KUAYE, A.Y. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 504-510, 2008.

SOTO, F. R. M.; RISSETO, R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, A. M. G. Toxinfecção alimentar por *Bacillus cereus*: relato de caso. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 130, p.33-36, 2005.

SOUZA, C. de M.O. da C.C. de; ABRANTES, S. de M.P. Isolamento e Contagem de *B. cereus* em Amostras de Café Torrado e Moído comercializado no Município do Rio de Janeiro. **Revista Científica da UFPA**, v. 7, n. 1, 2009.

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

SOUZA, E.C.; PEREIRA, W.D.; FROEHLICH, A.;LIMA, G.M.S; SOUZA, L.I.O; SANTOS, M. da S.**Caracterização sanitária de sanduíches naturais comercializados na cidade de Maceió/AL**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25, 2009, Porto de Galinhas. Anais Eletrônicos... Porto de Galinhas-PE, 2009. Disponível em: <<http://sbmicrobiologia.org.br/pdf/cdsbm/resumos/R2340-1.html>>. Acesso em: 13 maio 2011.

SOUZA, I.B. de;**Aplicabilidade de um modelo para estimar o crescimento de *Bacillus cereus* em arroz-doce, em função da temperatura**. 2003. 71p. Tese realizada para a obtenção do título de Magister Scientiae. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2003.

SOUZA, J. C. R.; BARROS, G. C.; MEMDES, E. S.; MENDES, P. P.; ALVES, C. A. B. **Perfil microbiológico de alguns condimentos mais comercializados na grande Recife-PE**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18, 2002, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre-RS, 2002, p. 1415-1418. SPERBER, W.H. Hazard identification: from a quantitative to qualitative approach. **Food Control**, v.12, n. 4, p.223-228, 2001.

SPIRA, W.M.; GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus* - induced fluid accumulation in rabbit ideal 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 the International Dairy Federation**, s/v, n. 275, p. 4-8, 1992.

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

SUTHERLAND, D.A.; MURDOCH, R. Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, n.4, p.279-292, 1994.

SUWAN, S.; ISOBE, M.; OHTANI, I.; AGATA, N.; MORI, M.; OHTA, M. Structure of celeuride, a cyclic dodecadepsipeptide toxin from *Bacillus cereus* and studies on NMR characteristic of its alkali metal complexes including a conformational structure of the K⁺ complex. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, Cambridge**, v.30, n.7, p.765-775, 1995.

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

SVENSSON, B.; MONTHÁ, A.; SHAHEEN, R.; ANDERSSON, M.A.; SALKINOJA-SALONEN, M.; CHRISTIANSSON, A. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. **International Dairy Journal**, v. 16, n. p.740–749, 2006.

TAY, L.; GOH, K.T.; TAN, S.E. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning. **Singapore Medical Journal**, v. 23, n. 4, p. 214-217, 1982.

TE GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; GRANUM, P. E.; ROMBOUTS, F. M. 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, 1997.

TE GIFFEL, M. C.; BEUMER, R. R.; LEIJENDEKKERS, S.; ROMBOUTS, F. M. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. **Food Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 53-58, 1996.

TE GIFFEL, M.C. ; BEUMER, R.R. ; SLAGHUIS, B.A. ; ROMBOUTS, F.M. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. **Neth. Milk. Dairy Journal**, v. 49, n. 213, p. 125-138, 1995.

TERRANOVA, W.; BLAKE, P.A. *Bacillus cereus* food poisoning. **The New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 3, p. 143-144, 1978.

TODD, E.C.D. Foodborne disease in Canada - a 10-year summary from 1975 to 1984. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 2, p. 123-132, 1992.

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

UBOLDI-EIROA, M.N.; LEITÃO, M.F.F.; LEITÃO, R.F.F.; VITTI, P. Caracterização microbiológica de farinhas e amidos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 6, n. 2, p. 459-473, 1975.

UEDA, S.; YAMAZAKI, M.; MACHIDA A.; AKAO, A.; KUWABARA Y. Ecological study of *Bacillus cereus* in rice crop processing. III. Airborne *B. cereus* in rice mills. **Journal of antibacterial and Antifungal Agents**, v. 16, p. 459-464, 1992.

UNIÃO EUROPÉIA. European Food Safety Authority. **Scientific Report of EFSA: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks (Ano 2004 a 2009)**. Pesquisado em: 10 junho 2011.

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

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

VALLIM, D. B. **Deteção do grau de contaminação do arroz comercializado em restaurantes do tipo "self-service" da UNICAMP, com ênfase na incidência de *Bacillus cereus***. 1999. 84 p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1999.

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.

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

VARADARAJ, M.C. Methods for detection and enumeration of foodborne bacterial pathogens: a critical evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 1-13, 1993.

VARNAM, A.H.; EVANS, M. G. **Foodborne Pathogens: An Illustrated Text**. Saint Louis: Mosby Year Book, 1991, 557p.

VASCONCELLOS, F.C. da S. **Análise microbiológica de barras de cereais e cereais matinais, comercializados na cidade de Pelotas - RS**. 2006. 49p. Monografia de conclusão de curso. Instituto de biologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2006.

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

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI, O.D.; Bürger, K.P.; Cardozo, M.V.; Salloti, B.M. Cortez, A.L.L. *Bacillus cereus* enterotoxigênicos em diferentes fases do processamento de leite UAT. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 32-36, 2006.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI, O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra-alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

VIJAYALAKSHMI, G.; DWARAKANATH, C.T.; SREENIVASA MURTHY, V. Studies on *Bacillus cereus* contamination of rice and rice preparations. **Journal of Food Science and Technology**, v. 18, n. 6, p. 231-234, 1981.

VILAS-BÔAS, G.T., PERUCA, A.P.S.; ARANTES, O.M.N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 6, p.673-687, 2007.

WATANUKI, M.M.; **Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos à temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura.** 2008. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2008.

WESTHOFF, D.C.; DOUGHERTY, S.L. Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p.572-580, 1981.

WHO (World Health Organization), FIRST PAN-EUROPEAN CONFERENCE ON FOOD QUALITY AND SAFETY. **Foodborne Diseases are on the Rise In Europe - Fao/Who Call For Better Consumer Protection.** Press Release WHO/10, 2002.

WIJMAN, J.G.E.; LEEUW, P.P.L.A. de; MOEZELAAR, R.; ZWIETERING, M.H.; ABEE, T. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 1481-1488, 2007.

WONG, H.C.; CHANG, M.H.; FAN, J.Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 699-702, 1988.

YUSUF, I.Z.; UMOH, V.J.; AHMAD, A.A. Occurrence and survival of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in some Nigerian flour-based foods. **Food Control**, v. 3, n. 3, p. 149-152, 1992.

ZOTTOLA E.A. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry? **Food Technology**, v.48, n.7, p. 107-114, 1994.

ZOTTOLA, E.A. **Special techniques for studying microbial biofilms in food systems.** In: Food Microbiological Analysis New Technologies by TORTORELLO, L. M.; SENDEL, M.S., p.315-345. 1997. Ed. Marcel Dekker, Inc. N. York.