

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

LEON RABINOVITCH,* MARIA MARFISA A. VICENTE,*[†] THANIA V. GUAYCURÚS,*
JARINA PIMENTEL GOMES V. DE FREITAS** & ROBERTO PIMENTEL DE MESQUITA***

Cento e quatorze amostras de Bacillus cereus foram isoladas durante contagens presuntivas em placas a partir de dezoito grupos de alimentos, industrializados ou não, crus ou cozidos, pertencentes a dez classes. As contagens presuntivas para a espécie variaram entre 10² a 6 x 10³/g ou ml. Dentre estes isolamentos, treze amostras provieram de três casos de toxinfecção alimentar (envolvendo um mínimo de 57 indivíduos), e pareceram estar relacionadas com a toxinfecção em razão dos ensaios da qualidade bacteriológica dos alimentos ingeridos. Como procedimento adotado para correlacionar toxicidade e produção de doença no homem, os fluidos de cultivo de todas as amostras foram ensaiados quanto à capacidade de provocar aumento da permeabilidade capilar (APC) e necrose na pele de coelhos, assim como, morte de camundongos albinos. APC foi positivo em 86,85% das 114 amostras, morte de camundongos ocorreu em 65,79% e a combinação do APC e morte foi observada em 59,65%. APC mais necrose ou somente necrose ocorreram com 34,21% dos líquidos de cultivo. Morte, APC e necrose, associados, foram observados em 28,07% das amostras. APC, APC e morte com ou sem necrose, foram também evidenciadas nas amostras originárias de alimentos causadores de doença, o que confirma a conhecida individualidade de ação de alguns dos fatores promotores de intoxicação alimentar. As baixas contagens presuntivas de B. cereus, como 10²-10³/g ou ml, encontradas nos alimentos implicados ou não com toxinfecção alimentar, conduzem à recomendação de que o número de B. cereus por g ou ml de amostra de alimento deve ser reavaliado, aliando-se a isto a ampliação das classes de alimentos a serem conduzidas para o controle bacteriológico da espécie.

Nas últimas três décadas ficou evidenciada e aceita a etiologia do *Bacillus cereus* como agente principal de duas formas clínicas de toxinfecção alimentar para o homem (Midura et al., 1970; Mortimer & Mc Cann, 1974; Taylor & Gilbert, 1975; Spira & Goepfert, 1975; Raevuori et al., 1976; Melling et al., 1976; Turnbull, 1976; Portnoy, Goepfert & Harmon, 1976; Terranova & Blake, 1978; Parry & Gilbert, 1980; Johnson, Nelson & Busta, 1982). Relatos de surtos epidêmicos localizados, ocorrentes em diversos países, são encontrados na literatura (Midura et al., 1970; Mortimer & Mc Cann, 1974; Raevuori et al., 1976; Portnoy, Goepfert & Harmon, 1976; Terranova & Blake, 1978; Turnbull et al., 1979). As manifestações clínicas compreendem gastroenterite acompanhada de diarréias e dores abdominais, que se iniciam na maioria dos casos de 8 a 16 horas após a ingestão de alimentos contaminados, de modo similar aos sintomas causados por *Clostridium perfringens*, ou náuseas e vômitos dentro de 1 a 5 horas após a alimentação, à semelhança do que ocorre nas intoxicações causadas por estafilococos enterotoxigênicos (Spira & Goepfert, 1975; Melling et al., 1976; Turnbull, 1976; Parry & Gilbert, 1980; Johnson, Nelson & Busta, 1982).

A patogenia do *B. cereus* para o homem está relacionada com a existência de pelo menos duas entidades tóxicas, uma diarréica e outra emética (Spira & Goepfert, 1975; Melling et al., 1976; Turnbull, 1976; Turnbull, Nottingham & Grosh, 1977; Melling & Capel, 1978).

Enquanto que para Turnbull, Nottingham & Ghosh (1977) algumas amostras da espécie elaboram toxina capaz de destruir a parede intestinal e acumular líquido em alça ileal ligada de coelho, além de produzir necrose na pele de cobaia, Spira & Goepfert (1975) demonstraram uma enterotoxina (exotoxina) promotora do aumento da permeabilidade capilar (APC) na pele e reação positiva na alça ileal do coelho, culminando também por matar camundongos por via endovenosa.

Posteriormente, Turnbull et al. (1979) obtiveram evidências de que a enterotoxina de *B. cereus* tida como promotora de diarréia é uma proteína estável, de PM 50000 dal, separável da toxina emética, mais estável, de PM 5000 dal. Além disso, estes autores concluíram que tal enterotoxina era uma única entidade, letal para camundongos, piogênica e pirogênica para o homem, e conhecida na literatura como: "toxina, diarreagênica, agente diarréico, fator de acúmulo de fluido, fator de permeabilidade vascular, toxina dermonecrótica, e toxina intestionecrótica".

Na condição de bacilo produtor de esporo e disseminado no solo, o *B. cereus* é ubíquo, fato que contribui para que seja encontrado em alimentos os mais variados, crus ou não, o que torna particularmente

Projeto em realização com suporte da Secretaria de Ciência e Tecnologia – Ministério da Saúde, MS.

Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia* e Departamento de Patologia,*** Caixa Postal 926, 20000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Laboratório Central de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.**

[†] *In memoriam.*

Recebido para publicação em 6 de abril e aceito em 1º de outubro de 1984.

clássicos os casos de intoxicações coletivas após ingestão de arroz frito (Mortimer & Mc Cann, 1974; Turnbull, 1976; Terranova & Blake, 1978) onde o sorotipo 1 parece predominar sobre os demais sorotipos, em virtude de seus esporos apresentarem considerável termorresistência (Parry & Gilbert, 1980).

Por todos estes motivos, esta bactéria tem importância do ponto de vista sanitário, figurando nos manuais de controle microbiológico de alimentos, sendo pesquisada com preponderância nos de origem fari-nácea. A Food and Drug Administration – Bureau of Foods (1976), estatui que o *B. cereus* presente já na contagem de 1×10^7 /g apresenta potencialidade para causar toxinfecção alimentar. No Brasil, a legislação própria (Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos, CNNPA-MS, Resoluções nº 20 de 1976 e nº 13 de 1978) admite como níveis condenatórios da presença de *B. cereus* em cereais e derivados, amido, farinhas e féculas, misturas para sopas e caldos, a proporção de 1×10^3 células/g de alimento. Para os alimentos infantis destinados a lactentes, pré-escolares e escolares, o limite de tolerância máxima é de 1×10^3 /g, exceto para crianças de 0 a 1 ano de idade, quando o limite máximo permitido passa a ser de 1×10^2 células/g (Resolução nº 20, de 1976).

Em comunicação anterior deste Laboratório, Vicente et al. (1983) constataram a existência de amostras de *B. cereus* produtoras de toxinas em diferentes alimentos industrializados, sendo então tal pesquisa ampliada com o objetivo de se atingir uma abrangência maior em termos de exame de alimentos mais variados, industrializados ou não, crus ou cozidos. Buscava-se com isto o correlacionamento daquele fato com a ocorrência em nossa comunidade de surtos epidêmicos ocasionais de toxinfecções alimentares, cujos agentes bacterianos causais outros (*Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* e *Cl. perfringens*), reconhecidamente causadores não foram surpreendidos e, assim, não puderam ser incriminados.

O presente trabalho mostra os resultados de um levantamento, que sugere a necessidade de alteração dos atuais padrões oficiais microbiológicos, no concernente a *B. cereus* encontrado em diferentes classes de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Alimentos examinados: as amostras utilizadas em todo o trabalho provieram de alimentos submetidos às análises de: orientação técnica, prévia, fiscal, de controle e de requisição, registradas num período de dezesseis meses no Laboratório Central de Saúde Pública (LCSP), Rio de Janeiro. Cada amostra foi submetida ao processo de contagem bacteriana o mais rápido possível, em seguida aos tratamentos e diluições. Alimentos perecíveis eram analisados imediatamente e, quando necessário, eram armazenados a $-18^{\circ}\text{C}/24\text{h}$, no máximo. Os casos de toxinfecção alimentar epidêmica localizada ocorreram em refeitórios de fábricas privadas e repartições públicas sediadas no Rio de Janeiro, onde o número de acontecimentos ultrapassou a pelo menos 57 casos, todos relacionados com histórias de náuseas, vômitos, dores abdominais e/ou diarreias. Dos alimentos aí implicados obteve-se amostragens colhidas aleatoriamente e, por vezes, mais de uma amostra de um mesmo alimento foi levada aos exames de controle bacteriológico. Somente em uma história, a provocada por chocolate branco em barra, o número de pessoas acometidas foi de dois. Os alimentos estudados foram grupados conforme as classes e grupos constantes da Resolução nº 13, de 1978, CNNPA-MS (Tabela I).

Isolamento de *B. cereus* dos alimentos: foi seguida a metodologia adotada pelo Instituto Adolfo Lutz, e LCSP, que está baseada nos procedimentos da Food and Drug Administration – Bureau of Foods (1976) – FDA – e da American Public Health Association (1976) – APHA – com algumas modificações: 11 ml ou 11 g do produto eram transferidos para 99 ml de tampão Butterfield pH 7,2 (leito e derivados) ou salina (NaCl, 0,85%) peptonada 0,1% (para os demais alimentos), fazendo-se a homogeneização vigorosa em recipiente estéril. Seguiam-se as diluições de 1 ml do homogeneizado nos mesmos diluentes, em séries decimais até 10^{-3} . Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição eram semeadas em placas com o meio seletivo-indicador ágar-vermelho de fenol-gema do ovo-polimixina (MYP), no qual a polimixina B foi substituída pela polimixina E (sulfato de colistin). Bons resultados foram obtidos sem inconvenientes, comparáveis ao meio MYP + polimixina B, empregando-se Colistin Lafi (procedimento do LCSP), na proporção de 50,0 U/ml, sem a necessidade de filtração prévia. A incubação era a $33^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 48h. Colônias lecitinase-positivas no meio MYP foram contadas, usando-se o número médio oriundo de três placas (número total de colônias/número de placas). As colônias produtoras de reações típicas eram passadas para ágar nutriente, no sentido de se verificar microscopicamente o aspecto e a pureza da cultura. Em seguida eram submetidas aos testes da catalase, de ágar-gelatina, de ágar-amido, a série de açúcares (manita, xilose, maltose, arabinose, salicina e glicose), usando-se ainda outras provas para confirmar a espécie, tais como: nitrato, acetil-metil-carbinol (VP), mobilidade, NaCl a 5%, 7% e 10%, ágar-anaeróbico, sorbitol, dimensões celulares, presença de corpo para-esporal e prova de hemolisina (Gordon, Haynes & Pang, 1973; Gibson & Gordon, 1974; APHA, 1976; FDA, 1976).

Os comportamentos bioquímico e morfológico das amostras isoladas foram sempre comparáveis aos do *B. cereus* NCTC 2599, neotipo, empregado neste trabalho. Todos os isolados de *B. cereus* foram crescidos em ágar extrato-de-solo por 4-7 dias a $33-35^{\circ}\text{C}$, sendo que os esporos produzidos foram transferidos e mantidos em solo estéril seco (Gordon, Haynes & Pang, 1973), de onde partiram os cultivos subsequentes para as experiências de toxicidade.

Outros microrganismos que não *B. cereus*: em todos os alimentos foram determinados: bactérias dos grupos coliforme fecal e não fecal (número mais provável), *Salmonella* sp., clostrídios sulfito-redutores

a 44°C, *Staphylococcus aureus*, leveduras e bolores, além da contagem padrão em placas. A metodologia foi a mesma citada no item anterior.

TABELA I
Classes e grupos de alimentos, conforme a Resolução nº 13/78 - CNNPA - MS, dos quais se isolou *B. cereus*

Classes	Grupos
I Frutas e hortaliças	e - Hortaliças frescas, refrigeradas ou congeladas consumidas sem cocção
II Carnes e produtos cárneos	a - Carnes cruas c - Produtos cárneos cozidos e - Produtos cárneos curados
V Leite e produtos de laticínios	a - Leite pasteurizado do tipo B c - Leite em pó d - Leite fermentado
VII Cereais e derivados, massas alimentícias, produtos de panificação	e - Pão e produtos de panificação g - Cereais flocados, inflados e laminados h - Fermentos biológicos
IX Produtos a serem consumidos após adição de líquido, com emprego de calor	b - Mistura para sopas e caldos c - Misturas ou pós para sobremesas
X Produtos a serem consumidos após adição de líquido sem emprego de calor	a - Mistura ou pós para o preparo de bebidas
XI Alimentos sólidos prontos para consumo	b - Especiarias e condimentos preparados em pós
XV Condimentos e molhos preparados	g - Molhos preparados
XVI Produtos de confeitaria e similares, doces e salgados	e - Chocolate h - Pastéis, empadas e outros salgados prontos para o consumo
XVIII Gelados comestíveis	Grupo único

Comprovação da toxicidade das amostras isoladas: de cada alimento analisado, pelo menos duas colônias de *B. cereus* foram ensaiadas quanto à toxidez para animais de laboratório, exceto para os alimentos das Classes XVIII e XVI e dos quais utilizou-se uma colônia de cada. Para esta finalidade, dois procedimentos foram adotados e em ambos o *B. cereus* NCTC 2599 foi utilizado como exemplo de resultados positivos: (1) - **Inoculação de fluido de cultivos em camundongos albinos (suíços) machos ou fêmeas** - Para estes ensaios, esporos das amostras eram germinados em infuso-cérebro-coração (GHI, E. Merck ou Difco) por 16-20h, seguindo-se a transferência de uma alça (3mm de diâmetro) para 50ml de BHI contido em dois Erlenmeyer de 150ml de capacidade cada, os quais permaneciam em agitador recíproco (120 oscilações/min.) a 27°C ± 1°C. O restante dos procedimentos seguiu em parte a rotina do método de Srivastava et al., 1981, o qual é uma adaptação daquele de detecção de toxina botulínica em alimentos, empregado pelo Center for Disease Control - USA (Anon., 1974).

Dos cultivos em crescimento narrados acima, 2ml de líquido eram transferidos para 4ml de gel-fosfato pH 6.2 (Srivastava et al., 1981) nos horários de 18, 24 e 30h, tempos evidenciados experimentalmente como adequados a surpreender o poder tóxico (efeito letal, APC e necrose). Por vezes, tempos de cultivos maiores mostravam inativação ou atenuação do poder tóxico.

As culturas em gel-fosfato correspondentes às tomadas de 18 a 24h eram mantidas a 0°C até o momento de serem ministradas com a alíquota colhida após 30h. O conjunto era centrifugado a 4.500 x g a 0°C por 40 min., e o sobrenadante límpido, com raras formas vegetativas, era dividido em três partes; uma para ser injetada (0,5ml) por via intraperitoneal em lotes de cinco camundongos, com pesos de 20-22g, e outra a ser injetada (0,5ml) após o aquecimento em banho-maria à temperatura de 100°C durante 5 min.

Uma fração deste líquido aquecido era guardada para o ensaio em coelhos. Dois camundongos recebiam BHI mais gel-fosfato (BHIT) na proporção 1 + 2, e outros dois não eram inoculados. Estes últimos procedimentos foram adotados como testemunhos para cada cultura bacteriana examinada, não se registrando qualquer morte em nenhum experimento. Considerava-se a existência de efeito tóxico quando pelo menos dois animais morriam dentro de 24h após a injeção. A rigor, a maioria das mortes se dava de poucos minutos até 14h. Cada amostra bacteriana teve o seu líquido de cultivo ensaiado duas vezes por este procedimento.

(2) – **Inoculação intracutânea de fluido de cultivos em coelhos** – Examinava-se o APC e a existência de necrose ao fim de 24h e cinco dias respectivamente. No dorso de coelhos albinos adultos, depilados à máquina e que recebiam 1h antes, pela veia marginal da orelha 40mg/kg de azul de Evans em água destilada estéril, eram injetados intradermicamente 0,3ml de uma terceira porção do sobrenadante obtido anteriormente. Cada animal permitia ensaiar pelo menos quatro diferentes amostras de *B. cereus*, sempre com testemunhos de BHIT. Considerava-se a existência do APC pela acentuação da cor azul a partir de uma distância mínima de 1 cm do ponto de inoculação. Cada fluido de cultivo foi ensaiado duas vezes. As zonas de necrose foram medidas em cm a partir da média de dois diâmetros perpendiculares e ressecados para estudo histológico, após a fixação em formalina neutra a 10%, cortadas na espessura de 5µm e coradas pela hematoxilina-eosina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 1983, Vicente et al., comunicaram haver isolado *B. cereus* de alimentos industrializados, cujos fluidos de cultivo determinavam a morte de camundongos (via intraperitoneal) e promoviam o APC na pele de coelhos. Alguns casos evoluíam para necrose.

Tanto quanto se pode saber através da literatura, este foi o primeiro relato de um conjunto de amostras de *B. cereus* providas de variadas naturezas de alimentos, comercializados e consumidos no Rio de Janeiro, muito embora nem todos elaborados neste Estado, que foi pesquisado quanto a provocar reações em animais de laboratório. Embora não únicos, morte de camundongo (Spira & Goepfert, 1975; Turnbull et al., 1979; Srivastava et al., 1981) e APC (Spira & Goepfert, 1975; Portnoy, Goepfert & Harmon, 1976; Turnbull et al., 1979) com ou sem necrose (Turnbull, Nottingham & Ghosh, 1977), são importantes parâmetros usualmente considerados para o relacionamento da toxicidez com a patogenicidade de *B. cereus* para o homem. A Fig. 1 ilustra um exemplo de necrose produzida pela amostra AL25 na pele de coelho ao fim de cinco dias.

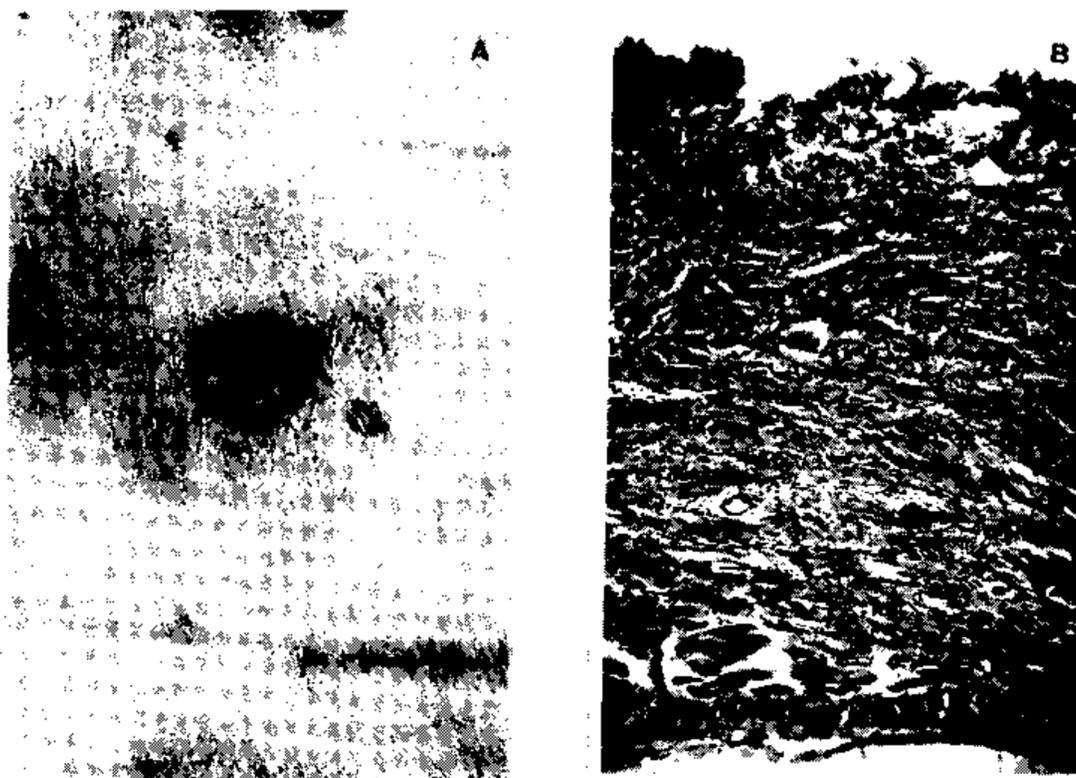


Fig. 1: necrose cutânea produzida na região dorsal de coelhos após injeção intradérmica de 0,3ml de centrifugado límpido de *B. cereus*, amostra AL 25, ao fim de cinco dias. A: aspecto macroscópico da lesão que é sempre bem delimitada e recoberta por uma crosta negra. B: corte histológico mostrando o centro desta lesão, onde se constata que a área de necrose atinge a epiderme, o derme e parte da camada muscular profunda, e apresenta um importante infiltrado inflamatório do tipo mononuclear (HE. 100 X).

Com a continuação destes trabalhos e ampliando-se o naipe de alimentos levados ao exame da qualidade microbiológica, em dezoito grupos integrantes de dez classes de alimentos, de um total de dezoito classes previstas na Resolução nº 13/78 CNNPA-MS (Tabela I), obteve-se 114 amostras de *B. cereus*. Os respectivos fluidos de cultivo foram pesquisados quanto a duas modalidades de ação *in vivo*, figurando os resultados na Tabela II. Não figuram aqueles relacionados com o ensaio da toxicidez após o aquecimento a 100°C/5 min., que sempre foram negativos tanto para camundongos como para o APC em coelhos.

TABELA II

Amostras de *B. cereus* isoladas de diferentes classes e grupos de alimentos, e as respostas aos ensaios da toxidez dos líquidos de cultivos

Classes (*)	Grupos (*)	Amostras isoladas (**)	Contagem presuntiva de <i>B. cereus</i> por g ou ml	Toxinfecção (§)	Toxidez dos sobrenadantes das culturas		
					Em camundongos		Em Coelhos
					Morte	APC	Necrose
I	e	AL 102	400	N	S	S	N
	e	AL 103	400	N	S	S	N
	e	AL 104	400	N	S	S	N
II	a	AL 1	6000	S	S	S	+
	a	AL 2	6000	S	S	S	N
	a	AL 3	6000	S	S	S	N
	a	AL 4	6000	S	S	S	+
	a	AL 78	400	N	S	S	++
	a	AL 79	400	N	S	S	++
	a	AL 80	400	N	S	S	++
	a	AL 81	400	N	S	S	++
	c	AL 6	200	N	S	S	N
	c	AL 7	200	N	S	S	N
	c	AL 17	300	N	S	S	N
	c	AL 18	300	N	S	S	N
	c	AL 41	6000	S	S	S	N
	c	AL 42	6000	S	S	S	++
	c	AL 43	6000	S	S	S	++
	e	AL 21	200	N	N	S	N
	e	AL 27	200	N	S	S	++
V	a	AL 46	300	N	N	S	N
	a	AL 31	100	N	S	S	N
	a	AL 32	100	N	S	S	++
	a	AL 33	100	N	S	S	++
	a	AL 34	100	N	S	S	++
	a	AL 35	100	N	S	S	++
	a	AL 36	100	N	S	S	++
	a	AL 37	100	N	S	S	++
	a	AL 38	100	N	S	N	N
	a	AL 39	100	N	S	N	N
	a	AL 40	100	N	S	N	++
	a	AL 44	100	N	S	N	N
	a	AL 45	100	N	S	S	N
	a	AL 47	400	N	S	S	N
	a	AL 48	400	N	S	S	N
	a	AL 49	400	N	S	S	N
	a	AL 50	400	N	S	S	N
	a	AL 51	400	N	S	S	N
	a	AL 58	400	N	N	S	N
	a	AL 68	100	N	N	S	N
	a	AL 69	100	N	N	S	N
	a	AL 70	100	N	N	S	N
	a	AL 71	100	N	N	S	N
	a	AL 72	100	N	N	S	N
	a	AL 73	100	N	N	S	N
	a	AL 74	100	N	N	S	N
	a	AL 75	100	N	N	S	N
	a	AL 76	100	N	N	S	N
	a	AL 77	100	N	N	S	N
	a	AL 82	100	N	N	S	N
a	AL 87	100	N	N	S	N	
a	AL 83	200	N	S	N	N	
a	AL 84	200	N	S	N	N	
a	AL 85	200	N	S	N	N	
c	AL 16	300	N	S	S	N	
c	AL 88	1000	N	S	S	N	
c	AL 89	1000	N	S	S	N	
c	AL 90	1000	N	S	S	N	
c	AL 91	1000	N	S	S	N	
c	AL 92	1000	N	S	S	N	
c	AL 93	1000	N	S	S	N	
d	AL 52	300	N	S	S	+	
d	AL 53	300	N	S	S	++	
d	AL 54	100	N	S	S	+	
d	AL 55	400	N	S	S	++	
d	AL 56	200	N	S	S	++	
d	AL 57	100	N	S	S	+	
VII	b	AL 95	300	N	S	S	++
	e	AL 5	300	N	S	S	N
	g	AL 100	300	N	S	S	+

(continuação)

Classes (*)	Grupos (*)	Amostras isoladas (**)	Contagem presuntiva de <i>B. cereus</i> por g ou ml	Toxinfecção (§)	Toxidez dos sobrenadantes das culturas		
					Em camundongos		Em Coelhos
					Morte	APC	Necrose
	g	AL 113	300	N	S	S	+
	g	AL 114	300	N	S	S	N
	h	AL 22	1700	N	N	S	N
	h	AL 23	1700	N	N	S	N
	h	AL 24	1700	N	S	S	N
	h	AL 25	200	N	S	S	++
	h	AL 26	400	N	S	S	++
IX	b	AL 30	700	N	N	S	N
	b	AL 59	100	N	N	N	N
	b	AL 60	100	N	N	N	N
	b	AL 65	100	N	S	S	N
	b	AL 66	100	N	S	S	+++
	b	AL 86	100	N	S	S	+
	b	AL 8	300	N	S	S	N
	c	AL 19	300	N	S	S	N
	c	AL 20	300	N	S	S	N
	c	AL 67	100	N	N	S	N
	c	AL 96	400	N	S	S	++
	c	AL 97	400	N	S	S	++
	c	AL 98	400	N	S	S	++
	c	AL 99	400	N	S	S	++
	c	AL 105	1000	N	N	S	N
b	AL 101	1000	N	N	S	N	
X	a	AL 28	200	N	S	S	N
	a	AL 29	200	N	S	S	N
	a	AL 94	200	N	S	S	++
XI	b	AL 106	1000	N	N	S	N
	b	AL 107	1000	N	N	S	N
	b	AL 108	1000	N	N	S	N
	b	AL 109	1000	N	N	S	N
	b	AL 110	1000	N	S	S	++
	b	AL 111	1000	N	N	S	N
	b	AL 112	1000	N	N	S	N
XV	g	AL 61	800	N	N	S	N
	g	AL 62	800	N	N	S	N
	g	AL 63	800	N	N	S	N
	g	AL 64	800	N	N	S	N
XVI	e	AL 15	400	S	N	N	N
	h	AL 9	500	S	S	S	N
	h	AL 10	500	S	N	S	+
	h	AL 11	500	S	S	S	+
	h	AL 12	500	S	S	S	N
	h	AL 13	500	S	N	S	+
XVIII	(£)	AL 14	300	N	N	S	N

(*) Distribuição dos alimentos conforme classificação da Resolução CNNPA-MS nº 13/78. (**) Confirmadas como *B. cereus*.

(§) Relacionamento do alimento com toxinfecção alimentar. S = positivo. N = negativo. + = 1 a 1,5 cm; ++ = 1,6 a 2,5 cm; +++ = >2,5 cm. (£) = Grupo único.

Neste último caso, não se pôde reproduzir as observações anteriores de Vicente et al. (1983), nas quais dois líquidos de cultivo de duas amostras de *B. cereus* forneceram positividade de APC nas condições de aquecimento mencionadas. Possivelmente isto se deve ao fato de que, no presente trabalho, somente se considerou a reação positivada quando a acentuação da cor azul era medida a partir de uma distância igual ou superior a 1 cm do ponto de inoculação, não sendo considerados valores menores.

A Tabela II mostra que, no período do levantamento considerado, ocorreram surtos de toxinfecção alimentar em três ocasiões distintas, envolvendo ingestão de classes diferentes de alimentos que foram submetidos à análise fiscal.

Assim, as amostras AL 1, AL 2, AL 3 e AL 4 relacionadas com um destes surtos e providas de alimentos da Classe II grupo a (carnes cruas), foram letais para camundongos, exibindo o APC positivo. Somente AL 1 e AL 4 produziram necrose. Ainda na Classe II mas do grupo c (produtos cárneos cozidos), as amostras AL 41, AL 42 e AL 43, também relacionadas com alimentos envolvidos em toxinfecção, foram letais para camundongos e exibiram o APC; somente AL 42 e AL 43 adicionalmente foram necrosantes.

Na Classe XVI, grupo *e* (chocolate branco em barra) e *h* (empadão de galinha), das seis amostras ensaiadas e envolvidas em toxinfecção alimentar, unicamente AL 9, AL 11 e AL 12 foram letais para camundongos, mas todas revelaram-se positivas para o APC exceto AL 15. AL 10, AL 11 e AL 13 foram as únicas produtoras de necrose. É conhecido que nem todas as amostras de *B. cereus* isoladas de alimentos são capazes de elaborar a fração tóxica responsável por esta propriedade (Turnbull, Nottingham & Ghosh, 1977). Por outro lado, a amostra AL 15 não foi estimuladora de pelo menos uma reação. Possivelmente, a linhagem bacteriana não era do tipo produtor de reações detectáveis pelos procedimentos empregados, ou mesmo não excretava exotoxinas. Tal comportamento foi igual aos das amostras AL 59, AL 60, AL 69, AL 70, AL 71, AL 72 e AL 76.

De outro modo, como frutos de análises não fiscais, observa-se que um número apreciável de amostras de *B. cereus*, 101, isoladas de diferentes alimentos, não envolvidos com processos patológicos, mostraram-se produtoras de morte e/ou do APC, com ou sem necrose. Assim, com base na variabilidade das respostas encontradas, as amostras de *B. cereus* figurantes na Tabela II puderam ser arranjadas em grupos que refletem modelos de toxidez ou inocuidade para os animais de laboratório experimentados (Tabela III). Denota-se que APC é a reação mais constante com um total de 86,85% de ocorrência, seguida de morte com 65,79% e sua combinação com APC soma 59,65%. O APC mais necrose ocorreram em 34,21% das vezes e só necrose 34,21%. Todavia, morte, APC e necrose juntos ocorreram somente em 28,07% das amostras, e as demais combinações parecem não apresentar maiores significados. Estes resultados corroboram os de Turnbull, Nottingham & Ghosh (1977), em que nem todas as amostras de *B. cereus* elaboram toxina necrosante para mucosa intestinal e pele animal, e os de Turnbull et al. (1979), que admitem a existência de dois fatores envolvidos na letalidade de camundongos, um dos quais associados à toxina do APC, o que explicaria o fato de que nem sempre o APC é seguido de necrose e morte de camundongo.

TABELA III

Modelos de reações em animais de laboratório promovidos por 114 amostras de *B. cereus* originárias de alimentos relacionados ou não com toxinfecção alimentar

Morte ^a	APC [§]	Necrose [§]	M	% (*)
+	+	+	32	28,07
+	-	-	7	6,14
+	+	-	36	31,58
-	+	+	7	6,14
-	+	-	24	21,06
-	-	-	8	7,01
Totais 65,79%	86,85%	34,21%	114	100

^a = Camundongo. [§] = Pele de coelho. M = Vezes em que ocorreu o modelo na população total de 114 amostras estudadas. (*) = Percentagem da ocorrência do modelo, calculada sobre a população total. + = Reação presente. - = Reação ausente.

Outros aspectos interessantes adicionais são observados na Tabela II. Um deles diz respeito à correlação entre a contagem presuntiva de *B. cereus*/g ou ml de alimento, e a ocorrência ou não de casos localizados de epidemias de toxinfecção alimentar. Um segundo evidencia que a bactéria é surpreendida em diferentes classes de alimentos, estes não envolvidos com toxinfecção alimentar, mas presente em contagens presuntivas similares àquelas constatadas nos alimentos que foram implicados com os casos de doença. Os dados são sugestivos de que um alimento que apresente contagem presuntiva de colônias de *B. cereus* situadas dentro dos limites máximos, 10^2 /g ou ml - 10^3 /g ou ml, admitidos pelas Resoluções CNNPA-MS nº 20/76 e 13/78, respectivamente, têm chances de gerar toxinfecção alimentar. Contudo, nem todas as amostras de *B. cereus* isoladas de alimentos relacionados com casos patológicos evidenciaram ser positivas ao mesmo tempo para morte de camundongos, o APC e necrose. Nos acometimentos de toxinfecção aqui apresentados, o número levantado foi de pelo menos 57 pessoas, cujas diferentes classes de alimentos ingeridos foram submetidos às análises fiscais, que acusaram tal espécie bacteriana, sem qualquer destaque incriminador para enterobactérias patogênicas, *S. aureus* ou *Cl. perfringens*. Além disso, as baixas contagens presuntivas encontradas podem ser indicadoras de que os alimentos envolvidos com toxinfecções alimentares (Tabela II) não permaneceram estocados em condições suficientemente permissíveis para a proliferação da espécie e, por conseguinte, excreção de elevadas concentrações de enterotoxinas.

Todavia, estes achados contrastam com os existentes na literatura. Depreende-se que a concepção geral é de que a intoxicação se manifesta quando a contagem do agente etiológico por unidade de volume ou peso de alimento está em números elevados (variáveis de 10^3 a 10^9) e dependente da multiplicação do germe no alimento (Midura et al., 1970; Anon, 1972; Portnoy, Goepfert & Harmon, 1976; Raevuori et al., 1976; Terranova & Blake, 1978; Parry & Gilbert, 1980). Estes números contrastam com os registrados no presente trabalho, cujos maiores valores não suplantaram a 6×10^3 /g em dois casos (Tabela II).

No Brasil, a literatura pertinente é escassa, mas, indiretamente, alguma suspeita foi levantada recentemente quando, em Campinas, São Paulo, "em dois restaurantes de uma mesma instituição, grande número de pessoas apresentou sintomas de doença gastrointestinal, caracterizada por diarreia profusa, acompanhada de náuseas, vômitos e dores abdominais", ficando o *Cl. perfringens* e *B. cereus* considerados como os únicos possíveis agentes causais (Salzberg, Massaguer & Serrano, 1982). A relação agente/peso de alimento não ficou conhecida.

Por outro lado, ainda entre nós (Srivastava et al., 1981), o *B. cereus* teve destaque como bactéria toxigênica, letal para camundongos, encontrada como integrante da flora contaminante de carne de cabra levada ao comércio. Achado em contagens elevadas, 8×10^7 /g, acima dos valores legalmente permitidos, pareceu proliferar mesmo a -12°C juntamente com *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Fungos e *Salmonella* não foram encontrados. Curiosamente, Srivastava et al. (1981) mostraram que a permanência do efeito letal nos líquidos de cultivos de *B. cereus* injetados em camundongos eram lentamente inativados quando aquecidos a 100°C . Com 20 min. de aquecimento ainda havia "fator de letalidade" residual. Nossos achados, contudo, evidenciaram a ausência da atividade biológica neste particular, já com 5 min., quando não mais se observou morte de camundongos ou APC com todos os fluidos das amostras ativas. Estes resultados podem ser comparados com os de Spira & Goepfert (1975), que obtiveram negatividade na promoção de APC e aumento de volume da alça ileal de coelhos, usando tratamentos mais brandos como $56^\circ\text{C}/5$ min. O mesmo efeito não era observado com aquecimentos de $45^\circ\text{C}/30$ min. Em contraposição, a toxina emética produzida pelo *B. cereus* 4810/73 de Melling & Cepel (1978) mostrou-se estável mesmo a $126^\circ\text{C}/90$ min., não produzindo APC mas matando camundongos conforme Turnbull et al. (1979). Estas variações do comportamento das toxinas ainda carecem de ser melhor explicadas.

Nas contagens realizadas em alimentos desidratados, Delazari et al. (1978) mostraram que 15,9% das 805 amostras estudadas em farinhas, sopas, leite integral e desnatado, o *B. cereus* figurava com valores mais elevados ($> 10^3$ /g) que os limites admitidos à época pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos na sua Resolução nº 34/77. Estes autores sugeriram um controle de qualidade rígido para adequar os alimentos ou insumos à legislação em vigor.

Com respeito ao nosso ponto de vista, julgamos que os limites permitidos de contagem presuntiva, pela atual Resolução, devam ser reformulados em seguida a mais estudos. Além disso, pode-se sugerir que o controle de *B. cereus* deve ser ampliado para outras classes de alimentos, haja vista que ficou demonstrado que a potencialidade de toxidez existe na maior parte das amostras de *B. cereus* surpreendidas em nosso meio — se considerarmos isoladamente morte de camundongo ou APC —, estejam elas em alimentos cozidos ou não, e não somente em amidos, farinhas, féculas, misturas para sopas e caldos, como estipulado nas normas atuais em vigor.

SUMMARY

One hundred and fourteen strains of *Bacillus cereus* were isolated during presumptive plate-counts from 18 groups of industrialized, non-industrialized, crude or cooked food, belonging to 10 separate classes. Specific presumptive counts ranged from 10^2 to 6×10^3 /g or ml. Among these isolates, 13 strains were derived from 3 outbreaks of food poisoning (involving a minimum of 57 people), as determined by the assayed bacteriological quality of the ingested foods. As an adopted procedure to correlate toxicity and ability to promote illness in man, culture fluids of all strains were assayed to determine their ability to increase vascular permeability (APC) to cause necrosis in rabbits skin and to kill albino mice. APC was positive in 86,85% of the 114 strains, death of albino mice occurred in 65,79% and a combination of APC and death was observed in 59,65%. APC plus necrosis, or only necrosis, occurred with 34,21% of the culture fluids. Death, APC and death with or without necrosis, were demonstrated in the strains implicated with illness. This confirmed the known individuality of action exhibited by certain *B. cereus* food-borne toxigenic factors. The low presumptive counts of this bacterium in the order of 10^2 - 10^3 /g or ml found in food, implicated or not with illness, suggests that the recommended number of *B. cereus* per g or ml of food sample should be reevaluated in our country. Furthermore, a wider range of food should be brought under bacteriological sanitary control for this species.

AGRADECIMENTOS

Os melhores agradecimentos são dirigidos à SUPLAN-FIOCRUZ, ao Professor Hélio Gelli Pereira pela revisão do texto em inglês, assim como, à participação técnica de Fernando José M. de Vasconcellos, Yara Frazão Rosário e Francisco Manoel da Costa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Speck, M.L. (ed.), ALPHA, Washington, D.C.
- ANÔNIMO, 1972. Epidemiology. Food poisoning associated with *Bacillus cereus*. *Brit. Med. J.*, 1 :189.
- ANÔNIMO, 1974. Center for Disease Control. Botulism in the United States, 1899-1973. *Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers*. HEW/PHS. HEW no. 74-8279. CDC, Atlanta/Ga.

- COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS – Ministério da Saúde, Resolução nº 20/76, publicada no Diário Oficial da União, Seção I, Parte I, de 25 de outubro de 1976.
- COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS – Ministério da Saúde, Resolução nº 13/78, publicada no Diário Oficial da União, Seção I, Parte I, de 27 de junho de 1978 e 25 de julho de 1978.
- DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M. & EIROA, M.N.U., 1978. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. *Bol. Inst. Tec. Alimentos (ITAL)*, 60 :31-40.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – Bureau of Foods., 1976. *Bacteriological Analytical Manual of Foods*, Chap. XVI. *Bacillus cereus*, p. XVI. V.
- GIBSON, T. & GORDON, R.E., 1974. Endospore-forming Rods and Cocci. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., Buchanan & Gibbons, N.E. (ed.), Williams & Wilkins Co., pp. 529-575.
- GORDON, R.E.; HAYNES, W.C. & PANG, C.H.N., 1973. The Genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook no. 427*. Washington, D.C., U.S. Department of Agriculture.
- JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L. & BUSTA, F.F., 1982. Germination and Heat Resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses. *J. Food Sci.*, 44 :1268-1271.
- MELLING, J. & CAPEL, B.J., 1978. Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin. *FEMS – Microbiology*, 4 :133-135.
- MELLING, J.; CAPEL, B.J.; TURNBULL, P.C.B. & GILBERT, R.J., 1976. Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *J. Clin. Path.*, 29 :938-940.
- MIDURA, T.; GERBER, B.A.M.; WOOD, R. & LEONARD, A.R., 1970. Outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus*. *Public Health Rep.*, 85 :45-48.
- MORTIMER, P.R. & McCANN, G., 1974. Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *The Lancet*, 1 :1043-1045.
- PARRY, J.M. & GILBERT, R.J., 1980. Studies of the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boiled rice. *J. Hyg. Camb.*, 84 :77-82.
- PORTNOY, B.L.; GOEPFERT, J.M. & HARMON, S.M., 1976. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts. *Amer. J. Epidemiol.*, 103 :589-594.
- RAEVUORI, M.; KIUTAMO, T.; NISKANEN, A. & SALMINEN, K., 1976. An outbreak of *Bacillus cereus* food-poisoning in Finland associated with boiled rice. *J. Hyg. Camb.*, 76 :319-327.
- SALZBERG, S.S.; MASSAGNER, P.R. & SERRANO, A.M., 1982. Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. *Rev. Microbiol., São Paulo*, 13 :26-30.
- SPIRA, W.M. & GOEPFERT, J.M., 1975. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Can. J. Microbiol.*, 21 :1236-1246.
- SRIVASTAVA, K.C.; PAZ, A.A.; SARIDAKIS, H.D. & CASTRO, S.R.P., 1981. Microbiology of frozen goat meat and toxin production by *Bacillus cereus* isolated therefrom. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B* 174 :125-132.
- TAYLOR, A.J. & GILBERT, R.J., 1975. *Bacillus cereus* food poisoning: a provisional serotyping scheme. *J. Med. Microbiol.*, 8 :543-550.
- TERRANOVA, W. & BLAKE, P.A., 1978. *Bacillus cereus* food poisoning. *The New England J. Med.*, 298 :143-144.
- TURNBULL, P.C.B., 1976. Studies on the production of enterotoxins by *Bacillus cereus*. *J. Clin. Path.*, 29 :941-948.
- TURNBULL, P.C.B.; KRAMER, J.M.; JÖRGENSEN, K.; GILBERT, R.J. & MELLING, J., 1979. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 32 :219-228.
- TURNBULL, P.C.B.; NOTTINGHAM, J.F. & GHOSH, A.C., 1977. A severe necrotic enterotoxin produced by certain food, food-poisoning and other clinical isolates of *Bacillus cereus*. *J. Exp. Path.*, 58 :273-280.
- VICENTE, M.M.A.; RABINOVITCH, L.; GUAYCURÚS, T.V. & FREITAS, J.P.G.V., 1983. Resultados preliminares sobre a incidência de *Bacillus cereus* em alimentos industrializados. *Ciência & Cultura (Supl.)*, 35 :605.