



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

IMPORTANCIA E INCIDENCIA DE
BACILLUS CEREUS EN ALIMENTOS

Trabajo Monográfico de Actualización

Presentado por

SILVIA VEGA MORENO

Para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

- 1987 -



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1.	INTRODUCCION	6
2.	ANTECEDENTES	9
3.	CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS GENERALES DE <u>BACILLUS CEREUS</u>	13
4.	IMPORTANCIA DE <u>BACILLUS CEREUS</u> EN ALIMENTOS	17
5.	INCIDENCIA DE <u>BACILLUS CEREUS</u> EN ALIMENTOS	25
5.1	Aislamiento e identificación de <u>Bacillus cereus</u> en alimentos.	32
6.	TOXINAS PRODUCIDAS POR <u>BACILLUS</u> <u>CEREUS</u>	38
6.1	Toxinas producidas por <u>Bacillus</u> <u>cereus</u> en alimentos.	44
6.2	Características de la toxina que produce diarrea.	50
6.3	Toxina que produce vómito.	51
6.4	Características de la toxina que provoca el vómito.	55

6.5 Acción de toxinas producidas por <u>Bacillus cereus.</u>	58
7. EFECTOS DE AGENTES FISICOS Y QUI MICOS EN LA ESPORULACION DE <u>BACI</u> <u>LLUS CEREUS</u>	60
8. UTILIZACION DE AGENTES QUIMICOS PARA EL CONTROL A <u>BACILLUS CEREUS</u>	68
9. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	71
10. BIBLIOGRAFIA	78

1. INTRODUCCION

Los trastornos gastrointestinales son la causa principal de morbilidad en gran diversidad de países, sobre todo en aquellos que, como México, se encuentran en vías de desarrollo.

La Secretaría de Salubridad y Asistencia registra a Nivel Nacional numerosos casos de gastroenteritis cada año, siendo una de las causas de esta enfermedad las toxiinfecciones de origen alimenticio debidas a bacterias. La incidencia real, sin embargo, puede ser mucho más alta debido a que muchas personas afectadas no buscan tratamiento médico o, si lo hacen, puede parecer que presentan trastornos esporádicos, por lo que no se siguen investigaciones detalladas. Aunque la mortalidad es usualmente baja, los malestares entéricos contribuyen a una considerable morbilidad.

Se reconocen tres grupos principales de bacterias productoras de intoxicaciones de origen alimenticio: el primer grupo requiere de la multiplicación de los microorganismos en el tubo digestivo del huésped para provocar la infección; el segundo grupo comprende aquellas bacterias que producen toxinas en el alimento antes de ser consumido las cuales son la causa directa de la enfermedad; por último, en el tercero se agrupan los microorganismos cuyo mecanismo de acción no es bien conocido, es decir, no se sabe si actúan por sus toxinas o por su multiplicación en el aparato digestivo. Existe una estrecha relación entre los dos últimos grupos, ya que ambos necesitan de la presen

cia elevada de microorganismos en el alimento para que se manifieste la enfermedad. Al tercer grupo pertenecen Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium y Bacillus cereus (1,2).

Bacillus cereus es una bacteria que es relacionada con intoxicaciones alimentarias y trastornos gastrointestinales desde 1950 (3). Hasta la fecha se conocen dos tipos de intoxicaciones alimentarias causadas por Bacillus cereus. El primer tipo de intoxicación, se caracteriza por un período variable de 1 a 16 hs. entre la ingestión del alimento y la aparición de los síntomas, producción de diarrea que va desde ligera hasta profusa, dolores abdominales, náuseas y, ocasionalmente vómitos. Los alimentos involucrados son: carnes, sopas, verduras, salsas, postres, pescados, pastas, especias, cereales, helados, etc. (3,4,5).

El segundo tipo de intoxicación tiene un período de incubación más corto, de 1 a 5 hs. Los síntomas que se presentan son náuseas y vómitos. A diferencia del primer tipo de intoxicación el único alimento involucrado es el arroz (3,4,5).

En los Estados Unidos el número de reportes de intoxicaciones alimentarias por Bacillus cereus es muy inferior a los detectados en Gran Bretaña y en el Este de Europa. La escasa severidad de los síntomas puede contribuir a explicar el bajo número de reportes de este tipo de padecimientos en muchas partes del mundo (6,7).

El objetivo de este trabajo es investigar: (1) que alimentos están involucrados en intoxicaciones causadas por Bacillus cereus; (2) las condiciones que favorecen el desarrollo de Bacillus cereus y (3), las características de las toxinas producidas por el microorganismo en los alimentos.

2. ANTECEDENTES

En 1950 en Noruega se publica el primer informe completo sobre intoxicaciones alimentarias asociadas con Bacillus cereus. En la investigación de 4 brotes que involucran a 600 personas afectadas, se encuentra que el alimento responsable es una salsa de vainilla la cual permanece a temperatura ambiente durante -- 24 hs. Las muestras de salsa analizadas contienen de 25×10^6 a 110×10^6 de B. cereus por ml. El período de incubación en los pacientes es 10 a 12 hs. y los síntomas presentados son: dolor abdominal, diarrea, náusea y ocasionalmente vómito (tabla No. 1) (4,5).

Entre los brotes comentados por Goepfert y Spira algunos son muy importantes (4). Uno de ellos, acontecido en Italia en 1952 se debe al consumo de sopa de pollo que al ser analizada -- contiene 60×10^9 de B. cereus por g. En 11 brotes citados por -- Clarenburg y Kampelmacher en Holanda, los alimentos involucrados son sopas, papas en puré, carne, arroz y budines con una -- concentración del microorganismo de 5×10^5 a 2×10^8 por g. (tabla No. 1) (71).

Nikodemusz en 1958 describe un brote de intoxicación (72). De un total de 175 personas que consumen el alimento 65 presentan los síntomas de intoxicación mencionados anteriormente. El alimento involucrado es una sopa de verduras que sirve como medio para el desarrollo del microorganismo. (tabla No. 1). Bacillus cereus no se logra aislar de las heces de los pacientes.

En 1962, Nikodemusz reporta 51 brotes de intoxicación en Hungría, de los cuales 35 son atribuidos a B. cereus y afectan aproximadamente a 800 personas (73). Los alimentos contaminados son: salsas, sopa de verdura, carne y pastelitos con crema. La cantidad de B. cereus en los alimentos varía de 36×10^6 a 95×10^7 por g. El análisis de la muestra fecal revela la presencia de B. cereus en sólo 4 brotes (tabla No. 1) (4,5).

Los reportes de los investigadores húngaros resultan muy singulares por la frecuencia con que ese país aparece afectado por el microorganismo. Durante el período 1960-1966, se reportan 88 brotes (4.4% del total) con 3,560 personas afectadas -- (11% del total), cifras que ascienden respectivamente a 8.2% y 15.2% en el lapso de 1960-1968; 3 de cada 5 brotes son causados por alimentos cárnicos condimentados. Se especula que las especias utilizadas constituyen la fuente de contaminación de B. cereus; el microorganismo sobrevive al cocimiento y después prolifera cuando el alimento se conserva a temperaturas superiores a la refrigeración. La concentración del microorganismo en el alimento varía de 45×10^3 a 9×10^8 por g. (tabla No. 1) (4).

En 1968 Nikodemusz califica a B. cereus como el tercer agente causante de intoxicación alimentaria durante el período 1960-1966 (74).

A partir de 1971 se conoce otro tipo de intoxicación alimentaria asociada únicamente al consumo de arroz. La causa de los incidentes se debe a B. cereus presente en cantidades ele-

**Tabla No. 1 Intoxicaciones alimentarias causadas
por B. cereus. (5).**

Año	País	Tipo de alimento	cuenta/ g ó ml.	No. de personas afectadas
(1950)	Noruega	Salsa de vainilla	25×10^6 - 110×10^6	600
(1952)	Italia	Sopa de pollo	60×10^9	No registrado
(1957)	Holanda	Sopas, puré de papa, carne, arroz y budín	5×10^5 - 2×10^8	No registrado
(1958)	Hungría	Sopa de verduras	No registrado	65
(1962)	Hungría	Salsas, sopa de ver- duras y pasteles	36×10^6 - 95×10^7	800
(1966)	Hungría	Carne condimentada	45×10^3 - 9×10^8	3560
(1972)	Gran Bretaña	Arroz	1×10^8	No registrado

vadas, sin embargo los síntomas no son los típicos descritos - anteriormente ya que éstos se caracterizan por vómitos, después de un periodo corto de incubación de 1 a 5 hs., y sin diarrea - (8).

En Gran Bretaña en 1972 se reporta un brote debido al consumo de arroz que contiene entre $1-1 \times 10^8$ de B. cereus por g. - En Estados Unidos a partir de 1969 se reportan algunos brotes, involucrandose en ellos arroz frito, carne y un preparado con frutas y verduras como vehículo del microorganismo (tabla No. - 1) (48).

El número de B. cereus presente en los alimentos involucrados en algunos brotes además del caso citado por Hauge, asciende a 1.3×10^6 por g. en un postre (budín); 10^6 /g en una sopa de pollo; 1×10^5 por g. en salchicha; 2.0×10^6 por g. en cerdo a la cacerola; 92×10^3 /g en crema de vainilla; 10×10^6 a 100×10^6 /g en carne cocida; 10^6 /g en salsa de vainilla; 2.1×10^6 /ml en leche; 6.0×10^3 a 3×10^8 /g en pollo cocido, datos todos ellos recopilados por Gilbert y Taylor entre 1950 y 1974 en diferentes países (5). De la materia fecal de los pacientes de estos brotes se recuperan cifras muy bajas del microorganismo (48).

Esta serie de reportes provocan estudios más profundos sobre B. cereus para tratar de esclarecer sus características y - su relación con las intoxicaciones alimentarias.

3. CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS GENERALES

DE BACILLUS CEREUS

Las características de la familia Bacillaceae, se encuentran en la parte No. 15 correspondiente a bacilos y cocos, formadores de esporas, del Bergey's manual, 8^a edición 1976 (9).

I células en forma de bastón

A. Aeróbicos o facultativos, usualmente producen catalasa

Género I Bacillus

B. Microaerófilicos; no producen catalasa

Género II Sporolactobacillus

C. Anaeróbicos

1.- No reducen el sulfato a sulfito

Género III Clostridium

2.- Reducen el sulfato a sulfito

Género IV Desulfotomaculum

II células esféricas, en paquete

Género V Sporosarcina

Existen 3 clasificaciones del Género Bacillus en relación al tipo de espora.

Grupo I: Bacilos formadores de esporas elipsoidales o cilíndricas, las cuales son centrales o terminales que no deforman el esporo-

rangio. Esporas con pared delgada. (en este grupo se incluye a B. cereus).

Grupo II: Esporas elipsoidales, raramente cilíndricas, centrales o terminales con deformación del esporangio, esporas con pared gruesa.

Grupo III: Esporas esféricas, que deforman el esporangio.

CARACTERISTICAS DE B. CEREUS

B. cereus es un bacilo en forma de cilindro, que mide de 1.0 a 1.2 micras de diámetro por 3.0 a 5.0 micras de largo, -- Gram positivo, móvil por medio de flagelos peritricos, formador de esporas que miden de 1.0 a 1.5 micras las cuales se desarrollan de 18 a 24 hs., aeróbico o anaeróbico facultativo. -- El microorganismo se desarrolla en caldo glucosa bajo condiciones anaeróbicas; se desarrolla a un pH de 5.2 y en rangos de temperatura de 10 a 48°C., con una temperatura óptima de 30°C.. También se encuentra ampliamente distribuido en tierra y polvo y debido a ésto es común en alimentos, provocando intoxicación (9,10,11).

Las cepas de B. cereus requieren de uno o varios aminoácidos. Las vitaminas no son requeridas. (9). El microorganismo hidroliza el almidón y la caseína, produce acetil-metil-carbinol (Voges-Proskauer), reduce los nitratos a nitritos, fermenta la glucosa, sacarosa y trehalosa. También se caracteriza como

no fermentador de la xilosa, lactosa, sorbitol, inositol, manitol, arabinosa, galactosa, manosa y dulcitol; no produce ácido sulfhídrico ni indol, y no se desarrolla en agar con sales de amonio como única fuente de nitrógeno..(48).

B. cereus es resistente a la acción de la penicilina en -- función de su capacidad para generar penicilinas. Produce tam bién una fosfolipasa (lecitinasasa C), dos hemolisinas y una to xina letal muy activa contra el ratón. (48).

Una de las características biológicas más importantes de B. cereus, es la producción de dos enterotoxinas, responsables de una alta incidencia de intoxicación alimentaria..(9).

La tabla.No.2 presenta las características de 3 especies de Bacillus: B. anthracis, B. megaterium y B. cereus (9).

Tabla No. 2 Diferenciación de Bacillus spp. (9)

CARACTERISTICAS	B. cereus	B. anthracis	B. megaterium
Células alargadas:			
ancho micras	1.0-1.2	1.0-1.2	1.2-1.5
largo micras	3-5	3-5	2-5
Movilidad	d	-	d
Formación de ácido a partir de:			
xilosa, arabinosa y manitol	-	-	d
Reducción de NO_3^- a NO_2^-	+	+	d
Reacción de lecitinasa	+	+	-
Desarrollo en:			
Agar anaeróbico	+	+	-
Resistencia a lisozima al 0.001%	+	+	-
Crecimiento en agar-citrato-sales	+	d	+
Temperatura de desarrollo, °C			
máxima	35-45	40	35-45
mínima	10-20	15-20	3-20
Degradación de tirosina	+	d	d

+ = positivo para 90-100% de las cepas

- = negativo para 90-100% de las cepas

d = reacción diferente, positivo para 11-89% de las cepas

Características comunes: Gram positivos, catalasa positiva, desarrollo en: 7% de NaCl, caldo glucosa y en agar glucosa hidrólisis de almidón y caseína (9).

4. IMPORTANCIA DE B. CEREUS EN ALIMENTOS

Uno de los riesgos importantes para la salud del hombre es la contaminación microbiana asociada con los alimentos (19). B. cereus causa dos distintas formas de intoxicación alimentaria (4,5,20). Las toxinas producidas por B. cereus en alimentos son de importancia para la salud pública, ya que la incidencia de intoxicación alimentaria provocada por este microorganismo es alta (4,5).

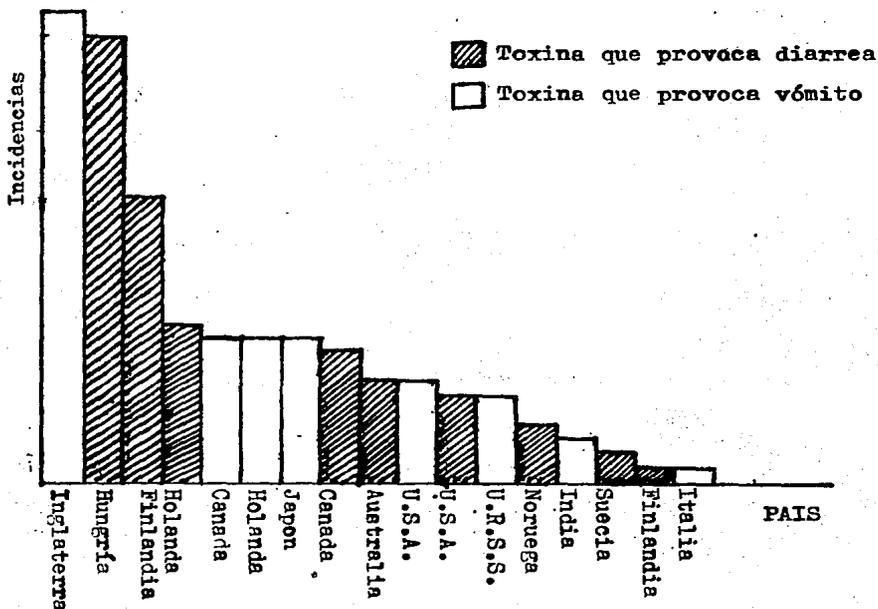
B. cereus se encuentra ampliamente distribuido en suelo y polvo (4,5). Su presencia en alimentos indica una contaminación por suelo a través del aire. En el primer tipo de intoxicación causada por B. cereus una gran variedad de alimentos son involucrados, por ejemplo: picadillo, sopas, salsas, aves, productos cárnicos, verduras, condimentos, arroz cocinado, postres, helados, pastas, pescados, cereales, leche fresca, pasteurizada y en polvo. La diarrea es el principal síntoma (3,4,5). En el segundo tipo de intoxicación, el arroz es el único alimento involucrado. El consumo de arroz contaminado con B. cereus provoca vómito principalmente (3,4,5).

La figura No. 1 presenta las incidencias de intoxicación alimentaria causadas por B. cereus en distintos países.

En los países Europeos las intoxicaciones alimentarias por B. cereus se reportan desde 1950. Los diferentes alimentos que están involucrados en las intoxicaciones alimentarias se --

presentan en la tabla No. 2 (5). Los síntomas posteriores a la intoxicación son: dolor abdominal, náusea y principalmente diarrea (3,4,5).

Figura No. 1 Intoxicaciones alimentarias causadas por B. cereus en diversos países. (8)



B. cereus se desarrolla frecuentemente en leche pasteurizada y en los alimentos infantiles reconstituídos con leche. - Estos alimentos son el vehículo para la transmisión de las enfermedades diarreicas, lo cual provoca un grave problema para la salud pública.

Tabla No.2 Intoxicaciones alimentarias causadas
por B. cereus. (5)

País	Tipo de alimento	cuenta/ g ó ml.
Noruega	salsa de vainilla	$2.5 \times 10^7 - 1.1 \times 10^8$ (4 brotes)
Dinamarca	puddín de gelatina	1.3×10^7
Italia	sopa de pollo	6.0×10^7
Holanda	puré de papa, verduras, carne picada, paté de -- hígado, pudines de sopas	$5.0 \times 10^5 - 2.0 \times 10^8$ (11 brotes)
Hungría	sopa de verduras embutido de salchicha pasteles, sopas	no registrada 1×10^5 $3.6 \times 10^4 - 9.5 \times 10^8$ (35 brotes)
Suecia	carne de cerdo crema de vainilla	2×10^7 9.2×10^5
Rumania	platos a base de carne de cerdo.	$1.0 \times 10^7 - 1 \times 10^8$
Hungría	leche, productos cárnicos, platos a base de arroz, picadillo, verduras	no registrada
U.S.A.	productos cárnicos	7×10^7
U.R.S.S.	embutidos, sopa de verdura, carne frita, verdura frita, sardina	no registrada
Canada	arroz frito	2.4×10^7
Inglaterra	arroz frito y hervido	$3.5 \times 10^5 - 2 \times 10^9$ (17 brotes)
Australia	arroz frito	no registrada

El desarrollo de B. cereus en leche pasteurizada provoca un daño que ocasionalmente se presenta, y se conoce como "cor-

tado de la leche" (21). El daño de la leche debido a B. cereus se estudia por Galesloot en 1953 (75). (El investigador varía las condiciones de tiempo y temperatura de pasteurización, provocando una estimulación o daño de las esporas de B. cereus, dependiendo de la severidad del tratamiento (21). La primera manifestación del daño, es la formación de coajos en la superficie de la leche pasteurizada que se almacena por varios días a temperaturas de refrigeración (21,22). La causa del "cortado de la leche" se debe a las esporas desarrolladas que sobreviven al tratamiento de pasteurización (21).

En países en vías de desarrollo, el consumo de la leche comercial destinada para niños es motivo de gran controversia debido a la intoxicación alimentaria que se provoca por este alimento (23). La importancia de conservar la calidad higiénica de la leche es una necesidad ya que forma parte del suplemento en los alimentos infantiles, pero existe poca información en relación a la calidad microbiológica de los alimentos para niños, debido a la falta de interés por parte de las autoridades de Salud Pública (23,24).

La alta incidencia de B. cereus en los alimentos para niños se observa en la tabla No. 3 (24). Los estudios indican la falta de precauciones adecuadas durante la producción y el procesamiento de la leche bronca, en las subsecuentes manipulaciones o en la distribución del producto (24).

La presencia de B. cereus en pequeñas cantidades en ali--

mentos deshidratados no constituye problema, debido a la humedad relativa tan baja, que no permite su germinación (25). Sin embargo, en el cereal reconstituido con leche estas esporas podrían germinar y en algunas horas multiplicarse significativamente provocando una intoxicación (25).

Tabla No. 3 Incidencia de diferentes tipos de microorganismos en alimentos lácteos deshidratados para niños. (25).

No. de muestra	Cuenta total de bacterias/g	Cuenta de S. aureus/g	Cuenta de B. cereus/g
1	5.0×10^3	2.0×10^3	0.5×10^3
2	9.0×10^3	0.7×10^3	0.2×10^3
3	3.0×10^3	6.0×10^3	0.4×10^3
4	6.0×10^3	menos de 1	menos de 1
5	6.0×10^3	0.2×10^3	0.3×10^3
6	7.0×10^3	0.9×10^3	0.4×10^3
7	3.0×10^3	3.0×10^3	0.6×10^3
8	8.0×10^3	0.2×10^3	0.2×10^3
9	2.0×10^3	0.2×10^3	2.0×10^3
10	3.0×10^3	0.5×10^3	0.5×10^3

$$\bar{X}=566.66 \quad S=554.5$$

Hasta la fecha no se conoce el nivel de B. cereus que causa intoxicación en niños de corta edad (25). Sin embargo Goepfert, indica la posibilidad de que éstos pueden ser más afectados que los adultos. Los autores citan dos casos de into-

xicación en los cuales son involucrados tanto niños como adultos, que consumen el mismo alimento contaminado con B. cereus; los adultos sufren síntomas leves mientras que los niños (de 5 a 9 años) requieren hospitalización por tres días (25).

El riesgo de intoxicación por el alimento destinado a niños aumenta debido a los siguientes factores:

- (1) Alimentos contaminados con B. cereus destinados a niños pequeños (6 meses-2 años).
- (2) Utilización de la leche contaminada en la preparación de alimentos.
- (3) Mantener el alimento por tiempo prolongado a temperatura óptimas que favorecen la proliferación de B. cereus. (25).

A partir de 1971 B. cereus se aísla de platillos a base de arroz en sus diferentes formas de preparación frito y hervido. El principal síntoma de intoxicación es el vómito (5,26, -27).

La incidencia de intoxicación por B. cereus a través de alimentos orientales es alta (27,28). En estos alimentos las poblaciones de B. cereus varían entre 10^4 a 10^9 /g. del alimento mencionado (26,27,28). En cinco brotes reportados por Schiemann los tiempos de incubación en horas son: 7.5, 3.5 a 4.7, y 7-10 hs., con diarrea en todos los casos, vómito en cuatro, náuseas en tres, y dolor abdominal en cuatro (tabla No. 4). Los alimentos implicados (comida china) se encuentran

prácticamente libres de coliformes, Clostridium perfringens,
y Salmonella sp.

Tabla No.4 Características sobresalientes en cinco brotes de intoxicación alimentaria por B. cereus. (48)

Brote	Incubación (hs.)	Síntomas	Alimento involucrado	B. cereus por g.
1	7.5	Diarrea y vomito	Chop suey	3×10^6
2	5	Diarrea, vómito, náusea y dolor - abdominal	Chop suey de pollo	1×10^6
3	4	Vómito y diarrea	Arroz frito con carne de res	3×10^6
4	7	Dolor abdominal y diarrea	Arroz frito	3×10^6
5	7-10	Dolor abdominal, diarrea y náusea	Rollo de hue vo (comida - china)	1.9×10^4

Para reducir la incidencia de intoxicación alimentaria -
provocada por B. cereus en arroz es necesario:

- a) Conocer el desarrollo y potencial de contaminación -
de B. cereus en arroz.
- b) Investigación de B. cereus en los alimentos involu--

crados en las intoxicaciones alimentarias.

Tomando en cuenta las consideraciones antes mencionadas, el papel del arroz como vehículo en las intoxicaciones alimentarias causadas por B. cereus tendrá una mayor importancia para la Salud Pública. (28,29,30).

5. INCIDENCIA DE BACILLUS CEREUS EN ALIMENTOS

Los análisis microbiológicos realizados en diferentes muestras de alimentos presentan una alta incidencia de B. cereus en ellos. Kjellander y Nirren (1957) examinan 514 muestras de alimentos y encuentran que 26% de las muestras de carne, 77% de las muestras de leche, 51% de frutas, nueces y vegetales están contaminadas con B. cereus (76). En 1959 los autores reportan que 129 de 486 muestras de leche pasteurizada, y 147 de 161 muestras de crema contienen células viables de B. cereus (76). En Hungría durante el periodo (1960-1966) B. cereus es la tercera causa de intoxicación alimentaria. Este organismo es responsable de 88 brotes en los cuales 3560 personas sufren síntomas de intoxicación (31,53,54).

La presencia de B. cereus en productos lácticos se confirma por un estudio llevado a cabo en Rumanía (1966), en el cual en 72.4% de la leche bronca fresca, 86.7% de la leche pasteurizada, y el 100% de las muestras de leche tomadas directamente del pasteurizador, se encuentran que contienen B. cereus en cantidades de 1×10 hasta 1×10^4 org./ml. (4,51).

El estudio más importante acerca de la incidencia de B. cereus en alimentos se lleva a cabo por Nirren en 1962 (76). El examen de 3888 muestras confirman que 51.6% de las 1546 muestras de especias, 43.8% de 1911 muestras de pudín y crema, y 52.2% de los 431 productos de carne y vegetales, son contaminados con B. cereus. En la mayoría de los casos la cantidad es de 1×10^2

org./g. (4).

Kim y Goepfert (1971) identifican a B. cereus en 25.3% de alimentos deshidratados (12). Akimov (1969) en un estudio realizado en Rusia reporta, que en 13.6% de los alimentos enlatados, 7.7% de los productos embutidos, 6.7% de los ingredientes utilizados en confitería, se demuestra la presencia de B. cereus (4,77).

En Gran Bretaña en 1971 se reportan 34 incidentes de intoxicación alimentaria causadas por B. cereus. El arroz frito es el vehículo de contaminación (tabla No. 5) (13,31).

Tabla No. 5 Intoxicaciones alimentarias causadas por B. cereus. (5).

Año	No. de incidentes reportados	No. de casos reportados
1971	6	15
1972	5	21
1973	23	79

En Suecia en 1971 después de examinar 3,888 muestras de alimentos e ingredientes alimenticios B. cereus se identifica en un 47.8%. La causa más frecuente de intoxicación alimentaria es el arroz contaminado con B. cereus (27).

En Estados Unidos durante el periodo 1976-1978, se repor-

tan 24 casos de intoxicación alimentaria. El 8.8% de las personas presentan síntomas de intoxicación por B. cereus. Se confirma que el arroz es el vehículo de contaminación.

Chorpa y col. reportan un 100% de incidencias de B. cereus en leche, carne y productos cárnicos y un 75% de incidencia en productos lácteos (32).

Gilbert y Taylor (1975) demuestran la presencia de B. cereus en 8.8% de las muestras de arroz frito (78).

Las incidencias de enfermedades alimenticias en Canada y los Estados Unidos muestran, que los platillos orientales a base de arroz son el vehículo de intoxicación cada año. De alimentos adquiridos en restaurantes que preparan comida china, el 15% de 165 muestras de 9 diferentes platillos contienen más de 100 UFC de B. cereus/g.; de ellos el 71% corresponde al arroz frito (55). En el 25% de diversos alimentos desecados (papas, ensaladas, almidones, leche, cremas, salsas) Kim y Goepfert cuentan B. cereus en cantidades variables de 100 a 4,000/g.

B. cereus se aísla de pure de jitomate enlatado. La tabla No. 6 ilustra los microorganismos aislados de 292 muestras (33).

Powers realiza un estudio microbiológico en especias procesadas de 10 plantas procesadoras en Estados Unidos. Después

de analizar 110 muestras el 53% de ellas contienen B. cereus tabla No. 7 (34).

Tabla No.7 B. cereus en especias procesadas. (34)

Especcias	No. de muestras	Cuenta total	% de cepa enterotóxicas de <u>B. cereus</u>
Hoja de Laurel	11	50-275	82 (9/11)
Pimienta	18	50-3500	96 (24/25)
Chile en Polvo	16	50-500	100 (4/4)
Canela	16	50-8500	83 (24/29)
Ajo en polvo	17	50-1000	100 (11/11)
Mostaza en polvo	14	- 100	100 (1/1)
Orégano	18	50-3800	83 (15/18)
Total	110	50-8500	84 (88/99)

En 1982 Baxter analiza 24 muestras de especias y aditivos para alimentos. Las muestras presentan contaminación por varias especies de Bacillus, principalmente B. cereus (tabla No. 8).

Existen numerosos microorganismos patógenos que son aislados de las ostras. Normalmente el análisis microbiológico de las ostras no incluye el aislamiento e identificación de B. cereus. En 1978 se reporta una intoxicación causada por B. cereus, a través de ostras (35). El estudio realizado demuestra la presencia de B. cereus en cantidades de 100-500 org./g. de alimento (tabla No. 9) (35).

Tabla No. 8 Especies de Bacillus aislados de diferentes muestras. (34)

Muestra	B. sub tilis	B. ce reus	B. liche niformis	B. poly myxa	B. an- thracis	B. coa- gulans
Soya	1	1				
Mejorana		1				
Cebolla en polvo		1	1	1		
Pimienta		1	2			1
Pimenton		1	1		1	
Pimento		1				
Total	1	6	4	1	1	1

Tabla No. 9 Resultados de análisis microbiológicos de ostras, procedentes de distintas regiones de Australia. (35)

Cuenta	No. de org./g. de ostra			
	E. coli	Salmonella	B. cereus	C. perfringens
1.7x10 ⁴	4.3	(-)	475	30
1.3x10 ⁴	46.0	(-)	490	15
6.5x10 ⁴	0.91	(-)	190	7
1.0x10	0.36	(-)	250	15
9.0x10 ³	0.91	(-)	87	5
3.0x10 ⁴	0.36	(-)	450	7

Blakey y Priest demuestran la presencia de *B. cereus* en variedad de leguminosas y cereales (36). En 56% de las muestras analizadas, *B. cereus* se aísla en cantidades de 10^2 - 6×10^4 org./g. (tabla No. 10) (36).

Tabla No. 10 Incidencia de *B. cereus* en alimentos. (36).

Producto	org./g. de alimento
Lenteja roja	1×10^2 - 4.5×10^4
Lenteja dorada	2×10^2
Chícharo amarillo	2×10^2 , 3×10^2
Chícharo verde	3×10^3
Frijol negro	6×10^4
Frijol	1×10^3 , 5×10^3
Frijol de soya	1×10^2 , 2×10^2
Caldo escocés	2×10^2
Arroz	1×10^2 - 3×10^3
Cebada	5×10^2 , 2×10^4
Harina	1×10^2 - 6×10^4

La incidencia de *Bacillus* spp. en pasta, harina de trigo y trigo se presenta en la tabla No. 11. *B. cereus* se identifica en 30% de las muestras examinadas (37).

Después de analizar 133 muestras de postre a base de natilla, se demuestra la presencia de *S. aureus*, *E. coli* y *Strepto-*

coccus faecalis en cantidades limitadas, sin embargo B. cereus se encuentra en cantidades considerables (tabla No.12).(31).

Tabla No. 11 Bacillus spp aislado de pasta refrige-
rada, harina de trigo y trigo.(37)

Bacillus spp	muestras			Total
	pasta refri-gerada	Harina de Trigo	Trigo	
B. brevis		2	1	3
B. cereus	17	2	3	22
B. circulans			6	6
B. licheniformis	2	1	1	4
B. megaterium		1		1
B. pumilis	10	11		21
B. subtilis	24	10		34

Tabla No. 12 Microorganismos aislados de postre
a base de natilla. (31)

Microorganismo	Proporción de muestras con cuenta mayor de 10^3	Incidencia (%)
B. cereus	29/133	21.8
E. coli	7/133	5.3
S. aureus	4/133	3.0
S. faecalis	1/133	0.75

5.1 Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus*

en alimentos

Existen varios métodos para la identificación y enumeración de *B. cereus* en alimentos. Estos procedimientos rápidos y sencillos aprovechan dos características importantes del microorganismo: 1) *B. cereus* produce en los medios de cultivo -- con yema de huevo una enzima que proporciona turbidez alrededor de la colonia. Esta enzima se denomina factor de yema de -- huevo, lecitinasa o fosfolipasa y 2) Este microorganismo es re -- sistente a la polimixina B (10,11).

Los medios recomendados para el aislamiento de *B. cereus* son: Agar sangre, KG (Kim y Goepfert), MYP y PEMBA. Las colo -- nias que aparecen en la superficie deben ser confirmadas por -- medio de pruebas bioquímicas como son: la fermentación de algu -- nos azúcares, licuefacción de la gelatina, así como las prue -- bas de Voges Proskauer, reducción de nitratos, entre otras --- (10,12).

AGAR SANGRE

Las colonias de *B. cereus* sobre agar sangre son grandes -- de 4 a 7 mm. de diámetro, planas, con una ligera coloración -- verde después de una incubación de 35 a 37°C durante 48 hs. El microorganismo es usualmente alfa-hemolítico, pero algunas cepas producen beta-hemólisis. En incubación anaeróbica las colo -- nias son pequeñas, de 2 a 3 mm. de diámetro con borde u orilla

irregular, rodeadas por una zona de beta-hemólisis. Cuando B. cereus se encuentra en el alimento en pequeñas cantidades se utiliza la técnica de preenriquecimiento en el caldo nutritivo, incubado a 37°C durante 18 hs. con posterior subcultivo en agar sangre (13,14).

AGAR MYP

Este medio contiene manitol, yema de huevo y rojo de fenol. Donovan recurre a la incorporación de la yema de huevo como medio diferencial. Mossel y col. adicionan manitol con el fin de introducir otro compuesto diferencial y excluir los bacilos Gram positivos fermentadores, como B. megaterium. B. cereus no fermenta el manitol por lo que no produce ácido, y por ello, no muestra zonas rojas alrededor de las colonias producidas en este medio. Las zonas de precipitación de yema de huevo son grandes. Las colonias de B. cereus no son rizoides. El rojo de fenol se incorpora al medio únicamente para facilitar la observación de la zona de turbidez en el medio con yema de huevo. Este medio no es adecuado para detectar B. cereus cuando se encuentra en pequeñas cantidades en los alimentos (14,15, 17).

AGAR KG Kim- Goepfert

Kim y Goepfert elaboran otro tipo de medio de cultivo también con yema de huevo que favorece la esporulación en un periodo de incubación de 24 hs. Las colonias de B. cereus en

agar KG son rizoides, mayores de 1 cm. de diámetro, y la precipitación de la yema de huevo es mucho más débil que en otros medios. (12,14).

En la técnica para el recuento de B. cereus en los alimentos, los medios de MYP y KG pueden ser empleados con éxito. Ambos se inoculan por superficie a partir de las diluciones del alimento, y a partir de las colonias desarrolladas es necesaria una confirmación con pruebas bioquímicas (tabla No. 13). Ninguno de estos medios es tóxico contra las formas vegetativas del bacilo dañados por el calor, a condición de que el pH de aquéllos se encuentre por encima de 6.3 y por debajo de --7.3.. Al comparar la eficiencia de los medios de MYP, KG y gelsa sangre, Schiemann concluye que ninguno ofrece sobre los demás ventajas en la identificación de las colonias; en los tres desarrollan una variedad de microorganismos que pueden asociarse a B. cereus en los alimentos, y en consecuencia siempre es necesario en cualquier caso purificar cada colonia antes de estudiarla en su comportamiento bioquímico. (48,49,50).

Para el recuento del microorganismo a partir de la materia fecal se utiliza con éxito la inoculación en superficie de placas de gelsa sangre. Tratándose de casos humanos dentro de un brote, el desarrollo de las colonias características de B. cereus (hemolíticas, secas, planas y borde irregular o rizoides) constituye un hallazgo presuntivo muy interesante el cual, desde luego, debe ser confirmado. También Gilbert y Taylor en Inglaterra, afirman que el empleo de gelsa sangre de caballo

incubada aeróbicamente a 35-37°C durante 48 hs. es adecuado para el recuento de B. cereus a partir de muestras de materia fecal y de alimentos muy contaminados. Cifras por encima de --- 100,000/g. en el alimento sospechoso sugieren un diagnóstico -- por B. cereus en el brote. (48).

AGAR PEMBA

El medio PEMBA contiene, polimixina, piruvato, yema de --- huevo, manitol, azul de bromotimol. La polimixina es un anti--- biótico específico contra bacterias Gram negativas. Las colo--- nias de B. cereus en el medio mencionado son filamentosas has--- ta ligeramente rizoides, de 2 a 5 mm. de diámetro de color a--- azul turquesa a azul con brillo intenso, después de un periodo de incubación de 24 hs. a temperatura ambiente. Algunas cepas desarrollan centros grises. Las zonas de precipitación de yema de huevo son grandes (5 mm. alrededor de cada colonia). Este --- medio es suficientemente selectivo para poder detectar peque--- ñas cantidades de B. cereus y sus esporas en la presencia de --- grandes cantidades de otros microorganismos (15).

Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de B. cereus:

- Fermentación de la glucosa.- Se inocula el microorganis--- mo, se incuba anaeróbicamente durante 24 hs. a 35°C, u--- tilizando el sistema Gas-Pak. El vire de color rojo a a--- marillo indica la producción de ácido a partir de la --- glucosa en condiciones anaeróbicas (16).

- Reducción de Nitratos.- Se inocula el microorganismo en caldo nitrato, se incuba durante 24 hs. a 35°C. Para observar la presencia de nitrito se adicionan 0.25 ml. de alfa-naftol y 0.25 ml. de ác. sulfanílico. La aparición de color rojo en 10 min. indica la presencia de nitritos (16).
- Prueba de Voges-Proskauer .- El microorganismo se inocula en el medio MR-VP se incuba durante 48 hs. a 35°C. - Se transfiere 1 ml de cultivo en un tubo, se adicionan 0.2 ml de KOH al 40% y 0.6 ml de alfa-naftol al 5%; la aparición de coloración roja indica una prueba positiva (16).
- Utilización de tirosina.- El microorganismo se inocula en la superficie del agar nutritivo con tirosina se incuba durante 48 hs. a 35°C. Posteriormente se observa - el desarrollo sobre la superficie del medio, el cual indica la utilización de la tirosina. Si los tubos no presentan crecimiento en la superficie incubar 24 hs. más y descartar (16).
- Crecimiento en caldo nutritivo con lisozima. El microorganismo se inocula en el medio mencionado se incuba a - 35°C durante 24-48 hs., posteriormente se observa el - crecimiento (16).

La tabla No. 13 presenta las características bioquímicas de B. cereus (18).

Tabla No. 13 Características bioquímicas de B. cereus.

PRUEBA	RESULTADOS
Indol	-
Voges-Proskauer	+
Utilización de citrato	+
Reducción de nitrato	+
Ureasa	-
Licuefacción de gelatina	+
Hidrólisis de caseína	+
Hidrólisis de almidón	+
Desarrollo anaeróbico en 1% de glucosa	+
Actividad de lecitinasa	+
Movilidad	+
Actividad fermentativa sobre carbohidratos:	.
Glucosa	+
Manitol	-
Lactosa	-
Glicerina	+
Salicina	v
Xilosa	-
Arabinosa	-

+ = positivo en 80-100% de las cepas probadas

- = negativo en 80-100% de las cepas probadas

v = reacción variable

6. TOXINAS PRODUCIDAS POR BACILLUS CEREUS

Las intoxicaciones alimentarias son causadas comúnmente - por la ingestión de productos metabólicos (toxinas) producidas por algunas bacterias. Los principales microorganismos productores de toxinas en alimentos son Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, C. botulinum (18). Las toxinas producidas por B. cereus, adquieren mayor importancia últimamente, pero - las investigaciones realizadas acerca de su composición y mecanismo de acción no son muy definidas aún, por lo tanto existe gran controversia acerca de su naturaleza (8,18).

B. cereus sintetiza un gran número de productos metabólicos extracelulares. Algunos de ellos por ejemplo: La toxina Letal, Hemolisinas, Fosfolipasa C, y más recientemente dos distintas enterotoxinas. Las enterotoxinas se relacionan con dos distintos tipos de intoxicación alimentaria: La intoxicación - con producción de diarrea y la intoxicación con producción de vómitos (8,38).

Toxicidad

Chu en 1949 encuentra que los productos extracelulares de B. cereus presentan actividad lipolítica en emulsión de yema de huevo, provocan lisis a glóbulos rojos, son dermonecróticos cuando se inyectan a ratones (79). El investigador establece la primera evidencia acerca de la naturaleza tóxica de B. cereus. Se

sospecha inicialmente que éstas propiedades son función de un sólo producto, sin embargo, los resultados de las investigaciones demuestran que la fosfolipasa, la toxina hemolítica y la toxina letal son tres distintos productos extracelulares. En el caso de la alfa-toxina de *C. perfringens* existe una marcada diferencia, ya que presenta los mismos productos extracelulares, pero catalizados por una sólo entidad proteica (8,38).

PRODUCTOS EXTRACELULARES:

HEMOLISINAS

B. cereus es capaz de producir dos hemolisinas. Una de ellas bien definida con un peso molecular de 55,500 y se denomina cereolisina. La segunda menos definida, con un peso molecular de 30,000 es más estable a la temperatura. Ambas hemolisinas son sensibles al cloroformo, eter, pHs extremos, tripsina y pronasa. La cereolisina es letal cuando se inyecta a ratones (39).

TOXINA LETAL

Ezepchuk y col. en 1973 logran purificar la toxina letal de B. cereus con un peso molecular de 50,000-60,000, sensible a la tripsina, produce vómito en gatos con una dosis de 300 microgramos por Kg. y es letal para ratones en concentración de 300 microgramos por ratón. En 1979 los mismos investigadores purifican una segunda toxina letal, con un peso molecular de 100,000 resistente a la tripsina con una MLD_{50} = 40-50 microgramos por ratón. Una dosis de 300 microgramos por Kg. produce --

una reacción febril poco severa en gatos (80).

FOSFOLIPASAS

Slein y Logan en 1963 encuentran que B. cereus produce -- tres diferentes fosfolipasas, que son metabolitos del desarrollo vegetativo. Sólo la fosfatidil colina (lecitinas) colin--fosfohidrolasa se estudia ampliamente. Los investigadores encuentran que se trata de una fosfolipasa de tipo C, ya que libera fosforilcolina y un diglicerido a partir de un sustrato -- de lecitina (como se observa en la fig. No.2). En B. cereus no son encontradas hasta la fecha fosfolipasas de tipo A, B ó D (81).

Möllby en 1978 estudia más ampliamente la fosfolipasa de tipo C y encuentra que tiene un peso molecular de 23,000 con -- una actividad máxima a un pH de 7.2-7.5. El valor de LD₅₀ de la fosfolipasa es 1.6-1.7 mg./Kg. (82).

La tabla No. 14 presenta las características de las toxinas producidas por B. cereus (8).

Algunas consideraciones que demuestran que la toxina letal, la hemolisina y la fosfolipasa son de naturaleza diferente, se describen a continuación:

- Reaccionan en forma diferente cuando se les somete a varios tratamientos:

Inhibición completa de la fosfolipasa C por alcoholes de bajo peso molecular. En tanto, la toxina letal y la hemolisina

Figura No. 2 Representa esquemáticamente la formación de diglicéridos y fosforilcolina como productos de la interacción enzimática entre la lecitina y la enzima de B. cereus. (18)

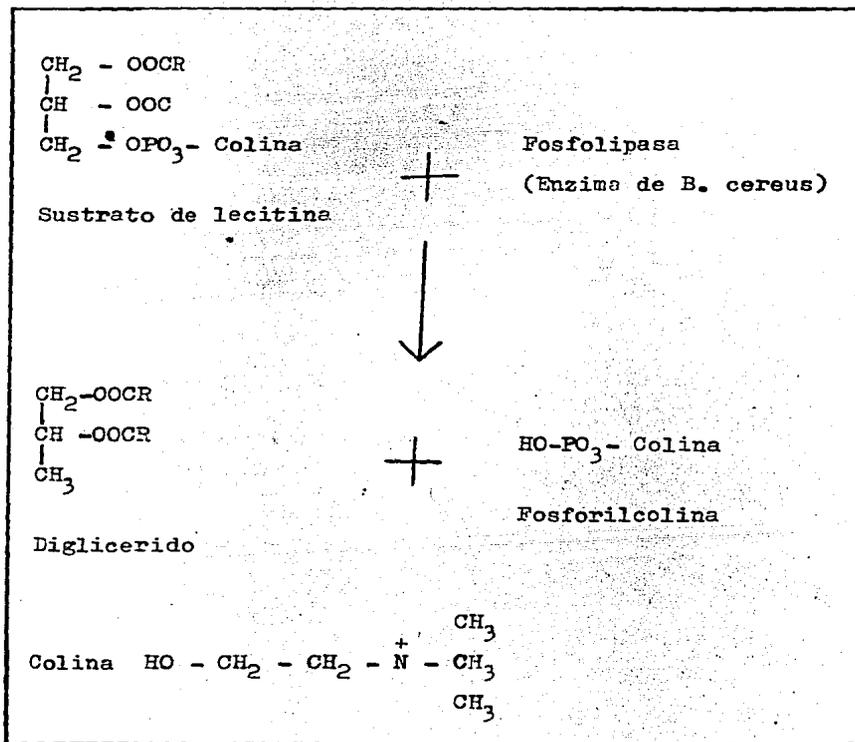


Fig. 2 Productos obtenidos de la degradación de la lecitina en presencia de fosfolipasa C.

Tabla No. 14 Características de las toxinas producidas por B. cereus. (8)

Toxina	Características.
Toxina Letal (1973)	Proteína termolábil, P.M. 57,000. Se inactiva a 60°C por 20 min. Letal para ratones y conejos. Inyección intravenosa induce vómito en gatos, puede relacionarse con la toxina que produce vómito.
Toxina Letal (1979)	P.M. de 100,000. Resistente a la tripsina. Letal para ratones; - inyección en gatos produce poca fiebre pero no vómito. La acumulación de fluido en asas ligadas es negativa, pero altera la permeabilidad de la piel.
Cereolisina o Hemolisina primaria	Proteína termolábil, con P.M. 49,000-59,000. PI 6.3-6.7. Inactivada por colesterol. Es letal para ratones.
Hemolisina secundaria	Proteína termolábil, con P.M. 29,000-34,000, PI 4.92. Susceptible a pronasa, pepsina y tripsina. La toxicidad in vivo todavía no está establecida.
Fosfolipasa C	P.M. 23,000, no es dermonecrótica en conejos y no causa permeabilidad vascular actividad máxima a un pH 7.2-7.5.
Toxina que produce diarrea	Proteína enterotoxigénica, inestable, P.M. 50,000, PI 4.85, sensible a tripsina y pronasa. Antigénica.
Toxina que produce vómito	P.M. menor de 50,000, enterotoxina estable bajo condiciones de - 126°C por 1.5 hs., pH extremos a la tripsina y pepsina. Puede ser relacionada con la esporulación y con productos de arroz.

se ven afectadas parcialmente.

Total inactivación de la hemolisina y de la toxina letal por acción de la tripsina, a diferencia de la fosfolipasa C.

La fosfolipasa C es relativamente resistente a los efectos de temperatura elevada. A 45°C la hemolisina es totalmente inactivada.

- Las actividades de la toxina letal, la hemolisina y la fosfolipasa C aparecen simultáneamente en el medio de crecimiento, pero la cinética de síntesis es diferente para cada una de ellas.

- Se demuestra por Cromatografía en sephadex G-75 que el peso molecular de la hemolisina, toxina letal y fosfolipasa C, decrece en el orden mencionado (8).

Estudios realizados por Bonventre y Johnson en 1970 indican que la hemolisina y la fosfolipasa no son requeridas para una respuesta patológica en varias especies animales. Los autores las proponen como factores auxiliares de virulencia --- (83). Sin embargo se desconoce la contribución de la toxina letal, de la hemolisina y de la fosfolipasa C a la acción letal o a la patogenia de la enfermedad. La inducción experimental de intoxicación de origen alimenticio por B. cereus en humanos, presentan resultados variables aún cuando gran número de microorganismos son administrados en el alimento a voluntarios; lo que indica que las condiciones para la producción y estabilidad de los productos extracelulares de B. cereus son problemáticos. Estudios experimentales demuestran la produ---

cción en ciertos niveles de la toxina letal, hemolisina y fosfolipasa C en diferentes alimentos; pero la estabilidad de estas toxinas ocasionan diferentes respuestas por los tratamientos dados a los alimentos como son: calentamiento, refrigeración y congelado, a diferentes tiempos de exposición destruyen de parte de su actividad y en algunas ocasiones totalmente --- (40,56).

6.1 Toxinas producidas por B. cereus en alimentos

Existen otros productos extracelulares producidos por B. cereus, diferentes a la fosfolipasa C, hemolisina y toxina letal (8). Estos productos extracelulares son reconocidos como la toxina que causa la diarrea y la toxina que provoca el vómito, y son la causa de las intoxicaciones alimentarias (8).

TOXINA QUE PRODUCE DIARREA

La toxina de B. cereus que se aísla de pacientes con diarrea produce diversos efectos biológicos tales como:

- Acumulación de fluido en asas ligadas en el intestino delgado de conejo.
- Reacción necrótica en la piel de cobayos
- Incremento en la permeabilidad vascular

Los efectos biológicos antes mencionados son establecidos por diversas bacterias patógenas entéricas y confirman la producción de cepas enterotoxigénicas (40). La tabla No. 15 presenta la producción de los tres efectos biológicos de la toxina

na de B. cereus y de otras especies de Bacillus (41,42,43).

Tabla No. 15 Producción de los tres efectos biológicos en cultivos filtrados estériles de B. cereus y de otras especies de Bacillus. (41,42)

Especie	#	Producción de Acum. de fluido	#	Reacción necrótica positiva	#	Permeabili- dad vascu- lar positiva
<u>B. cereus</u>	22	19	24	21	10	9
<u>B. thuri-</u> <u>giensis</u>	4	1	11	11	5	5
<u>B. subtilis</u>	1	0	4	0	4	0
<u>B. megate-</u> <u>rium.</u>	1	0	1	0	1	0
<u>B. licheni-</u> <u>formis</u>	1	0	1	0	1	0

= No. de cepas examinadas.

Los resultados presentados en la tabla No. 15 demuestran la correlación entre los tres factores biológicos, debido a que las cepas de B. cereus que producen acumulación de fluido en asas ligadas en el intestino de conejo, también provocan una reacción necrótica positiva en la piel de cobayos y manifiestan una permeabilidad vascular alterada. Sin embargo hasta que la purificación de la toxina, que produce diarrea se -

realize totalmente, no se puede afirmar que los tres factores biológicos son producidos por una sola sustancia (la enterotóxica), o por más de una (57, 58).

- Acumulación de fluido en asas ligadas en el intestino de conejo

La prueba del asa ligada en el intestino delgado de conejo, se utiliza para el estudio de varias bacterias enteropatógenicas (41). La inyección de cultivos celulares de bacterias enteropatógenicas, provoca la dilatación del asa debido a la acumulación de fluido. Esta técnica se usa para estudiar la enteropatógenicidad de E. coli, Salmonella, Shigella, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium perfringens y posteriormente Vibrio parahaemolyticus y Vibrio alcaligenes (41).

Spira y Goepfert en 1972 inician investigaciones para evaluar la adaptabilidad de la prueba del asa ligada de conejo para el estudio de B. cereus. Encuentran que B. cereus produce acum. de fluido en el asa ligada de conejo. Los cultivos filtrados (son cultivos de B. cereus centrifugados, el sobrenadante se esteriliza por medio de un filtro membrana cuyo tamaño de poro es de $0.2\mu\text{m}$. El filtrado estéril se almacena a una temperatura de 4°C y se usa a las 48 hs.). Los cultivos filtrados de varias bacterias patógenas entéricas, son inyectados en forma subcutánea a los animales en prueba y muestran contener una sustancia que produce la acumulación de fluido en el asa ligada de conejo. (42). Spira y Goepfert en 1972 estudian -

la adaptabilidad de la prueba del asa ligada de conejo, siguiendo la técnica utilizada por De y Chatterje, (1953) (84).

METODO PARA LA DETERMINACION DE ACUM. DE FLUIDO. (41)

Para la prueba se emplean conejos blancos de raza Nueva Zelandia. Se verifica la edad del conejo (conejos de corta edad destetados, pesando 800-1500 g). Los conejos se dejan sin comer durante 48 hs. antes de realizar la prueba y 24 hs. antes, no se les proporciona agua. Se liga el ileon de cada conejo bajo condiciones de anestecia. Las secciones de ileon son aproximadamente de 10-12 cm. de largo, separadas por un espacio de 2-4 cm. de la siguiente asa ligada. El número de asas ligadas en un mismo animal es de cinco y no más de seis porque se pierde la confiabilidad de la prueba. Se inyectan dos ml. de inóculo (cultivo de B. cereus) dentro de cada asa. En cada conejo, una asa se inyecta con medio estéril como un control. Después el intestino se acomoda en la cavidad abdominal y la incisión es cerrada. Una vez que el conejo se recupera de la anestecia, sólo se le suministra agua. Posteriormente se observa el aumento en volumen del asa en prueba. (41).

Para compensar las variaciones en la longitud del asa en prueba se emplea la relación de acumulación de fluido con la longitud del asa (V/L). Cuando esta relación es mayor de 0.3 se considera como evidencia de que hay acumulación de fluido neto dentro del asa y se considera como prueba positiva (40).

Para enumerar a B. cereus, el contenido de cada asa se -

transfiere a un tubo de prueba y el volúmen se ajusta a 10 ml. agregando 0.1% de agua peptonada estéril. Si el volúmen de -- fluido es mayor de 10 ml no se agrega agua peptonada. La mez-- cla se agita en un mezclador por 1.5 min. La cuenta de células viables en estas muestras se determinan sembrando por duplica-- do en agar nutritivo. La cuenta de esporas se obtiene calentando las muestras por 15 min. a 75°C antes de sembrarlas en -- agar nutritivo. Las cajas se incuban a 32°C por 24 hs. antes de enumerar las colonias (41).

- Reacción necrótica en la piel de cobayos

Los cultivos filtrados de B. cereus, cuando se inyectan -- en forma subcutánea en animales producen una reacción necrótica en la piel de cobayos. Craig en 1965 demuestra que los cultivos filtrados de Vibrio cholerae, incrementan la permeabilidad capilar en el área donde se aplica la inyección (85). Nii-- lo en 1962, demuestra una actividad similar en extractos de -- células de Clostridium perfringens (42).

METODO PARA LA DETERMINACION DE LA REACCION NECROTICA (42)

La inyección intradermal de 0.05 ml. de cultivo filtrado estéril del microorganismo provoca como consecuencia una rea-- cción en la piel de cobayos. La reacción se caracteriza por un obscurecimiento en el lugar de inoculación, desarrollada a los 5 min. y 6 hs. más tarde, dependiendo de la concentración del principio activo, se produce una úlcera necrótica identificada por una zona de color verde-gris (de 4-10 mm. de diámetro); --

y otra de color rojo obscuro (de 2-7 mm. de diámetro). Las zonas centrales son rodeadas por inflamación que en algunos casos mide hasta 20 mm. de diámetro. A las 24 hs., la inflamación desaparece y la zona central es completamente de color verde o cubierta por una costra. La reacción persiste durante 7 días. El pelo se inhibe en esta área (42).

- Incremento de la permeabilidad vascular en conejos.

METODO PARA DETERMINAR LA PERMEABILIDAD VASCULAR (43)

Para esta prueba se emplean conejos blancos de raza Nueva Zelanda con un peso de 2 a 3 Kg. Los conejos se rasuran, depilan y se marcan de 25 a 36 cuadros. La inyección intradermal de muestras (0.05 ml.) de cultivos filtrados de *B. cereus* se suministran dentro de cada cuadro. Posteriormente a las 3 hs. el colorante azul de Evans se inyecta en la vena de la oreja del conejo, en una dosis de 1 ml. por Kg. de peso de conejo de una sol. preparada al 10% de colorante en sol. salina fisiológica. Los animales se observan 60 min. después de la administración del colorante. La piel del conejo cambia ligeramente a un color gris-azul. A los 10 min.; las reacciones positivas aparecen como áreas de color azul obscuro alrededor de los sitios de inoculación. A los 20 min. la coloración es máxima tanto en intensidad de color como en extensión y es estable por 1 h. El área de color azul se toma como una indicación de la liberación del colorante dentro del tejido dermal, como resultado de una permeabilidad vascular alterada (43).

En 1975 se logra obtener una enterotoxina altamente purificada (sin actividad de lecitinasa ni hemolítica) que permite obtener un antisuero de buen título y con ello desarrollar una prueba de hemoaglutinación especial para descubrir la toxina - en medios de cultivo y alimentos en cantidades de 0.004 mcg./ ml. (59). Se consiguen buenos rendimientos de esta sustancia, utilización la técnica de diálisis con caldo cerebro corazón y evaluando su actividad en términos de permeabilidad capilar - (60). La temperatura óptima para la formación de la enterotoxina es de 32°C (8).

6.2 Características de la toxina que produce diarrea

La inducción de acumulación de fluido en el asa intestinal de conejo, la reacción necrótica en la piel de cobayo y - el incremento de la permeabilidad vascular en la piel de conejo, son cuestiones aún debatibles en cuanto a su posible origen por una sola sustancia (enterotoxina), o por más de una. - Sin embargo en 1972-1975 se determinan algunas características comunes de la toxina o toxinas que producen los tres factores biológicos (41,43,44).

1.- La toxina o toxinas reaccionan en forma similar cuando se someten a varios tratamientos:

1.1 Son sensibles a temp. de 56°C por 5 min. Y no se alteran cuando se someten a temp. de 45°C por 30 min.

1.2 Se precipitan por adición de sulfato de amonio entre 40-60% de saturación.

1.3 Se inactivan por tripsina y pronasa

2.- La toxina o toxinas son sintetizadas simultáneamente durante la fase de desarrollo exponencial.

6.3 Toxina que produce vómitos

Melling en 1976 propone la presencia en el arroz de una - segunda enterotoxina distinta a la que provoca la diarrea (45). Esta proposición se basa en los estudios sobre la alimentación de monos y la producción de acum. de fluido en asas ligadas en el intestino de conejo, usando cepas de B. cereus aisladas de diarreas y vómitos (45).

METODO PARA DETERMINAR LA TOXINA QUE PRODUCE VOMITO (45)

Preparación del medio de cultivo:

100 g de arroz de cocina se remojan en 400 ml de 0.95% de sol. salina y se esteriliza durante 15 min a 115°C. El arroz - se inocula con 30 ml de cultivo de B. cereus desarrollado previamente en caldo tripticasa soya por 8 hs., se incuba a 30°C por 18 a 20 hs. Posteriormente el cultivo de arroz se homogeniza con 30 ml. de 0.5% de diastasa en buffer acetato pH 5.0 para producir el licor el cual se dializa con 10% de carbowax a 4°C por 24 hs. El concentrado se utiliza para la alimentación en monos en experimentación. Los cultivos líquidos se desarrollan en medios que contienen proteína hidrolizada al 3%, aminoácidos y almidón al 5% (el almidón puede no ser adicionado en algunos casos para observar como influye en los animales - en prueba) (45).

La producción de vómito en los monos alimentados con cultivos de B. cereus se produce únicamente con la cepa 4810 que originalmente se aísla de un paciente con vómito. La toxina -- que provoca el vómito se desarrolla exclusivamente en un medio a base de arroz (tabla No. 16) (45).

Tabla No. 16 Producción de vómito en monos. después de la administración oral de cultivos de B. cereus. (45)

Medio de Cultivo	Monos que vomitaron/ Monos alimentados			<u>Medio no inoculado con B. cereus</u>
	<u>Cepa de B. cereus</u>			
	4810	4433	2532B	
arroz	10/24	0/10	0/8	0/8
P.H.+aa	0/8	0/4	0/4	0/4
P.H.+aa+a	0/4	0/4	0/4	0/4

P.H. = proteína hidrolizada
aa = aminoácidos
a = almidón

La producción de diarrea en los monos en prueba se provoca principalmente con la cepa 4433 de B. cereus que se aísla previamente de un paciente con diarrea (tabla No. 17) (45).

Las cepas de B. cereus que provocan diarrea, también producen acumulación de fluido en asas ligadas de conejo (cepa -- 4433). Por el contrario la producción de acum. de fluido en cepas de B. cereus que provocan el vómito (cepa 4810) es mínima.

La producción de acum. de fluido en las cepas 4433 y 4810 confirmó una vez más que B. cereus está relacionado con dos distintos tipos de intoxicación alimentaria (tabla No.18) (45).

Tabla No. 17 Producción de diarrea en monos alimentados con cultivos de B. cereus. (45)

Medio de Cultivo	Monos con diarrea/ Monos alimentados			Medio no inoculado con B. cereus
	<u>Cepas de B. cereus</u>			
	4810	4433	2532B	
arroz	1/24	6/10	0/8	0/8
P.H.+aa	0/8	1/4	0/4	0/4
P.H.+aa+a	0/4	2/4	0/4	0/4

P.H. = proteína hidrolizada
aa = aminoácidos
a = almidón

Tabla No. 18 Producción de acumulación de fluido en asas ligadas del intestino de conejo - en dos cepas de B. cereus. (45)

Cepa de B. cereus	No. de pruebas	Producción Acum. de fluido (No. de asas positivas)
4810	13	2
4433	15	12

Existen problemas prácticos en el desarrollo de otro tipo de pruebas para el estudio de las condiciones favorables de la producción de la toxina causante de vómitos. Hasta ahora la toxina sólo se produce en platillos a base de arroz (8).

Melling y col. en 1978, proponen que la producción de la toxina puede estar relacionada con la esporulación (8). Se llevan a cabo dos estudios sobre el desarrollo y producción de la toxina de B. cereus (tabla No. 19) (8).

Tabla No. 19 Producción de la toxina de B. cereus causante de vómito, en relación a las células vegetativas y cuenta de esporas en cultivos de arroz. (8)

Tiempo hr	Experimento 1			Experimento 2		
	LCV	LCE	RV	LCV	LCE	RV
0	6.3	- 1	0/3	1.8	- 1	-
6	8.2	- 1	3/3	6.4	3.3	-
14	8.5	7.8	2/2	7.8	4.5	-
18	8.4	8.2	2/2	7.9	6.6	0/4
24	8.6	8.4	3/3	8.1	7.2	0/4
30	n			8.0	7.1	1/4
36	n			8.3	7.4	3/4
42	n			8.5	7.8	3/4

LCV = Log. de células vegetativas/ml

LCE = Log. de esporas/ml

n = No experimentado

RV = Respuesta de vómito (No. de monos que vomitaron / No. de monos alimentados).

En el primer experimento, la toxina aparece en la fase de desarrollo exponencial antes de que la producción de esporas se determine; en el segundo experimento la toxina no se presenta hasta varias horas después de que la fase de desarrollo estacionaria se presenta, y también se produce la esporulación. Por los resultados de los dos experimentos los autores no pueden confirmar ni rechazar la relación que puede existir entre la producción de la toxina de B. cereus causante de vómitos y la esporulación (8,46,61).

Existe la posibilidad de que el factor tóxico puede ser un producto del rompimiento o desdoblamiento de los componentes del arroz, llevado a cabo por una acción bacteriana indefinida de B. cereus (46,61).

6.4 Características de la toxina que provoca el vómito

La temperatura óptima para la producción de la toxina de B. cereus causante de vómito es de 30°C (tabla No. 20) (8).

La cuenta de células vegetativas, así como la cuenta de esporas son mayores a temperaturas de 35-45°C., sin embargo la respuesta al vómito es mayor a 30°C.

La toxina presente en los cultivos de arroz muestra su estabilidad en varias condiciones, los resultados se presentan en la tabla No. 21 (47).

Tabla No. 20 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la toxina de B. cereus en cultivos de arroz de 24 hs. (8)

Temperatura °C	Células vegetativas cuenta/ml	Esporas cuenta/ml	Respuesta al vómito
22	9×10^7	1.0×10^5	2/4
25	5.5×10^7	2.0×10^5	3/4
30	3.0×10^8	1.0×10^6	4/4
35	9.0×10^8	8.0×10^7	1/4
40	3.0×10^8	5.0×10^7	1/4
45	3.0×10^8	1.5×10^7	0/4
50	3.0×10^4	8.0×10^4	0/4

Respuesta al vómito= No. de monos que presentan vómito/
No. de monos alimentados

Tabla No. 21 Estabilidad de la toxina producida por B. cereus causante de vómito. (47)

Tratamiento	Toxina (actividad)
45°C 30 min.	NE
80°C 10 min.	+
126°C 90 min.	+
4°C 7 días	+
4°C 2 meses	+
pH= 4 2hs.	+
pH= 11 2hs.	+
Tripsina	+
Pepsina	+

+, no disminuye su actividad

NE, No experimentada

Los resultados indican que la toxina producida por B. cereus es muy estable aún cuando las condiciones son variables. Por su estabilidad al calor 126°C durante 90 min. es una de las enterotoxinas más estables y de ahí que la producción de intoxicaciones alimentarias son a través de arroz que es almacenado inadecuadamente y recalentado sin tener las precauciones debidas (47).

6.5 Acción de toxinas producidas por B. cereus

En los años 1950'S y 1960'S se trata de establecer y clasificar a B. cereus como un microorganismo capaz de causar diarrea a través de intoxicación alimentaria (8). La primera indicación clara de la posible existencia de una enterotoxina producida por B. cereus, se menciona por Goepfert en 1972 (41), - ya que logra en el laboratorio la acumulación de fluido en asas ligadas en el intestino de conejo, después de haber inyectado a éstos con cultivos de células de B. cereus (8).

Raynaud y Alouf en 1972 establecen varios criterios para definir que la toxina producida por B. cereus es una exotoxina.

- Se sintetiza por células en desarrollo activo
- No hay aumento apreciable de la toxina durante la fase estacionaria.
- La concentración intracelular es muy pequeña durante el desarrollo de las células.

Parece no haber duda de que la patogenicidad de B. cereus al hombre en el tracto digestivo se identifica mejor con una intoxicación que con una infección y que la idea de una enterotoxina ligada a las células y liberada por lisis celular es compatible con ciertos hechos, como son la necesidad de un gran número de células para causar una respuesta clínica, un rápido establecimiento de la enfermedad, su corta duración, la ausencia de fiebre y el fracaso en el aislamiento del microorganismo a partir de la materia fecal de los pacientes en algu-

nos casos (48).

Los estudios que se realizan hasta la fecha acerca de la reacción necrótica en la piel de cobayos, la reacción de permeabilidad vascular y la acumulación de fluido en asas ligadas en el intestino de conejo son enfocados para:

- Determinar su relación con el tipo de intoxicación alimentaria que causa diarrea.
- Demostrar su no identidad con la hemolisina y la fosfolipasa C
- Su purificación.

Las razones por las cuales se desconoce el mecanismo de acción de la toxina que produce diarrea son:

- La toxina que produce diarrea se produce junto con varios metabolitos de los cuales no es completamente separable.
- Su labilidad
- Las dificultades para encontrar las condiciones óptimas para la producción en gran escala (8).

7. EFECTO DE AGENTES FISICOS Y QUIMICOS EN LA

ESPORULACION DE BACILLUS CEREUS

Durante el ciclo de vida de las bacterias formadoras de esporas hay dos estadios importantes, esporulación y germinación. En la esporulación las células bacterianas se encuentran en un estado latente conocido como endoespora. Las endoesporas son refractiles, resistentes a la temperatura y a otros agentes químicos. Bajo condiciones favorables se altera el estado latente y conduce a la formación del desarrollo de células vegetativas, que son sensibles a la temperatura. Este proceso se conoce como germinación de esporas. La germinación se manifiesta por la liberación de ácido dipiconílico, incremento en la resistencia a la luz ultravioleta o por disminución en la densidad óptica. La germinación de las esporas se presenta en dos fases. Pérdida de ácido dipiconílico (DPA) y estabilidad al calor de las esporas formadas en la primera fase de germinación. Durante la segunda fase se presenta la síntesis macromolecular (62).

Efecto de la temperatura:

Las esporas son extremadamente resistentes a la temperatura. Esta resistencia es probablemente producida por la deshidratación del protoplasto durante la formación de la espora (63). Cuando las esporas son expuestas a altas temperaturas pierden su característica de estado inactivo y posteriormente germinan. Este tratamiento de activación por temperatura, pro-

voca marcados cambios en las características de las esporas, favoreciendo el inicio de la germinación. Curran y Evans (86) en 1947 reportan que la activación de las esporas por temperatura es reversible a su estado inactivo, si las esporas son almacenadas en ausencia de sustancias que inducen la germinación. Existen varias hipótesis que son propuestas para explicar el mecanismo de activación de las esporas por temperatura. Algunas de estas hipótesis relacionan la activación por temperatura a los cambios en la permeabilidad de la espora, liberación de sustancias que inducen la germinación, o inactivación de algunas sustancias inhibidoras de la germinación. Keynan y Halvorson (87) proponen que la activación de la espora por la temperatura cambia la estructura terciaria de algunas macromoléculas, probablemente las proteínas de la cubierta de la espora con enlaces S-S, responsables de mantener el estado inactivo. La estructura terciaria puede ser responsable del sitio activo enzimático necesarios para la germinación, facilitando la permeabilidad de sustancias estimulantes para la germinación, o por la liberación de algunas sustancias inhibidoras de la germinación (64).

La cubierta de la espora consiste principalmente de proteínas con enlaces S-S. Maeda y Koga (88), encuentran que las proteínas que forman la cubierta de la espora de B. cereus probablemente se desnaturalizan a una temperatura de 56°C (64).

Efecto de Calcio y Acido dipiconflico (Ca-DPA)

Los iones juegan un papel muy importante en la germina---

ción de las esporas. Varios cationes bivalentes, especialmente calcio y magnesio, son requeridos para la germinación (62). -- Rode y Foster afirman que existen compuestos secundarios en el proceso de germinación como son glucosa, L-alanina e inosina -- los cuales no provocan la germinación en la ausencia de iones. Parece que el Ca se almacena en las esporas formando un complejo con el DPA y durante la germinación, la liberación en el -- medio de Ca y DPA demuestra que la concentración del complejo Ca-DPA se mantiene durante la liberación (62).

Las esporas de B. cereus contienen considerables concen-- traciones de iones metálicos y ácido dipicolónico comparados -- con las células vegetativas. El complejo CA-DPA en las esporas de B. cereus provoca la resistencia de las esporas al calor -- (62).

Efecto de Agentes Químicos

Las esporas son aprox. 10000 veces más resistentes a los agentes químicos que las células vegetativas. El mecanismo -- puede ser debido a la deshidratación del protoplasto durante -- la formación de las esporas o también la resistencia de las es-- poras puede explicarse por la presencia de puentes disulfuro -- en las proteínas de la cubierta de la espora (63).

Waites y Bayliss realizan un estudio acerca de la resis-- tencia de las esporas de B. cereus a los agentes químicos.

Los resultados obtenidos incrementan la destrucción de las esporas por los agentes químicos probablemente por la oxidación de los puentes disulfuro de las proteínas que se encuentran en la corteza de la espora. (63).

El tratamiento de las esporas de B. cereus con urea-mercapto etanol permiten a la lisozima inducir la germinación en un 99%, debido a que la proteína que se encuentra en la corteza de la espora se desnaturaliza (63).

El cloro como hipoclorito se usa ampliamente como bactericida, oxidando las proteínas. El tratamiento de las esporas con urea-mercapto etanol también incrementa la destrucción de las esporas por el cloro. Los resultados demuestran que sin el tratamiento con urea-mercapto etanol la corteza de la espora se encuentra intacta y esto permite la resistencia de la espora a la lisozima y al cloro (63).

Existen otros agentes químicos como son: peróxido de Hidrógeno, Hidróxido de sodio los cuales son capaces de destruir la espora aún cuando su corteza esté intacta o reciba algún tratamiento con urea-mercapto etanol (63).

En los estados físicos del protoplasto de las esporas de diferentes especies se encuentran diferencias, las cuales se reflejan en el incremento de la susceptibilidad al daño de las esporas especialmente si la resistencia se debe a las pro

piecidas de la cubierta de las esporas (63).

Efecto del sorbato de potasio

Las sales de ácido sórbico y potasio son usados como agentes fungicidas en la industria de alimentos (65).

En 1979 se reconoce que las sales de sorbato inhiben el botulismo, particularmente en el curado de la carne (65,66).

Los investigadores Smoot y Pierson encuentran que el sorbato de potasio inhibe la germinación de las esporas de B. cereus T y Cl. botulinum 62 A. El mecanismo por medio del cual el sorbato de potasio inhibe la germinación de las esporas se desconoce (65,67).

La efectividad del sorbato de potasio disminuye cuando el pH del medio se incrementa de 5.7 a 6.7. El sorbato de potasio inhibe la germinación de la espora a una concentración de 3,900 ng/ml a un pH de 5.7. (65,67).

La inhibición de la germinación de las esporas de B. cereus por el sorbato de potasio es reversible cuando las esporas se resuspenden en un medio de germinación sin sorbato de potasio. Esto indica que la inhibición por el sorbato de potasio no provoca alteración permanente en la germinación de las esporas (65,67).

Efecto del Ac. Etilendiamintetraacético (EDTA)

Las bacterias Gram negativas son sensibles a EDTA. En particular las del Género *Pseudomonas* presentan una alta sensibilidad. Los estudios llevados a cabo sobre el efecto de EDTA en -- bacterias Gram positivas son muy reducidos. La concentración de 2.5 mM de EDTA inhibe la germinación de las esporas de C. botulinum y 50 ppm de EDTA inhibe el desarrollo de Staphylococcus aureus en un medio de cultivo (89).

El EDTA puede inhibir el desarrollo bacteriano mediante dos efectos: Secuestrando cationes esenciales y haciendo al alimento nutricionalmente deficiente, o por ruptura de la membrana exterior la cual afectar la permeabilidad y estabilidad de la célula. (89).

Los resultados obtenidos del efecto de EDTA sobre el desarrollo de las esporas de *B. cereus* son los siguientes:

a) A una conc. menor de 300 ppm de EDTA, se reduce el desarrollo de B. cereus.

b) A una conc. de 300 a 1000 ppm de EDTA, se inhibe el desarrollo de B. cereus aunque en algunas ocasiones se presenta poco desarrollo.

c) Colonias pequeñas no características de B. cereus y un lento desarrollo de las colonias sobre agar en placa, se observa cuando se incrementa la conc. de EDTA en caldo infusión de cerebro corazón.

d) Cuando la conc. es de 1000 ppm de EDTA no tiene efecto sobre el porcentaje de germinación de las esporas de B. cereus

e) El desarrollo de B. cereus se inhibe a una conc. de -- EDTA de 500 ppm y a pH 5 a 9, y a pH 7 se observa la mayor resistencia de las esporas.

f) La inhibición de desarrollo de las esporas de B. cereus por el EDTA es reversible cuando se adiciona al medio de desarrollo Fe, Zn y Ca (89).

Efecto de Dioxido de Cloro

Los compuestos con cloro (ac. hipoclorito, ac. hipocloroso y cloro) son los desinfectantes más utilizados en tratamientos de agua, y también son usados comúnmente para desinfectar los alimentos. El dioxido de cloro (ClO_2) es un desinfectante igual o más efectivo que el cloro. (90). El ClO_2 se usa en la -- Industria alimentaria en aplicaciones como: tratamiento a vegetales y agua, inactiva bacterias, virus y algas. La información sobre la actividad en las esporas es limitada (90).

Principales efectos de ClO_2 sobre las esporas de B. cereus:

a) Las esporas (de una sola cepa) de B. cereus desarrolladas en un medio de esporulación simple son más susceptibles al ClO_2 que las esporas desarrolladas en un medio más complejo

b) La inactivación de las esporas de B. cereus T se incrementa cuando la conc. de ClO_2 se aumenta de 20, 50 y 80 mg --- ClO_2 /l.

c) La inactivación de las esporas de B. cereus T con ClO_2 no fueron afectadas por el pH

d) Cuando la cubierta de la espora de B. cereus se encuentra intacta protege a la espora del efecto de ClO_2

e) La eliminación de la cubierta de la espora no afecta la viabilidad de la espora pero es más susceptible a los agentes químicos (peróxido de hidrógeno, hipoclorito, germinación con lisozima, ClO_2) (90).

Efecto del Cloruro de Amonio

La acción del cloruro de amonio en la germinación de las esporas de B. cereus son presentados a continuación.

a) La adición de cloruro de amonio a una mezcla de germinantes (L-alanina e inosina) estimulan la germinación de las esporas desactivadas de B. cereus en iguales proporciones que cuando se utiliza la activación de las de las esporas por calentamiento sin cloruro de amonio.

b) La D-alanina tiene poco efecto sobre la germinación de esporas activadas con calor, e inhibe la germinación de esporas inactivadas en la presencia de cloruro de amonio

c) El cloruro de amonio no reemplaza las necesidades de L-alanina o inosina. Los tres compuestos se requieren para una rápida germinación

d) En comparación de varias cepas de B. cereus, la estimulación de germinación por cloruro de amonio se presenta en todos los casos, sin embargo la mayoría de las esporas que se aislan del suelo germinan más rápidamente que las esporas de B. cereus T en ausencia de cloruro de amonio (91).

8. UTILIZACION DE AGENTES QUIMICOS PARA EL
CONTROL A BACILLUS CEREUS

Los estudios acerca de la utilización de agentes químicos para el control de las células vegetativas de B. cereus son - muy escasos.

Para evaluar la seguridad microbiológica de un alimento - en particular, es importante conocer el porcentaje de células inoculadas capaces de iniciar el crecimiento bacteriano en el alimento (68). El uso de los diferentes métodos de preserva--- ción, permite disminuir la población bacteriana para mantenerla dentro de ciertos límites estandarizados, para diferentes - tipos de alimentos y poder considerar los alimentos como seguros para el consumo (68). Existen numerosos estudios sobre el efecto de la temperatura en la disminución bacteriana. El ca--- lentamiento altera la membrana citoplásmica, se pierden varias sustancias y se incrementa la sensibilidad a varios inhibido--- res selectivos como son: cloruro de sodio, polimixina y colo--- rantes como el azul de metileno. Altera también en algunos casos el RNA ribosomal y el DNA (69). Los estudios sobre el efec--- to de la temperatura en B. cereus son limitados. En 1978 Rappa port y Goepfert realizan un estudio y encuentran que después de un calentamiento a 47°C durante 5 min. en buffer pH 6.0 las células no son susceptibles a sulfato de polimixina B y rojo - de fenol a concentraciones en las cuales estas sustancias es--- tan presentes en los medios usados para enumerar a B. cereus.

Efecto de NaCl y pH

La información relacionada a efectos de concentración de NaCl y pH sobre el desarrollo de B. cereus es limitada. El rango de pH permitido para el desarrollo de B. cereus es pH 4.9 a 9.3. En relación con el desarrollo de B. cereus en alimentos - con diferente acidez el pH varía de 4.5 a 5.15. El microorganismo se puede desarrollar a una concentración de NaCl al 7% - pero se inhibe a una concentración de 10% (68). En general los resultados obtenidos pueden ser resumidos:

a) Los efectos de pH y NaCl sobre el desarrollo de B. cereus varían con la cepa y el medio de cultivo usado.

b) La adición de NaCl de 0-10% al medio de cultivo causa una reducción en el desarrollo de B. cereus.

c) En el caso cuando se incrementan las concentraciones de NaCl, se debe utilizar mayor concentración de inóculo de B. cereus para asegurar su desarrollo.

d) Concentraciones elevadas de NaCl y valores extremos de pH inhiben el desarrollo de B. cereus.

e) Aún a bajas concentraciones de NaCl el microorganismo se inhibe cuando los valores de pH son lejanos del óptimo.

Efecto de Aw

Las bacterias que provocan intoxicación en alimentos generalmente se desarrollan a un rango de Aw 0.83 a 0.99. El valor de Aw mínimo permitido para el desarrollo de B. cereus es 0.95 (68).

Efecto del ac. sórbico

El ácido sórbico y sus sales son usados comunmente para prevenir la contaminación en alimentos. Este aditivo inhibe el desarrollo de hongos y levaduras cuando se usa en bajas concentraciones y también tiene un efecto antibacteriano, especialmente sobre bacterias como B. cereus y B. subtilis (70). A valores de pH bajos se incrementa la cantidad de ácido no disociado en el medio. El ácido libre entra en la célula bacteriana e inhibe varios sistemas enzimáticos. El efecto sobre B. cereus puede ser obtenido si el pH del substrato es menor de 6.3. A este pH, las sales de potasio son también hidrolizadas a ácido libre.

La cantidad de ácido sórbico necesaria para prevenir el desarrollo de B. cereus es entre 0.1 a 0.2% a un pH de 5.5 a 6.3 (68).

9. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

La experiencia obtenida a la fecha en la epidemiología de la intoxicación alimentaria por B. cereus, permite establecer algunas conclusiones:

- se requiere la ingestión de millones de microorganismos para causar intoxicación.

- el microorganismo se desarrolla en una gran variedad de alimentos (los cuales funcionan como vehículo de la bacteria) especialmente en aquellos que están en contacto con el polvo o bien en otros alimentos cocinados o procesados, en los cuales el tratamiento antibacteriano aplicado (fumigación con óxido de etileno o de propileno, o el calor) no es bastante para destruir al germen presente en los ingredientes utilizados; se implica por tanto, una deficiente conservación del alimento.

- los síntomas del padecimiento suelen ser leves, con incubación corta, y pronta recuperación.

- el alimento que contiene elevado número de células de B. cereus no muestra signos de alteración.

La escasa severidad de los síntomas puede contribuir a explicar el bajo número de reportes de este tipo de padecimientos en muchas partes del mundo, por lo que la incidencia real del padecimiento es difícil de precisar, pero son de esperar cifras altas tomando en cuenta la frecuencia cada vez mayor con la que se describen los brotes, conforme se tiene más conciencia entre los epidemiólogos. En Hungría por ejemplo, durante el periodo -

1968-1969 se presenta como la tercera causa de intoxicación alimentaria. En nuestro país la alta endemicidad de las infecciones entéricas dificulta el estudio del problema, desde el punto de vista epidemiológico, pues a las limitaciones de orden técnico en la notificación de los casos, en los estudios de campo y en los recursos de laboratorio, habrá que adicionar las dificultades para descubrir casos de una sintomatología relativamente benigna, dentro de una población que regularmente sufre la invasión y actividad de agentes patógenos en su tracto digestivo, afrontando la situación (con verdaderas excepciones) como algo cotidiano que no merece mayor atención. Conviene sin embargo, mantener conciencia del problema sobre todo en el caso de instituciones (guarderías, hospitales, centros de trabajo) en donde se atiende la alimentación de grupos grandes de individuos.

Existen propiedades de las toxinas de B. cereus que limitan el progreso en las investigaciones por lo cual no se define su naturaleza como son:

- la inestabilidad de las toxinas
- su sensibilidad a varias enzimas
- la capacidad de las cepas para perder parcialmente su patogenicidad
- y los problemas para separarla de otros metabolitos de B. cereus con similar peso molecular.

Este trabajo trata de la incidencia de B. cereus en una -

gran cantidad de alimentos y de las toxinas producidas por el microorganismo. Sin embargo, sería muy útil e interesante que se realizara un estudio más específico del comportamiento y desarrollo de B. cereus en una variedad de alimentos bajo varias condiciones como: temperatura, pH y la presencia o ausencia de otros microorganismos, el desarrollo de un método adecuado para la purificación de las enterotoxinas y poder conocer más acerca de su naturaleza.

Este trabajo cumple con los objetivos anteriormente señalados en la introducción. Dentro de las condiciones favorables para el desarrollo de B. cereus podemos mencionar:

- las malas condiciones de almacenamiento
- el poco cuidado durante el manejo del alimento provocado por la falta de higiene personal
- la preparación de los alimentos dejándolos expuestos -- varias horas a temp. ambiente con posterior calentamiento a -- temperatura inadecuada.

Existe una gran variedad de alimentos que sirven como vehículo para el desarrollo de B. cereus como son: productos lácteos, jamones, frutas, verduras, sopa de pasta, especias procesadas (ajo en polvo, chile, mostaza, orégano, pimienta etc.), productos cárnicos, postres etc. Por último, B. cereus produce principalmente dos enterotoxinas relacionadas con los alimentos, la toxina que provoca diarrea y la toxina que provoca el vómito.

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO KG

Medio basal:

peptona	0.1%	0.1%
extracto de levadura		0.05%
rojo de fenol		0.0025%
agar		1.8%
pH del medio		6.8

El medio basal se esteriliza a una temperatura de 121°C - durante 20 min. Se enfría a 50°C, se adicionan 100 ml. de emulsión de yema de huevo concentrado estéril y suficiente sulfato de polimixina B a una concentración final de 10 microg. por ml. se adicionan a 900 ml del medio basal. El medio se vierte en cajas petri, se deja solidificar. Y puede ser almacenado por una semana a 4°C. El almacenamiento prolongado no es recomendable (12).

MEDIO MYP

Agar manitol-yema de huevo-polimixina

Extracto de carne	1.0 g.	
peptona	10.0 g.	
D-manitol	10.0 g.	
Nacl	10.0 g.	
Rojo de fenol	0.025 g.	
Agar	15.0 g.	
H ₂ O	900 ml	ajustar el pH a 7.2 ± 0.1

Mezclar todos los ingredientes y calentar a disolver, se dispersa en porciones de 225 ml. en matraces de 500 ml. Se esteriliza 15 min. a 121°C. Se deja enfriar a 50°C en agua y se adicionan 12.5 ml. de emulsión de yema de huevo y 2.5 ml. de sol. de polimixina B, a cada 225 ml de medio. Mezclar bien y vaciar en cajas petri. Dejar las placas 24 hs. a temperatura ambiente antes de usar (16).

MEDIO PEMBA

Medio basal:

peptona	1.0 g.
D-manitol	10.0 g.
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g.
NaCl	2.0 g.
Na ₂ HPO ₄	2.5 g.
KH ₂ PO ₄	0.25 g.
Azul de bromotimol	0.12 g.
Agar	18.0 g.
H ₂ O	1000 ml.

Se mezclan los ingredientes y se calienta a disolver se ajusta a pH 7.4. El medio se dispersa en cantidades de 90 ml. y se esteriliza a 121°C durante 15 min. (pH final 7.2). Posteriormente las siguientes soluciones estériles se adicionan al medio basal fundido y enfriado a 48-50°C.

Piruvato de sodio 20% P/V	5 ml
Polimixina	10 microg./ml
Emulsión de yema de huevo	5 ml

El medio se vierte en cajas petri y se deja por 24 hs. a

Mezclar todos los ingredientes y calentar a disolver, se dispersa en porciones de 225 ml. en matraces de 500 ml. Se esteriliza 15 min. a 121°C. Se deja enfriar a 50°C en agua y se adicionan 12.5 ml. de emulsión de yema de huevo y 2.5 ml. de sol. de polimixina B, a cada 225 ml de medio. Mezclar bien y vaciar en cajas petri. Dejar las placas 24 hs. a temperatura ambiente antes de usar (16).

MEDIO PEMBA

Medio basal:

peptona	1.0 g.
D-manitol	10.0 g.
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g.
NaCl	2.0 g.
Na ₂ HPO ₄	2.5 g.
KH ₂ PO ₄	0.25 g.
Azul de bromotimol	0.12 g.
Agar	18.0 g.
H ₂ O	1000 ml.

Se mezclan los ingredientes y se calienta a disolver se ajusta a pH 7.4. El medio se dispersa en cantidades de 90 ml. y se esteriliza a 121°C durante 15 min. (pH final 7.2). Posteriormente las siguientes soluciones estériles se adicionan al medio basal fundido y enfriado a 48-50°C.

Piruvato de sodio 20% P/V	5 ml
Polimixina	10 microg./ml
Emulsión de yema de huevo	5 ml

El medio se vierte en cajas petri y se deja por 24 hs. a

temperatura ambiente ambiente antes de usar (15).

REACTIVOS

CALDO NITRATO

Extracto de carne	3.0 g.
Peptona	5.0 g.
KNO ₃	1.0 g.
H ₂ O	1000 ml.

Ajustar el pH a 7.0 ± 0.1 y vaciar porciones de 5 ml en tubos (125X16 mm.). Esterilizar 15 min. a 121°C.

Reactivos de la prueba para la reducción de nitritos:

Reactivo A.- Disolver 8 g. de ác. sulfanílico en 1 litro de ác. acético 5N (2+5)

Reactivo B.- Disolver 2.5 g de alfa-naftol en 1 litro de ác. acético 5N

VOGES-PROSKAUER

alfa-naftol 5% .- Disolver 5.0 g. de alfa-naftol en 100 ml. de alcohol.

Hidroxido de potasio al 40% .- Disolver 40 g. en KOH en 100 ml. de agua.

AGAR NUTRITIVO CON L-TIROSINA:

Agar nutritivo

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g.
Agar	15.0 g.

H₂O

1000 ml.

Calentar a disolver los ingredientes y vaciar en porciones de 100 ml en frascos. Esterilizar 15 min. a 121°C. Enfriar a 45°C en un baño de agua y adicionar 0.5 g. de L-tirosina estéril disuelta en 10 ml. de agua en cada 100 ml de medio. Mezclar vigorosamente y vaciar asépticamente 3.5 ml. del medio en tubos (100X13 mm.). Inclinarse y enfriar rápidamente para prevenir la separación de la tirosina. Para preparar L-tirosina adicionar 0.5 g. en 10 ml. de H₂O y vaciar en tubos de 150X20 mm. Esterilizar 15 min. a 121°C (16).

CALDO NUTRITIVO CON LISOZIMA

Extracto de carne	3.0 g.
Peptona	5.0 g.
H ₂ O	1000 ml.

Vaciar en porciones de 99 ml. en botellas y esterilizar - 15 min. a 121°C. pH final 6.8 ± 0.1. Mezclar 1.0 ml. de 0.1% solución de lisozima con 99 ml. de caldo y vaciar asépticamente 2.5 ml de medio en tubos de 100X13 mm. Para hacer la solución de lisozima, disolver 0.1 g. de lisozima en 65 ml de HCl 0.01N estéril, hervir por 20 min., y diluir a 100 ml. con HCl 0.01N estéril. Al mismo tiempo, disolver 0.1 g. de clorhidrato de lisozima en 100 ml de H₂O y esterilizar en filtro de membrana -- con un tamaño de poro de 0.45 milimicras (16).

10. BIBLIOGRAFIA

- (1) Thatcher F.S., and Clark D.S.. Análisis microbiológico de los alimentos, 3-6, 168-172, (1972).
- (2) Frazier W. C.. Food Microbiology. Food-Borne Infections - and intoxications: Bacterial, 3a. edición, McGraw-Hill Company limited New Delhi.
- (3) Buesa Muñoz F. P.. B. cereus: epidemiología, patogenicidad y patogenicidad. Revisión bibliográfica. Rev. Cub. Med. - Trop. 33 (2), 121-127, (1981).
- (4) Goepfert J.M. and Spira W.M.. B. cereus: Food poisoning - organism. a review. J. Milk Food Technol., 35 (4), 213-227, (1972).
- (5) Gilbert R.J. and Taylor A.J.. B. cereus Food Poisoning En Microbiological Trends in Agriculture, Fisheries and Food (Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. No. 4) Academic Press, London, New York, 197-213, (1976).
- (6) Gianella R.A. and Brasile L.. A hospital food-borne outbreak of diarrhea caused by B. cereus: clinical and microbiologic studies. J. Infect. Dis., 139, 366-370, (1979).
- (7) Terranova W. and Blake F. A.. B. cereus food poisoning. - N. Engl. J. Med 298 (3), 143-144, (1978).
- (8) Turnbull P.C.B.. B. cereus toxins. Pharmac. Ther., 13, - 453-505, (1981).
- (9) Bergey's manual of determinative bacteriology. Ed. Buchanan, R.E. and Gibbson, N.E. 8a. ed. William and Wilkins Co., Baltimore, (1976).
- (10) Jay J.M., Microbiología moderna de los alimentos 2a. Edición española Ed. Acribia Zaragoza España (1978).

- (11) Microorganismos de los alimentos, Vol. I Tecnicas de análisis microbiológico. ICMS Editorial Acribia Zaragoza España 2a. Edición.
- (12) Kim H.U. y Goepfert J.M.. Enumeration and identification of *B. cereus* in foods. Applied Microbiology, 22 (4), -- 581-587 (1971).
- (13) Kim H.U. and Goepfert J.M.. Ocurrence of *B. cereus* in selected dry food products. J. Milk Food Technol., 34, 12-15, (1971).
- (14) Owens J.J.. The egg yolkreaction produced by several species of bacteria. J. Appl. Bacteriol., 27, 137-148, --- (1974).
- (15) Holbrook R. and Anderson J.M.. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of - *B. cereus* in foods. Can. J. Microbiol., 26, 753-759 --- (1980).
- (16) Lancette G.A. and Hormon S.M.. Enumeration and confirmation of *B. cereus* in foods: Collaborative Study, J. A--ssoc. Off. Anal. Chem., 63 (3), 581-586, (1980).
- (17) Mossel D.A.A., Koopman M.J. and Jongerius F. Enumeration of *B. cereus* in foods, Can. J. Microbiol., 15, 651-653, (1967).
- (18) Gutierrez R.E.A.. Aislamiento e identificación de *B. cereus* en alimentos deshidratados, Tesis (1980), Fac. de - Química, UNAM.
- (19) Collins D.L. and Weiss K.F.. Microbiological guidelines and sampling plans for dried infant cereals and powdered infant formula from a Canadian National Microbiological survey, Journal of Food Protection, 43 (8), 613-616 --- (1980).

- (20) Bryan F.L.. Foodborne diseases, Center for Disease Control Public Health Service. Department of Health, Education, and Welfare, 209-211 (1980).
- (21) Wilkinson G. and Davies F.L.. Germination of spores of *B. cereus* in milk and milk dialysates: Effect of heat treatment, *J. Appl. Bact.* 36, 485-496, (1973).
- (22) Overcast W.W. and Krishnaswamy A.. The role of *B. cereus* in sweet curdling of fluid milk, *J. Milk Food Technol.*, 37 (5), 233-236, (1974).
- (23) Barrell R.A.E. and Rowland M.G.M.. Commercial milk products and indigenous weaning foods in a rural West African environment: a bacteriological perspective, *J. of Hyg.*, 84, 191-201, (1980).
- (24) Singh R.S., Sukhbir S. and Batish V.K.. Bacteriological quality of infant milk foods, *Journal of Food Protection* 43 (5), 340-342, (1980).
- (25) García V., Lastreto C. y Montoya A.. Evaluación de la presencia de *B. cereus* en un alimento infantil deshidratado, *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 23, 141-144, (1981).
- (26) Johnson K.M., Nelson C.I. and Busta F.F.. Germination and heat resistance of *B. cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses *Journal of Food Science*, 47 1268-1271, (1982).
- (27) Gilbert R.J. and Stringer M.F.. The survival and growth of *B. cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning, *J. Hyg.*, 73, 433-444, (1974).
- (28) Bryan F.L. and Bartleson Ch.A.. Hazard analyses, in referencia to *B. cereus*, in boiled and fried rice in cantonese-style restaurants, *Journal of Food Protection*, 44 (7), 500-512, (1981).

- (29) Sly T. and Ross E.. Chinese foods: Relationship between hygiene and bacterial flora, *Journal of Food Protection*, 45 (2), 115-118 (1982).
- (30) Holmes J.R. and Plunkett T.. Emetic food poisoning caused by *B. cereus*, *Arch. Intern. Med.* 141, 766-767, (1981)
- (31) Buxton J.D. and Pinegar J.A.. An investigation of the bacteriological quality of retail vanilla slices, *Journal of Hygiene*, 78, 387-394, (1977).
- (32) Raevuori M. and Kiutamo T.. An outbreak of *B. cereus* cereus food-poisoning in Finland associated with boiled rice, *Journal of Hygiene*, 76, 319-327, (1976).
- (33) Fields M.L. and Zamora A.F.. Microbiological analysis of home-canned tomatoes and green beans, *Journal of Food Science* 42 (4), 931-934, (1977).
- (34) Powers E.M. and Latt G.T.. Incidence and levels of *B. cereus* in processed spices, *J. of Milk and Food Technology* 39 (10), 668-670, (1976).
- (35) Son T.N. and Graham H.F.. Behavior of pathogenic bacteria in the oyster, *crassostrea commercialis*, during depuration, Re-laying, and storage, *Applied and Environmental Microbiology*, 40 (6), 994-1002, (1980).
- (36) Blakey J.L. and Priest F.G.. The occurrence of *B. cereus* in some dried foods including pulses and cereals, *Journal of Applied Bacteriology*, 48, 297-302, (1980).
- (37) Rogers F.. *Bacillus* isolates from refrigerated doughs, - wheat flour, and wheat, *Cereal Chemistry* 55 (5), 671-674 (1978).
- (38) Jawetz E., Melnick J.L. and Adelberg A.E.. *Microbiologia médica*, 11a. ed.. manual moderno. Editorial S.A. de C.V.

- (39) Coolbaugh J.C. and Williams R.P.. Production and characterization of two hemolysins of *B. cereus*, *Canad. J. Microbiol.*, 24, 1289-1295, (1978).
- (40) Turnbull P.C.B.. Studies on the production of enterotoxins by *B. cereus*, *J. Clin. Path.* 29, 941-948, (1976).
- (41) Spira W.M. and Goepfert J.M.. *Bacillus cereus* induced fluid accumulation in rabbit ileal loops, *Appl. Microbiol.*, 24, 341-348, (1972).
- (42) Glatz B.A. and Goepfert J.M.. Extracellular factor synthesized by *Bacillus cereus* which evokes a dermal reaction in guinea pigs, *Infection and Immunity*, 8(1), 25-29, - (1973).
- (43) Glatz B.A., Spira W.M. and Goepfert J.M.. Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *B. cereus* and related species, *Infection and Immunity*, - 10, 229-303, (1974).
- (44) Spira W.M. and Goepfert J.M.. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *B. cereus*, *Canad. J. Microbiol.*, 21, 1236-1246, (1975).
- (45) Melling J. and Capel B.J.. Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *B. cereus*, *J. Clin. Path.*, 29, 938-940, (1976).
- (46) Turnbull P.C.B., Kramer J.M. and Gilbert R.J.. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *B. cereus*, *Amer. J. Clin. Nutr.*, 32, 219-228, (1979).
- (47) Melling J. and Capel B.J.. Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin, *FEMS microbiology Letters*, 4, 133-135, (1978).

- (48) Escartin F.E.. Microbiología sanitaria. Vol. 1, (1981) Universidad de Guadalajara.
- (49) Schiemann D.A.. Occurrence of *Bacillus cereus* and the bacteriological quality of chinese 'take out' foods, *J. Food Prot.*, 41, 450-454, (1978).
- (50) Rappaport H. and Goepfert J.M.. Thermal injury and recovery of *B. cereus*, *J. Food Prot.*, 41, 533-537, (1978).
- (51) Ghosh A.C.. Prevalence of *B. cereus* in the feces of healthy adults, *J. Hyg.*, 80, 233-236, (1978).
- (52) Credit C., Hedeman R. and Heywood P.. Identification of bacteria isolated from pasteurized milk from pasteurized milk following refrigerated storage, *J. Milk Food Technol.*, 35, 709, (1972).
- (53) Shehata T.E. and Duran T.E.A.. Influence of temperature on the growth of psychrophilic strains of bacillus, *J. Dairy Sci.*, 54, 1579, (1971).
- (54) Mikolajcik E.M. and Kearney J.W.. Fate of *Bacillus cereus* in cultured and direct acidified skinmilk and cheddar cheese. *J. Milk Food Technol.*, 36, 317-320, (1973).
- (55) Mortimer P.R. and McCann G.. Food poisoning episodes associated with *B. cereus* in fried rice. *Lancet*, 1, 4043-4045, (1974).
- (56) Tatini S.R.. Thermal stability of enterotoxins in food, *J. Milk Food Technol.*, 39, 432-438, (1976).
- (57) Glatz B.A. and Goepfert J.M.. Production of *Bacillus cereus* enterotoxin in defined media in fermenter-grown cultures, *J. Food Prot.*, 40, 472-474, (1977).
- (58) Ivers J.T. and Potter N.N.. Production and stability of hemolysin, phospholipase C, and lethal toxin of *Bacillus cereus* in foods, *J. Food Prot.*, 40, 17-22, (1977).

- (59) Gorina L.G., Fluor F.S. and Olovnikov A.M.. Use of the aggregate-hemagglutination technique for determining exocenterotoxin of *Bacillus cereus*, *Appl. Microb.*, 29, 201-204, (1975).
- (60) Parker, D.A. and Goepfert J.M.. Enhancement of synthesis of *Bacillus cereus* enterotoxin using a sac-culture technique, *J. Food Prot.*, 41, 116-117, (1978).
- (61) Morita T.N. and Woodburn M.J.. Stimulation of *Bacillus cereus* by protein in cooked rice combinations, *J. Food Sci.* 42, 1232-1235, (1977).
- (62) Misra B.C., Sharma D. and Gollakota K.G.. Studies on Germination of Calcium and Zinc-enriched spores of *B. cereus* T., *Journal General Applied Microbiology*, 23, 109-117, - (1977).
- (63) Waites W.M. and Bayliss E.C.. The effect of changes in spore coat on the destruction of *B. cereus* spores by heat and chemical treatments, *Journal of Applied Biochemistry*, 1, 71-76, (1979).
- (64) Yoshimi Maeda, Ikuzo Kagami and Shozo Koga. Thermal analysis of the spores of *B. cereus* with special referencia to heat activation, *Canadian Journal of Microbiology*, 24, - 1331-1334, (1978).
- (65) Smoot L.A. and Pierson M.D.. Mechanisms of sorbate inhibition of *B. cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spore germination, *Applied and Environmental Microbiology*, 42 (3), 477-482, (1981).
- (66) Tompkin R.B., Christiansen L.N. and Shapares A.B. Effect of potassium sorbate on *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* *Clostridium perfringens*, and *Clostridium botulinum* in cooked, uncured sausage, *Appl. Microb.*, 28, 262-264, (1974).

- (67) Dring G.J. and Gould G.W.. Sequence of events during rapid germination of spores of *B. cereus*, *J. Gen. Microbiol.*, 65, 101-104, (1974).
- (68) Marrku Raevuori and Constantin Genigeorgis, *Applied Microbiology*, 29, 68-73, (1975).
- (69) Harriet R. and Goepfert J.M., Thermal injury and recovery of *B. cereus*, *J. Food Prot.*, 41 (7), 533-537, (1979).
- (70) Raevuori M.. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on growth of *B. cereus* and *B. subtilis* in rice filling of Karelian pasty, *European J. Appl. Microbiol.*, 2, 205-213, (1976).
- (71) Clarenburg A, Kampelmacher E. H.. *Bacillus cereus* als -- oor Zaak van voedselvergiftiging, *Voeding*, 18, 384, (1957).
- (72) Nikodemucz, I.. *Bacillus cereus* als Ursache von Lebensmittelvergiftungen *Z. Hyg. Infekt- Krankh.*, 145, 335, (1958).
- (73) Nikodemucz I., Bodnar, S.. Aerobe Sporenbildner als Lebensmittelvergifter. *Zentbl. Bakt. Parasitk de, I., Abt. Orig.* 184, 462, (1962).
- (74) Nikodemucz, I.. Die Aetiologie der Lebensmittelvergiftungen in Ungarn in den Jahren 1960 bis 1966., *Z. Hyg. Infektkrankh.*, 155, 204, (1968).
- (75) Galesloot L.. *Bacillus* spores in milk- Part 1. *Dairy Sci. Abstr.* 22, 215, (1953).
- (76) Nigren B.. Phospholipase C producing bacteria and food poisoning. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* 160, 1-89 - (1962).
- (77) Akimov A.M.. The contamination of various food products -- with *B. cereus*, *Gig. Sanit.* 34, 109-111, (1969).
- (78) Gilbert R.J. and Taylor A.J.. Outbreaks of *Bacillus cereus* food poisoning in Great Britain, *Archiv für Lebensmittelhygiene* 26, 38 (1975).

- (79) Chu H.P.. The lecithinase of *B. cereus* and its comparison with *Clostridium welchii* α -toxin. *J. Gen. Microbiol.*, 3 - 255-273, (1949).
- (80) Ezepechuk Yu. V., Bondarenko V.M., Yakovleva E.A. and Koryagina I.P.. The *Bacillus cereus* toxin: Isolation of permeability factor. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.*, 244, -- 275-284 (1979).
- (81) Slein M. W. and Logan G.F., Jr.. Partial purification and properties of two phospholipases of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriology*. 85, 369-381, (1963).
- (82) Mølbj R. Bacterial phospholipases. In: *Bacterial toxins -- and cell membranes*. 367-424, Jeljaszewicz, J. and Wadström T. (Eds), Academic Press, London (1978).
- (83) Boventre P.F. and Johnson C.E.. *Bacillus cereus* toxin. In: *Microbial toxins 3. Bacterial Protein Toxins*. 415-435, Montie, T.C., Kadis, S., *AJL. S. D.*, (Eds), Academic Press - London (1970).
- (84) De S.N., and Chatterje D.N.. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal - mucous membrane. *J. Pathol. Bacteriol* 66, 559-562, (1953).
- (85) Craig J.P.. A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature (London)* 207, 614-616 (1965)
- (86) Curran H.R., and Evens F.R.. The viability of heat activatable spores in nutrient and nonnutrient substrates as influenced by prestorage or poststorage heating and other -- factors. *J. Bacteriol*, 535, 103-113, (1947).
- (87) Keynan A., and Halvorsen H.. Transformation of dormant spore into a vegetative cell in Spores III. Edited L.L. Campbell and H.O. Halvorsen. *Am. Soc. Microbiol. Ann Arbor, Michigan*, 174-179 (1965).
- (88) Maeda Y., Teramoto Y., and Koga S.. Calorimetric study on heat activation of *Bacillus cereus* spores. *J. Gen. Appl.*

Microbiol, 21, 119-122, (1975).

- (89) Bulgarelli M.A. and Shelef L.A.. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) on Growth from Spores of *Bacillus cereus*. J. of Food Science, 50 (3), 661-664, (1985).