



AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE HOLBROOK E ANDERSON PARA IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DO GRUPO *BACILLUS CEREUS*

Victor B. C. **Biruel**^{1a}; Daniel V. **Mannarino**^{1b}, Maristela da S. do **Nascimento**^{1c}

¹ Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Microbiologia

Nº 13239

RESUMO - *Bacillus cereus* é um microrganismo ubiqüitário, importante patógeno de veiculação alimentar que pode causar síndrome emética ou diarréica. O emprego de metodologias para seu isolamento e identificação que sejam menos laboriosas e ao mesmo tempo rápidas é fundamental. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do teste confirmatório rápido de Holbrook e Anderson comparado ao método de referência da Food and Drug Administration (FDA) para a identificação do grupo *B. cereus*. Foram isoladas 157 colônias a partir de 100 amostras de alimentos, ração animal, fertilizante agrícola, embalagens e ambiente industrial. O isolamento foi realizado em ágar Manitol gema de ovo polimixina (MYP). Em seguida, as colônias foram submetidas à confirmação pela metodologia de referência e pelo método de Holbrook e Anderson. Todos os isolados que apresentaram resultados discordantes entre os métodos avaliados foram identificados pelo sistema API 50 CHB. A partir do ágar MYP foram isoladas 104 colônias típicas e 53 atípicas. Todos os isolados típicos foram identificados como membros do grupo *B. cereus* por ambas as metodologias avaliadas. Contudo, foi observada discordância entre os métodos para a identificação dos isolados atípico. Treze dos 53 (25%) isolados foram identificados como grupo *B. cereus* pela metodologia de referência, enquanto que pelo método de Holbrook e Anderson apenas quatro (8%) isolados foram confirmados como pertencentes ao grupo *B. cereus*. Portanto, o método de Holbrook e Anderson apresentou maior especificidade que a metodologia de referência.

Palavras-chaves: *Bacillus cereus*, isolamento, método de Holbrook e Anderson, alimentos.

^a Bolsista CNPq: Graduando em Biomedicina, UNIP, Campinas-SP, vborincenturion@yahoo.com.br.

^b Colaborador: Estagiário, Microbiologia CCQA/ITAL, Campinas-SP.

^c Orientadora: Pesquisadora, Microbiologia CCQA/ITAL, Campinas-SP, mnascimento@ital.sp.gov.br.



ABSTRACT- *Bacillus cereus* is a ubiquitous organism and a common food-borne pathogen that can cause diarrhea or emetic syndrome. The employment of methods for isolation and identification which are not laborious but at the same time fast is crucial. This study had the aim of evaluating the efficiency of the rapid confirmatory method of Holbrook and Anderson compared to the reference method of the Food and Drug Administration (FDA) for the identification of *B. cereus* group. One hundred and fifty seven colonies were isolated from 100 samples of food, animal feed, agricultural fertilizer, packaging and the industrial environment. The isolation was carried out on Mannitol egg yolk polymyxin agar (MYP). The colonies were then confirmed by the reference and the Holbrook and Anderson methods. All isolates with conflicting results between the two methods evaluated were identified by the API 50 CHB system. From MYP agar 104 typical colonies and 53 atypical were isolated. All typical isolates were identified as members of *B. cereus* group by both methods. However, there was disagreement between the methods for the identification of atypical isolates. Thirteen of 53 (25%) isolates were identified as *B. cereus* group by the reference method, while the Holbrook and Anderson method confirmed only four (8%) isolates as *B. cereus* group. Therefore, the Holbrook and Anderson method showed higher specificity than the reference method.

Key-words: *Bacillus cereus*, isolation, Holbrook and Anderson method, food

1 INTRODUÇÃO

O grupo *Bacillus cereus* é constituído por sete espécies, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* (GUINEBRETEIRE et al, 2012). A espécie *Bacillus cereus* é um importante patógeno de veiculação alimentar, responsável por inúmeros surtos em todo o mundo. Este microrganismo pode causar duas síndromes, emética ou diarreica. A síndrome emética se assemelha a intoxicação causada por *Staphylococcus aureus*, já a diarreica apresenta similaridade à infecção causada por *Clostridium perfringens* (MARINO, 2006).

Os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos são produtos cárneos, laticínios, condimentos, arroz e massas que tenham sido submetidos a um brando tratamento térmico (BENNETT e BELAY, 2001). As principais fontes de contaminação dos alimentos são matéria-prima, manipuladores e ambiente.

A contagem de *Bacillus cereus* em alimentos pode ser feita pelo plaqueamento direto, ou pelo método de Numero Mais Provável (NMP). A confirmação de grupo e espécie é feita tradicionalmente por provas bioquímicas e a obtenção dos resultados pode levar até 72h



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

(TALLENT et al, 2012). O método de Holbrook e Anderson combina a coloração de esporos de Ashby e de glóbulos de gordura intracelular de Burdon e possibilita a identificação do grupo *B. cereus* em 24 h após o isolamento (HOLBROOK e ANDERSON, 1980). Devido à importância do *B. cereus* em saúde pública torna-se importante a realização de estudos comparativos entre metodologias para verificar a viabilidade de implantação nas condições encontradas em nosso país. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do teste confirmatório rápido de Holbrook e Anderson comparado com o método de referência da Food and Drug Administration (FDA) (TALLENT et al, 2012) para a identificação do grupo *B. cereus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Para a realização do estudo foram utilizadas 157 colônias isoladas de 100 amostras, sendo 26 amostras de produtos lácteos (preparado lácteo em pó, leite em pó e queijo), 26 de refeições prontas para o consumo (composta de arroz, feijão, carne e guarnições), 21 de diferentes tipos de alimentos e ingredientes (amido de milho, caldo de cana de açúcar, extrato de levedura em pó, extrato de soja, farinha de arroz sem glúten e lactose, goma guar, macarrão, pectina cítrica, petit gateau, proteína de soja, soja integral), 22 de ração animal extrusada, 1 de fertilizante agrícola, 1 de papel cartonado e 3 de swab de instalações industriais (equipamentos e utensílios).

Além dos isolados, foram avaliadas as seguintes cepas de referência: *B. cereus* ATCC14579, *B. thuringensis* ITAL, *B. mycoides* ITAL, *B. subtilis* ATCC 9372, *B. stearothermophilus* ATCC 7953, *Alycyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498.

2.2 Isolamento em ágar

Inicialmente, uma alíquota de 25 g de cada amostra foi homogeneizada em 225 ml de água peptonada 0,1 %. Após o preparo de diluições decimais seriadas, foi realizado o plaqueamento em superfície em Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP) (Merck), com incubação a 30 °C por 24 h. As colônias típicas foram isoladas em Ágar Nutriente (NA) (Merck) e submetidas as provas de identificação. As colônias típicas de *B. cereus* são esféricas, com bordas perfeitas, planas e secas, translúcidas, levemente creme ou rósea leitosa, rodeadas por um grande halo de precipitação, devido à reação com a gema de ovo. Menos frequentemente, mas ainda consideradas típicas, as bordas são irregulares e, nesses casos, normalmente são brancas no centro e translúcidas ao redor. Já as atípicas apresentam colônias esféricas, amareladas ou brancas, com ou sem fermentação do manitol, sem halo de precipitação (TALLENT et al, 2012).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

2.3 Método de referência

Para a identificação dos isolados foram realizados os testes: utilização anaeróbia da glicose, decomposição da tirosina, teste de Voges-Proskauer modificado, redução do nitrato, teste de motilidade, atividade hemolítica, resistência à lisozima, crescimento rizóide, presença de cristais de toxinas intracelulares (TALLENT et al, 2012).

2.4 Método confirmatório rápido de Holbrook e Anderson

A partir do Ágar nutriente (NA) foram preparadas as lâminas para coloração. Inicialmente, foi adicionada a solução aquosa 5 % de Verde Malaquita (Synth), seguido por aquecimento em chapa elétrica por 2 min. Após lavagem em água corrente, foi adicionada a solução de Sudan Black (Sigma) (0,3 % peso/volume em etanol 70 %), permanecendo por 20 min em contato. Em seguida, a lâmina foi lavada com xileno (PA) (Merck) em capela de exaustão por 5 a 10 seg. Então, foi corada com solução de Safranina 0,5 % (Vetec) por 30 seg. O grupo *B. cereus* apresenta glóbulos de lipídios intracelulares corados em preto; esporos centrais a subterminais, sem dilatação do esporângio, corados de verde pálido; e células vegetativas, coradas de vermelho (Holbrook e Anderson, 1980).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a padronização do método de Holbrook e Anderson foram utilizadas cepas de referência do grupo *B. cereus* (*B. cereus* ATCC 14579, *B. thuringensis* ITAL, *B. mycoides* ITAL) e representantes de outras espécies que não apresentam glóbulos de lipídios intracelulares, comumente isoladas de alimentos (*B. subtilis* ATCC 9372, *B. stearothermophilus* ATCC 7953 e *Alycyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498) (Figura 1).

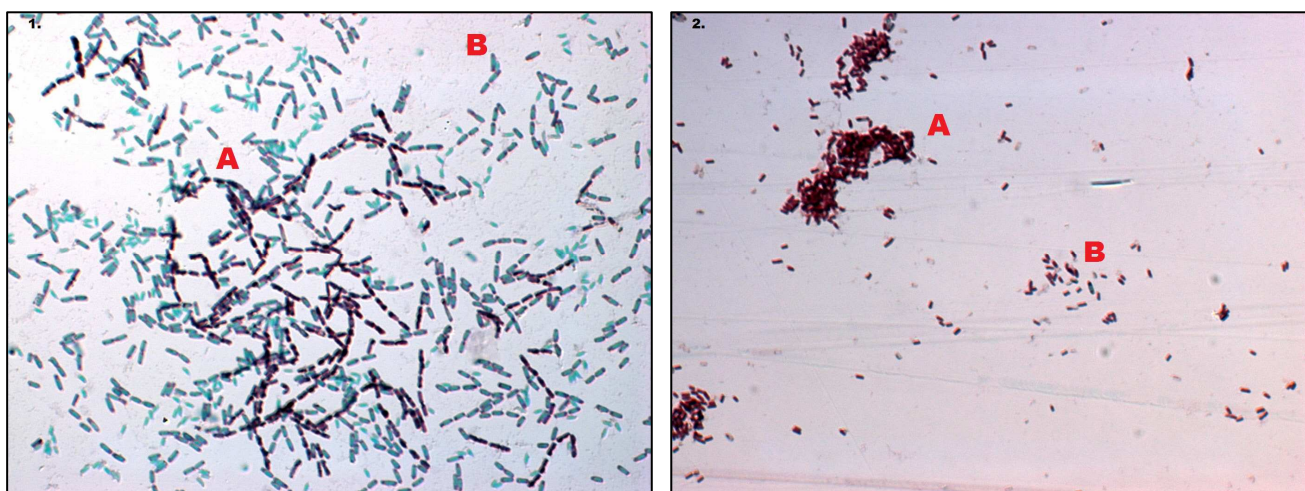


FIGURA 1. Coloração de Holbrook e Anderson. 1. *Bacillus cereus* A: Células vegetativas coradas em vermelho, com glóbulos de gordura intracelular em preto; B: Esporos centrais a subterminais, sem dilatação do esporângio, corados em verde; 2. *Bacillus subtilis* A: Células vegetativas coradas em vermelho, sem glóbulos de gordura intracelular; B: Esporos centrais a paracentrais sem dilatação do esporângio, corados em verde.

Durante o estudo foram utilizadas 157 colônias, isoladas em ágar MYP de 100 amostras de diferentes origens (produtos lácteos, refeições prontas para consumo, alimentos e ingredientes diversos, ração animal, fertilizante agrícola, papel cartonado, swab de instalações industriais). Deste total, 104 apresentaram característica morfolologicamente típica e 53 foram atípicas para o grupo *B. cereus* (Tabela 1).

Na confirmação dos isolados típicos, foi observado 100 % de concordância entre a metodologia de referência da FDA e o método de Holbrook e Anderson, sendo todos os 104 isolados identificados como membros do grupo *B. cereus*.

Cepas morfolologicamente não características apresentaram 24 % de positividade para grupo *B. cereus* quando utilizada a metodologia de referência. Com o auxílio do API 50CHB (sistema utilizado para classificação taxonômica), constatou-se índice de 21 % de resultado falso-positivo em isolados provenientes de amostras de fertilizante, ração e swab. Dois (4 %) isolados de preparado lácteo em pó apresentaram resultado falso-negativo para o grupo *B. cereus*. Pelo método de Holbrook e Anderson, apenas 8 % dos isolados atípicos foram confirmados como grupo *B. cereus*, condizendo com os resultados do API 50CHB.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

TABELA 1. Identificação do grupo *Bacillus cereus* pelo método de referência da FDA e pelo método de confirmação rápida de Holbrook e Anderson.

Amostras	Nº de Amostras	Tipo de Colônia	Total de Isolados	Resultados			
				Método de Referência (FDA)		Método de Holbrook &	
				Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Amido de Milho	2	Típica ^a	2	100%	-	100%	-
		Atípica ^b	-	-	-	-	-
Caldo de Cana de Açúcar	2	Típica	2	100%	-	100%	-
		Atípica	-	-	-	-	-
Extrato de Levedura em pó	1	Típica	1	100%	-	100%	-
		Atípica	-	-	-	-	-
Extrato de Soja	4	Típica	4	100%	-	100%	-
		Atípica	-	-	-	-	-
Farinha de arroz	4	Típica	4	100%	-	100%	-
		Atípica	-	-	-	-	-
Fertilizante Agrícola	1	Típica	5	100%	-	100%	-
		Atípica	4	50%	50%	-	100%
Leite em Pó Integral	7	Típica	7	100%	-	100%	-
		Atípica	-	-	-	-	-
Preparado Lácteo em pó	16	Típica	18	100%	-	100%	-
		Atípica	7	14%	86%	43%	57%
Goma Guar	1	Típica	-	-	-	-	-
		Atípica	2	-	100%	-	100%
Macarrão	2	Típica	2	100%	-	100%	-
		Atípica	-	-	-	-	-
Papel Cartonado	1	Típica	2	100%	-	100%	-
		Atípica	-	-	-	-	-
Pectina Cítrica	1	Típica	1	100%	-	100%	-
		Atípica	-	-	-	-	-
Petit Gateau	1	Típica	1	100%	-	100%	-
		Atípica	1	100%	-	100%	-
Proteína de Soja	2	Típica	2	100%	-	100%	-
		Atípica	2	-	100%	-	100%
Queijo tipo Minas	3	Típica	2	100%	-	100%	-
		Atípica	1	-	100%	-	100%
Ração Animal Extrusada	22	Típica	21	100%	-	100%	-
		Atípica	17	35%	65%	-	100%
Refeição Pronta para Consumo (arroz, feijão e guarnições)	26	Típica	16	100%	-	100%	-
		Atípica	10	-	100%	-	100%
Soja Integral	1	Típica	1	100%	-	100%	-
		Atípica	1	-	100%	-	100%
Swab de Instalações Industriais	3	Típica	13	100%	-	100%	-
		Atípica	8	38%	62%	-	100%
Total		Típica	104	100%	-	100%	-
		Atípica	53	24%	76%	8%	92%
Total Geral	100		157	76%	24%	71%	29%

^a: colônias róseas com halo; ^b: colônias brancas/amarelas sem halo.

Além disso, os resultados evidenciam o risco de se adotar a prática laboratorial de não confirmar colônias com características atípicas isoladas em MYP, visto que 4 isolados atípicos foram confirmadas como grupo *B. cereus*. Ehling-Chulz et. al. (2004) relataram que cepas de *B.*



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

cereus podem apresentar padrões metabólicos diversificados, o que resultaria em desenvolvimento de colônias atípicas em meios seletivos. Estas cepas podem eventualmente apresentarem alta toxicidade, como relatado em um surto na França que resultou em 3 óbitos (LUND et. al., 2000) pelo novo membro do grupo, *B. cytotoxicus*.

4 CONCLUSÃO

Apesar de não discriminar espécies do grupo *B. cereus*, a metodologia de confirmação rápida de Holbrook e Anderson apresentou maior sensibilidade e especificidade que método de referência da FDA. Portanto, trata-se de uma metodologia eficiente para ser implantação na rotina laboratorial.

5 AGRADECIMENTO

Ao CNPq – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA Microbiologia – ITAL, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Bennett, R.W.; Belay, N. *Bacillus cereus*. In: Downes, F.P.; Ito, K. (Ed.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, American Public Health Association, Washington, D.C., chap.32, 4 ed., p.311-316, 2001.

Ehling-Schulz, M.; Fricker, M.; Scherer, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition and Food Research** v.48, p.479-487, 2004.

Guinebretiere, M.H.; Auger, S.; Galeron, N.; Contzen, M.; De Sarrau, B.; De Buyser, M.L.; Lamberet, G.; Fazerlund, A.; Granum, P.E.; Lereelus, D.; De Vos, P.; Nguyen-The, C.; Sorokin, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 31-40, 2013.

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

Lund, T.; De Buyser, M.L.; Granum, P.E. A new enterotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, v.38, p.254–261, 2000.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Marino, M. Tossinfezioni alimentari da *Bacillus cereus*. **Igieni Alimenti: Desinfestazione & Igiene Ambientale**, Mar., 2006.

Schoeni, J.L.; Wong, A.C.L. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **Journal of Food Protection**, v.68, p.636–648, 2005.

Tallent, S. M.; Rhodehamel, E.J.; Harmon, S.M.; Bennett, R.W. *Bacillus cereus*. In: FDA (Ed.) **Bacteriological Analytical Manual**, Chap. 14, 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm>> Acesso em: 24 jan. 2013.