

Calidad bacteriológica y detección de *Bacillus cereus* toxigénicos en arroz blanco cocido expendido en el área metropolitana de la provincia de San José, Costa Rica

Rodrigo Coto, Carolina Chaves, María del Mar Gamboa, Maria Laura Arias

Facultad de Microbiología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET),
Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

RESUMEN. El gran consumo de arroz a nivel mundial es uno de los factores que favorece su implicación en brotes de origen alimentario y de uno de los patógenos más importantes ligado a este producto como el *Bacillus cereus*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de 50 muestras de arroz blanco cocido expendido en restaurantes de área Metropolitana de San José Costa Rica, incluyendo la determinación del recuento total aerobio mesófilo, Número Más Probable de coliformes totales, fecales y *E. coli*, *B. cereus* así como de detección de sus genes *nheA*, *nheB*, y *nheC*. Para el análisis bacteriológico se siguieron los procedimientos descritos en el Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos y para la detección de los genes se utilizó un PCR múltiplex y la metodología descrita por Hansen et al., 2001. De las muestras analizadas 46% fueron positivas por coliformes totales, 34% por coliformes fecales, 16% por *E. coli*, 10% por *B. cereus* y un 8% por *B. cereus* toxigénico. Lo anterior sugiere que el consumo de arroz blanco en restaurantes puede representar un riesgo para la salud pública y que es necesario implementar mejoras con el fin de brindarle al consumidor un producto inocuo y de mejor calidad. **Palabras clave:** Arroz, *Bacillus cereus*, calidad microbiológica

SUMMARY. Bacteriological quality and toxigenic *Bacillus cereus* detection in cooked white rice sold at the Metropolitan Area of San José, Costa Rica. The wide use of rice is one of the factors that favors its implication in food borne diseases, and one of the most important pathogens associated to it is *Bacillus cereus*. The aim of this work was to evaluate the microbiological quality of 50 samples of white cooked rice sold in restaurants at the Metropolitan Area of San José, Costa Rica, including the determination of the total aerobic plate count, the Most Probable Number of total and fecal coliforms and *Escherichia coli*. MPN of *Bacillus cereus* and the detection of *nheA*, *nheB* and *nheC* genes, associated to its toxicity, was also performed. Procedures described in the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods were followed for the bacteriological analysis, multiplex PCR was used for the detection of genes following the methodology described by Hansen et al, 2001. 46% of the samples analysed were positive for total coliforms, 34% for fecal coliforms, 16% for *E. coli* and 10% for *B. cereus*, being 8% toxigenic. These facts suggest that white cooked rice may represent a risk for Public Health and that improvements shall be performed in order to offer a safe and high quality product to consumers. **Key words:** Rice, *Bacillus cereus*, microbiological quality

INTRODUCCIÓN

El arroz es el cereal más cultivado el mundo y es el segundo de mayor consumo después de trigo (1). El gran consumo de este grano a nivel mundial es uno de los factores que favorece su implicación en brotes de origen alimentario y de uno de los patógenos más importantes ligado a este producto es *Bacillus cereus*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de 50 muestras de arroz blanco cocido expendido en Area Metropolitana de San José Costa Rica, incluyendo la determinación del recuento total

aerobio mesófilo, Número Más Probable de coliformes totales, fecales y *E. coli*, *B. cereus* así como de detección de sus genes *nheA*, *nheB*, y *nheC*. Para el análisis bacteriológico se siguieron los procedimientos descritos en el Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos y para la detección de los genes se utilizó un PCR múltiplex y la metodología descrita por Hansen et al., 2001. De las muestras analizadas 46% fueron positivas por coliformes totales, 34% por coliformes fecales, 16% por *E. coli* y 10% por *B. cereus* y un 8% por *B. cereus* toxigénico. Lo anterior sugiere que el consumo de arroz blanco

en restaurantes puede representar un riesgo para la salud pública y que es necesario implementar mejoras con el fin de brindarle al consumidor un producto inocuo y de mejor calidad.

En Costa Rica el arroz representa la principal fuente de alimentación y en el período 2005/2006 se calculó un consumo per cápita por año de aproximadamente 52 kilogramos, unos de los mayores de la región latinoamericana (2).

Dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos, uno de los patógenos más importantes ligado al arroz es *Bacillus cereus* (3). Desde la década del setenta en países como Finlandia y el Reino Unido se ha relacionado a este microorganismo con intoxicaciones alimentarias posterior al consumo de arroz (3).

B. cereus es un bacilo Gram positivo, formador de esporas, aerobio facultativo, habitante saprófito del suelo (4) que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente (5). Debido a esta amplia distribución es que se facilita su acceso a los alimentos (6). Dentro de sus principales reservorios en el ambiente se encuentra la materia orgánica en descomposición, agua dulce y salada, vegetales, fomites y el tracto gastrointestinal de invertebrados (7).

Esta bacteria ha sido relacionada con una amplia gama de patologías, las más comunes son las enfermedades diarreicas y eméticas; sin embargo también se ha relacionado con infecciones del tracto respiratorio, urinario, del sistema nervioso central, endocarditis, osteomielitis, endoftalmitis, entre otras (8). La patogenicidad de esta bacteria, ya sea en infecciones intestinales o extraintestinales, se encuentra íntimamente asociada con la producción de exoenzimas o toxinas. Dentro de estas toxinas se describen cuatro hemolisinas (9), tres fosfolipasas, una toxina emética (cerúlida), y tres enterotoxinas formadoras de poros: la hemolisina BL (Hbl), la enterotoxina no hemolítica (Nhe), y la citotoxina K (10,11).

La patogénesis por *B. cereus* en el tracto gastrointestinal se debe a que las células vegetativas ingeridas, producen y secretan las enterotoxinas que inducen el síndrome diarreico (Hbl, Nhe y citotoxina K); o a que la toxina emética, un péptido cíclico codificado por un plásmido, que es producida en los alimentos e ingerida ya preformada (8).

Aunque se han descrito casos del tipo emético asociados con niveles de *B. cereus* de 10^3 UFC/g de alimento contaminado, se estima que la dosis infec-

tiva mínima para ambos tipos de síndrome, se encuentra aproximadamente entre 10^5 - 10^8 UFC/g de alimento consumido (11). El tipo de síndrome que se presenta con mayor frecuencia varía de acuerdo al país en estudio, por ejemplo en Japón el síndrome emético es diez veces más frecuente que el diarreico, mientras que en Europa y Norteamérica es más frecuente el diarreico (11).

Debido a que la intoxicación alimentaria por *B. cereus* no es de reporte obligatorio en ningún país, no se conocen datos exactos acerca de su incidencia o sobre su efecto en la inocuidad de los alimentos. Los pocos países que han realizado estudios a profundidad sobre este patógeno han encontrado que *B. cereus* es un agente etiológico frecuente en intoxicaciones alimentarias (11,12); en Noruega e Islandia se reportaron porcentajes de aislamiento en intoxicaciones alimentarias entre 47-22% , respectivamente (11).

Aunado a lo anterior, la presencia de *B. cereus* en los alimentos no es suficiente para determinar su potencial patogénico, por lo que la identificación o no de los genes que codifican sus toxinas es necesaria para establecer el potencial toxigénico de las cepas, de manera que se pueda esclarecer realmente el riesgo sanitario del consumo de los alimentos contaminados (13).

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, se puede apreciar la importancia de realizar un estudio que determine la frecuencia de *B. cereus* en muestras de arroz blanco cocido de restaurantes del área metropolitana nacional, así como la presencia de los genes *nheB*, *nheA* y *nheC* de la toxina Nhe en los aislamientos obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Las muestras que se utilizaron en este proyecto fueron de arroz blanco cocido obtenido de 50 restaurantes localizados en los cantones de Tibás, Desamparados, Moravia, Goicoechea, Montes de Oca, Curridabat y el cantón central de San José, Costa Rica. El análisis de las mismas se realizó en el Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, localizado en la Universidad de Costa Rica. Las muestras fueron transportadas en frío al laboratorio, para evitar el crecimiento de los microorganismos y la contaminación de las mismas. El análisis de éstas se realizó dentro de las 24 horas posteriores a su adquisición.

Para llevar a cabo el análisis, se aplicaron los procedimientos descritos en el Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos (14). Se tomaron 25 g del alimento y se mezclaron con 225 mL de Agua Peptonada Estéril (APE) al 0,1% en un homogenizador Stomacher®400 Circulator de la marca Seward, de esta suspensión se hicieron cuatro diluciones decimales adicionales (10^{-1} a 10^{-5}).

Recuento total aerobio mesófilo

A partir de cada dilución realizada, se tomaron 100 μ L que se colocaron sobre una placa de Petri con agar Estándar + 2,3,5-cloruro trifeníl tetrazolium al 0,5% (TTC) y se esparcieron con asa de Drigalski. Se incubaron a 35° C durante 48 horas. Luego de la incubación se contaron las colonias rojizas en los platos de Petri que contuvieran entre 25 y 250 colonias y se calculó el número de UFC/g multiplicando el número de colonias por el factor de dilución.

Número más probable de coliformes totales, fecales y *E. coli*

Prueba presuntiva

Se transfirió 1mL de las diluciones preparadas a una serie de 3 tubos de Caldo Lactosado Simple (CLS) con campana de Durham, los cuales se incubaron a 35° C por 48 horas. Los tubos que presentaron gas y crecimiento bacteriano se consideraron presuntamente positivos.

Prueba confirmatoria

Coliformes totales: Los tubos presuntamente positivos se subcultivaron a caldo bilis verde brillante (CBVB) utilizando palillos de madera estériles. Se incubaron por 48 horas a 35° C, los tubos con gas y crecimiento bacteriano se utilizaron para determinar el NMP de coliformes totales /g.

Coliformes fecales: Los tubos presuntamente positivos se subcultivaron a caldo *E. coli* (EC) utilizando palillos de madera estériles. Se incubaron por 24 horas a 44,5° C, los tubos con gas y crecimiento bacteriano se utilizaron para determinar el NMP de coliformes fecales /g.

E. coli: Se inocularon tubos con caldo tripton a partir de los tubos positivos de caldo *E. coli* (EC) utilizando palillos de madera estériles. Se incubaron a 35° C durante 24 horas. Se confirmó la presencia de *E. coli* evaluando la producción de indol con el reactivo de Ehrlich y xilol.

Determinación de *B. cereus*

Se utilizó la técnica de Número Más Probable descrita por Downes *et al.*, 2001. Para ello se utilizó una serie de tres tubos de Caldo Trypticase Soya (CTS) con Polimixina B (0.06 mg/mL) y se inoculó 1mL de las diluciones del homogenizado del alimento. Se incubó cada tubo por 48 horas a 35° C. Posteriormente, a partir de los tubos que mostraron turbidez se rayaron placas de agar Manitol-Yema de Huevo-Polimixina (MYP) que se incubaron a 35° C por 48 horas. A partir de estas placas se escogieron las colonias típicas de *B. cereus*, que se observaron grandes, irregulares, secas, de color rosado (manitol negativo) y rodeadas por un halo opalescente (lecitinasa positivo). Posteriormente, se realizaron varias pruebas con el fin de confirmar o descartar la presencia de *B. cereus*. Estas pruebas incluyeron tinción de Gram, oxidasa, catalasa, reducción de nitratos a nitritos, movilidad y hemólisis.

Detección de los genes *nheA*, *nheB*, y *nheC*.

Se utilizó la metodología descrita en 2001 por Hansen *et al.*, (15), los genes de la enterotoxina Nhe de *B. cereus* se detectaron mediante un PCR multiplex que utilizó ADN extraído mediante choque térmico como molde. Para ello, una colonia bacteriana recuperada a partir de agar Sangre incubado por 24 horas a 35° C, fue resuspendida en 500 μ L de solución tamponada de fosfatos ajustada a pH = 6.8 (PBS) e incubada durante 20 minutos a 95° C. Los detritos celulares fueron removidos mediante sedimentación por centrifugación a 4° C por 10 min. Del sobrenadante, que contenía el ADN extraído, se almacenaron 300 μ L para ser utilizados como ADN base para la amplificación. La mezcla para la amplificación se hizo utilizando 1 μ L de cada primer a 100 μ M (*nheA* 344 S, *nheA* 843 A, *nheB* 1500 S, *nheB* 2269 A, *nheC* 2820 S y *nheC* 3401 A) (15), 5 μ L del ADN extraído por choque térmico, 25 μ L del “ready-to use” 2X mastermix (Fermentas®) y 17 μ L de agua libre de nucleasas para un volumen final de 50 μ L. El programa de amplificación incluyó 30 ciclos de desnaturalización a 94° C por 15 segundos, un paso de alineación a 55° C por 45 segundos y un paso de extensión a 72° C por 2 minutos. Como control positivo se usó la cepa *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD 137 la cual presenta los 3 genes para la toxina Nhe, y como control negativo se empleó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. La electroforesis de los productos amplificados se realizó en gel de agarosa al 2% con bro-

muro de etidio a una concentración final de 0,0005 mg/mL. El gel se cargó con 10 µL de mezcla de carga (10 µL de las muestras amplificadas con 1 µL de buffer de carga) y se corrió a 120 V durante 1 hora. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pares de bases (Fermentas®).

Los primers fueron escogidos de los deducidos por Hansen *et al.*, 2001 (15) para detectar los genes que codifican para los tres componentes de la toxina Nhe y son descritos en el tabla 1.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos a partir del recuento total aerobio mesófilo demostraron que un 30% de las muestras tenían valores superiores a 10^5 UFC/g, destacándose dos muestras que presentaron recuentos superiores a 10^8 UFC/g.

En el tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para coliformes totales, fecales, *E. coli* y *B. cereus*. Cabe destacar que el 46% (n=23) de las muestras fueron positivas (>3 NMP/g) por coliformes totales, el 34% (n=17) por coliformes fecales y en el 16% (n=8) por *E. coli*. En cinco muestras fue posible la identificación de *B. cereus* (>3 NMP/g), siendo 240 NMP/g el valor más alto.

La evaluación de los aislamientos de estas últimas muestras mediante la prueba de PCR determinó que cuatro de ellas eran positivas por los tres genes (*nheA*, *nheB* y *nheC*) del operón *nhe*. En la cepa restante se detectó únicamente los genes *nheA* y *nheB* (figura 1).

DISCUSIÓN

El arroz blanco cocido se encuentra

TABLA 1.
Secuencia de nucleótidos, posición de los primers utilizados para la detección de genes codificantes para la toxina Nhe y tamaño de los productos esperados.

Nombre y secuencia (5'→3')	Posición	Producto esperado (pares de bases)
Componente A (gen <i>nheA</i>) de Nhe <i>nheA</i> 344 S: TACGCTAAGGAGGGGCA <i>nheA</i> 843 A: GTTTTATTGCTTCATCGGCT	344-360 → 843-823 ←	499
Componente B (gen <i>nheB</i>) de Nhe <i>nheB</i> 1500 S: CTATCAGCACTTATGGCAG <i>nheB</i> 2269 A: ACTCCTAGCGGTGTTCC	1500-1518 → 2269-2253 ←	769
Componente C (gen <i>nheC</i>) de Nhe <i>nheC</i> 2820 S: CGGTAGTGATTGCTGGG <i>nheC</i> 3401 A: CAGCATTCGTACTTGCCAA	2820-2836 → 3401-3383 ←	581

TABLA 2
Resultados en porcentajes de NMP de Coliformes Totales, NMP de Coliformes Fecales, NMP de *E. coli* y NMP de *B. cereus* obtenidos a partir de las muestras de arroz evaluadas.

Análisis	< 3 NMP/g	≥ 3 NMP/g - < 1100 NMP/g	≥ 1100 NMP/g
Coliformes Totales	54% (n=27)	20% (n=10)	26% (n=13)
Coliformes Fecales	66% (n=33)	14% (n=7)	20% (n=10)
<i>Escherichia coli</i>	84% (n=42)	10% (n=5)	6% (n=3)
<i>Bacillus cereus</i>	90% (n=45)	10% (n=5)	0% (n=0)

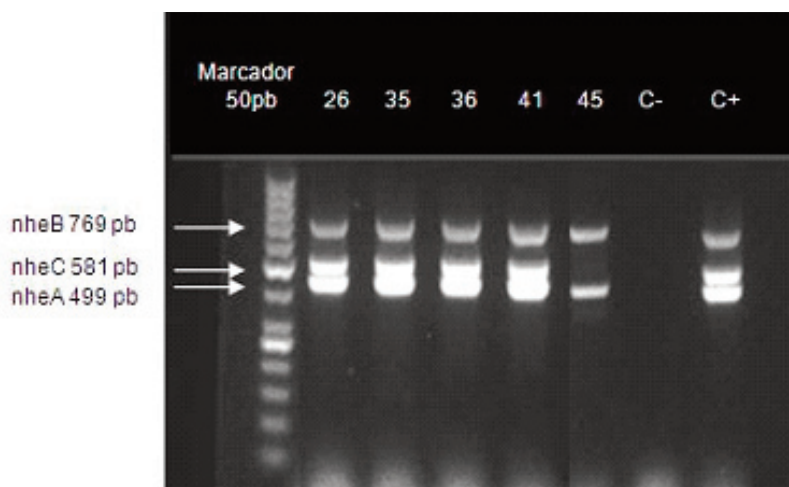


FIGURA 1
Productos de amplificación del PCR de *B. cereus*. C+= Control positivo, cepa *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD 137 con los 3 genes para la toxina Nhe. C- = Control negativo, cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

dentro del grupo denominado alimentos listos para el consumo ya que no requieren tratamientos térmicos adicionales antes de ser ingeridos por el consumidor. La calidad bacteriológica de este alimento depende de muchos factores incluyendo la forma de prepararlo, la clase de arroz, la forma de servirlo y la manipulación del mismo (16).

En alimentos listos para el consumo, varios lineamientos (17,18) recomiendan recuentos totales aerobios mesófilos menores a 10^5 UFC/g de alimento. A nivel mundial se han realizado varios estudios para estimar la carga bacteriana mesófila aerobia inicial en arroz blanco cocido, algunos resultados incluyen los obtenidos en el Reino Unido donde se reportan valores que oscilan entre $<10^3$ a $\geq 10^7$ UFC/g (20), en Filipinas con un promedio de 10^5 UFC/g (20) y en la ciudad de Benin (Nigeria), se encontraron valores promedio de 10^5 UFC/g (17). En el actual estudio se determinó que el 30% (n=15) de las muestras tenían recuentos totales aerobios mesófilos superiores a 10^5 UFC/g de alimento, lo que supera los estándares de calidad a nivel internacional. Sin embargo, como la mayoría de estudios han encontrado resultados en el rango de 10^5 UFC/g de alimento, algunos autores como Gilbert *et al.* (17) abordan la posibilidad de aumentar el límite de aceptabilidad en alimentos a base de arroz hasta 10^6 UFC/g de alimento (20). Aún así, se encontró que 11 muestras superaron el valor de 10^6 UFC/g y dos de ellas sobrepasaron los 10^8 UFC/g. Niveles elevados de contaminación bacteriana en el arroz se han relacionado con la práctica de preparar grandes cantidades del producto en los restaurantes de manera anticipada para su posterior utilización y el guardar el producto a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo antes de volver a calentarlo. Estas prácticas son particularmente comunes en países donde el arroz es parte importante de la dieta y además se usa como materia prima para otros alimentos (19).

La adición de productos frescos al arroz cocinado y las prácticas incorrectas al servir los alimentos pueden ayudar a explicar los altos porcentajes de muestras positivas (>3 NMP/g) por coliformes totales (46%) y coliformes fecales (34%), indicando mala higiene, inadecuada cocción o contaminación post tratamiento térmico (16,20).

Por otra parte, como es conocido, *E. coli* se considera el microorganismo indicador de contaminación fecal por excelencia, esto debido a que tiene como há-

bitat natural el intestino de animales vertebrados (14,20). En este trabajo se encontró que un 16% de las muestras (n=8) eran positivas (≥ 3 NMP/g) por *E. coli*. Según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 empleado para la interpretación de resultados en el grupo 17: Alimentos listos para consumir y subgrupo 17.1: Alimentos preparados, listos para consumir que no requiere tratamiento térmico, para el parámetro de *E. coli* el límite máximo permitido es de <3 NMP/g, por lo que las ocho muestras anteriormente mencionadas no son aptas para el consumo humano. Para la mayoría de los especímenes en los que se detectó *E. coli* se sobrepasó el límite permitido, teniendo la muestra más contaminada un resultado de 24 000 NMP/g. Tales valores implican un riesgo potencial de contaminación con patógenos entéricos al encontrar cantidades significativas de contaminación fecal en alimentos listos para consumo.

Se aisló *B. cereus* a partir del 10% de las muestras analizadas. Estudios nacionales previos reportan un 33% de aislamientos en productos lácteos con especias y leches deshidratadas (13), mientras que en un estudio realizado en Nigeria se reportó porcentajes de aislamiento de 50% de *B. cereus* en diferentes clases de arroz cocido (16). Por otro lado, en un estudio realizado en Cuba por Martino *et al.*, (2010) (6) se aislaron 24 cepas de *B. cereus* a partir de 110 muestras de alimentos listos para el consumo, donde la mayor incidencia se encontró en los platos elaborados a base de arroz y de natilla. Otros estudios recientes también han reportado recuentos altos de *B. cereus* en arroz y pastas en Holanda y Taiwán (16, 21).

La determinación de *B. cereus* mediante la técnica de NMP realizada en este estudio reveló cinco muestras positivas (>3 NMP/g) pero con niveles bajos de contaminación por este patógeno, siendo 240 NMP/g el valor más alto encontrado. Los criterios de aceptabilidad para alimentos positivos por *B. cereus* son diversos, algunas fuentes citan como satisfactorios niveles $<10^3$ UFC/g, aceptables entre 10^3 - $<10^4$ UFC/g, insatisfactorios entre 10^4 - $<10^5$ UFC/g, e inaceptables/potencialmente patógenos $>10^5$ UFC/g (20). Otras autoridades citan niveles $<10^2$ UFC/g como satisfactorios, entre 10^2 a $<10^3$ como aceptables, entre 10^3 y $<10^4$ como insatisfactorios y $\geq 10^4$ como peligrosos (20-22). Sin importar cuáles criterios de interpretación sean utilizados, los resultados encontrados en esta investigación señalan valores que no representan

un riesgo para la salud del consumidor, no obstante, la presencia de *B. cereus* en alimentos listos para el consumo generalmente se ha relacionado con manejos inadecuados luego de la cocción (6).

Aunque muchos autores consideran que valores bajos representa un bajo riesgo de intoxicación alimentaria por *B. cereus*, se ha reportado que al tratarse de alimentos ya cocidos, desprovistos de la mayoría de los microorganismos competidores, mantenidos a temperaturas fuera del rango térmico sugerido por largos periodos de tiempo, el riesgo de una infección o intoxicación por este patógeno aumenta considerablemente (23-24).

La presencia de *B. cereus* en el alimento no es suficiente para determinar el riesgo real de producir infección en el consumidor, por lo que es importante determinar el potencial toxigénico de las cepas aisladas (10,13). De acuerdo a los resultados obtenidos del PCR, cuatro de los cinco aislamientos de *B. cereus* contaban con los genes *nheA*, *nheB* y *nheC* del operón *nhe*; y por lo tanto se consideran capaces de producir la toxina Nhe. Algunos estudios indican que el operón *hbl* se encuentra presente en aproximadamente 50% de los aislamientos de *B. cereus* y el *nhe* en cerca del 100% de las cepas (11). En un estudio danés realizado por Rosenquist *et al.* (21) se identificaron 40 cepas de *B. cereus* en alimentos listos para el consumo, las cuales eran todas positivas por el operón *nhe*. En muchos casos de intoxicaciones alimentarias por *B. cereus*, la toxina Nhe actúa de forma exclusiva (25), por lo que el aislamiento de cepas con los tres genes codificados por el operón *nhe* no solo implica la producción de toxina si no también la posibilidad de causar una toxiinfección aún en ausencia de otra toxina (Hbl o CytK). Se sabe que la presencia de *nheC* junto con *nheA* y *nheB* es esencial para producir la actividad citotóxica del complejo Nhe en ensayos con células Vero (25). Al parecer la función de *nheC* es similar al de un “catalizador”, ya sea ayudando a unir a *nheA* con *nheB* (luego que *nheB* se acople con la célula blanco) o facilitando cambios conformacionales (25), por lo que los productos de los tres genes son indispensables para la actividad biológica de la toxina; es por esto que la muestra donde solo se detectaron los genes *nheA* y *nheB*, no se considera capaz de producir una toxina Nhe funcional.

Teniendo en cuenta los hallazgos obtenidos durante esta investigación que incluyen un 46% de muestras

positivas por coliformes totales, 34% por coliformes fecales, 16% por *E. coli* y 10% por *B. cereus* y un 8% por *B. cereus* toxigénicos se sugiere que el consumo de arroz blanco en restaurantes puede representar un riesgo para la salud pública y que se deberían implementar mejoras en las medidas higiénicas, el procesamiento, la manipulación y el almacenamiento del alimento, con el fin de brindarle al consumidor un producto inocuo y de mejor calidad.

REFERENCIAS

1. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA. Estudio de la cadena agroalimentaria de arroz en la República Dominicana. 2006. 1-94.
2. Conarroz. Laboratorio de Control de Calidad. 2011. En línea. www.conarroz.com. Consultado el 21 de Julio 2011
3. Pan T, Wang T, Lee C, Chien S & Horng C. Food-Borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J Clin Microbiol.* 1997. 35: 1260–1262.
4. Martínez J. Desarrollo de métodos rápidos para el control del *Bacillus cereus* en alimentos. Tesis Doctoral Universidad de Valencia. 2008.
5. Ash C, Farrow J, Dorsch M, Stackenbrandt E & Collins M. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol.* 1991. 41: 343–346.
6. Martino T, Leyva V, Puig Y, Machin M, Aportela N & Ferrer, Y. *Bacillus cereus* y su implicación en la inocuidad de los alimentos. Parte I. *Rev Cub Salud Púb.* 2010. 36: 128–138.
7. Jensen G, Hansen B, Ellenberg J, & Mahillon J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environm Microbiol.* 2003. 5: 631–640.
8. Bottone E. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2010. 23: 382–398.
9. Lund T, DeBuyser M & Granum P. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 2000. 38: 254–261.
10. Saki C, Luchi T, Ishii A, Kumagai K & Takagi T. *Bacillus cereus* brain abscesses occurring in severely neutropenic patients: successful treatment with antimicrobial agents, granulocyte colony-stimulating factor, and surgical drainage. *Int. Med.* 2001. 40: 654–657.
11. Granum P. *Bacillus cereus* and food poisoning. *Applications and systematics of Bacillus and relatives.* 2002. 141-159.
12. Schmidt K. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Infections and Into-

13. Blanco W, Arias M, Pérez C, Rodríguez C & Chaves C. Detección de *Bacillus cereus* toxigénicos en productos lácteos con especias y leches deshidratadas colectadas en Costa Rica. ALAN. 2009. 59: 402-406.
14. Pouch DF. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. APHA. US. 2001.
15. Hansen B & Hendriksen N. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Appl Environ Microbiol. 2001. 67: 185-189
16. Wogu M, Omoruyi M, Odeh H & Guobadia J. Microbial load in ready-to-eat rice sold in Benin City. J Microbiol & Antimicrobiol. 2011. 3: 29-33.
17. Gilbert R, De Louvois J, Donovan T, Little C, Nye K, Ribeiro C, Richards J, Roberts D & Bolton F. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. Commun Dis Public Health 2000. 3: 163-167.
18. FSAI, Food Safety Authority of Ireland. Guidelines for the Interpretation of Results of Microbiological Analysis of Some Ready-to-eat Foods Sampled at Point of Sale, Guidance, Note No. 2001. 3: 1-12.
19. Azanza P. Aerobic plate counts of Philippine ready-to-eat foods from take-away premises. J Food Safety. 2005. 25: 80-97.
20. New South Wales, Food Authority. Microbiological quality guide for ready-to-eat foods, A guide to interpreting microbiological results. 2009.
21. Rosenquist H, Smidt L, Andersen S, Jensen G & Wilcks A. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. FEMS Microbiol Lett. 2005. 25: 129-136.
22. Food Standards Australia New Zealand. Guidelines for the microbiological examination of ready - to - eat foods. 2001.
23. Mendes R, de Azeredo R, Coelho A, de Oliveira S & Coelho M. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. Rev Nutr Campinas. 2004. 17: 255-261.
24. Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Barsotti C, Baggiani A & Senesi S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. FEMS Microbiol Lett. 2002. 208: 129-34.
25. Lindbäck T, Fagerlund A, Rødland M & Granum P. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin. Microbiol. 2004. 150: 3959-3967.

Recibido: 28-05-2012

Aceptado: 13-08-2012