

***Bacillus cereus* enterotoxigênicos em diferentes fases do processamento de leite UAT**

Enterotoxigenics *Bacillus cereus* in different phases of the UHT milk process

Ana Maria Centola Vidal-Martins,* Oswaldo Durival Rossi Júnior,* Karina Paes Bürger,* Marita Vedovelli Cardozo,*
Bruna Maria Salloti,* Ana Lúgia Lordello Cortez*

Resumo

Um total de 300 amostras de leite foram submetidas à pesquisa de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* e as cepas isoladas foram analisadas quanto à produção de enterotoxinas através do kit BCET-RPLA. Bactérias do grupo do *Bacillus cereus* foram verificadas em 36 amostras de leite cru, 55 de pasteurizado e 27 de UAT. Destas, 12 cepas isoladas do leite cru, 24 do pasteurizado e 24 do UAT foram submetidas ao teste de detecção de enterotoxinas. Verificou-se que 50,0% das cepas isoladas de amostras de leite cru, 20,8% das isoladas de pasteurizado e 75,0% das isoladas de UAT submetidas ao teste demonstraram-se positivas para produção de enterotoxinas. Os resultados evidenciaram maior número de cepas de *Bacillus cereus* enterotoxigênicos em leite UAT, o que serve de alerta para a indústria e autoridades sanitárias pela possibilidade de amostras de leite consideradas isentas de microrganismos estarem veiculando microrganismo potencialmente patogênico.

Palavras-chave: leite cru, leite pasteurizado, leite UAT, *Bacillus cereus*, enterotoxinas.

Abstract

Three hundred milk samples have been submitted to *Bacillus cereus* group bacteria research and the isolated strains were analysed to enterotoxin production, through BCET-RPLA kit. The *Bacillus cereus* group bacteria were found in 36 raw milk samples, 55 pasteurized and 27 from UHT. On which, 12 raw milk isolated strain, 24 from pasteurized and 24 from UHT were submitted to enterotoxin detection test. It has been verified that 50.0% isolated strains from raw milk samples, 20.8% from pasteurized milk and 75.0% from UHT milk which have been submitted to the test, were positive to enterotoxin production. These results show that high number of enterotoxigenic *Bacillus cereus* strain in UHT milk, what can be considered an alert to industries and sanitary authorities, on the possibility that considered microorganisms free milk being a potential pathogenic microorganism vehicle.

Keywords: raw milk, pasteurized milk, UHT milk, *Bacillus cereus*, enterotoxins.

Introdução

O *Bacillus cereus* pertence à família *Bacillaceae*; é um bastonete, Gram-positivo, aeróbio facultativo e capaz de formar esporos resistentes a elevadas temperaturas, desidratação e alterações físicas e químicas. Estes microrganismos estão largamente distribuídos no ambiente e podem ser isolados de diversos tipos de alimentos (Shinagawa, 1990).

Apesar do tratamento por ultra alta temperatura (UAT) eliminar totalmente as formas vegetativas dos microrganismos presentes no leite *in natura*, formas esporuladas, que são altamente resistentes ao calor, poderão estar presentes no leite UAT, decorrentes das condições precárias de obtenção da matéria prima (Foschino et al., 1990). As principais bactérias esporuladas e conseqüentemente resistentes ao calor e de importância na microbiologia alimentar pertencem ao gênero *Bacillus* (Cosentino et al., 1997).

O *Bacillus cereus* tem importância na indústria de alimentos pela capacidade de produzir toxinas responsáveis por surtos de enfermidades transmissíveis por alimentos (ETA), pela produção de enzimas extracelulares que determinam o potencial de deterioração e também pela formação de esporos termorresistentes que podem resistir ao tratamento UAT (Robinson e Phill, 1987).

A produção de enterotoxinas pelo *Bacillus cereus* é demonstrada quando o microrganismo cresce a 32°C, em condições aeróbicas, com um nível de 1% de carboidratos e pH alcalino. Assim sendo, alimentos que contêm elevados níveis de amido, frutose ou lactose, como produtos lácteos, quando estocados em temperatura ambiente por longos períodos, estão mais sujeitos ao desenvolvimento de *Bacillus cereus* enterotoxigênicos (Gore et al., 2003).

Sabe-se que nem todas as cepas de *Bacillus cereus* são capazes de provocar ETA. Entretanto, a produção de toxinas

* Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista UNESP – Campus de Jaboticabal, SP. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane Km 5, 14.884-900, Jaboticabal-SP. e-mail: rossijr@fcav.unesp.br, anacentola@ig.com.br

foi notada em muitas cepas de *Bacillus cereus* isoladas de leite (Champagne et al., 1994).

Granum (1994) cita que o *Bacillus cereus* produz sete diferentes tipos de toxinas, sendo que seis delas são produzidas durante a fase de crescimento exponencial e secretadas pelas células. A sétima toxina, a emética, é provavelmente produzida em maior quantidade a partir de componentes nos alimentos durante a fase estacionária de desenvolvimento do *Bacillus cereus*. As sete toxinas podem ser divididas em quatro grupos: enterotoxinas, hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase, fosfatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) e a toxina emética.

Os dois principais tipos de toxinas produzidas pelo *Bacillus cereus* e que são responsáveis por casos de ETA são uma termolábil, que é a toxina diarreica, e uma termoestável, que é a toxina emética (Varnam e Evans, 1991).

A síndrome emética, determinada pela toxina emética, tem um curto período de incubação variando de 1 a 6 horas e os sintomas iniciais são náusea, seguido de vômito e mal-estar. Estes sintomas persistem durante 24 horas (Varnam e Evans, 1991). Segundo Becker et al. (1994), a síndrome emética é causada geralmente pelo consumo de arroz, produtos lácteos desidratados ou alimentos infantis contaminados com números elevados de células de *Bacillus cereus*.

A síndrome diarreica é determinada pela toxina diarreica e caracterizada por um período de incubação de 8 a 16 horas, seguido por dor abdominal, diarreia aquosa e tenesmo retal, que desaparecem após 24 horas; febre e vômito são raros (Varnam e Evans, 1991). A enterotoxina pode ser pré-formada no alimento ou produzida no intestino. Neste último caso, após a ingestão de células vegetativas ou esporos de *Bacillus cereus* (Drobniewski, 1993).

Spira e Goepfert (1972), observaram a produção de enterotoxinas por *Bacillus cereus* isolados de alimentos responsabilizados por ETA. Comparando o meio de cultura utilizado para obtenção da toxina com o teste do acúmulo de líquido em alça ligada de coelho, verificaram que o crescimento em caldo de infusão de cérebro e coração (ICC) foi o de melhor resposta no teste da alça ligada, seguido do caldo soja triptona (CST).

Granum et al. (1993a) isolaram 85 cepas de *Bacillus cereus* de leite pasteurizado, sendo 59% cepas enterotoxigênicas potencialmente capazes de causar toxinfecção alimentar e destas, 7% foram caracterizadas como cepas psicotróficas, pois tiveram um bom crescimento a 6°C. Russul e Yaacob (1995) verificaram que 50% e 86,6% das cepas enterotoxigênicas de *Bacillus cereus* isoladas de diversos alimentos foram capazes de crescer a 5°C e a 7°C durante sete dias de incubação, respectivamente.

Granum et al. (1993b) testaram cinco cepas de *Bacillus cereus* para a produção de enterotoxinas em condições aeróbicas e anaeróbicas e verificaram que todas as cepas foram capazes de produzir toxinas nas duas condições de incubação, salientando que as cepas crescem bem em anaerobiose, podendo produzir toxinas no intestino. Por outro lado, Christiansson et al. (1989) não observaram a produção de enterotoxinas em leite sem aeração mantido a 30°C, 15°C ou 8°C.

Barros et al. (2001) classificam a síndrome diarreica como a forma clássica da ETA causada pelo *Bacillus cereus* e cita alguns inquéritos epidemiológicos nos quais foram observados como os principais responsáveis por esta síndrome os alimentos que continham amido de milho, purê de batata, verduras, carne picada, salsichas de fígado, arroz indonésio e sopas.

Os testes biológicos para detecção de toxina diarreica produzidas pelo *Bacillus cereus* incluem o teste da alça ligada de coelho e reação de permeabilidade vascular (Chopra et al., 1980). Há também testes imunoenzimáticos rápidos como o de aglutinação passiva em látex (*kit* BCET-RPLA - OXOID) e o teste de ELISA (BDE-VIA - TECRA), que são mais sensíveis (Pimbley e Patel, 1998).

Rezende et al. (2000) utilizaram o teste biológico da alça ligada de coelho para verificar a capacidade enterotoxigênica de cepas de *Bacillus cereus* isoladas de leite UAT e não encontraram nenhuma cepa enterotoxigênica. Entretanto, Vidal (2001) e Rezende-Lago (2002) isolaram cepas de *Bacillus cereus* de leite UAT e verificaram capacidade enterotoxigênica através do teste imunoenzimático rápido de aglutinação passiva em látex.

Van Netten et al. (1990), Mätynen e Lindström (1998) e Torkar e Mozina (2000) utilizaram o *Kit* BCET-RPLA (OXOID) para verificar a produção de enterotoxina diarreica por cepas de *Bacillus cereus* isoladas de produtos lácteos e observaram a sensibilidade do teste, principalmente se comparado com a PCR.

Tendo em vista o apresentado, idealizou-se o presente estudo tendo como objetivo verificar a capacidade enterotoxigênica de cepas de microrganismos de espécie *Bacillus cereus* isoladas de amostras colhidas em diferentes pontos do fluxograma de produção do leite UAT.

Material e métodos

Do total de 118 cepas de *Bacillus cereus* isoladas em diferentes fases do fluxograma de produção do leite UAT, 60 foram submetidas ao teste de aglutinação passiva em látex, através do *kit* BCET-RPLA, para verificação da capacidade enterotoxigênica. As cepas foram isoladas de 300 amostras de leite, sendo 60 de leite cru, 60 de leite pasteurizado e 180 de leite UAT.

As análises foram realizadas no laboratório de análise de alimentos de origem animal e água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – UNESP.

Isolamento das cepas de *Bacillus cereus*: para tal, inicialmente foi realizado o enriquecimento seletivo, onde 10mL de cada amostra foram transferidos para frasco tipo Erlenmeyer contendo 90mL de caldo de soja triptona (CST), adicionado de polimixina B na proporção de 20µg/mL (Stadhouders, 1992). O conjunto foi incubado a 30°C por 24 – 30 horas e, após esse período, foi realizado o plaqueamento seletivo inoculando três alíquotas de 0,3mL e uma de 0,1mL em quatro placas de Petri contendo ágar manitol – gema de ovo – polimixina B (MGP), segundo recomenda Mossel et al. (1967). As placas foram incubadas a 30°C por 18 – 40 horas

e, ao final do período, foram observados os tipos de colônias presentes. Foram consideradas sugestivas das espécies do grupo do *Bacillus cereus* aquelas que se apresentavam róseas, de aspecto rugoso e seco, medindo entre 3 e 6mm de diâmetro, rodeadas por um halo esbranquiçado formado pela ação da lecitinase (Mossel et al., 1967; Van Netten e Kramer, 1992; Te-Giffel et al., 1995). A partir do plaqueamento seletivo, três a cinco colônias sugestivas foram transferidas para tubos de ensaio contendo ágar soja triptona (AST) inclinado. Os tubos foram incubados a 30°C por 24 horas e, posteriormente, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e pelo método de Wirtz-Conklin para verificação da morfologia e presença de esporos (Bier, 1975). Uma vez constatada a presença de bastonetes Gram-positivos, com esporo centro-terminal, foi realizada a caracterização bioquímica (catalase, motilidade e redução de nitrato a nitrito, reação de Voges-Proskauer, fermentação anaeróbica da glicose, hemólise em sangue de carneiro e crescimento rizóide) para a confirmação da espécie como pertencente ao grupo do *Bacillus cereus* (Apha, 2001).

Determinação da Produção de Enterotoxina através do kit BCET – RPLA (produto OXOID – TD950): Foram submetidas ao teste, as cepas de *Bacillus cereus* isoladas das amostras de leite cru, pasteurizado e UAT. Para tal, as cepas foram repicadas em 20mL de caldo de infusão de cérebro e coração (ICC) contidos em frascos tipo Erlenmeyer e incubadas a 32 – 37°C durante 24 horas. Após a incubação, procedia-se a centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C, em centrífuga Eppendorff (cetrífuge 5804R). O sobrenadante foi utilizado no teste de determinação da produção da enterotoxina pelo teste de aglutinação passiva em látex (*kit* BCET-RPLA).

Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão descritos o total de cepas de *Bacillus cereus* isoladas de 60 amostras de leite cru, 60 de leite pasteurizado e 180 de leite UAT, totalizando 300 amostras de leite analisadas. O microrganismo foi isolado em 36, 55 e 27 amostras, respectivamente. Também na Tabela 1 estão descritos os resultados do teste de detecção de enterotoxinas (*kit* BCET-RPLA – teste de aglutinação passiva em látex) a que cepas de *Bacillus cereus* isoladas das amostras de leite cru, pasteurizado e UAT foram submetidas. Verifica-se que 29 (48,3%) cepas foram positivas para produção de enterotoxinas e 31 (51,7%) negativas.

Com relação ao tipo de amostras no qual os *Bacillus cereus* foram isolados, na Tabela 1 verifica-se que 50,0% das cepas isoladas de leite cru foram positivas para produção de enterotoxinas, enquanto apenas 20,8% das isoladas de leite pasteurizado demonstraram esta capacidade. Para as isoladas de leite UAT, esse número foi bem maior, representando 75,0% das cepas testadas.

Rezende-Lago (2002) isolou *Bacillus cereus* de amostras de leite cru, leite pasteurizado e leite UAT e verificou que, de 11 cepas isoladas do leite cru, 7 (63,6%) foram positivas para produção de enterotoxinas; do leite pasteurizado, das 13 isoladas, 4 (30,8%) foram positivas e do leite UAT das 10 isoladas 8 (80,0%) foram positivas. Tais resultados demonstram semelhança com os encontrados no presente estudo, no qual se verificou que 50,0% das cepas isoladas de leite cru, 20,8% das cepas isoladas do leite pasteurizado e 75,0% das isoladas do leite UAT demonstraram-se positivas para produção de enterotoxinas.

Ao comparar os testes de permeabilidade vascular e acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelho (*in vivo*) com o da aglutinação passiva em látex (*kit*) (*in vitro*), Rezende-Lago (2002) verificou que das 89 cepas testadas pela permeabilidade vascular, 5,6% demonstraram-se positivas para produção de enterotoxinas, das 89 testadas pela alça ligada, 15,7% foram positivas e das 43 testadas pela aglutinação, 51,2% foram positivas; por fim o autor verificou uma baixa concordância entre as técnicas *in vivo* e *in vitro*.

Em trabalho semelhante, Vidal (2001), ao submeter 10 cepas de *Bacillus cereus* isoladas de amostras de leite UAT ao teste para detecção de produção de enterotoxinas (*kit* BCET-RPLA – aglutinação passiva em látex), verificou que 80% das cepas demonstraram-se positivas. Porém, Rezende et al. (2000) não encontraram nenhuma das 44 cepas isoladas de amostras de leite UAT com capacidade enterotoxigênica, quando testadas pela técnica em alça intestinal ligada de coelho.

Torkar e Mozina (2000) isolaram 82 cepas de *Bacillus cereus* de amostras de leite cru, pasteurizado e produtos lácteos, e verificaram através do teste de aglutinação passiva em látex (BCET-RPLA OXOID) que 80,1% das cepas foram positivas para produção de enterotoxina diarreica.

Mäntynen e Lindström (1998), com o objetivo de comparar técnicas de detecção de enterotoxinas produzidas pelo *Bacillus cereus*, utilizaram 33 cepas do microrganismo, e verificaram que a PCR e o *kit* BCET-RPLA (OXOID) apresentaram resultados semelhantes para tal.

Shinagawa (1993) isolou *Bacillus cereus* de amostras de leite cru e verificou pelo teste de aglutinação passiva em látex que todas as amostras demonstraram-se enterotoxigênicas, diferindo-se, assim, do presente estudo, onde apenas 50% das cepas demonstraram-se positivas.

Tabela 1: Total de cepas de *Bacillus cereus* isoladas de leite cru, pasteurizado e UAT, distribuídos segundo a produção ou não de enterotoxinas

Tipo de amostra	Nº de cepas de <i>B. cereus</i> isoladas	Nº de cepas de <i>B. cereus</i> analisadas	Produção de enterotoxinas	
			Cepas positivas nº (%)	Cepas negativas nº (%)
Leite cru	36	12	6 (50,0)	6 (50,0)
Leite pasteurizado	55	24	5 (20,8)	19 (70,2)
Leite UAT	27	24	18 (75,0)	6 (25,0)
Total	118	60 (100,0)	29 (48,3)	31 (51,7)

Ao analisar 85 cepas isoladas de diferentes produtos lácteos pasteurizados, Granum et al. (1993a) encontraram um percentual maior de cepas entero-toxigênicas, quando testadas pela técnica de Western Blotting (59%). Os autores não encontraram diferenças significativas entre esta técnica e a técnica de aglutinação passiva em látex.

Van Netten et al. (1990) isolaram 35 cepas de *Bacillus cereus* de amostras de leite pasteurizado e as submetem ao teste de produção de enterotoxinas, por meio do *kit* BCET-RPLA (OXOID), e verificaram que 25% delas demonstraram-se positivas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo onde 20,8% das cepas apresentaram esta capacidade.

Christiansson et al. (1989) analisando cepas de *Bacillus cereus*, isoladas de amostras de leite cru e embalado, quanto à produção de enterotoxinas através do teste de permeabilidade vascular em coelhos, verificaram que a presença de cepas enterotoxigênicas foi maior no leite cru do que no leite já embalado.

Chopra et al. (1980) reportaram que seis cepas de *Bacillus cereus* isoladas de 25 amostras de leite demonstraram-se positivas para a produção de enterotoxinas, quando submetidas ao teste de acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelho.

Segundo Rezende-Lago (2002), o tratamento térmico aplicado ao leite pode causar diferentes tipos de injúrias no *Bacillus*

cereus, fazendo com que o microrganismo precise se restabelecer antes de produzir a enterotoxina. Isso talvez explique o motivo da frequência de isolamento de cepas enterotoxigênicas ser maior no leite UAT do que nos demais tipos de leite, dado o fato do leite UAT ter um grande período de vida útil, além de permanecer estocado em temperatura ambiente, o que pode favorecer a recuperação e o posterior desenvolvimento do microrganismo. Associa-se a isso a baixa competitividade encontrada pelo *Bacillus cereus* neste tipo de leite, pois o tratamento UAT é capaz de destruir a maioria dos microrganismos não esporulados presentes. Por outro lado, o leite pasteurizado permanece sob refrigeração, além de ter um período de vida útil bem menor; características que podem prejudicar a recuperação do *Bacillus cereus* remanescente e a posterior produção de enterotoxinas pelas cepas enterotoxigênicas.

Conclusão

Os resultados demonstrados no presente estudo evidenciaram um elevado percentual de cepas de *Bacillus cereus* enterotoxigênicos em leite UAT (75%), seguido do leite cru (50%) e pasteurizado (20,8%), o que serve de alerta para a indústria e autoridades sanitárias, pois o leite UAT pode ser considerado de risco à saúde da população consumidora, indicando a necessidade de melhorias na obtenção e transporte da matéria-prima.

Referências

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001, 676 p.
- BARROS, V.R.M.; ARAUJO, W.M.C.; BORGIO, L.A. Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó integral comercializado na capital do estado de São Paulo, Brasil – 1987/1988. *Rev. Educ. Cont. CRMV-SP*, v. 4, n. 1, p. 45-51, 2001.
- BECKER, H.; SCHALLER, G.; Von WIESE, W.; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 23, n. 1, p. 1-15, 1994.
- BIER, O. *Bacteriologia e imunologia: em suas aplicações à medicina e a higiene*. 16. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975.
- CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R.R.; ROY, D.; MAFU, A.A.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.
- CHOPRA, P.; SINGH, A.; KALRA, M.S. Occurrence of *Bacillus cereus* in milk and milk products. *Indian J. Dairy Sci.*, v. 33, n. 2, p. 248-252, 1980.
- CHRISTIANSOON, A.; NAIDU, A.S.; NILSSON, I.; WADSTRÖM, T.; PETTERSSON, H.E. Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, n. 10, p. 2595-2600, 1989.
- COSENTINO, S.; LOGAN, N.A.; ANDERTON, A. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 38, n. 2/3, p. 235-238, 1997.
- DROBNIIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.
- FOSCHINO, R.; GALLI, A.; OTTOGALLI, G. Research on the microflora of UHT milk. *Ann. Microbiol.*, v. 40, n. 1, p. 47-59, 1990.
- GORE, H.M.; SPIRA, W.M.; KIM, H.U. Real-time molecular beacon NASBA reveals *hblc* expression from *Bacillus* spp. In milk. *Biochem. Bioph. Res. Com.*, v. 311, p. 386-390, 2003.
- GRANUM, P.E.; LEMBKE, F.; SUHREN, G.; HEESCHEN, W. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 17, n. 4, p. 269-279, 1993a.
- GRANUM, P.E.; SUHREN, G.; HEESCHEN, W. The enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization. *Bull. IDF*, n. 287, p. 19, 1993b.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bact. Symp.*, v. 76, p. 61S-66S, 1994. Supplement.
- MÄNTYNEN, V.; LINDSTRÖM, K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 5, p. 1634-1639, 1998.
- MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.*, v. 15, n. 3, p. 650-653, 1967.
- PIMBLEY, D.W.; PATEL, P.D. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. *J. Appl. Microbiol. Symp. Supplement*, v. 84, p. 98s-109s, 1998.
- REZENDE-LAGO, N.C. *Bactérias do grupo do Bacillus cereus em leite e estudo enterotoxigênico das cepas isoladas*. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- REZENDE, N.C.M.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A. do. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra high temperature). *R. Bras. Ci. Vet.*, v. 7, n. 3, p. 162-166, 2000.
- ROBINSON, R.K.; PHILL, M.A.D. *Microbiologia lactológica*. Zaragoza: Acribia, 1987, p. 18-32.
- RUSSUL, G.; YAACOB, N.H. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 25, n. 2, p. 131-139, 1995.
- SHINAGAWA, K. Analytical methods of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 10, p. 125-141, 1990.

- SHINAGAWA, K. Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. *Bull. IDF*, n. 287, p. 42-49, 1993.
- SPIRA, W.M.; GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus* – induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Appl. Microbiol.*, v. 24, n. 3, p. 341-348, 1972.
- STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. *Bull. IDF.*, n. 275, p. 15-18, 1992.
- Te-GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; SLAGHUIS, B.A.; ROMBOUITS, F.M. Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. *Neth. Milk Dairy J.*, v. 49, n. 213, p. 125-138, 1995.
- TORKAR, K.G.; MOZINA, S.S. Differentiation of *Bacillus cereus* isolates from milk and milk products with biochemical, immunological, AP-PCR and PCR-RFLP methods. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 38, n. 2, p. 135-142, 2000.
- Van NETTEN, P.; MOOSDIJK, A.V.; HOELSEL, P.V.; MOSSEL, D.A.A.; PERALES, I. Psychrotropic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 69, p. 73-79, 1990.
- Van NETTEN, P.; KRAMER, J.M. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 17, n. 2, p. 85-99, 1992.
- VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. *Bacillus*. In: VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. *Foodborne Pathogens*. London: Mosby Year Book, 1991, p. 267-288.
- VIDAL, A.M.C. *Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do Bacillus cereus em leite UAT (ultra alta temperatura) integral*. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.