

Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas

[Occurrence of *Bacillus cereus* in Whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains]

N.C.M. Rezende-Lago, O.D. Rossi Jr., A.M.C. Vidal-Martins, L.A. Amaral

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n
14884-900 – Jaboticabal, SP

RESUMO

Pesquisaram-se a presença de *Bacillus cereus* e a produção de enterotoxinas produzidas por esses microrganismos em 120 amostras de diversos tipos de leite. *Bacillus cereus* foi isolado e identificado em 22 (73,3%), 15 (50,0%), 29 (96,7%) e quatro (13,3%) amostras de leite em pó, cru, pasteurizado e UAT (longa vida), respectivamente. Para a detecção de enterotoxinas pela técnica da alça ligada de coelho, foram positivos, respectivamente, três (13,6%), um (7,1%) e 10 (35,7%) microrganismos isolados das amostras de leite em pó, leite cru e leite pasteurizado. Pelo teste de aumento de permeabilidade vascular, dois (9,1%), um (7,1%), um (3,6%) e um (4,0%) microrganismos isolados de leite em pó, cru, pasteurizado e UAT apresentaram-se enterotoxigênicos, respectivamente. O uso da técnica de aglutinação passiva em látex demonstrou a produção da toxina diarreica por três (33,3%), sete (63,6%), quatro (30,8%) e oito (80,0%) microrganismos isolados, respectivamente, de leite em pó, cru, pasteurizado e UAT. Os resultados indicam um risco potencial, podendo colocar em risco a saúde dos consumidores desses produtos.

Palavras-chave: leite, *Bacillus cereus*, enterotoxinas

ABSTRACT

A hundred and twenty samples of different types of milk were examined to the presence of *Bacillus cereus* and the enterotoxigenic potential of the isolated strains. *Bacillus cereus* was isolated and identified in 22 (73.0%), 15 (50.0%), 29 (96.7%) and four (13.3%) samples of powder, raw, pasteurized and UHT milk, respectively. The enterotoxigenicity detection using the rabbit ileal loop assay showed positive, respectively, three (13.6%), one (7.1%) and 10 (35.7%) isolated strains from powder, raw and pasteurized milk. Using vascular permeability activity assay two (9.1%), one (7.1%), one (3.6%) and one (4.0%) isolated strains from powder, raw, pasteurized and UHT milk were positive, respectively. The reversed passive latex agglutination test showed diarrheal toxin production by three (33.3%), seven (63.6%), four (30.8%) and eight (80.0%) strains isolated from, respectively, powder, raw, pasteurized and UHT milk. Those results indicated a potential hazard and may put in risk the health of the consumers of these products.

Keywords: milk, *Bacillus cereus*, enterotoxins

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento altamente nutritivo (Franco et al., 2000), fato que favorece o desenvolvimento de inúmeros microrganismos, tornando-o altamente perecível, além de um

importante veiculador de agentes de toxinfecção alimentar (Ponsano et al., 2001). Muitos desses agentes, no entanto, são destruídos pelo calor ao qual é submetido durante o seu processamento, antes de chegar ao comércio (Mijacevic e Samardzija, 1996). No entanto, esporos

altamente resistentes ao calor - *highly heat resistant spores* (HHRS) - permanecem viáveis no leite após o seu processamento. Assim, quanto pior a qualidade higiênico-sanitária da matéria-prima, maior a chance de o leite veicular microrganismos patogênicos aos consumidores (Franco et al., 2000).

Dentre as formas esporuladas, *Bacillus cereus* destaca-se na indústria alimentícia como agente causador de toxinfecção alimentar, além de provocar grandes prejuízos econômicos por ser um potencial deteriorante de alimentos (Cosentino et al., 1997). Por ser um microrganismo ubíquo e formador de esporos é, continuamente, isolado de alimentos lácteos (Rangasamy et al., 1993; Rezende et al., 2000; Vidal-Martins et al., 2005).

A presença de *B. cereus* no leite é devida tanto à resistência do microrganismo ao tratamento térmico, quanto à contaminação do alimento após o tratamento. Christiansson et al. (1999) e Vidal-Martins (2005) realizaram estudos sobre a sobrevivência do microrganismo e verificaram que o DNA de *B. cereus*, isolados antes e após o processamento térmico do leite, apresentaram semelhança genética. Ahmed et al. (1983) analisaram amostras de leite cru e pasteurizado e verificaram que as taxas de contaminação foram de 9 e 35%, respectivamente, indicando uma provável contaminação pós-pasteurização. *B. cereus* é um agente formador de biofilmes, fato que pode explicar o aumento da taxa de contaminação do leite. Assim, salienta-se que tanto a contaminação anterior ao processamento térmico quanto a que ocorre após o tratamento do leite podem levar a presença desse microrganismo nos diferentes tipos de leite disponíveis ao consumidor.

Não existe uma legislação específica em relação à enumeração de *B. cereus* presente no leite. No entanto, a legislação para o leite UAT estabelece que esse produto não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas após permanecer por sete dias incubado a uma temperatura de 35-37°C (Portaria..., 1996).

As toxinas produzidas por *B. cereus* são classificadas em quatro grupos: enterotoxinas, hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase,

fosfatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) e toxina emética (Granum, 1994). As enterotoxinas são responsáveis pela síndrome diarreica, doença provocada pela ingestão de cepas de *B. cereus* que, no intestino, produzem as toxinas (Fehlhaber e Janetschke, 1995), embora não existam evidências suficientes para se concluir se essa síndrome é causada pela ingestão da toxina pré-formada no alimento ou se a toxina é produzida no intestino (Beecher et al., 1995). O período de incubação médio da síndrome diarreica varia de seis a 15 horas (Dromigny et al., 1994).

A literatura registra vários surtos envolvendo *B. cereus*. Um deles ocorreu na Romênia e atingiu 221 crianças, sendo o leite o veiculador da enfermidade (Christiansson, 1992). De acordo com Becker et al. (1994), cerca de 18% dos casos de toxinfecção alimentar ocorridos entre 1985 e 1989 foram provocados por *B. cereus* e, na maioria desses casos, os alimentos envolvidos estavam contaminados com uma população pequena do microrganismo.

No mercado, existem inúmeros kits para a determinação da enterotoxigenicidade de cepas de *B. cereus*. No entanto, testes *in vivo*, como o acúmulo de líquidos em alça intestinal, e teste de alteração de permeabilidade vascular em pele, ambos em coelhos, são muito utilizados.

Os objetivos deste trabalho foram isolar *B. cereus* de diferentes amostras de leite, testar sua capacidade enterotoxigênica por técnicas *in vivo* e *in vitro*, compará-las, e caracterizar a qualidade microbiológica do produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 120 amostras de leite integral, sendo 30 de leite cru, 30 de leite pasteurizado, 30 de leite em pó instantâneo e 30 de leite longa vida (UAT) de seis diferentes marcas comerciais, dentro do prazo de validade, para a pesquisa da presença de microrganismos do grupo *B. cereus*. As amostras de leite cru e pasteurizado foram adquiridas em um laticínio, na cidade de Ribeirão Preto/SP, no período de janeiro a junho de 2000, totalizando seis colheitas (uma por mês) de cinco amostras de diferentes lotes para ambos os tipos de leite. As amostras de leite em pó e de leite UAT foram adquiridas no comércio,

respectivamente, das cidades de Ribeirão Preto/SP e Jaboticabal/SP. As de leite cru e pasteurizado foram mantidas em caixas isotérmicas com cubos de gelo desde a sua aquisição até o momento da análise, no mesmo dia.

Após abertura asséptica da embalagem, o leite em pó foi revolvido com uma espátula para a obtenção de uma alíquota de 25g, que foi reconstituída em 225ml de água peptonada (0,1%). As amostras líquidas (leites cru, pasteurizado e longa vida) foram homogeneizadas antes da sua abertura e usadas *in natura*.

Para o isolamento de *B. cereus*, inicialmente, as amostras foram inoculadas em meio de enriquecimento seletivo - caldo soja tripton¹ adicionado de polimixina B - (Stadhouders, 1992). O inóculo foi incubado a 30°C por 24-30 horas e, após esse período, foi feito o plaqueamento seletivo em agar manitol-gema de ovo-polimixina B¹, segundo Mossel et al. (1967). As placas foram incubadas a 30°C por 18-40 horas e, ao final do período, as colônias sugestivas das espécies do grupo *B. cereus* foram repicadas em ágar soja tripton¹. Após incubação (30°C/24 horas), foram realizados esfregaços para coloração de Gram e de Wirtz-Concklin. Confirmada a presença de bastonetes Gram positivos, com esporo centro-terminal, foram realizadas provas bioquímicas para confirmação do grupo *B. cereus* (Compendium..., 2001).

Para a verificação da capacidade enterotoxigênica dos isolados, foram utilizados o teste da alça intestinal ligada, o teste da reação de permeabilidade vascular, ambos em coelhos, e o teste de aglutinação passiva em látex *in vitro*² (Granum et al., 1993).

Para a obtenção da enterotoxina, os isolados foram repicados em caldo nutriente e, após a incubação a 30°C por 12 horas. Uma alíquota desse cultivo foi repicado em caldo de infusão de cérebro e coração adicionado de 0,1% de glicose¹, e novamente incubado a 30°C por 12 horas, sob moderada agitação (200rpm). Ao término desse período, a cultura foi centrifugada

a 8000rpm por 20 minutos, sob refrigeração, o sobrenadante foi filtrado em membranas de éster de celulose de 25ml de diâmetro e poros de 0,45µm (Spira e Goepfert, 1972). O filtrado foi inoculado em segmentos de íleo de coelho (em duplicata, mas em animais diferentes). Após sete horas, os coelhos foram sacrificados e as alças intestinais examinadas quanto à presença de acúmulo de líquido. O teste foi considerado positivo quando houve acúmulo de líquido nos segmentos que foram inoculados com as culturas-teste, em ambos os coelhos. Quando houve resultados antagônicos, repetiu-se o teste em pelo menos mais um animal.

Para o teste do aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho, o dorso do animal foi depilado e marcado em quadrados. Em cada quadrado injetaram-se, intradermicamente, 0,05ml do filtrado. Após três horas, uma solução de azul de Evans a 2% foi injetada pela veia auricular do coelho, na dose de 2ml/kg. Se a permeabilidade da pele é alterada pela toxina, o corante acumula-se na pele ao redor do local de aplicação do filtrado, gerando uma mancha azul facilmente visualizada uma hora após a injeção do corante (Glatz et al., 1974).

Os resultados relativos ao número de amostras contaminadas por *B. cereus*, bem como por microrganismos isolados que demonstraram a produção de enterotoxinas detectadas pelas diferentes técnicas usadas foram analisados por meio do teste não paramétrico do qui-quadrado no nível de significância de 5% (Berquó et al., 1981).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tab. 1 e 2 são apresentados os resultados referentes ao isolamento dos microrganismos do grupo *B. cereus* das diferentes amostras de leite, bem como a produção de enterotoxinas pelas diferentes técnicas a partir dos isolados.

Das 120 amostras analisadas, 58,3% foram positivas para a presença desse microrganismo. Esse valor é maior do que os achados de Rangasamy et al. (1993), que tiveram 26,4% das amostras de leite (cru, pasteurizado e UAT) e derivados (queijo Cheddar e sorvete) contaminadas por *B. cereus*, e é menor que o verificado por Kamat et al. (1989), que encontraram cerca de 94% das amostras de leite

¹Difco® - Franklin Lakes, NJ, USA

²BCET-RPLA *Bacillus cereus* enterotoxin (diarrhoeal type) test kit, Oxoid®

e sorvete produzidos na Índia contaminadas por *B. cereus*. Tais resultados mostram que a qualidade higiênico-sanitária do leite pode estar insatisfatória em diferentes países e que a baixa qualidade do leite e de seus derivados pode estar relacionada com a matéria-prima contaminada. No entanto, o fato de *B. cereus* ser termodúrico e produzir biofilme em tubulações de leite pode

também favorecer a contaminação do leite após o processamento térmico, fato que pode estar diretamente relacionado com os achados deste trabalho. Nota-se que 50,0% das amostras de leite cru apresentaram-se contaminadas por *B. cereus*, sendo que, após a pasteurização, 96,7% amostras de leite pasteurizado apresentaram a contaminação pelo microrganismo.

Tabela 1. Presença de *B. cereus* em diferentes tipos de leite adquiridos em Ribeirão Preto (SP) e Jaboticabal (SP) no ano de 2000

Tipo de leite	Amostras analisadas	Amostras positivas	
		Número	%
Pó	30	22b	73,3
Cru	30	15a	50,0
Pasteurizado	30	29b	96,7
Longa vida	30	4c	13,3
Total	120	70	58,3

Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$).

Tabela 2. Presença de *B. cereus* enterotoxigênico em diferentes tipos de leite integral pelas técnicas de acúmulo de fluido em alça intestinal ligada de coelho, de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho e de aglutinação passiva em látex

Tipo de leite	Tipo de teste para detecção de enterotoxina					
	Alça ligada		Permeabilidade		Aglutinação	
	Test ¹	Pos (%) ²	Test	Pos (%)	Test	Pos (%)
Pó	22	3 (13,6)	22	2 (9,1)	9	3 (33,3)
Cru	14	1 (7,1)	14	1 (7,1)	11	7 (63,6)
Pasteurizado	28	10 (35,7)	28	1 (3,6)	13	4 (30,8)
Longa vida	25	0 (0,0)	25	1 (4,0)	10	8 (80,0)
Total	89	14 (15,7)a	89	5 (5,6)a	43	22 (51,2)b

¹Test: número de isolados submetidos aos testes.

²Pos (%): positivos ao teste de produção de enterotoxinas.

Valores com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$).

As amostras que menos apresentaram contaminação por *B. cereus* foram as de leite longa vida (13,3%). Em trabalhos semelhantes, Vidal-Martins et al. (2005) encontraram 11,8% de amostras positivas, Rezende et al. (2000), no entanto, verificaram quase 35% das amostras de leite UAT contaminadas por *B. cereus*.

Houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre o número de amostras positivas para o leite em pó e o leite cru e os demais tipos de leite ($P < 0,05$) para a presença de *B. cereus*. O leite pasteurizado foi o que apresentou o maior número de amostras positivas, 96,7%. Este resultado reforça a teoria da contaminação após o tratamento térmico do leite, como defendem Ahmed et al. (1983), já que o biofilme formado nas tubulações percorridas pelo leite pasteurizado facilitaria essa

contaminação pós-processamento térmico. Essa baixa qualidade higiênico-sanitária encontrada nas amostras de leite pasteurizado deve servir de alerta aos responsáveis técnicos para que sejam revistos os procedimentos padrões de higiene operacional empregados nessa indústria

A alta proporção de amostras de leite em pó contaminadas (73,3%) é de extrema importância, pois esse produto é consumido, na sua maioria, por crianças e recém-nascidos. Ressalta-se, ainda, que o leite em pó, após ser reconstituído, torna-se ainda mais perigoso se não for devidamente armazenado. Além disso, o leite em pó é comumente utilizado na fabricação de doces caseiros, especialmente de doces para festas infantis, que ficam expostos por longos períodos em temperatura ambiente, favorecendo não só a multiplicação microbiana, como a produção de

enterotoxinas. Rangasamy et al. (1993), ao analisarem 91 amostras de leite e produtos lácteos coletados de diferentes lugares em Victoria (Austrália), encontraram *B. cereus* em leites cru, pasteurizado e em pó, e em iogurte, queijo e sorvete. Barros et al. (2001) analisaram 72 amostras de leite em pó integral, em São Paulo, com a finalidade de isolar e quantificar *B. cereus*. Os autores verificaram que 97,2% das amostras de leite em pó analisadas apresentavam-se em condições adequadas para o consumo. No entanto, após reconstituição e armazenamento inadequado (20°C/24 horas), 91,6% das amostras foram consideradas potencialmente capazes de provocar toxinfecção alimentar, devido aos níveis elevados de *B. cereus*.

O presente trabalho assume uma importância ainda maior quando se verifica a capacidade enterotoxigênica dos isolados. Pode-se observar que apenas o leite longa vida (Tab. 2) não apresentou cepas positivas para a produção de enterotoxinas pela técnica de alça ligada de coelho, enquanto pelas demais técnicas, todos os tipos de leite apresentaram cepas com características enterotoxigênicas. No entanto, as amostras de leite longa vida apresentaram 80,0% dos seus isolados produtores de enterotoxinas quando testadas pela técnica de aglutinação passiva em látex. Esse dado é alarmante, tendo em vista o fato de ser o longa vida o leite mais consumido pela população (Vendas..., 2004) e, muitas vezes, sem nenhum tratamento térmico domiciliar, aumentando ainda mais o risco de casos de toxinfecção alimentar por *B. cereus*.

As amostras de leite pasteurizado foram as que menos apresentaram isolados enterotoxigênicos detectáveis pela prova de aglutinação passiva em látex, com aproximadamente 31% deles sendo virulentos. Segundo Griffiths (1989), 85% das cepas isoladas de leite pasteurizado foram produtoras de enterotoxinas. Muito embora 31% pareçam ser um valor relativamente baixo, não pode ser esquecido o fato de que esse leite coloca em risco a saúde da população, já que as amostras apresentaram-se contaminadas por cepas de *B. cereus* potencialmente enterotoxigênicas.

A técnica de aglutinação passiva em látex foi a que apresentou maior porcentagem de detecção de enterotoxinas quando comparada às demais

técnicas, enquanto as técnicas *in vivo* não diferiram entre si (Tab. 2). Os microrganismos isolados do leite longa vida não foram enterotoxigênicos quando testados pela técnica de alça ligada de coelho. Rezende et al. (2000) também analisaram cepas de *B. cereus* isoladas de leite longa vida e em nenhuma a enterotoxigenicidade foi comprovada por esta técnica. Estes resultados sugerem que tal técnica apresenta baixa sensibilidade, gerando valores falso-negativos. Além disso, essa técnica apresenta resultados variáveis (Beecher et al., 1995). De acordo com Granum (1997), existe variação individual na susceptibilidade a síndrome diarreica e, talvez por este fato, as técnicas *in vivo* sejam tão pouco sensíveis e apresentem resultados tão variáveis em relação à técnica *in vitro*. O autor ainda cita um fator que pode estar relacionado à resistência ao microrganismo, a saber, a imunidade adquirida pela ingestão freqüente de pequena quantidade de *B. cereus*.

Os resultados encontrados pela técnica de aumento de permeabilidade vascular em pele de coelho também foram diferentes dos encontrados na aglutinação em látex, embora tenham sido semelhantes àqueles encontrados pela técnica de alça ligada (com exceção das cepas isoladas de leite pasteurizado). As duas técnicas *in vivo* são altamente correlacionadas (Christiansson, 1992). De acordo com Shinagawa (1990), os testes biológicos para a detecção das enterotoxinas produzidas por *B. cereus* são demorados, dispendiosos e pouco sensíveis, o que reforça os dados encontrados neste estudo.

Além de os resultados por si só indicarem que as técnicas *in vivo* para esse tipo de estudo não são apropriadas, deve-se, ainda, salientar que o conselho de bioética recomenda usar animais de experimentação só em casos de extrema relevância, isto é, todas as vezes que o experimento *in vivo* puder ser substituído por técnicas *in vitro*, o pesquisador deve fazê-lo (Raymundo, 2000).

Apesar das diferenças encontradas na detecção de enterotoxinas produzidas por *B. cereus* provenientes das amostras analisadas, fica clara a alta porcentagem de amostras que estavam contaminadas por esse microrganismo, fato que não só causa prejuízos econômicos por diminuição da vida útil do produto, por ser o

produto proteolítico, como também coloca em risco a saúde pública. De acordo com Datta e Deeth (2003), a proteólise do leite UAT durante a estocagem em temperatura ambiente é um dos fatores mais importantes na limitação da vida de prateleira, em decorrência de mudanças organolépticas.

CONCLUSÕES

A alta positividade de amostras contaminadas por *B. cereus* enterotoxigênicos sugere a necessidade de melhorias higiênico-sanitárias em todo o processamento do leite para evitar danos à saúde pública. Além disso, as técnicas *in vivo* para a detecção da toxina diarreica não se mostraram eficientes, devendo ser substituídas pela técnica *in vitro*. Estudos moleculares podem ser propostos para a identificação da fonte de contaminação do leite por *B. cereus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A.H.; MOUSTAFA, M.K.; MARTH, E.M. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. *J. Food Prot.*, v.46, p.126-128, 1983.
- BARROS, V.R.M.; PANETTA, J.C., MIGUEL, O. Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó integral comercializado na capital do estado de São Paulo, Brasil – 1987/1988. *Rev. Educ. Contin. CRMV-SP*, v.4, p.45-51, 2001.
- BECKER, H.; SCHALLER, G.; WIESE, W. VON et al. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.*, v.23, p.1-15, 1994.
- BEECHER, D.J.; SCHOENI, J.L.; WONG, A.M. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.*, v.63, p.4423-4428, 1995.
- BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*. São Paulo: EPU, 1981. 350p.
- CHRISTIANSSON, A. The toxicology of *Bacillus cereus*. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.275, p.30-35, 1992.
- CHRISTIANSSON A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.305-314, 1999.
- COSENTINO, S.; MULARGIA, A.F.; PISANO, B. et al. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, v.38, p.235-238, 1997.
- COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: APHA, 2001. 676p.
- DATTA, N.; DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel-Wissenschaft Technol.*, v.36, p.173-182, 2003.
- DROMIGNY, E.; VINCENT, P.; JOUVE, J.L. *Bacillus cereus*. In: BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J. (Eds). *Microbiología alimentaria*. Zaragoza: Acribia, 1994. p.107-111.
- FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. (Eds). *Higiene veterinaria de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1995. p.57-58.
- FRANCO, R.M.; CAVALCANTI, R.M.S.; WOOD, P.C.B et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. *Hig. Alim.*, v.14, p.70-77, 2000.
- GLATZ, B.A.; SPIRA, W.M.; GOEPFERT, J.M. Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species. *Infect. Immun.*, v.10, p.299-303, 1974.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, v.76, p.61S-66S, 1994.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Eds). *Food microbiology: fundamentals frontiers*. Washington: ASM Press, 1997. p.327-336.
- GRANUM, P.E.; BRYNESTAD, S.; KRAMER, J.M. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.*, v.17, p.269-279, 1993.
- GRIFFITHS, M.W. Toxin production by psychotropic *Bacillus cereus* present in milk. Modern microbiological methods for dairy products. *Int. Dairy Fed. Special Issue*, n.8901, p.143-147, 1989.

- KAMAT, A.S.; NERKAR, D.P.; NAIR, P.M. *Bacillus cereus* in some Indian foods, incidence and antibiotic, heat and radiation resistance. *J. Food Saf.*, v.10, p.31-41, 1989.
- MIJACEVIC, Z.; SAMARDZIJA, S. Heat treatment of milk. *Veterinarski Glasnik*, v.50, p.283-287, 1996.
- MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.*, v.15, p.650-653, 1967.
- PORTARIA nº 146, de 07 de março de 1996. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996. (DOU, seção I, p.3977. 11 mar. 1996).
- PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; DELBEMM, A.C.B. et al. Avaliação da qualidade de amostras de leite comercializado no município de Araçatuba e potenciais riscos decorrentes de seu consumo. *Hig. Alim.*, v.15, p.31-38, 2001.
- RANGASAMY, P.N.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. *Aust. J. Dairy Technol.*, v.48, p.93-95, 1993.
- RAYMUNDO, M.M. *Os deveres dos pesquisadores para com os animais de experimentação: uma proposta de auto-regulamentação*. 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/animprin.htm>>. Acessado em 22 out. 2002.
- REZENDE, N.C.M.; ROSSI JR., O.D.; AMARAL, L.A. Ocorrência de bactérias do grupo de *Bacillus cereus* em leite UHT integral (Ultra-High-Temperature). *Rev. Bras. Cienc. Vet.*, v.7, p.162-166, 2000.
- SHINAGAWA, K. Analytical methods of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol.*, v.1, p.125-141, 1990.
- SPIRA, W.M.; GOEPFERT, J.M. *Bacillus cereus* – Induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. *Appl. Microbiol.*, v.24, p.341-348, 1972.
- STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.275, p.15-18, 1992.
- VIDAL-MARTINS, A.M.C. *Leite UAT: estudo das características microbiológicas e físico-químicas e investigação epidemiológica de Bacillus cereus ao longo de sua produção e vida comercial*. 2005. 134f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- VENDAS de leite fluido e longa vida no Brasil. São Paulo: Associação Brasileira de Leite Longa Vida 1990/2004, 2004. Disponível em <http://www.cnppl.embrapa.br/producao/07consumo/tabela07.01.php>. Acessado em 22 jan. 2007.
- VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI Jr., O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo de *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p. 396-400, 2005.