


Avaliação da especificidade do ágar Violeta Vermelho Bile Glucose para o isolamento de Enterobacteriaceae em leite de cabra cru

Evaluation of Violet Red Bile Glucose agar specificity for Enterobacteriaceae isolation in raw goat milk

RESUMO

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos^{1,*} 

Janaína dos Santos Nascimento^{II} 

Introdução: Bactérias do grupo dos coliformes têm sido empregadas ao longo dos anos como micro-organismos indicadores da qualidade microbiológica. No entanto, diversos estudos relatam a falta de correlação direta entre sua presença e a de patógenos na avaliação da segurança de alimentos, levando a sugestão de novas propostas de análise, como a pesquisa de enterobactérias totais, que compreende todos os membros da família Enterobacteriaceae. **Objetivo:** Determinar a população de enterobactérias em amostras de leite caprino cru com base nos critérios microbiológicos sugeridos pela Consulta Pública nº 542, de 17 de julho de 2018, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde (Anvisa - MS), para amostras de leite pasteurizado. **Método:** Foram utilizadas 21 amostras de pequenos produtores de diversas regiões do estado do Rio de Janeiro. Os isolados foram obtidos a partir de inoculação em ágar VRBG, de acordo com a ISO 21528-2, e identificados por espectrometria de massas por *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization* - Time of Flight (MALDI/TOF). **Resultados:** Dos 222 isolados identificados, apenas 26,6% pertenciam à família Enterobacteriaceae. Outros 61,3% pertenciam ao gênero *Pseudomonas*, 4,5% ao gênero *Acinetobacter* e 7,6% eram *Stenotrophomonas maltophilia*. Apesar de não haver parâmetros microbiológicos na RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Anvisa-MS, para leite cru, os resultados do isolamento em ágar VRBG levaram à investigação de outros estudos com achados semelhantes referentes ao isolamento de bactérias VRBG a partir de amostras de leite caprino e bovino. **Conclusões:** A detecção em ágar VRBG de bactérias oxidase negativas não pertencentes à família Enterobacteriaceae, como as do gênero *Acinetobacter*, sugere a necessidade de um debate acerca da metodologia indicada pela ISO 21528-2 para enumeração de enterobactérias, visto que o novo regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos não mais utilizará o grupo coliforme como indicador, e sim a contagem de Enterobacteriaceae/g ou mL.

PALAVRAS-CHAVE: Enterobacteriaceae; *Pseudomonas*; Leite; *Acinetobacter*; Legislação

ABSTRACT

Introduction: Coliforms have been used over the years as indicator microorganisms for microbiological quality. However, several studies report the lack of direct correlation between their presence and that of pathogens in the evaluation of food safety, leading to the suggestion of new analysis proposals, such as the search for total enterobacteria, which includes all members of the Enterobacteriaceae family. **Objective:** This study aimed to determine the population of enterobacteria in raw goat milk samples based on the microbiological criteria suggested by the National Health Surveillance Agency - Ministry of Health (Anvisa - MS) - Public Consultation No° 542 of July 17, 2018 for Pasteurized milk samples. **Method:** 21 samples from small producers from different regions of the state of Rio de Janeiro were used. Isolates were obtained from inoculation on VRBG agar according to ISO 21528-2 and identified by Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight (MALDI/TOF) mass spectrometry. **Results:** Of the 222 isolates identified, only 26.6% belonged to the Enterobacteriaceae family.

^I Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil

^{II} Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: gustavoanciens@id.uff.br

Recebido: 24 jun 2019

Aprovado: 12 dez 2019



Another 61.3% belonged to the *Pseudomonas* genus, 4.5% to the *Acinetobacter* genus and 7.6% were *Stenotrophomonas maltophilia*. Although there are no microbiological parameters in Anvisa-MS RDC N° 12 of January 2, 2001 for raw milk, the results of isolation on VRBG agar led to the investigation of other studies with similar findings regarding isolation of VRBG bacteria from goat and bovine milk samples. **Conclusions:** Detection in VRBG agar of non-Enterobacteriaceae-negative oxidase bacteria, such as those of the genus *Acinetobacter*, suggests the need for a debate on the methodology indicated by ISO 21528-2 for enumeration of enterobacteria, as the new regulation on standard microbiological data for food will no longer use the coliform group, but the Enterobacteriaceae/g or mL count, as an indicator.

KEYWORDS: Enterobacteriaceae; *Pseudomonas*; Milk; *Acinetobacter*; Legislation

INTRODUÇÃO

As condições higiênico-sanitárias na cadeia produtiva do leite estão diretamente relacionadas com os parâmetros microbiológicos e, conseqüentemente, com a qualidade do produto final¹.

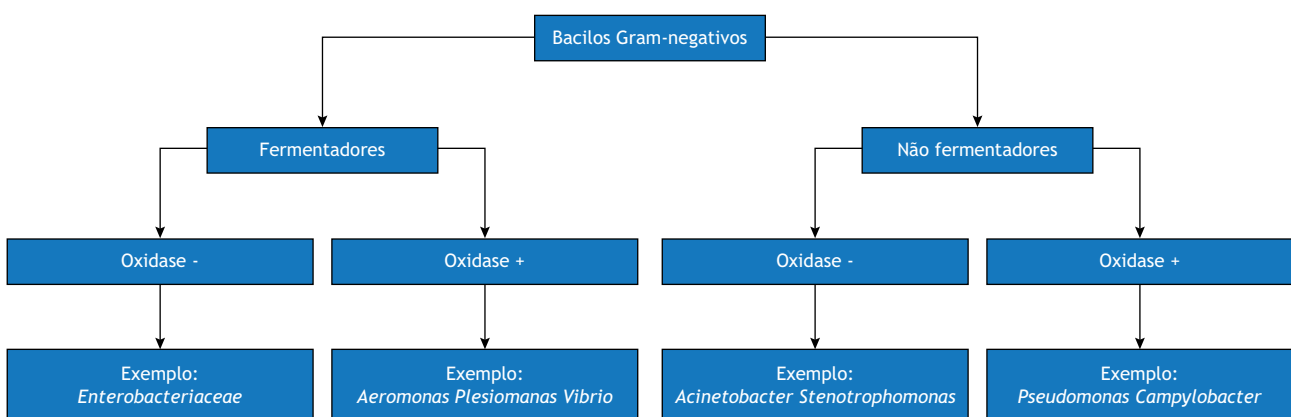
A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 12, de 2 de janeiro de 2001², da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. No grupo de alimentos denominado “leite de bovinos e de outros mamíferos e derivados” são indicados os micro-organismos que devem ser pesquisados, assim como seus valores de tolerância máximos, para que a qualidade mínima desses produtos seja garantida. Para leite fluido pasteurizado, a recomendação é que sejam pesquisados coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. Já para queijos, a orientação varia de acordo com o tipo e a umidade de cada produto. Em geral, devem ser avaliados coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Para leite cru, não existe parâmetro estabelecido, pois sua comercialização não é permitida².

Os bacilos Gram-negativos são considerados importantes agentes causadores de infecções hospitalares e os mais relevantes são frequentemente relacionados à área de alimentos, exibindo maior capacidade de disseminação quando comparados aos cocos Gram-positivos³. São divididos em dois grandes grupos, os fermentadores e os não fermentadores, como exibido na Figura 1.

A família Enterobacteriaceae é composta por 53 gêneros e mais de 170 espécies descritas. Alguns gêneros patogênicos revelam-se de grande importância clínica, como *Enterobacter* e *Salmonella*, assim como as espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*⁵.

Os coliformes são um grupo de micro-organismos utilizados como indicadores, com a finalidade de verificar a condição microbiológica geral da amostra. Os micro-organismos desse grupo são aeróbicos ou anaeróbicos facultativos e não esporulados, que fermentam a lactose com produção de ácido e gás a 32°C-35°C (coliformes totais). Dentro deste grupo há, ainda, aqueles que conseguem fermentar a lactose até a temperatura de 45°C, sendo denominados coliformes termotolerantes, onde podemos destacar a espécie *E. coli*, cuja presença em alimentos indica contaminação fecal devido à sua origem exclusiva das fezes. Os membros do grupo coliforme pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo os principais os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*⁶.

O conceito inicial de se testar bactérias indicadoras foi elaborado para se detectar a contaminação fecal, que serviria como uma evidência indireta da presença de patógenos⁷. Entretanto, alguns estudos ao longo dos anos têm mostrado a falta de correlação direta entre a presença de indicadores e de patógenos, o que coloca em discussão a utilidade desses micro-organismos na avaliação da segurança de alimentos⁸. Além disso, a presença de certos coliformes no ambiente também diminuiu sua associação



Fonte: Adaptado de Koneman et al.⁴

Figura 1. Classificação dos bacilos Gram-negativos e exemplos de seus representantes mais relevantes.



como um grupo como indicadores de contaminação fecal^{9,10}. Há casos ainda em que patógenos foram detectados em amostras de leite cru que apresentaram baixa contagem de coliformes, o que a princípio sugeriria boa qualidade microbiológica¹¹.

Uma vez que o uso dos coliformes como indicadores em produtos lácteos vem sendo debatido na comunidade científica, novas soluções têm sido propostas, como o uso do chamado Grupo EB ou Enterobactérias totais, que compreende todos os membros da família Enterobacteriaceae, incluindo o grupo coliforme. O uso do grupo EB como indicador se torna vantajoso por detectar com maior sensibilidade uma possível contaminação pós-pasteurização, em vista da abrangência maior de espécies contaminantes. Outro grupo sugerido é o de bactérias Gram-negativas totais, que inclui todas as enterobactérias e os outros Gram-negativos não fermentadores, como o gênero *Pseudomonas*. Este é o principal gênero associado à contaminação pós-processamento na indústria de lácteos, podendo exibir atividade produtora de biofilme e produção de enzimas deteriorantes. Ambos os grupos propostos, apesar de incluírem patógenos, são considerados indicadores higiênico-sanitários^{6,12}.

O presente estudo teve como objetivo inicial determinar a população de Enterobacteriaceae em amostras de leite caprino cru, com base nos critérios microbiológicos sugeridos pela Consulta Pública nº 542, de 17 de julho de 2018, da Anvisa - Ministério da Saúde¹³ para amostras de leite pasteurizado.

MÉTODO

Foram utilizadas 21 amostras de leite de cabra cru provenientes de pequenos produtores de diversas cidades de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro, sendo sete provenientes da região Metropolitana, quatro da Região Serrana e dez da Região Noroeste do estado. Os estabelecimentos foram selecionados após pesquisas realizadas *online* sobre locais onde era possível adquirir leite caprino cru, e também por meio de conhecimento prévio, por parte dos autores, de alguns pontos de venda. As amostras foram coletadas diretamente nos recipientes onde ocorre a venda do produto ao consumidor, em dois períodos (março e agosto de 2018), e estas foram mantidas em refrigeração até o momento da análise, que ocorreu em um curto prazo.

Vinte e cinco mililitros de cada amostra analisada foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada (BIOCEN, São Paulo) 0,1%. A partir de diluições seriadas dessas suspensões, foram feitas inoculações em ágar Violeta Vermelho Bile Glicose (VRBG, Kasvi, São Paulo), preparado com no máximo 3 h de antecedência, de acordo com a metodologia indicada pela ISO 21528-2. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h. Para cada novo lote de VRBG produzido foi realizado o controle da qualidade do meio, com a incubação de uma placa não semeada^{14,15}.

As colônias típicas de cor rósea e de cor arroxeada, com a presença de halos de precipitação (em média, 15 por amostra) foram inoculadas em ágar Triptona de soja (ágar Casoy, BIOCEN, São Paulo) para ganho de massa, e posteriormente, armazenados sob congelamento em criotubos em caldo Casoy (Merck, São Paulo) e glicerol (Merck, São Paulo) a 40%.

Foram selecionados 271 isolados para identificação por espectrometria de massas por *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF; Microflex LT, Bruker, Estados Unidos). Para isto, as culturas bacterianas semeadas em ágar Casoy foram inseridas em duplicata na placa metálica própria do equipamento, com posterior adição de 1 µl de ácido fórmico 70% para que ocorresse a lise celular. Após a secagem do ácido, foi inserido o mesmo volume de matriz, que se mostrou cristalizada ao final do processo. Assim, a placa foi inserida no equipamento e a partir da emissão de feixes de laser, a amostra foi evaporada com liberação de proteínas ionizadas de diferentes cargas e massas, posteriormente foi gerado um espectro em função do tempo percorrido até o detector. O equipamento foi previamente calibrado com uma cepa controle de *E. coli*, e a identificação de cada isolado foi gerada pelo *software* Biotype 3.1¹⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultado da identificação dos isolados selecionados

Dos 271 isolados, 222 foram identificados com precisão por meio de MALDI-TOF e somente 26,6% corresponderam a membros da família Enterobacteriaceae. Outros 61,3% dos isolados foram identificados como espécies do gênero *Pseudomonas* e 4,5% como espécies do gênero *Acinetobacter*. Ainda, 7,6% corresponderam à espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, uma espécie que anteriormente era classificada como pertencente ao gênero *Pseudomonas*. A Figura 2 ilustra a identificação geral obtida.

Um estudo chinês, realizado por Zhang et al.¹⁷, avaliou a diversidade bacteriana de leite de cabra cru, e também detectou os mesmos grupos encontrados neste estudo, porém em proporções diferentes, sendo as enterobactérias correspondentes a cerca de 25% do total (juntamente com alguns isolados Gram-positivos), seguidas por *Pseudomonas* (13%), *Acinetobacter* (13%) e *Stenotrophomonas* (3%).

O gênero *Pseudomonas* é extremamente relevante na deterioração do leite cru, especialmente por ser psicotrófico, se multiplicando com eficiência durante o armazenamento refrigerado e apresentar atividade proteolítica e lipolítica. *Pseudomonas* sp. possuem uma grande diversidade genética e variedade metabólica, permitindo seu desenvolvimento em ambientes diversos,

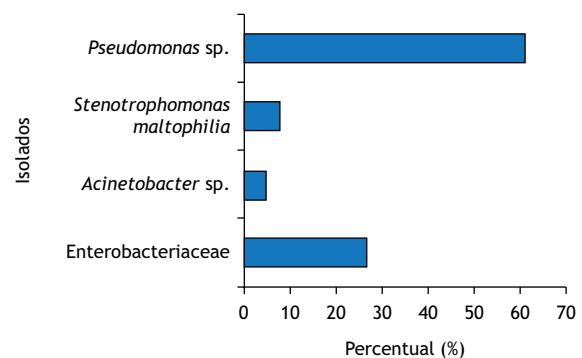


Figura 2. Distribuição dos isolados identificados a partir das amostras de leite caprino cru analisadas.



incluindo superfícies e equipamentos usados na cadeia produtiva láctea. As espécies *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* e *Pseudomonas putida* são consideradas pela literatura como as mais relevantes no leite¹⁸.

Dentre os micro-organismos psicrotróficos usualmente encontrados no leite, as espécies do gênero *Pseudomonas* possuem o menor tempo de geração a temperaturas entre 0°C e 7°C, justificando sua prevalência. *P. fluorescens* é a espécie mais isolada em produtos lácteos e a que mais produz enzimas deteriorantes¹⁹.

Embora os micro-organismos do gênero sejam inativados por eventuais tratamentos térmicos posteriores, as enzimas produzidas se mostram termorresistentes, resistindo até mesmo a tratamentos de temperatura ultra-alta (UHT), e podem deteriorar o leite durante as etapas seguintes de armazenamento e transporte. Os efeitos causados em decorrência da deterioração provocada por *Pseudomonas* sp. variam consideravelmente de acordo com cada cepa e condições de crescimento^{19,20}.

O gênero *Acinetobacter* é associado à alta taxa de mortalidade em infecções hospitalares e à expressão de multirresistência, sendo suas espécies boas competidoras na microbiota de matrizes alimentares devido a vários fatores como capacidade de formação de biofilme e sobrevivência por longos períodos em superfícies²¹.

Apesar de pouco relacionado a alimentos, as bactérias do gênero *Acinetobacter* já foram reportadas também em leite. Estudos asiáticos mostram que centenas de isolados, especialmente *A. baumannii*, de leite bovino cru apresentaram multirresistência a uma vasta gama de antibióticos^{22,23}.

Em estudo recente, cepas multirresistentes a antimicrobianos (MDR), resistentes inclusive aos carbapenêmicos, do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* foram encontradas em fórmulas infantis e utensílios de lactário em hospital público no Rio de Janeiro, indicando um problema de saúde pública associado a este gênero²⁴.

Estudos recentes ressaltam a ocorrência de isolamento dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* em ágar VRBG, comparando a influência deste grupo frente à detecção de enterobactérias em amostras alimentícias em diferentes meios de cultura. Dependendo do tipo de amostra, da temperatura e das espécies presentes, podem-se obter diferentes combinações dos micro-organismos presentes^{25,26}.

Associação com a Consulta Pública nº 542/2018

Inicialmente, o estudo era voltado para a detecção de bactérias da família Enterobacteriaceae e, por isso, foi utilizado o procedimento com o ágar VRBG. No entanto, a maior proporção de isolados foi pertencente ao gênero *Pseudomonas*. O ágar VRBG também é associado à recuperação de micro-organismos do gênero *Pseudomonas*, segundo a farmacopeia internacional da Organização Mundial da Saúde (OMS). Este meio é indicado para uso com bactérias Gram-negativas tolerantes à bile, e possui as propriedades de promotor de crescimento e indicador dos micro-organismos abordados²⁷.

Acompanhando a discussão da comunidade científica mundial, a Anvisa, por meio da Consulta Pública nº 542/2018, propôs a remoção da pesquisa do grupo coliformes do Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, sugerindo a substituição desta pela pesquisa de Enterobacteriaceae e *Escherichia coli* em âmbito nacional¹³. No entanto, até o momento, a nova legislação que substituirá a RDC nº 12/2001 ainda não foi publicada.

No Brasil, a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003¹⁴, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), descreve o procedimento recomendado para a contagem de enterobactérias em alimentos, com o emprego do ágar VRBG⁷. O meio de cultura anteriormente utilizado para detecção de coliformes era o ágar *Violet Red Bile* (VRB), que possuía lactose em sua composição. O grupo dos coliformes é capaz de fermentar tanto a glicose quanto a lactose, porém, outras espécies da família Enterobacteriaceae fermentam apenas a glicose. Assim, o ágar VRB, teve a lactose substituída pela glicose em sua composição, dando origem ao ágar VRBG, permitindo a detecção das enterobactérias. Na presença dessas bactérias, o pH do meio é diminuído devido à fermentação da glicose, ocasionando a presença de colônias de tom rosado, em virtude da presença do indicador vermelho neutro na formulação. Ocorre, ainda, a formação de halos devido à precipitação dos sais biliares. Os micro-organismos Gram-positivos são inibidos pela presença do cristal violeta e dos sais biliares²⁸.

Neste estudo, as colônias de todos os gêneros identificados se apresentaram de forma muito semelhante na superfície do ágar, com coloração rósea e halo, não sendo possível nem mesmo diferenciar fermentadores e não fermentadores da glicose com relação ao aspecto da colônia isolada. Assim, membros da família Enterobacteriaceae e dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, embora possuam comportamentos diferentes, se apresentaram da mesma forma quando isolados diretamente da amostra.

Outros trabalhos também descrevem esse fato. Um estudo realizado no Japão exibiu resultados de um teste feito com ágar VRBG em leite cru e pasteurizado, no qual foi verificado o potencial de desenvolvimento de *Pseudomonas* frente às enterobactérias, exibindo crescimento significativo de ambos os grupos²⁰. Na Alemanha, uma pesquisa realizada com leite em pó utilizou o ágar VRBD (outra denominação para o ágar VRBG) com o objetivo específico de isolar *Acinetobacter* sp., obtendo diferentes espécies do gênero em conjunto com membros da família Enterobacteriaceae²⁶. Njage et al.²⁹ utilizaram o ágar VRBG com o objetivo estrito de isolar enterobactérias de leite de camelo, porém, ao identificar as colônias isoladas, foram encontrados micro-organismos dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, assim como em nosso estudo.

Como técnicas de identificação mais avançadas, como a espectrometria de massas, ainda são extremamente custosas e de difícil acesso, a IN nº 62/2003 do MAPA e as referências internacionais indicam que após o plaqueamento em ágar VRBG, as colônias devem ser submetidas à coloração de Gram e ao teste da oxidase para confirmação da presença de enterobactérias^{14,15}. Imaginando a rotina de um laboratório de análises microbiológicas que



passará a investigar enterobactérias rotineiramente em muitas classes de alimentos, serão gerados inúmeros isolados que possivelmente não sejam enterobactérias, como visto neste estudo, que precisarão passar por estes testes, gerando grande mão de obra e maior custo.

A coloração de Gram não geraria nenhuma diferenciação entre as enterobactérias, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, pois todos são bacilos Gram-negativos. O teste da oxidase descartaria *Pseudomonas*, porém o gênero *Acinetobacter* acabaria sendo contabilizado como enterobactérias, pois também é oxidase negativa. Assim, além da maior mão de obra e custo, poderiam ser geradas contagens superestimadas.

CONCLUSÕES

A diversidade da população de bacilos Gram-negativos identificada neste trabalho, assim como a identificação de grupos potencialmente patogênicos, evidencia o risco de consumo de

leite caprino cru, fato que ocorre principalmente em cidades do interior do país.

Embora a legislação brasileira esteja voltada para leite pasteurizado e não para o leite cru, os resultados obtidos nesse estudo, corroborados com aqueles encontrados por outros autores, apontaram para a necessidade de um debate sobre a metodologia indicada para contagem de enterobactérias em âmbito nacional, visto que o novo regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos não mais utilizará o grupo coliforme como indicador, e sim a contagem de Enterobacteriaceae/g ou mL, tendo como metodologia oficial a ser empregada o isolamento em ágar VRBG.

Do ponto de vista da legislação brasileira, a inclusão do parâmetro Enterobacteriaceae/g ou mL de amostra traz um debate sobre o método de quantificação recomendado, que pode vir a trazer resultados inexatos, ocasionando a indicação de uma amostra como imprópria em razão de resultados superestimados.

REFERÊNCIAS

1. Queiroga RCRE, Costa RG, Biscontini TMB, Medeiros NA, Madruga MS, Schuler ARP. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. *Rev Bras Zootecn.* 2007;36(2):430-37. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000200021>
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução RDC Nº 12, de 2 janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial União.* 2 jan 2001.
3. Hernández-Gómez C, Blanco VM, Motoa G, Correa A, Maya JJ, Cadena E et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica.* 2013;34:91-100. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>
4. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.* 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2018.
5. Public Health England. *UK standards for microbiology investigations: identification of enterobacteriaceae.* London: Public Health England; 2015.
6. Martin NH, Trmčić A, Hsieh T, Boor KJ, Wiedmann M. The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Front Microbiol.* 2016;7:1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549>
7. Miskimin DK, Berkowitz KA, Solberg M, Riha Jr. WE, Franke WC, Buchanan RL et al. Relationships between indicator organisms and specific pathogens in potentially hazardous foods. *J Food Sci.* 1976;41(5):1001-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb14376.x>
8. Jackson EE, Erten ES, Maddi N, Graham TE, Larkin JW, Blodgett RJ et al. Detection and enumeration of four foodborne pathogens in raw commingled silo milk in the United States. *J Food Prot.* 2012;75(8):1382-93. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-548>
9. Boor KJ, Wiedmann M, Murphy S, Alcaine S. A 100-year review: microbiology and safety of milk handling. *J Dairy Sci.* 100(12):9933-51. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12969>
10. Trmčić A, Chauhan K, Kent DJ, Ralyea RD, Martin NH, Boor KJ et al. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *J Dairy Sci.* 2016;99(8):6105-20. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11112>
11. D'Amico DJ, Groves E, Donnelly CW. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J Food Prot.* 2008;71(8):1580-9. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.8.1580>
12. Hervert CJ, Alles AS, Martin NH, Boor KJ, Wiedmann M. Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. *J Dairy Sci.* 2016;99(9):7033-42. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11074>
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Consulta pública Nº 542, de 17 de julho de 2018. *Diário Oficial União.* 18 jul 2018.
14. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial União.* 18 set 2003.
15. International Organization for Standardization – ISO. ISO 21528-2: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae part 2: colony count method. Geneva: International Organization for Standardization; 2004.



16. Rodrigues NMB, Bronzato GF, Santiago GS, Botelho LAB, Moreira BM, Coelho IS et al. The matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. *Braz J Microbiol.* 2017;48(1):132-38. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.025>
17. Zhang F, Wang Z, Lei F, Wang B, Jiang S, Peng Q et al. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. *J Dairy Sci.* 2017;100(10):7812-24. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13244>
18. Scatamburlo TM, Yamazi AK, Cavicchioli VQ, Pieri FA, Nero LA. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *J Dairy Sci.* 2015;98(2):759-64. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8747>
19. Ferreira AA, Marques KA, Barbosa JB, Martins EMF, Pinto CLO, Martins ML. Influência da atividade enzimática de *Pseudomonas fluorescens* 041 em labneh1. *Rev Inst Latic Candido Tostes.* 2012;385(67):17-24. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120018>
20. Meng L, Liu H, Dong L, Zheng N, Xing M, Zhang Y et al. Identification and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp isolated from different raw milks at storage temperatures. *J Dairy Sci.* 2018;101(4):2897-905. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13617>
21. Amorim AMB, Nascimento JS. *Acinetobacter*: an underrated foodborne pathogen? *J Infect Dev Ctries.* 2017;11(2):111-14. <https://doi.org/10.3855/jidc.8418>
22. Gurung M, Nam HM, Tamang MD, Chae MH, Jang GC, Lim SK. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *J Dairy Sci.* 2013;96(4):1997-2002. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5965>
23. Tamang MD, Gurung M, Nam HM, Kim SR, Jang GC, Jung SC et al. Short communication: genetic characterization of antimicrobial resistance in *Acinetobacter* isolates recovered from bulk tank milk. *J Dairy Sci.* 2014;97(2):704-09. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7403>
24. Araújo BC, Moraes MS, Costa LEO, Nascimento JS. Short communication: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolated from infant milk formula and utensils in a nursery in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 2015;98(4):2303-6. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8825>
25. Sato J, Ohno H, Matsui C. Applicability of the ISO Enterobacteriaceae test for determining the suitability of pasteurized milk for shipment. *Jpn J Food Microbiol.* 2014;31(2):86-92. <https://doi.org/10.5803/jsfm.31.86>
26. Cho GS, Li B, Rostalsky A, Fiedler G, Rösch N, Igbinosa E et al. Diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter* strains from milk powder produced in Germany. *Front Microbiol.* 2018;9:1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00536>
27. World Health Organization - WHO. The international pharmacopoeia. Geneva: World Health Organization; 2017.
28. Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. Handbook of culture media for food microbiology. Amsterdam: Elsevier Science; 2003.
29. Njage PMK, Dolci S, Jans C, Wangoh J, Lacroix C, Meile L. Ampicillin resistance and extended spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae isolated from raw and spontaneously fermented camel milk. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6(7):1446-52. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.1293>

Agradecimentos

Ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela disponibilização do espectrômetro de massas (MALDI-TOF).

Contribuição dos Autores

Todos os autores participaram da concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.