



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ADRIELLE BAHIENSE TREVISAN

**ENTEROBACTÉRIAS NO PREPARO DE FÓRMULAS
LÁCTEAS INFANTIS: OCORRÊNCIA DE *Cronobacter*
Sakazakii E PERFIL ANTIMICROBIANO DOS ISOLADOS**

Salvador
2016

ADRIELLE BAHIANSE TREVISAN

**ENTEROBACTÉRIAS NO PREPARO DE FÓRMULAS
LÁCTEAS INFANTIS: OCORRÊNCIA DE *Cronobacter*
Sakazakii E PERFIL ANTIMICROBIANO DOS ISOLADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rogeria Comastri de Castro Almeida

Salvador
2016

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Trevisan, Adrielle Bahiense.

Enterobactérias no preparo de fórmulas lácteas infantis: ocorrência de *Cronobacter sakazakii* e perfil antimicrobiano dos isolados / Adrielle Bahiense Trevisan. - 2016.
84 f.: il.

Orientadora: Profª. Drª. Rogéria Comastri de Castro Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2016.

1. Leite - Microbiologia. 2. Alimentos - Microbiologia. 3. Bactérias gram-negativas.
4. *Cronobacter sakazakii*. I. Almeida, Rogéria Comastri de Castro. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 664.024
CDU - 664



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

ADRIELLE BAHIENSE TREVISAN

ENTEROBACTÉRIAS NO PREPARO DE FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS: OCORRÊNCIA DE *Cronobacter sakazakii* E PERFIL ANTIMICROBIANO DOS ISOLADOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 28 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Rogéria Comastri de Castro Almeida
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. Maurício Costa Alves da Silva
Universidade Federal da Bahia

Dr^a. Norma Suely Evangelista Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dedico

Ao meu filho:

Bernardo Trevisan Maggitti.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá (1910-1997)

AGRADECIMENTOS

Àquele a quem dedico a minha fé, a quem rogo proteção todas as manhãs e a quem agradeço por mais um dia de vida todas as noites – ao Senhor, meu Deus, pai de todas as coisas, agradeço por mais essa graça.

Ao meu filho, o anjo do céu que Deus me confiou, agradeço a você por ter me mostrado o quão forte eu posso ser. Meu passarinho, te agradeço por ser essa criança tão doce e carinhosa, por ter tão poucos anos e uma compreensão incrível das coisas. Você, sem dúvida, a minha grande inspiração, minha maior fonte de força. Você me enche de alegria e orgulho, meu amor por você é incondicional.

À você, Paolo, pelos longos anos de caminhada ao meu lado, por estar sempre me incentivando a seguir em frente e me apoiando no que for preciso. Você viu o meu crescimento e sinto o seu orgulho, você também faz parte disso. Obrigada.

Agradeço a toda a minha família, que quando foi necessário cuidou do meu filho para que eu pudesse me dedicar aos estudos e ao trabalho. Um agradecimento especial a D. Sueli, a minha mãe, a meu pai, a minha irmã Daniele, ao meu compadre Guino, e ao caçulinha Daniel (que já cresceu, mas eu não percebi). Obrigada a todos vocês, sobretudo, por compreenderem todas as minhas ausências, mas para se ter êxito é necessário fazer uma série de abdições.

Aos meus queridos colegas de mestrado, por toda a ajuda, por toda a paciência e por todas as alegrias. Obrigada, sobretudo, ao meu grande amigo Túlio, por todo seu apoio, orientações e carinho sincero. Um agradecimento especial às minhas queridas Binha (Cíntia), Adriana e Aline, que estiveram mais próximas nessa jornada, e por toda a ajuda prestada.

Agradeço também a Priscila Oliveira, pela competência, eficiência e por estar sempre disposta a ajudar. Você ajuda a tornar o dia dos mestrados muito mais leve! Obrigada!

À grande família LABCARNE/LASAB, pela parceria, pela ajuda e pela eterna disponibilidade de receber seus discípulos. Obrigada a todos que estiveram em experimento no mesmo período por toda a compreensão e paciência. Um agradecimento

especial a Professora Lia pela confiança no meu trabalho e por sempre me receber de braços abertos; a Nilma e a Rebeca por todo o tempo e ajuda dispensados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Controle Qualidade de Alimentos da Escola de Nutrição, sob coordenação da professora Rogéria, agradeço imensamente pela ajuda prestada, sobretudo aos técnicos Ary e Luis. Vocês são excelentes profissionais, muito obrigada.

Agradeço aos meus colegas de trabalho da ADAB, pela oportunidade de trabalhar com pessoas como vocês, em especial a Itamar, por todo apoio, compreensão e paciência. Eu sou e serei sempre muito grata a vocês, sem esse apoio teria sido infinitamente mais difícil chegar ao final de mais essa etapa da minha vida profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e à Dra. Marise Dutra Asensi do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ) pelo fornecimento da cepa de *Cronobacter sakazakii*.

Agradeço também às coordenadoras das equipes de Nutrição dos hospitais em que o projeto foi executado, os nomes serão omitidos para garantir o sigilo dos hospitais participantes, mas não serão esquecidos. Sou muito grata pela oportunidade, pela atenção e apoio durante as coletas.

Agradeço às minhas queridas alunas do PIBIC, Lidiane e Larissa, por toda a dedicação, competência e seriedade. Sem vocês, repito, eu não teria conseguido fazer metade do que me comprometi. Vocês foram dois braços direitos (e muito eficientes). Que a nossa parceria não acabe por aqui, muito obrigada!

A Thaíse, que chegou a fazer parte da equipe, momentaneamente, mas precisou se afastar. E a mestranda da escola de Nutrição, Tainara, pela disposição em ajudar prontamente quando solicitada. Ao professor Cláudio Ribeiro por toda a ajuda com o tratamento dos resultados e a execução da análise descritiva dos dados.

Agradeço ao meu grande e eterno mestre Prof. Dr. Maurício, sem você nada disso teria acontecido. Você foi o grande responsável por plantar essa semente da pesquisa e me contaminar com o mundo viciante da inspeção de alimentos. Obrigada pela parceria, dedicação, ensinamentos, conselhos e amizade. E obrigada por me fazer

acreditar que eu tinha a “estrelinha”, eu de fato passei a ter. Espero poder fazer nascerem muitas estrelinhas em minha jornada.

E por fim, mas não menos importante, agradeço à Professora Dra Rogéria por sua orientação maravilhosa, por seu apoio, por estar sempre disposta e verdadeiramente presente. Obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, foi uma grande honra e saiba que levarei muitos aprendizados dessa experiência. Eu a admiro muito como profissional, mas sobretudo como pessoa e a sua caminhada me inspira a continuar. Obrigada por tudo!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	21
OBJETIVOS.....	24
CAPITULO I – Revisão da literatura.....	26
1. O lactário.....	27
2. Enterobactérias em fórmulas lácteas infantis.....	30
3. <i>Cronobacter</i> spp.	31
3.1. Taxonomia.....	31
3.2. Características do gênero e reservatórios.....	32
4. <i>Cronobacter sakazakii</i>	35
4.1. Características e resistência	35
4.2. Manifestações clínicas	38
4.3. Surto envolvendo o microrganismo	40
5. Fórmula infantil em pó e <i>Cronobacter sakazakii</i>	42
6. Susceptibilidade de <i>Cronobacter sakazakii</i> a antimicrobianos	44
7. Aspectos regulatórios	46
Referências	47
CAPÍTULO II – Artigo.....	54
Enterobactérias no preparo de fórmulas lácteas infantis: ocorrência de <i>Cronobacter sakazakii</i> e perfil antimicrobiano dos isolados	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAIS E METODOS.....	61
2.1. Amostra e amostragem.....	61
2.2. Isolamento e identificação de <i>C. sakazakii</i>	62
2.3. Resistência dos isolados de <i>C. sakazakii</i> aos antimicrobianos.....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1. Detecção de <i>C. sakazakii</i> e outras enterobactérias.....	65

3.2.	Perfil antimicrobiano dos isolados de <i>C. sakazakii</i>	73
4.	CONCLUSÕES.....	76
	AGRADECIMENTOS.....	76
	CONFLITO DE INTERESSE	76
	DECLARAÇÃO DE SUBMISSÃO E VERIFICAÇÃO	77
	REFERÊNCIAS	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO I

Figura 1 – Lactário: Sala de preparo, estocagem e distribuição de fórmulas lácteas infantis	28
Figura 2 – Colônias características de <i>Cronobacter sakazakii</i> em ágar Hicrome Cronobacter	36

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPITULO I e II

Quadro 1 – Ambientes e áreas mínimas para estabelecimentos assistenciais de saúde com mais de 15 leitos.....	28
Tabela 1 – Isolamento de enterobactérias de utensílios utilizados no preparo e distribuição de fórmulas lácteas infantis (0 a 6 meses)	67
Tabela 2 – Bactérias isoladas em utensílios usados no preparo das fórmulas lácteas infantis.....	68
Tabela 3 – Bactérias isoladas em fórmulas lácteas infantis em lactários de Salvador, BA.....	70
Tabela 4 - Perfil de resistência/susceptibilidade de <i>Cronobacter sakazakii</i> isolado de fórmulas lácteas infantis.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α - Alfa

β – Beta

% – Porcentagem

mL – Mililitro

g – Grama

h – Hora

°C – Graus celcius

ATCC- *American Type Culture Collection*

APT- Água peptonada tamponada

MLSTv- Caldo lauril sulfato triptose modificado e adicionado de vancomicina

MH- Mueller Hinton

TSA- Ágar Trypticase de Soja

PIF- Powdered Infant Formula

FLD- Fórmula Láctea Infantil Desidratada

FLR- Fórmula Láctea Infantil Reconstituída

AMP- Ampicilina

AMI- Amicacina

ATM- Aztreonam

CFL- Cefalotina

CTX- Cefotaxima

CFT- Ceftriaxona

CLO- Cloranfenicol

GEN- Gentamicina

IPM- Imipenem

SZT- Sulfazotrim

TET- Tetraciclina

X α Glc- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D

E.U.A.- Estados Unidos da América

FAO -Food and Agricultural Organization

WHO/OMS- World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde

CDC- Centers for Disease Control and Prevention

ICMSF- *International Commission for Microbiological Specification for Foods*

ISO- *International Organization for Standardization*

CLSI- *Clinical Laboratory Standards Institute*

CAC/RCP- *“Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Children”*

RDC- Resolução de Diretoria Colegiada

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

EAS- Estabelecimentos Assistenciais de Saúde

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

NEC- Enterocolite Necrosante

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

LABCARNE – Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Carne e Derivados

UFBA – Universidade Federal da Bahia

TREVISAN, Adrielle Bahiense. *Enterobactérias no preparo de fórmulas lácteas infantis: ocorrência de Cronobacter sakazakii e perfil antimicrobiano dos isolados*. f. 82. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

Cronobacter sakazakii é um patógeno oportunista emergente que nos últimos anos vem ganhando notoriedade em função do crescente número de surtos em diversos países. O principal grupo de risco envolvido em casos e surtos de infecções relatados são os neonatos, principalmente os prematuros e imunocomprometidos que necessitam de cuidados hospitalares especiais. Os quadros clínicos causados por esta bactéria são caracterizados por infecções sistêmicas graves, como a meningite neonatal, enterocolites necrosantes e septicemia em neonatos. O microrganismo tem sido isolado de diversos alimentos em todo o mundo, a maioria de origem vegetal, entretanto somente as fórmulas infantis em pó (FIP) foram ligadas aos casos de infecção em lactentes. Esse estudo teve o objetivo de verificar a ocorrência de *C. sakazakii* e outras enterobactérias em fórmulas lácteas infantis e utensílios de três lactários de hospitais particulares especializados na cidade de Salvador, BA, assim como analisar o perfil de susceptibilidade das cepas isoladas de *C. sakazakii* frente a antimicrobianos. Foram analisadas 225 amostras, conforme metodologia recomendada por ISO/TS 22964, modificada. Os resultados indicaram que 112 (49,7%) amostras apresentaram algum tipo de contaminação microbiana, sendo 102 (45,3%) por enterobactérias. *C. sakazakii* foi detectado em 1,8% das amostras de alimentos, sendo que *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cancerogenus* e *Pseudomonas* spp. foram os microrganismos mais frequentemente isolados das mesmas: 36,6%, 33,9% e 14,2%, respectivamente. As amostras de utensílios apresentaram o maior nível de contaminação por enterobactérias nos três lactários avaliados, destacando-se os bicos de mamadeiras e as jarras de preparo do lactário C e as colheres dosadoras do lactário B, todas apresentando 100% de contaminação. Em relação à susceptibilidade antimicrobiana dos três isolados de *C. sakazakii*, todos (100%) apresentaram sensibilidade a amicacina, gentamicina, cloranfenicol e imipenem, enquanto 66,6% apresentaram resistência a ampicilina, cefalotina, tetraciclina e sulfazotrim. Embora a ocorrência de *C. sakazakii* nas fórmulas lácteas tenha sido baixa, o risco deve ser considerado uma vez que a falta de controle na

produção deste alimento poderá resultar na proliferação da bactéria, podendo ocasionar doenças severas e sequelas irreversíveis em neonatos. A multirresistência dos isolados a alguns dos agentes terapêuticos comumente empregados no tratamento da infecção, justifica a necessidade de novos estudos para melhor caracterizar esse perfil de resistência, visando alternativas para o tratamento e o controle do microrganismo no alimento.

Palavras chaves: *Cronobacter sakazakii*, fórmulas lácteas infantis, lactários, antimicrobianos.

ADRIELLE, Bahiense Trevisan. *Enterobacteria in the preparation of infant milk formulas: occurrence of Cronobacter sakazakii and antimicrobial isolates profile*. p. 82. Dissertation (Master's degree) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii is an emerging opportunistic pathogen in recent years have gained notoriety due to the growing number of outbreaks in several countries. The main risk group involved in disease and infection outbreaks are newborns, especially premature infants and immunocompromised needing hospital care. Clinical infections caused by this bacterium are characterized by severe systemic infections such as neonatal meningitis, necrotizing enterocolitis and sepsis in neonates. It has been isolated in various foods around the world, the majority of plant origin, but only powdered infant formula (PIF) have been linked to cases of infection in infants. This study aims to verify the occurrence of *C. sakazakii* and other Enterobacteriaceae in infant milk formulas in lactaries specialized from three private hospitals in the city of Salvador, BA, as well as to analyze the profile of resistance/sensitivity of the isolated strains of *C. sakazakii* front of antimicrobials. A total of 225 samples were analyzed according to ISO method/TS 22964, modified. The results showed that 112 (49.7%) samples had some kind of microbial contamination, and 102 (45.3%) were contaminated by enterobacteria. *C. sakazakii* was detected in 1.8% of the food samples and *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cancerogenus* and *Pseudomonas* spp. were the most frequent microorganisms isolated from its: 36.6%, 33.9% and 14.2%, respectively. Samples of utensils showed the highest level of contamination of enterobacteria in the three lactaries evaluated, and 100% of the beaks of baby bottles and jars used in milk preparation from lactarie C, and spoons from lactarie B were contaminated. Regarding to the antimicrobial susceptibility of the three isolates of *C. sakazakii*, all of them (100%) showed sensitivity to amikacin, gentamicin, chloramphenicol, imipenem, while 66.6% were resistant to ampicillin, cephalothin, tetracycline and sulfazotrim. Although the occurrence of *C. sakazakii* in infant formula has been low, the risk should be considered as a lack of control in the production of food may result in the proliferation of the bacteria and can cause severe illness and irreversible consequences in newborns. The multidrug-resistant isolates to usually therapeutic agents used in the treatment of

infection justifies the need for new studies to characterization this resistance profile, seeking alternatives for the treatment and control of the microorganisms in food.

Key words: *Cronobacter sakazakii*, infant milk formulas, lactarie, antimicrobials.

INTRODUÇÃO GERAL

O *Cronobacter sakazakii* é um microrganismo patogênico, bastonete Gram-negativo, aeróbio facultativo, móvel, pertencente à família Enterobacteriaceae. Atualmente, em função do crescente número de surtos em diversos países, o microrganismo é considerado um patógeno oportunista emergente de alto risco. Os quadros clínicos associados à infecção por *C. sakazakii* são graves e apresentam taxa de mortalidade entre 20 a 80% (LEHNER & STEPHAN, 2004; EMAMI et al., 2011; HEALY et al., 2010).

Embora infecções em idosos e em indivíduos adultos com deficiência imunológica também tenham sido relatadas (GOSNEY et al., 2006; SEE, THAN, & TANG, 2007), o principal grupo de risco envolvido em casos de surtos de infecções pelo patógeno são os neonatos, principalmente os prematuros e imunocomprometidos, que após nascimento necessitam de cuidados especiais. Os neonatos apresentam maior susceptibilidade a infecções em função da sua imaturidade imunológica e pH estomacal menos ácido, fatores que contribuem para a sobrevivência do microrganismo no trato gastrintestinal (WHO/FAO, 2008; JOSHI, HOWELL, & D'SOUZA, 2014).

O quadro clínico causado pela infecção por *Cronobacter sakazakii* reflete sintomas de acometimento do sistema nervoso central. A apresentação clínica mais frequente é a meningite neonatal, mas podem desenvolver também enterocolite necrosante, septicemia e disenteria (LAI, 2001; AGUIRRE CONDE et al., 2007; CAUBILLA-BARRON et al., 2007; SIMÓN, et al., 2010). Os pacientes que sobrevivem à meningite associada à *Cronobacter* spp. desenvolvem sequelas neurológicas irreversíveis como hidrocefalia, tetraplegia e retardamento do

desenvolvimento neurológico (BARREIRA et al., 2003; TOWNSEND et al., 2008; EMAMI et al., 2011).

Apesar do Ministério da Saúde e da Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendarem o aleitamento materno como fonte de alimentação exclusiva até os seis meses de idade, há situações em que o aleitamento artificial é necessário (BRASIL, 2009). Assim, neonatos prematuros de baixo peso ou aqueles em que as mães não possam amamentar, recebem aleitamento artificial nos hospitais em que estiverem internados (WHO/FAO, 2007). Entretanto, as fórmulas infantis em pó destinadas a bebês não são estéreis e apresentam risco significativo de contaminação por *Cronobacter* spp. (DRUDY et al., 2006; CDC, 2011).

A contaminação intrínseca das fórmulas lácteas infantis por microrganismos está relacionada à etapa de processamento na indústria devido a condições higiênicas sanitárias insatisfatórias e à adição de ingredientes contaminados. Essa contaminação pode perdurar no produto acabado, uma vez que a pasteurização não é capaz de eliminar todos os microrganismos intrínsecos ao alimento (WHO/FAO, 2007; BARASH, HSIA & ARNON, 2010; CDC, 2011). Por outro lado, os fatores extrínsecos estão associados ao uso utensílios contaminados na reconstituição destas fórmulas; a partir do ambiente de preparação, ou ainda a partir da manipulação inadequada (WHO/FAO, 2007).

Além do *C. sakasakii*, estudos demonstram que as fórmulas lácteas infantis são frequentemente contaminadas por outras espécies de enterobactérias. Dentre as espécies de enterobactérias mais recuperadas a partir deste alimento, destacam-se a *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *E. coli*, *Escherichia*

vulneris, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* e outras (SHAKER et al., 2007; WANG et al., 2009; OONAKA et al., 2010; ZHOU et al., 2011).

Quanto ao *C. sakasaki*, o microrganismo foi isolado a partir de uma ampla variedade de alimentos, principalmente de origem vegetal (LI et al., 2014; LOU et al., 2014; Xu et al., 2015), entretanto, somente as fórmulas lácteas infantis em pó estiveram relacionadas aos casos de surtos infecciosos em lactentes (FRIEDEMANN, 2009).

A presença deste patógeno nas fórmulas lácteas em pó constitui um sério risco, sobretudo diante dos quadros clínicos severos com alta taxa de mortalidade entre os neonatos. Somando-se estas premissas às falhas durante o processo de reconstituição e armazenamento, que maximizam a possibilidade de proliferação do microrganismo no alimento pronto para o consumo, amplia-se os riscos a que estes pacientes serão expostos, aumentando a probabilidade de infecção pelo patógeno (PALCICH et al., 2009). Nesse sentido, justifica-se a necessidade de pesquisas que determinem a ocorrência, as possíveis rotas de veiculação e mecanismos de controle do microrganismo no preparo das fórmulas infantis, bem como o controle eficaz da infecção nos pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Esse estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de *Cronobacter sakazakii* e outra enterobactérias em fórmulas lácteas infantis e utensílios usados no preparo de mamadeiras em lactários de hospitais particulares especializados na cidade de Salvador, BA, assim como determinar o perfil dos isolados de *Cronobacter sakasakii* a antimicrobianos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência de *Cronobacter sakazakii* e outras enterobactérias em amostras de fórmulas lácteas infantis em pó industrializadas (para crianças de 0 a 6 meses de idade);
- Investigar a ocorrência de *Cronobacter sakazakii* e outras enterobactérias em amostras de fórmulas lácteas infantis reconstituídas nos lactários;
- Investigar a ocorrência de *Cronobacter sakazakii* e outras enterobactérias em utensílios usados no preparo e distribuição das mamadeiras;
- Investigar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *Cronobacter sakazakii* a antimicrobianos comumente utilizados na terapia para tratamento da infecção.

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este estudo organiza-se em dois capítulos, sendo o primeiro de revisão da literatura, com abordagem de temas relacionados ao preparo de fórmulas lácteas infantis em lactários de hospitais especializados e maternidades, características de enterobactérias e *Cronobacter sakazakii*, a sua ocorrência em alimentos e susceptibilidade a antimicrobianos. Obedece ao disposto na Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para redação de Dissertação.

O segundo capítulo, em forma de artigo, avalia a ocorrência de *Cronobacter sakazakii* e outras enterobactérias em amostras de fórmulas lácteas infantis em pó e reconstituídas e utensílios da preparação de mamadeiras em três lactários de Salvador, BA. Avalia também a resistência dos isolados de *C. sakazakii* aos antimicrobianos comumente utilizados na medicina humana para controle da infecção. Obedece ao *Guide for Authors* para submissão de artigos ao periódico *Food Control*.

CAPITULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1) O LACTÁRIO E FÓRMULA LÁCTEAS INFANTIS

Lactário é o local destinado exclusivamente ao preparo, armazenamento, e distribuição de mamadeiras contendo fórmulas lácteas reconstituídas para a alimentação de neonatos e pacientes pediátricos, em substituição ao leite materno. Ao lactário reserva-se também a função de lavagem e higienização de mamadeiras, seus bicos e todos os equipamentos e utensílios utilizados no preparo destas fórmulas (WHO/FAO, 2007; MEZOMO, 2015).

Segundo a RDC nº 50 de 21 de fevereiro de 2002, é obrigatório que os estabelecimentos de saúde com Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal e Pediátrica, sejam providos de lactário, cujas dimensões devem ser proporcionais à quantidade de leitos disponíveis na UTI (BRASIL, 2002). Esta mesma resolução dispõe sobre Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS), incluindo todos os padrões para a construção de lactários.

É preconizado que os hospitais com UTI neonatal contendo até 15 leitos devem possuir lactário com área mínima de 15,0 m², com distinção entre área "suja e limpa", com acesso independente a área "limpa" feito através de vestiário de barreira. Além disso, segundo a legislação, pode ser única a sala destinada ao preparo, estocagem e distribuição das fórmulas lácteas, desde que tenham áreas separadas específicas para cada etapa (Figura 1). Segue os mesmos princípios a sala com a função de recepção, lavagem, higienização e esterilização de mamadeiras (Quadro 1) (BRASIL, 2002).

A localização ideal do lactário dentro do hospital/maternidade é em região próxima ao berçário, em área própria, sem contato com a cozinha do hospital, distante da ala da infectologia e também de áreas com grande circulação de pessoas, assegurando assim risco mínimo de contaminação no preparo e distribuição dos alimentos (MEZOMO, 2015).

Figura 1 – Lactário: Sala de preparo, estocagem e distribuição de fórmulas lácteas infantis.



Fonte: Arquivo pessoal.

Quadro 1- Ambientes e áreas mínimas para Estabelecimentos Assistenciais de Saúde com mais de 15 leitos.

Ambiente	Área
Sala 1- Recepção e descontaminação de mamadeiras e utensílios	8m ²
Sala 1- Área para esterilização de mamadeiras	4m ²
Sala 2- Área para preparo e envase de fórmulas	7m ²
Sala 2- Área para estocagem e distribuição de formulas	5m ²

Fonte: BRASIL, 2002.

Fórmulas lácteas infantis são definidas como os produtos prescritos para lactentes e fabricados para satisfazer as necessidades nutricionais desse grupo etário. São geralmente compostas por leite de origem bovina, podendo-se utilizar leite de outros mamíferos, bem como componentes de origem vegetal. A escolha do tipo de fórmula láctea varia em função das particularidades do lactente, e a composição destas fórmulas pode sofrer alterações visando o atendimento às necessidades distintas (WHO/FAO, 2007; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b; BRASIL, 2011c).

Segundo recomendação do Ministério da Saúde e da Organização Mundial da Saúde (OMS), o aleitamento materno deve ser exclusivo até o sexto mês e complementado até os dois anos de idade ou mais (BRASIL, 2009). No entanto, é recomendado o aleitamento artificial como substituto, em situações em que o aleitamento materno é inviável. Neonatos prematuros de baixo peso, mães em uso de medicação que impeçam a amamentação, mães que não produzem quantidade suficiente de leite ou recém-nascidos de mães portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) recebem aleitamento artificial em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) de hospitais ou maternidades (WHO/FAO, 2007).

O processo atual de produção das fórmulas infantis não garante a esterilidade do produto destinado aos bebês, pois a pasteurização a que são submetidas não é capaz de eliminar em sua totalidade os microrganismos intrínsecos ao alimento (DRUDY et al., 2006; BARASH, HSIA & ARNON, 2010; CDC, 2011). Além da contaminação intrínseca, há também a extrínseca que pode ocorrer a partir de utensílios contaminados (colheres dosadoras, liquidificadores, mamadeiras e bicos) utilizados na reconstituição destas fórmulas; a partir do ambiente de preparação, ou ainda a partir da manipulação inadequada (WHO/FAO, 2007).

Nesse contexto, as fórmulas lácteas infantis apresentam risco significativo, pois podem funcionar como veículos de microrganismos potencialmente patogênicos (DRUDY et al., 2006; CDC, 2011). Assim, a reconstituição das fórmulas nos lactários pode representar uma porta de entrada para microrganismos patogênicos, sendo, portanto, reconhecido como um ponto crítico que deve ser controlado (WHO/FAO, 2007).

Para a garantia da segurança dos alimentos preparados nos lactários, o controle higiênico-sanitário deve ser rigoroso, de modo a minimizar os riscos de contaminação. As principais causas de contaminação nestes ambientes incluem a manipulação inadequada, higiene pessoal deficiente, práticas inadequadas na higienização de equipamentos e utensílios, e contaminação cruzada (WHO/FAO, 2007).

2) ENTEROBACTÉRIAS EM FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS

As enterobactérias são caracterizadas como bacilos Gram negativos, oxidase negativos, catalase positivos, móveis ou não, aeróbios ou anaeróbios facultativos. O termo “enterobactérias” é utilizado para se referir aos microrganismos da família Enterobacteriaceae. São encontrados largamente na água, plantas, solo e uma diversidade de alimentos, mas apesar do caráter onipresente, a maioria das enterobactérias habitam o trato intestinal dos animais, incluindo o homem. Algumas espécies desta família fazem parte da microbiota autóctone do trato gastrointestinal humano e de outros animais, outras, no entanto, quando presentes são agentes de doenças, como observado em algumas infecções. Os principais gêneros de enterobactérias isoladas a partir de alimentos são: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella* e *Shigella* (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Os microrganismos denominados Coliformes Totais compreendem um grupo de enterobactérias, cuja principal característica é a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37°C por até 48h. A presença de coliformes totais em um alimento não remete sempre à contaminação fecal, uma vez que apesar de albergar a espécie *Escherichia coli*, cujo habitat primário é o trato intestinal do homem e animais de sangue quente, outras bactérias pertencentes ao grupo, a exemplo das espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, que são encontradas no solo, água e em vegetação (FRANCO & LANDGRAF, 2003; JAY, 2005).

No grupo dos coliformes totais se encontram os coliformes termotolerantes que possuem a propriedade de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados na temperatura de 44-45°C, ou seja, a um intervalo de temperatura onde nem todas as espécies presentes no grupo coliformes totais resistem (JAY, 2005). A presença de espécies desse grupo é indicativa principalmente de contaminação de origem fecal e, conseqüentemente, da possibilidade de haver microrganismos patogênicos (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Vários estudos têm demonstrado a presença de enterobactérias em fórmulas lácteas infantis no Brasil e, sobretudo, em outros países do mundo. Oonaka et al. (2010) analisaram 149 amostras de fórmulas lácteas infantis, distribuídas em 61 amostras provindas do Japão e 88 de diversos países estrangeiros (incluindo quatro amostras do

Brasil), e observaram que 24,6% das amostras estavam contaminadas por diversas espécies de enterobactérias. Dentre as espécies isoladas, os autores detectaram a presença de *C. sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *E. coli*, *Escherichia vulneris*, dentre outras. Apenas uma (25%) amostra proveniente do Brasil estava contaminada. Shaker et al. (2007) também isolaram as espécies *C. sakazakii*, *E. cloacae* e *Pantoea agglomerans* a partir de amostras de fórmula láctea infantil e leite em pó. Wang et al. (2009) detectaram em fórmulas infantis em pó além de *C. sakazakii*, diversas outras enterobactérias como *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, e *Escherichia coli* O157. Ainda, Zhou et al. (2011) identificaram as espécies *C. sakazakii* e *K. pneumoniae* em 26,7% das amostras de fórmulas para lactentes analisadas na China.

3) *Cronobacter* spp.

3.1) TAXONOMIA

Anteriormente conhecido como *Enterobacter cloacae*, produtor de pigmento amarelo, *C. sakazakii* teve sua classificação alterada, e em 1980, Farmer et al. (1980) definiram uma nova espécie que recebeu o nome de *Enterobacter sakazakii*. Essa modificação na classificação se baseou nas diferenças existentes entre *E. cloacae* e *E. sakazakii*, observadas sobretudo, em pesquisas sobre a genética destes patógenos. Essencialmente, os pesquisadores notaram que as diferenças na hibridação de DNA, determinavam uma distância genética entre as duas espécies. Além disso, *E. sakazakii* também apresentava reações bioquímicas, produção de pigmentos e susceptibilidade aos antimicrobianos diferentes da outra espécie (FARMER et al., 1980).

Os mesmos pesquisadores mencionados anteriormente verificaram a existência de 15 biogrupos e concluíram que a espécie *E. sakazakii* poderia apresentar linhagens filogeneticamente diferentes. Essa teoria foi comprovada em 2004, quando Lehner et al. analisaram as sequências completas de 16S rRNA de 13 estirpes de *E. sakazakii* obtidas

a partir de várias fontes, relatando a existência de duas linhagens filogeneticamente distintas dentro da espécie (LEHNER et al., 2004).

Em consoância, novas pesquisas elucidaram outras características diferenciais da espécie, até que em 2007, Iversen et al. realizaram um estudo utilizando 210 cepas de *E. sakazakii* de diferentes origens. Nesse trabalho, os pesquisadores amplificaram fragmentos polimórficos fluorescentes de DNA (f-AFLP), ribotipos e analisaram as seqüências gênicas completas de 16S rRNA de todas as estirpes. Assim, relacionando as características genotípicas e os perfis fenotípicos determinados, os autores propuseram uma reclassificação do microrganismo como um novo gênero. A partir da publicação do trabalho, a nova nomenclatura foi validada e o gênero *Cronobacter* foi incorporado à família Enterobacteriaceae (IVERSEN et al., 2008).

Atualmente o gênero é composto por seis espécies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter genomospecies* I, e três subespécies: *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis*, *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* e *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* (IVERSEN et al., 2008).

3.2) CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO E RESERVATÓRIOS

As bactérias pertencentes ao gênero *Cronobacter* são bastonetes Gram negativos, oxidase-negativas, catalase-positivas, não formadoras de esporo, geralmente móveis, com flagelos peritríquios, anaeróbios facultativas e produtoras de pigmento amarelo (IVERSEN et al., 2008).

Estudos demonstram que na família Enterobacteriaceae os microrganismos do gênero *Cronobacter* são os mais resistentes à dessecação e ao estresse osmótico, características que garantem a sobrevivência em condições muito secas, a exemplo dos alimentos desidratados (BREEUWER et al. 2003; CAUBILLA-BARRON et al., 2007).

Iversen et al. (2004) observaram características de termotolerância em cepas de *Cronobacter* spp. e verificaram que a temperatura ótima para crescimento compreendeu o intervalo entre 37-43°C, concluindo que a resistência térmica desses microrganismos é similar à de outras enterobactérias. Todas estas características favorecem a

sobrevivência dos microrganismos em situações adversas, como por exemplo, no ambiente de processamento de alimentos em pó (indústrias), lactários e creches.

Diversos estudos foram realizados com o intuito de obter maiores informações a respeito do reservatório primário do *Cronobacter* spp., no entanto, essa questão ainda não foi completamente elucidada. Sabe-se, entretanto, que microrganismos deste gênero possuem caráter ubíquo, tendo sido isolado a partir de uma vasta gama de alimentos, ingredientes alimentares, amostras ambientais e também de amostras clínicas (IVERSEN & FORSYTHE, 2004; SHAKER et al. 2007; FRIEDMANN, 2007; CHAP et al., 2009; ARSALAN et al., 2013).

Iversen e Forsythe (2004) sugerem que as espécies de *Cronobacter* não fazem parte da microbiota autóctone dos humanos ou animais. Entretanto, Hamilton et al. (2003), a partir de estudos com larvas da mosca de estábulos (*Stomoxys calcitrans*), verificaram que há uma grande probabilidade de que os insetos representem reservatórios de enterobactérias, dentre as quais, *Cronobacter* spp. Nesse trabalho, os pesquisadores identificaram *C. sakazakii*, *Providencia stuartii*, *Carotovora Erwinia*, *Micrococcus luteus* e *Serratia marcescens*, o que demonstra que a contaminação por insetos é uma importante fonte de disseminação de patógenos. Apesar dessa possibilidade, estudos apontam como principais fontes ambientais o solo, a água e, sobretudo, os vegetais e cereais, incluindo produtos originados a partir deles (IVERSEN & FORSYTHE, 2004; FRIEDMANN, 2007; LOU et al., 2014; VOJKOVSKA et al., 2016).

O amplo espectro de alimentos contaminados por *Cronobacter* spp. abrange tanto os alimentos crus como os processados de origem vegetal ou animal, ou seja, os estudos demonstram isolamentos a partir de cereais, frutas e legumes, ervas e especiarias, ovo, leite, água, carne e peixe, e produtos feitos a partir desses alimentos (FRIEDMANN, 2007; XU et al., 2015; MOHAMMED et al., 2015; VOJKOVSKA et al., 2016).

Lou et al. (2014) em pesquisa com o objetivo de identificar os possíveis reservatórios e rotas de veiculação das espécies de *Cronobacter*, analisaram 141 amostras de diversos alimentos, dentre eles, fórmulas infantis em pó, leite e bebidas lácteas relacionados, produtos a base de cereais, chocolates, doces, farinha de trigo, grãos de trigo, macarrão desidratado e bolinho congelado. Os resultados demonstraram

que 12% de todas as amostras de alimentos apresentaram positividade para *Cronobacter* spp., sendo que os produtos a base de cereais foram o grupo de alimentos com o maior percentual de contaminação (69,3%).

A partir desse mesmo estudo, Lou et al. (2014) verificaram que a maioria dos produtos a base de cereais que apresentaram contaminação por microrganismos do gênero tinham em sua composição o trigo e, ao analisarem a farinha de trigo e amostras de grãos de trigo, detectaram a espécie em 100% e em 62,5% das amostras, respectivamente. Ainda, outro estudo conduzido por Li et al. (2014) demonstrou também que as amostras de trigo representavam o maior percentual de detecção, concluindo que o trigo é um reservatório importante na veiculação de *Cronobacter* spp.

Em se tratando de estudo com amostras ambientais, Kandhai et al. (2004), analisaram 147 amostras ambientais de indústrias alimentícias e de domicílios. Os autores verificaram a presença dos patógenos em oito das nove fábricas de alimentos e em cinco dos 16 domicílios, sendo que no geral, 35 (24%) amostras foram positivas. Os pesquisadores concluíram que os microrganismos desse gênero estão amplamente distribuídos nos ambientes estudados, sobretudo no ambiente das indústrias alimentícias. De modo similar, Mullane et al. (2008) observaram a presença de patógenos do gênero em um estudo numa indústria produtora de caseína em pó, a partir de amostras ambientais, amostras de equipamentos (filtros de ar) e também, no produto acabado.

Reforçando o caráter ubíquo destas bactérias, pesquisadores relatam a presença das mesmas em diversas amostras clínicas, tais como sangue, escarro, cavidade oral, cavidade nasal, intestino, pele, ferimentos, olhos e orelhas. Os autores verificaram ainda a presença do microrganismo no ar, água, solo e ralos de unidades de assistência à saúde (ARSALAN et al., 2013).

4) *Cronobacter sakazakii*

4.1) CARACTERÍSTICAS E RESISTÊNCIA

O *Cronobacter sakazakii* é um importante patógeno oportunista de origem alimentar, classificado como emergente e que pode causar infecções sistêmicas graves, como a meningite, septicemia e enterocolite relacionadas ao consumo de fórmulas lácteas infantis (LAI, 2001; VAN ACKER, et al., 2001; FAKRUDDIN et al., 2013; HUERTAS et al., 2015).

Em meios normalmente usados para cultivo, o microrganismo cresce formando colônias com produção de pigmento amarelo, entretanto, essa característica isolada não é suficiente para a identificação da espécie, visto que outras bactérias da família Enterobacteriaceae exibem essa mesma peculiaridade. Como exemplo de outras enterobactérias produtoras de pigmento amarelo pode-se citar: *Pantoea agglomerans*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermannii*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella planticola*, dentre outras (FARMER et al. 1980; RICHARD, 1984; NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997).

Os métodos de caracterização fenotípica baseados na produção de pigmento amarelo são questionados por estudiosos, uma vez que há variação da expressão dessa característica dentro do próprio gênero. Além disso, foram considerados métodos de baixa sensibilidade, especificidade e acurácia. Assim, a produção de pigmento amarelo pode ser utilizada como teste de triagem, sendo necessárias provas adicionais para a correta identificação da espécie (IVERSEN & FORSYTHE, 2007; CAWTHORN et al. 2008).

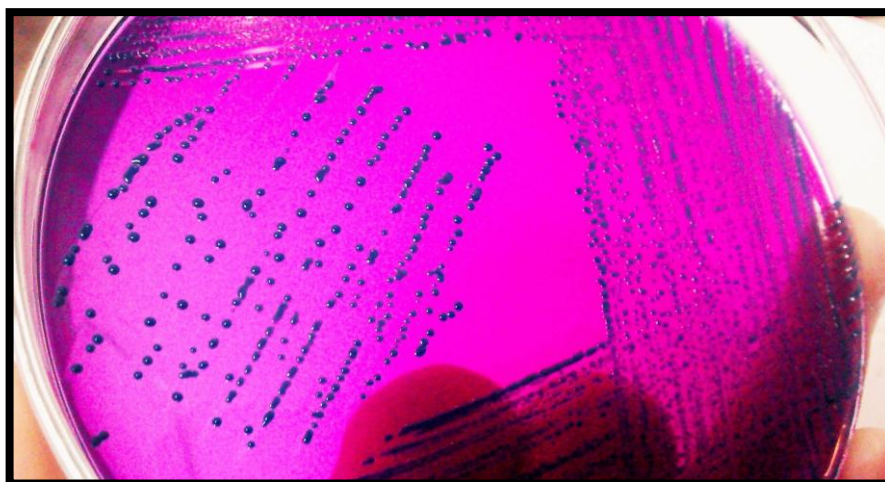
A espécie apresenta outras características que a diferenciam dentre as demais, inclusive a nível bioquímico, como por exemplo, a capacidade de produzir a enzima α -glucosidase, na sua aptidão para produzir uma desoxirribonuclease extracelular e incapacidade de fermentar o D-sorbitol (FARMER et al. 1980; NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997).

Quanto ao perfil bioquímico, algumas características são comuns a todas as espécies do gênero, como por exemplo, reação negativa aos testes vermelho de metila

(VM) e produção de H₂S e reação positiva aos testes Voges Proskauer (VP) e citrato de Simmons. Por outro lado, *C. sakazakii* apresenta reação negativa aos testes da lisina descarboxilase, formação de indol e produção de urease; e reação positiva para os testes de α -glucosidase, arginina, ornitina, dentre outros (RICHARD, 1984).

A particularidade de produzir a enzima α -glucosidase propiciou o desenvolvimento de meios cromogênicos para o isolamento seletivo do patógeno. Estes meios se baseiam na degradação enzimática do cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α , d-glucopiranosídeo (X α Glc) presente nos meios, com produção de colônias de pigmento azul (Figura 2) ou verde (variando a depender do meio) que são características para *Cronobacter* spp.

Figura 2- Colônias características de *Cronobacter sakazakii* em ágar Hicrome Cronobacter.



Fonte: Arquivo pessoal.

As cepas de *C. sakazakii* apresentam como temperatura ótima para crescimento o intervalo entre 37 e 43°C, entretanto algumas cepas se desenvolvem entre 25 a 45°C, e outras ainda na faixa de 6 a 47°C. Não foi relatado crescimento de células do patógeno em questão, em temperaturas maiores que 50°C (FARMER et al., 1980; BREEUWER et al. 2003; IVERSEN et al., 2004).

A termotolerância observada nesta espécie é semelhante àquela exibida por outras enterobactérias (IVERSEN et al., 2004), entretanto, Breeuwer et al. (2003) verificaram que *C. sakazakii* é capaz de se multiplicar no intervalo de temperatura de 45 a 47°C, o que significa, que as bactérias pertencentes ao gênero suportam uma

temperatura superior à tolerada pela maioria das enterobactérias (HUERTAS et al., 2015). Ainda em relação as características de crescimento em diferentes temperaturas, estudos revelam que *Cronobacter* spp. apresenta taxa de sobrevivência maior na temperatura de 4°C do que 30°C (BEUCHAT et al. 2009). Essa capacidade foi relatada também por Iversen et al. (2004) que observaram que as espécies deste gênero são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração em fórmulas lácteas infantis durante a estocagem, bem como em equipamentos e utensílios utilizados no preparo do alimento infantil.

A capacidade de *C. sakazakii* de formar cápsulas de polissacarídeo, uma goma viscosa, espessa e aderente, está relacionada com a formação de biofilmes. A habilidade de formar biofilme é reconhecida como importante para o mecanismo de adesão do microrganismo em superfícies abióticas ou para a colonização de organismos vivos (FARMER et al., 1980; BEUCHAT et al. 2009).

Iversen et al. (2004) ao investigarem a formação de biofilmes de duas linhagens de *C. sakazakii*, uma encapsulada e a outra não, observaram que a estirpe encapsulada produziu biofilmes mais densos do que a outra linhagem. Além disso, os pesquisadores verificaram que a aderência foi mais acentuada nas superfícies de látex, silicone e policarbonato, do que na superfície de aço inoxidável.

Ye et al. (2015) estudaram a habilidade de 23 isolados de *C. sakazakii* produzirem biofilmes sob diferentes valores de pH, temperatura e tempo, em culturas em laboratório. Os autores observaram que o pH foi determinante para a formação de biofilmes e que quantidade mais expressiva de biofilme foi encontrada quando o cultivo do microrganismo foi realizado em pH 5,0 (9 cepas, 39,1%), temperatura de 28°C (23 cepas, 100%) e 48 h (14 cepas, 60,9%).

A adesão bacteriana e a formação de biofilmes possibilitam que as superfícies possam albergar e disseminar microrganismos, constituindo uma fonte de contaminação (IVERSEN et al., 2004). Essa característica também contribui para a resistência das células microbianas frente a condições adversas, tais como: exposição a antimicrobianos, saneantes, às variações de pH, ao aquecimento e à dessecação (BEUCHAT et al. 2009; HEALY et al., 2010).

Algumas cepas de *C. sakazakii* já demonstraram capacidade de sobreviver e se multiplicar em ambientes ácidos. Quando submetida ao estresse ácido, a bactéria

desenvolve um estado vegetativo (fase estacionária) que permite a manutenção da integridade do envelope celular e conseqüentemente a sua sobrevivência. Esse fator, aliado à capacidade de formar biofilmes, possibilita que o patógeno supere a primeira barreira de defesa do organismo – o baixo pH estomacal - podendo causar infecção no indivíduo (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2014).

De acordo com Breeuwer et al. (2003), *C. sakazakii* apresenta alta resistência à dessecação e ao estresse osmótico e, segundo os mesmos, essa resistência está relacionada à acumulação de trealose nas células microbianas, o que estabiliza as membranas fosfolipídicas e protéicas, impedindo a ruptura e conseqüentemente, protegendo as células durante a dessecação. Essa alta tolerância à dessecação proporciona uma vantagem competitiva para o microrganismo em alimentos e ambientes secos, como por exemplo, em fábricas de leite em pó, podendo sobreviver no produto acabado por longos períodos (HUERTAS et al., 2015).

4.2) MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

C. sakazakii raramente causa doença em indivíduos hígidos e, embora tenha sido considerado agente causal de infecções em todas as faixas etárias, o principal grupo de risco são os neonatos e crianças de até 1 ano de vida (WHO/FAO, 2007; CDC, 2011). Dentro desse grupo, destacam-se os bebês de até 28 dias de idade e/ou nascidos prematuramente, sobretudo os de baixo peso (< 2,5 Kg) e, ainda, os que apresentam algum grau de imunocomprometimento (LAI, 2001; WHO/FAO, 2007), ou seja, pacientes que geralmente demandam cuidados especiais, permanecendo internados após o parto, na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal (WHO/FAO, 2007). Entretanto, infecções em idosos e pacientes adultos com e sem deficiência imunológica também foram relatadas (LAI, 2001; GOSNEY et al., 2006; SEE, THAN & TANG, 2007).

Os quadros clínicos associados à infecção por *C. Sakazakii* são graves e apresentam taxa de mortalidade que varia entre 20 e 80% (LEHNER & STEPHAN, 2004; EMAMI et al., 2001), ou 50-80% (HEALY et al., 2010).

Em neonatos, crianças lactentes, adultos e idosos, as infecções podem apresentar uma diversidade de sintomatologias. Nos lactentes, de uma forma geral, o quadro infeccioso reflete acometimento do sistema nervoso central, sendo a meningite, a apresentação clínica mais frequente (MUYTJENS et al., 1983; LAI, 2001; HIMELRIGHT et al., 2002; BARREIRA et al., 2003; CAUBILLA-BARRON et al., 2007; TOWNSEND et al., 2008; BAUMBACH et al., 2009; SIMÓN, et al., 2010).

Segundo LAI (2001) a predileção de *C. Sakazakii* pelo sistema nervoso central em neonatos e lactentes, ainda não foi elucidada. Os autores afirmam que o quadro de meningite nestes pacientes resultam em infartos e hemorragias cerebrais, ventriculite, formação de cistos e abscessos cerebrais. Os pacientes que sobrevivem à meningite causada por *Cronobacter* spp. desenvolvem sequelas neurológicas irreversíveis tais como hidrocefalia, tetraplegia e retardamento do desenvolvimento neurológico (LAI, 2001; BARREIRA et al., 2003; TOWNSEND et al., 2008; EMAMI et al., 2011).

Simón et al. (2010) descreveram um caso de infecção neonatal por *C. sakazakii* na Espanha, em que o paciente desenvolveu meningite, hidrocefalia e abscessos cerebrais, adquirindo retardo neurológico irreversível.

No Brasil, Barreira et al. (2003) relataram o caso de um neonato do sexo feminino com 14 dias de vida que deu entrada no hospital com emêse, hipoatividade e recusa alimentar. A cultura de líquor confirmou o quadro de meningite bacteriana por *C. sakazakii*, a paciente apresentou hemorragia extensa da meninge, hemorragia do parênquima, edema cerebral e o quadro ocasionou a morte da criança após 15 dias de internamento. Os autores do relato não mencionaram a provável fonte de contaminação, uma vez que a paciente foi exclusivamente alimentada por leite materno, não tendo, portanto, contato com fórmulas lácteas infantis.

Além do quadro neurológico, outras manifestações clínicas foram descritas, dentre as quais os quadros de bacteremia, disenteria, enterocolite necrosante e septicemia. Essas sintomatologias embora de menor gravidade, podem evoluir para o quadro de meningite (MUYTJENS et al., 1983; LAI, 2001; VAN ACKER, et al., 2001; AGUIRRE CONDE et al., 2007; TOWNSEND et al., 2008; SIMÓN, et al., 2010; EMAMI et al., 2011, FLORES et al., 2011). A enterocolite necrosante dos neonatos é o estado patológico caracterizado por isquemia, necrose e pneumatose intestinal, podendo evoluir para peritonite e choque (LEHNER & STEPHAN, 2004).

As manifestações clínicas associadas a infecção por *C. sakazakii* nos adultos e idosos, incluem bacteremia, formação de abscessos, pneumonia e septicemia (LAI, 2001; SEE, THAN & TANG, 2007). De acordo com LAI (2001) a maior parte dos casos de infecção pelo patógeno envolvendo adultos é acompanhada por doenças subjacentes graves. Entretanto, See, Than & Tang (2007) relataram o primeiro caso de infecção em paciente adulto sem imunocomprometimento.

4.3) SURTOS ENVOLVENDO O MICRORGANISMO

No período de 1958 a julho de 2008 foram notificados 120 casos de infecção associados ao *Cronobacter* spp. no mundo, incluindo dois casos no Brasil. Esses dados foram compilados baseados nas descrições documentadas, mas não necessariamente publicados em revistas científicas. O relatório publicado em 2008 pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) em parceria com a Organização Mundial da Saúde (WHO), reuniu informações sobre local, manifestações clínicas, idade, número de casos, número de óbitos, número de pacientes que sobreviveram com ou sem seqüelas, bem como a descrição dos comprometimentos neurológicos, dentre outras informações relevantes (WHO/FAO, 2008).

A maioria dos surtos e casos descritos no relatório envolveu o quadro de meningite (32%) ou meningite associada a alguma outra sintomatologia, como bacteremia, septicemia, abscessos cerebrais ou enterocolite necrosante. Dos 54 pacientes que desenvolveram meningite, 39% foram a óbito e 22% adquiriram seqüelas irreversíveis. A segunda maior manifestação clínica observada foi a bacteremia com 12% de acometimentos, seguida das enterocolites necrosantes (11%) e das septicemias (2,3%) (WHO/FAO, 2008). O mesmo relatório incluiu ainda, 87 casos comunicados pela vigilância laboratorial do Reino Unido e das Filipinas. Entretanto, como ainda não foram descritos, os dados reportados pelos laboratórios destes dois países não apresentam informação quanto à manifestação clínica dos pacientes, fontes envolvidas ou número de óbitos (WHO/FAO, 2008).

A primeira ocasião em que o *C. sakazakii* foi associado a meningite neonatal foi em 1958, quando um surto na Inglaterra culminou na morte de dois recém-nascidos. Os

autores relataram que os óbitos ocorreram por infecção generalizada, incluindo meningite, e na época, identificaram o agente etiológico como sendo o *Enterobacter cloacae* produtor de pigmento amarelo. A fonte de contaminação não ficou esclarecida, entretanto os pesquisadores sugeriram que a incubadora estivesse contaminada, já que os dois pacientes utilizaram a mesma incubadora e desenvolveram a doença (URMENYI & WHITE-FRANKLIN, 1961). Desde então, uma diversidade de surtos e casos de infecção neonatal por *Cronobacter* spp. tem sido descritos em todo o mundo (VAN ACKER et al. 2001; GURTLER et al., 2005; DRUDY et al., 2006; CAUBILLA-BARRON et al., 2007; FLORES et al., 2011; BRANDÃO et al., 2015).

Van Acker et al. (2001) relataram um surto de enterocolite necrosante (NEC), que ocorreu em um hospital na Bélgica, onde 12 recém-nascidos desenvolveram NEC e dois foram a óbito. Neste episódio, conhecido como “Surto da Bélgica”, o patógeno foi isolado a partir de amostras clínicas de seis dos 12 neonatos acometidos. Posteriormente, Caubilla-Barron et al. (2007), descreveram um surto na França em que 18 neonatos foram infectados por *C. Sakazakii*, onde 94% dos pacientes eram prematuros e com baixo peso. Do total de casos, sete pacientes desenvolveram NEC, um meningite, um bacteremia, e dois problemas digestivos. Embora alguns dos acometidos não tenham apresentado qualquer sintomatologia, quatro pacientes (dois que desenvolveram NEC, e os que apresentaram meningite e bacteremia) não resistiram e faleceram no hospital.

Baumbach et al. (2009) descreveram um surto no México envolvendo dois neonatos; um desenvolveu lesão cerebral grave e hidrocefalia e o outro não resistiu à infecção. Simón et al. (2010) relataram um caso de infecção neonatal por *C. sakazakii* na Espanha, em que o paciente desenvolveu meningite, hidrocefalia e abscessos cerebrais, adquirindo problemas neurológicos irreversíveis.

Ainda em 2010, dois bebês apresentaram quadro de gastroenterite severa em um hospital no México e *C. sakazakii* foi reportado como agente causal do surto (FLORES et al., 2011). Posteriormente, em 2013, Brog e Lee relataram um caso de infecção por *C. sakazakii* em uma lactente com 33 dias de vida internada em uma maternidade do estado da Flórida, nos Estados Unidos da América (EUA). A paciente desenvolveu quadro de bacteremia e após nove dias de internamento, recebeu alta, sem apresentar quaisquer seqüelas.

No Brasil, os relatos de casos e surtos causados por *Cronobacter* spp. ainda são poucos. A última descrição no país foi realizada por Brandão et al. (2015) em Teresina, Piauí. Os autores relataram que o surto envolveu três recém-nascidos do sexo feminino que apresentaram um quadro de bacteremia no período em que estiveram internados na maternidade. A fonte da contaminação não foi identificada, porém os pesquisadores identificaram o agente causal do surto como sendo o *C. malonaticus* nos três casos.

Observa-se que os números de casos e surtos documentados no mundo, inclusive no Brasil, são subnotificados, não refletindo a realidade. Isso ocorre na maioria das vezes devido ao fato da notificação de infecções por estes microrganismos não ser obrigatória; a pesquisa do patógeno não fazer parte da rotina laboratorial e ainda devido a muitos países não possuírem um sistema oficial para divulgação das informações (WHO/FAO, 2008).

É importante mencionar que a maior parte dos casos e surtos relacionados ao gênero *Cronobacter* spp. são oriundos de ambiente hospitalar, afetando sobretudo neonatos, especialmente os prematuros, e associados à ingestão de fórmulas infantis em pó (PIF) (WHO/FAO, 2007; WHO/FAO, 2008, CDC, 2011).

5) FÓRMULAS INFANTIS E *Cronobacter sakazakii*

A Organização Mundial da Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de vida da criança, no entanto, em algumas ocasiões é necessária a suplementação ou substituição do leite humano. Nos casos em que as mães não podem amamentar, os bebês são alimentados nos hospitais/maternidades com fórmulas infantis em pó (FIP) elaboradas geralmente com leite bovino, em substituição ao leite materno. Essas fórmulas são balanceadas de forma a suprir as necessidades nutricionais dos neonatos (WHO/FAO, 2007).

As FIP destinadas a bebês não são estéreis e apresentam risco de contaminação por *Cronobacter* spp. e outros patógenos. Além disso, a alta disponibilidade de nutrientes faz do leite em pó formulado para lactentes um excelente meio para o crescimento bacteriano (ICMSF, 2002; DRUDY et al., 2006; WHO/FAO, 2007; CDC, 2011). Dentre os microrganismos patogênicos que podem estar presentes nas fórmulas

em pó, temos: *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Cronobacter sakazakii* (ICMSF, 2002). Particularmente, a contaminação das fórmulas infantis em pó por *Cronobacter* spp. está relacionada à etapa de processamento na indústria onde as condições higiênicas sanitárias são insatisfatórias, à adição de ingredientes contaminados e/ou contaminação durante reconstituição do alimento nos lactários (KANDHAI et al., 2004; WHO/FAO, 2007).

Estudos realizados em todo o mundo resultaram no isolamento de *C. sakazakii* a partir de uma ampla variedade de alimentos, principalmente a partir de produtos de origem vegetal (LOU et al., 2014; LI et al., 2014; VOJKOVSKA et al., 2016). Entretanto, somente as fórmulas lácteas infantis em pó estiveram relacionadas aos casos de surtos infecciosos em lactentes (FRIEDEMANN, 2009).

O primeiro estudo associando a presença de *C. sakazakii* em FIP foi relatado por Biering et al. (1989). Os autores descreveram três casos de infecção neonatal causada por *C. sakazakii* num hospital universitário da Islândia, entre 1986 e 1987, onde dois pacientes sobreviveram ao quadro infeccioso, porém desenvolveram sequelas neurológicas severas e, o terceiro paciente morreu. Os autores obtiveram isolados de *C. sakazakii* a partir de vários lotes de FIP utilizados no lactário do hospital, inclusive de latas fechadas, e verificaram que os isolados a partir das amostras clínicas dos pacientes possuíam o biótipo, perfil de DNA plasmidial e perfil de resistência a antimicrobianos idênticos aos isolados das FIP.

Van Acker et al. (2001) descreveram um surto de infecção por *C. sakazakii* em um hospital na Bélgica, onde 12 crianças recém-nascidas desenvolveram NEC e duas foram a óbito após receberem a mesma fórmula como aleitamento artificial. *C. sakazakii* foi isolado de FIP em uso e de latas ainda fechadas de um mesmo lote e apresentava semelhança com os isolados dos pacientes. Após a publicação desse estudo, várias outras pesquisas mencionaram a relação entre o patógeno e as fórmulas industriais destinadas à alimentação de neonatos (HIMELRIGHT et al., 2002; LEHNER & STEPHAN, 2004; CAUBILLA-BARRON et al., 2007; SIMÓN, et al., 2010; FLORES et al., 2011; BROGE & LEE, 2013; LOU et al., 2014).

6) SUSCEPTIBILIDADE de *C. Sakazakii* A ANTIMICROBIANOS

Pesquisas vêm sendo conduzidas visando o desenvolvimento de métodos alternativos para inativação do *C. sakazakii* em alimentos, além das tecnologias já conhecidas. Uma nova vertente para o controle da contaminação em fórmulas lácteas infantis aposta na utilização de agentes antimicrobianos naturais.

Amalaradjou et al. (2009) comprovaram o efeito bactericida do trans-cinamaldeído - um composto do extrato de casca de canela - sobre células de *C. sakazakii* em fórmulas infantis reconstituídas. Os ensaios que continham trans-cinamaldeído obtiveram redução significativa da população de *C. sakazakii*, em comparação com os ensaios controles. Os autores demonstraram que uma exposição pelo período de quatro horas foi suficiente para a redução do patógeno em níveis não detectáveis. Nessa mesma linha de pesquisa, Joshi et al. (2014) avaliaram as propriedades antimicrobiana do *blueberry* (Proantocianidinas) e observaram que ambas as cepas de *C. sakazakii* testadas foram reduzidas para níveis não detectáveis após uma hora de exposição ao fruto.

Estudo conduzido por Shi et al. (2016) demonstrou que o ácido lipóico afeta a integridade da membrana de *C. sakazakii*, como evidenciado pela diminuição da concentração do ATP intracelular. Além disso, os autores detectaram redução do pH e despolarização da membrana da célula do microrganismo, após exposição ao ácido lipóico, demonstrando um efeito antimicrobiano moderado. Consideram ainda, que as propriedades antimicrobianas observadas juntamente com as funções nutricionais já bem conhecidas, o ácido lipóico apresenta potencial para adição como suplemento em fórmulas infantis ou outros alimentos.

Essas pesquisas são promissoras no sentido de que podem reduzir e/ou eliminar nas FIP a contaminação por agente patogênicos, a exemplo do *C. sakazakii*, entretanto, uma vez que ocorra infecção, o paciente necessita de terapia medicamentosa, com intervenção rápida e eficiente, uma vez que os quadros clínicos são graves em neonatos. Nesse sentido, é necessário se conhecer o perfil de sensibilidade do microrganismo aos antimicrobianos usados na terapia humana para aumentar a probabilidade de sucesso do tratamento e, por isso as pesquisas para definição do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos são importantes (LAI, 2001).

O documento publicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014) que traz os padrões para a avaliação da susceptibilidade antimicrobiana não fazem referência direta a *Cronobacter* spp., mas recomenda que sejam testadas drogas de rotina para as enterobactérias, a exemplo dos seguintes antibióticos: ampicilina, cefuroxime, ceftazidime, cefepime, cefoxitina, cefotaxime, ceftriaxone, cefazolin, gentamicina, imipenem, trimethoprim-sulfametoxazol, aztreonam, cloranfenicol, tetraciclina e outros.

De acordo com Stock e Wiedermann (2002), as espécies do gênero são susceptíveis a uma ampla gama de antibióticos. Os autores relatam que todas as espécies são naturalmente sensíveis às tetraciclinas, aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina), numerosos β -lactâmicos (ampicilina, cefalosporinas), quinolonas, cloranfenicol e nitrofurantoína, e afirmam que as espécies de *Cronobacter* são as mais sensíveis aos antimicrobianos quando comparadas às outras espécies de enterobactérias.

Estudos recentes continuam demonstrando a sensibilidade das cepas de *C. sakazakii* frente a gentamicina (OONAKA et al. 2010; ZHOU et al., 2011; KILONZONTHENG et al. 2012; LI et al., 2014; XU et al., 2015; VOJKOVSKA et al., 2016), cloranfenicol (OONAKA et al. 2010; LI et al., 2014; XU et al., 2015; VOJKOVSKA et al., 2016), amicacina (ZHOU et al., 2011; LI et al., 2014), ciprofloxacina (OONAKA et al. 2010; ZHOU et al., 2011; LI et al., 2014), cefalotina, cefotaxima, cefoperazone, ceftazidima e cefpirome (OONAKA et al. 2010; LI et al., 2014).

Entretanto, a exposição indiscriminada a antimicrobianos na medicina humana, medicina veterinária e o uso de drogas na agricultura, vem contribuindo para o desenvolvimento de resistência bacteriana. Mecanismos de seleção como a produção β -lactamases e a aquisição de elementos de transposição tem contribuído para o surgimento de cepas com resistência (LEHNER & STEPHAN, 2004). Assim, a resistência a ampicilina (AGUIRRE CONDE et al., 2007; CAUBILLA-BARRON et al., 2007; OONAKA et al. 2010; ZHOU et al., 2011), cefalosporinas (SEE, THAN & TANG, 2007; ZHOU et al., 2011; XU et al., 2015) e sulfonamidas (VOJKOVSKA et al., 2016) são relatadas na literatura.

Existem ainda muitas discussões a respeito do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais. Enquanto alguns querem banir o seu uso, outros

o defendem, justificando que se utilizados corretamente o seu nível de contaminação seria desprezível (HAESE & SILVA, 2004).

Essa resistência observada justifica a necessidade de introdução de novos esquemas terapêuticos para o tratamento de infecções causadas por *C. sakazakii*. Dessa forma, o uso de cefalosporinas em substituição à ampicilina, como recomendado recentemente, necessita de cautela, considerando a resistência emergente demonstrada pelo microrganismo (SEE, THAN, & TANG, 2007; ZHOU et al., 2011).

7) ASPECTOS REGULATÓRIOS

A *International Commission for Microbiological Specification for Foods* (ICMSF) classificou o *C. sakazakii* no grupo de risco que inclui as doenças “de severo perigo para as populações restritas, representando risco de morte ou seqüelas crônicas ou de longa duração” (ICMSF, 2002). Também existe um documento elaborado pelo *Codex Alimentarius* que contém todas as recomendações e instruções para a manipulação e preparo das fórmulas infantis, o “*Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Children*” (CAC/RCP 66) (CODEX ALIMENTARIUS, 2008). O CAC/RCP 66 é um documento de boas práticas de higiene para elaboração das fórmulas infantis e estabelece as diretrizes para o preparo, acondicionamento e distribuição do alimento. Recomenda ainda o uso de água a 70°C para reconstituição das PIF (o que reduz o risco de infecção por *C. sakazakii*) e define padrões microbiológicos para este tipo de alimento. Assim, o CAC/RCP 66, preconiza a ausência do patógeno em 10 g do alimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

A legislação brasileira que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001) não contempla os padrões microbiológicos para a presença do gênero *Cronobacter* em alimentos.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE CONDE, A., PÉREZ LEGORBURU, A., ECHÁNIZ URCELAY, I., HERNANDO ZÁRATE, Z., & ARRATE ZUGAZABEITIA, J.K. Sepsis neonatal por *Enterobacter sakazakii*. **Anal. Pediat.** (Barcelona), v.66, p. 196–197, 2007.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; CUMMINS, C.; DEASY, T.; BEGLEY, MÁIRE, T. C.; HILL, C. Acid stress management by *Cronobacter sakazakii*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.178, p. 21–28, 2014.
- AMALARADJOU, M. A.; HOAGLAND, T.A.; VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde. **Int. J. Food Microbiol.** v. 129, p. 146-149, 2009.
- ARSALAN, A.; ANWAR, Z.; AHMAD, I.; SHAD, Z.; AHMED, S. *Cronobacter sakazakii*: an emerging contaminant in Pediatric infant milk formula. **Int. Res. J. Pharmacy**, v.4, p. 17-22, 2013.
- BARREIRA, E. R., SOUZA, D. C., GÓIS, P. F., & FERNANDES, J. C. *Enterobacter sakazakii* meningitis in a newborn infant: case report. **Pediatrics** (São Paulo), v. 25, p. 65-70, 2003.
- BARASH, J. R., HSIA, J.K., ARNON, S. S. Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas. **J. Pediatrics**, v. 156, p. 402-408, 2010.
- BAUMBACH, MD, K ROONEY, MPH, C SMELSER, MD, P TORRES. *Cronobacter* Species Isolation in Two Infants -New Mexico, **MMWR**, v.58, p. 1179-1183, 2009.
- BEUCHAT, L. R., KIM, H., GURTLER, J.B., LIN, L-C., RYU, J-H., & RICHARDS, G. M. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. **Int. J. Food Microbiol.**, v.136, p. 204–213, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico: Planejamento, Programação, avaliação e aprovação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde**. Resolução da Diretoria Colegiada nº 50. (21 de fevereiro de 2002). Brasília: Ministério da saúde, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde da Criança: nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar**/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 43 de 19 de setembro de 2011. **Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes**. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 44 de 19 de setembro de 2011. **Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância.** Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 45 de 19 de setembro de 2011. **Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas.** Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2011c.

BRANDÃO, M. L.L.; UMEDA, N. S.; CARVALHO, K.R.; FILIPPIS, I. Investigação de um surto causado por *Cronobacter malonaticus* em um hospital maternidade em Teresina, Piauí: caracterização e tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado. **Vig. Sanit. Debate**, v. 3, p. 91-96, 2015.

BREEUWER, P.; LARDEAU, A.; PETERZ, M. AND JOOSTEN, H.M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, 967–973, 2003.

BIERING, G.; KARLSSON, S.; CLARK, N. C.; JÓNSDÓTTIR, K. E.; LÚDVÍGSSON, P., STEINGRÍMSSON, O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. **J. Clin. Microbiol.**, v.9, p. 2054- 2056, 1989.

BROGE, T.; LEE, A. A Case of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) Bacteremia in a Breastfed Infant. **J. Pediatric Infect. Dis.**, p. 1-2, 2013.

CAUBILLA-BARRON, J., HURRELL, E., TOWNSEND, S., CHEETHAM, P., LOC-CARRILLO, C., FAYET, O., PRERE, M.F., & FORSYTHE, S. J. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3979–3985, 2007.

CAWTHORN, D-M.; BOTHA, S.; WITTHUHN, R.C. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. **Int. J. Food Microbiol.**, v.127, p. 129–138, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC sites. **Investigation of *Cronobacter* bacteria illness in infants**, 2011. Disponível em: http://www.cdc.gov/media/releases/2011/s1230_Cronobacter.htmL. Acesso: 18 de Abril de 2014.

CHAP, J., JACKSON, P., SIQUEIRA, R., GASPAR, N., QUINTAS, C., PARK, J. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 136, p.185-188, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. **CLSI document M100-S24**, 2014.

CODEX ALIMENTARIUS: code of hygienic practice for foods for infants and children. **CAC/RCP 66**, 2008. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11026/CXP_066e.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2014.

DRUDY, D., MULLANE, N. R., QUINN, T., WALL, P. G., & FANNING, S. *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula. **Clin. Infect. Dis.**, v.42, p. 996-1002, 2006.

EMAMI, C. N., MITTAL, R., WANG, L., FORD, H. R., & PRASADARAO, N. V. Recruitment of dendritic cells is responsible for intestinal epithelial damage in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*. **J. Immunology**, v. 186, p. 7067-7079, 2011.

FARMER, J.J III, ASBURY, M.A.; HICKMAN, F.W.; BRENNER, D.J. *Enterobacter sakazakii*: A new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.30, p.569-584. 1980.

FAKRUDDIN, MD.; RAHAMAN, MD. M.; AHMED, M. M.; HOQUE, MD. M. *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*): An Emerging Foodborne Pathogen. **International J. Biomed. Adv. Res.**, v. 4, p. 349-359, 2013.

FLORES, J. PARRA; MEDRANO, S. ARVIZU; SÁNCHEZ, J. SILVA; FERNÁNDEZ-ESCARTÍN, E. Two Cases of Hemorrhagic Diarrhea Caused by *Cronobacter sakazakii* in Hospitalized Nursing Infants Associated with the Consumption of Powdered Infant Formula. **J. Food Prot.**, v. 12, p.2000-2228, 2011.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo. Editora Atheneu, 182 p., 2003.

FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). **Int. J. Food Microbiol.**, v. 116, p. 1–10, 2007.

FRIEDEMANN, M. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. **Europ. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.**, 28, p.1297–1304, 2009.

GOSNEY M. A., MARTIN, M. V., WRIGHT, A. E., & GALLAGHER, M. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. **Europ. J. Internal Med.**, v. 17, p.185–188, 2006.

HAESE, D. & SILVA, B. A. N. S. Antibióticos como promotores de crescimento em monogástricos. **Rev. Eletr. Nutrit.**, v.1, n.1, p.07-19, 2004.

HAMILTON, J. V.; LEHANE, M. J.; BRAIG, H. R. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Midgut of *Stomoxys calcitrans*. **Emerg. Infect. Diseases**, v.9, p.1355- 1356, 2003.

HIMELRIGHT, E. H.; LORCH, V.; ANDERSON, M.; JONES, T.; CRAIG, A.; KUEHNERT, M.; FORSTER, T.; ARDUINO, M.; JENSEN, B.; JERNIGAN, D. *Enterobacter sakazakii* Infections Associated with the Use of Powdered Infant Formula - Tennessee, 2001. **MMWR**, v.51, p.298-300, 2002.

HEALY, B., COONEY, S., O'BRIEN, S., IVERSEN, C., WHYTE, P., NALLY, J., CALLANAN, J.J., & FANNING, S. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: An opportunistic foodborne pathogen. **Foodb. Pathog. Dis.**, v. 4, p.339-350, 2010.

HUERTAS, J. P. A.; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. B.; MORRISSEY, R. C. D.; CHUMILLAS, R. M.; ESTEBAN, M. D. A.; MATÉ, J. A.; PALOP, A. A.; HILL, C. Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula. **Food Res. Internat.**, v.69, p. 401–409. 2015.

INTERNATIONAL COMMISSION FOR MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in Foods 7**: microbiological Testing in food safety management. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

ISO/TS 22964. **Milk and milk products – detection of *Enterobacter sakazakii***, 2006.

IVERSEN, C.; MULLANE, N.; MCCARDELL, B.; TALL, B.D.; LEHNER, A.; FANNING, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii* and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.**, v.58, p.1442-1447, 2008.

IVERSEN, C. & FORSYTHE, S. J. Comparison of Media for the Isolation of *Enterobacter sakazakii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p. 48–52, 2007.

IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.38, 378–382, 2004.

IVERSEN, C. & FORSYTHE, S. J. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. **Food Microbiol.**, v.21, p. 771-777, 2004.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JOSHI, S. S., HOWELL, A.B. & D'SOUZA, D. H. *Cronobacter sakazakii* reduction by blueberry proanthocyanidins. **Food Microbiol.**, v. 39, p.127–131, 2014.

KANDHAI, M. C., REIJ, M.W. , GORRIS, L. G. M. , GUILLAUME-GENTIL, O., & VAN SCHOTHORST, M. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. **Food Product. Environm.**, v.363, p.39–40, 2004.

KILONZO-NTHENGE, A.; ROTICH, E.; GODWIN, S.; NAHASHON, S.; CHEN, F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in middle Tennessee, United States. **J. Food Prot.**, v.8, p. 1366-1541, 2012.

LAI, K.K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. **Medicine**, v. 80, p.113–122, 2001.

LEHNER, A.; STEPHAN, R. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. **J. Food Prot.**, v.67, p.2850-2857, 2004.

LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPHAN, R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. **BMC Microbiol.**, v.4, p. 1-7, 2004.

LI, Y., CHEN, Q., ZHAO, J., JIANG, H., LU, F., BIE, X., & LU, Z. Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. **Food Control**, v. 37, p.109-114, 2014.

LOU, X., SI, G., YU, H., QI, J., LIU, T., & FANG, Z. Possible reservoir and routes of transmission of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) via wheat flour. **Food Control**, v. 43, p.258-262, 2014.

MEZOMO, I. B. **Os serviços de Alimentação- Planejamento e Administração**. 6º ed. São Paulo: Manole, 368 p., 2015.

MOHAMMED, M.A.; SALLAM, K.I.; TAMURA, T. Prevalence, identification and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* isolated from retail meat products, **Food Control**, v.53, p. 206–211, 2015.

MULLANE, N., HEALY, B., MEADE, J., WHYTE, P., WALL, P., & FANNING, S. Dissemination of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.74, p.5913–5917, 2008.

MUYTJENS, H.L., ZANEN, H.C., SONDERKAMP, H.J., KOLEE, L.A., WACHSMUTH, I.K., & FARMER, J. J. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 115– 120, 1983.

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J. M. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **J. Food Prot.**, v.60, p.226-230, 1997.

OONAKA, K., FURURATA, K., HARA, M., & FUKUYAMA, M. Powder infant formula milk contaminated with *Enterobacter sakazakii*. **Japanese J. Infect. Dis.**, v.63, p. 103–107. 2010.

PALCICH, G.; GILLIO, C.M.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; PAGOTTO, F.J.; FARBER, J.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. *Enterobacter sakazakii* in Dried Infant Formulas and Milk Kitchens of Maternity Wards in São Paulo, Brazil. **J. Food Prot.**, v. 72, p. 37–42, 2009.

RICHARD, C. Genus VI *Enterobacter*. In GARRITY, G. M., BOONE, D. R., CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. p. 465-469, 1984.

SEE, K.C.; THAN, H.A. & TANG, T. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. **Age and Ageing**, v.36, 595–596, 2007.

SHI, C.; SUN, Y.; XIAORONG, Z.; ZHENG, Z.; YANG, M. et al. Antimicrobial effect of lipoic acid against *Cronobacter sakazakii*. **Food Control**, v. 59, p. 352-358, 2016.

SIMÓN, M., SABATE, S., OSANZ, A. C., BARTOLOME, R., & FERRER, M. D. Investigación de um caso de infección neonatal por *Enterobacter sakazakii* asociada a um preparado em polvo para lactantes. **Enferm. Infect. Microbiol. Clín.**, v. 28, 713–715, 2010.

SHAKER, R., OSAILI, T., AL-OMARY, W., JARADAT, Z., & AL-ZUBY, M. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. **Food Control**, v. 18, 1241-1245, 2007.

STOCK, I., & WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 8, p.564–578, 2002.

TOWNSEND, S., HURRELL, E. & FORSYTHE, S. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. **BMC Microbiology**, v.8, p. 1-9, 2008.

VAN ACKER, J., DE SMET, F., MUYLDERMANS, G., BOUGATEF, A., NAESSENS, A., & LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p. 293–297, 2001.

VOJKOVSKA, H.; KARPISKOVA, R.; ORIESKOVA, M.; DRAHOVSKA, H. Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 217, p. 130–136, 2016.

URMENYI, A.M.C.; WHITE-FRANKLIN, A. Neonatal death from pigmented coliform infection. **The Lancet**, v.1, p.313-315, 1961.

WANG, M., CAO, B., GAO, Q., SUN, Y., LIU, P., FENG, L., & WANG, L. Detection of *Enterobacter sakazakii* and other pathogens associated with infant formula powder by use of a DNA microarray. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, 3178–3184, 2009.

WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agricultural Organization ***Enterobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formulae**. Meeting Report. Geneva, 90 p. Microbiological Risk Assessment Series, v.15, 2008. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_followup.pdf Acessado 21.04.14.

WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agricultural Organization. **Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula Guidelines**, 2007. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf. Acessado 21.04.14.

XU, X.; LI, C.; WU, Q.; ZHANG, J.; HUANG, J.; YANG, G. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of Cronobacter spp. in Chinese ready-to-eat foods. **Int. J. Food Microbiolog**, v. 204, p. 17–23, 2015.

YE, Y.; LING, N.; JIAO, R.; WU, Q.; HAN, Y.; GAO, J. Effects of culture conditions on the biofilm formation of Cronobacter sakazakii strains and distribution of genes involved in biofilm formation. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 62, p. 1-6, 2015.

ZHOU, X., GAO, J., HUANG, Y., FU, S., & CHEN, H. Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. **African J. Microbiol.**, v. 5, 3073–3077, 2011.

CAPITULO II

ARTIGO CIENTÍFICO

Enterobactérias em fórmulas lácteas infantis: ocorrência de *Cronobacter sakazakii* e perfil antimicrobiano dos isolados

***Enterobacter* spp. in infant formulas: occurrence of *Cronobacter sakazakii* and antimicrobial patterns of the isolates**

Adrielle Bahiense Trevisan^a, Lidiane Barbosa Santiago^b, Larissa Silva Martins^b,
Maurício Costa Alves da Silva^c, Rogeria Comastri de Castro Almeida^{b*}

^aPharmacy Faculty, Federal University of Bahia. Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, Cep: 40.170-290, Salvador, BA, Brazil. adrielle.mev@gmail.com

^bNutrition School, Federal University of Bahia. Av. Araújo Pinho, n° 32, Canela, Cep: 40.110-160, Salvador, BA, Brazil. lydysantago@hotmail.com; martin.larissa@outlook.com; rogeriac@ufba.br.

^cVeterinary Medicine School, Federal University of Bahia, Av. Adhemar de Barros, s/n, Ondina, Cep: 40.170-290 Salvador, Bahia, Brazil. mcasilva@ufba.br

*Author for correspondence: Rogeria C.C. Almeida (rogeriac@ufba.br).
Current address: Nutrition School, Federal University of Bahia, Salvador, BA - Brazil.
Phone/fax: +55 71-32837700.

RESUMO

O veículo mais importante das infecções ocasionadas por *Cronobacter sakazakii* são as fórmulas lácteas infantis utilizadas na preparação de mamadeiras. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência de *C. sakazakii* e outras enterobactérias em fórmulas lácteas infantis (0-6 meses) e em utensílios utilizados na preparação das mamadeiras em lactários de hospitais particulares no município de Salvador, BA, assim como avaliar a susceptibilidade das cepas isoladas de *C. sakazakii* frente a 11 antimicrobianos. No total, 225 amostras provenientes de três lactários foram investigadas, compreendendo 75 amostras de fórmulas lácteas infantis em pó (FIP), 75 de fórmulas lácteas infantis reconstituídas (FIR) e 75 de utensílios da preparação. *C. sakazakii* foi detectado em duas amostras (1,8%), uma em FIP do lactário B (2 isolados) e uma em FIR do lactário C (1 isolado). Outras espécies da família Enterobacteriaceae também foram detectadas nas amostras de fórmulas infantis e utensílios. O lactário A foi o que apresentou amostras com menor índice de contaminação por enterobactérias (13,3%). Em relação ao perfil antimicrobiano de *C. sakazakii*, os três isolados apresentaram sensibilidade a amicacina, gentamicina, cloranfenicol e imipenem, enquanto 66,6% deles foram resistentes a ampicilina, cefalotina, tetraciclina e sulfazotrim, evidenciando um caráter multirresistente de dois isolados. Embora a ocorrência de *C. sakazakii* nas fórmulas lácteas tenha sido baixa, o risco deve ser considerado uma vez que a falta de controle na produção deste alimento poderá resultar na proliferação da bactéria, podendo ocasionar doenças severas e sequelas irreversíveis

em neonatos. Ainda, a resistência dos três isolados à ampicilina, agente terapêutico comumente empregado no tratamento da infecção, é preocupante, indicando a necessidade do uso de drogas alternativas para o tratamento.

Palavras-chave: *Cronobacter* spp., lactário, neonatos, antimicrobianos.

ABSTRACT

The most important vehicle of infection caused by *Cronobacter sakazakii* are infant formulas used in the preparation of baby bottles. This study aimed to evaluate the occurrence of *C. sakazakii* and other Enterobacteriaceae in infant milk formulas (0-6 months) and utensils used in the preparation of baby bottles in milk kitchens of private hospitals in the city of Salvador, BA, as well as to evaluate the susceptibility of strains of *C. sakazakii* against 11 antimicrobials. In total, 225 samples from three lactaries were investigated, including 75 samples of power infant formulas (PIF), 75 of reconstituted infant formulas (RIF), and 75 of the preparation utensils. *C. sakazakii* was detected in two samples (1.8%), one PIF from lactaire B (2 isolates) and other one in RIF from lactarie C (1 isolate). Other Enterobacteriaceae species were also found in samples of infant formulas and utensils. The lactary A showed the samples with lower rate of contamination by enterobacteria (13.3%). Regarding to the antimicrobial profile of *C. sakazakii*, the three isolates showed sensitivity to amikacin, gentamicin, chloramphenicol and imipenem, while 66.6% were resistant to ampicillin, cephalothin, tetracycline and sulfazotrim, showing a multidrug-resistant character of two isolated. Although the occurrence of *C. sakazakii* in infant formula has been low, the risk should be considered as a lack of control in the production of food may result in the proliferation of the bacteria and can cause severe illness and irreversible consequences

in newborns. Also, the resistance of three strains to ampicillin, therapeutic agents commonly employed to treat infections, is disturbing, indicating the need for the use of alternative drugs for the treatment.

Keywords: *Cronobacter* spp., lactaries, newborns, antimicrobials.

1. Introdução

As fórmulas infantis em pó (FIP) são produzidas para atender as necessidades nutricionais de crianças prematuras, mais susceptíveis a infecções, crianças de mães portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e por crianças de mães impossibilitadas de amamentar, ou que simplesmente optam pela não amamentação (Freitas, Ristori, Jakabi, Paula, & Rowlands, 2011). As FIP não são produtos submetidos à esterilização, portanto, para reduzir o risco de infecção nos lactentes, o processo de reconstituição de leite em pó deve ser realizado de acordo com as diretrizes de segurança alimentar e seguindo normas de boas práticas de fabricação (Drudy, Mullane, Quinn, Wall, & Fanning, 2006).

Durante o primeiro ano de vida de uma criança, a alimentação é determinante para o adequado crescimento e desenvolvimento, e para diminuir a susceptibilidade a doenças de origem gastrointestinal, respiratória e alérgica, as quais, muito provavelmente, influenciarão no metabolismo e saúde na fase adulta. Diante disso, é indispensável a adequação dos alimentos infantis às necessidades nutricionais do estágio de vida do lactente, além de seguros microbiologicamente, uma vez que as infecções que ocorrem são as principais causas da elevação do índice de morbimortalidade entre crianças hospitalizadas (Rossi, Kabuki, & Kuaye, 2010; WHO/FAO, 2007).

C. sakazakii é considerado um patógeno oportunista emergente de alto risco. Os quadros clínicos associados à infecção por *C. sakazakii* são graves e apresentam taxa de mortalidade entre 20 e 80% (Emami, Mittal, Wang, Ford, & Prasadarao, 2011; Healy et al., 2010; Kandhai, Reij, Gorris, Guillaume-Gentil, & Van Schothorst, 2004).

O principal grupo de risco envolvido em casos de surtos de infecções pelo patógeno são os recém-nascidos, neonatos de baixo peso, imunocomprometidos e particularmente os prematuros internados em UTI neonatal (Joshi, Howell, & D'Souza, 2014; WHO/FAO, 2008), que desenvolvem bacteremia, disenteria, enterocolite necrosante, septicemia e meningite neonatal (Conde, Legorburu, Urcelay, Zárata, & Zugazabeitia, 2007; Barreira, Souza, Góis, & Fernandes, 2003; Caubilla-Barron et al., 2007; Emami et al., 2011; Lai, 2001; Muytjens, Zanen, Sonderkamp, Kolee, Wachsmuth, & Farmer, 1983; Simón, Sabate, Osanz, Bartolome, & Ferrer, 2010; Van Acker, Smet, Muyldermans, Bougatef, Naessens, & Lauwers, 2001). Entretanto, infecções em indivíduos adultos e idosos com ou sem deficiência imunológica também são relatadas (Gosney, Martin, Wright, & Gallagher, 2006; See, Than, & Tang, 2007).

De caráter ubíquo, a bactéria já foi isolada a partir de uma vasta gama de alimentos de origem animal e vegetal (Li et al., 2014; Lou, Si, Yu, Qi, Liu, & Fang, 2014; Mohammed, Sallam, & Tamura, 2015; Shaker, Osaili, Al-Omary, Jaradat & Al-Zuby, 2007; Vojkovska, Karpiskova, Orieskova & Drahovska, 2016; Xu, Li, Wu, Zhang, Huang & Yang, 2015), amostras ambientais (Kandhai et al., 2004; Vojkovska et al., 2016) e clínicas (Muytjens et al., 1983). Entretanto, somente as fórmulas lácteas infantis em pó estiveram relacionadas aos casos de surtos infecciosos em lactentes (Friedemann, 2009).

Além de *C. sakazakii*, pesquisas em todo o mundo, demonstram que a contaminação das fórmulas lácteas infantis por outras espécies de enterobactérias é frequente. Dentre as espécies de enterobactérias mais recuperadas a partir destas fórmulas, destacam-se: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *E. coli*, *Salmonella enterica* e outras (Shaker et al., 2007; Wang et al., 2009; Oonaka, Fururata, Hara & Fukuyama, 2010; Zhou, Gao, Huang, Fu & Chen, 2011).

O primeiro estudo associando a presença de *C. sakazakii* a fórmulas infantis em pó foi relatado por Van Acker et al. (2001). Os autores descreveram um surto de infecção por *C. sakazakii* em um hospital na Bélgica, onde 12 crianças recém-nascidas desenvolveram enterocolite necrosante e duas delas foram a óbito, após receberem a mesma fórmula como aleitamento artificial. Este caso ficou conhecido como “Surto da Bélgica”. Após a publicação desse estudo, outras pesquisas demonstraram a relação entre o patógeno e as fórmulas industriais destinadas à alimentação de neonatos (Caubilla-Barron et al., 2007; Simón, et al., 2010). E desde então, alguns estudos vêm sendo realizados no mundo com o objetivo de aumentar a compreensão sobre a epidemiologia, fatores de virulência, resistência a antimicrobianos, ecologia e características bioquímicas da espécie (Joshi, [Howell](#), & D'Souza, 2014; Yan, Condell, Power, Butler, Tall, & Fanning, 2012). Entretanto, no Brasil, há poucos dados na literatura científica a cerca do *Cronobacter* spp. Esta situação torna-se um estorvo para o monitoramento dos surtos de origem alimentar, bem como para a realização de estudos de avaliação de risco.

Cronobacter sakazakii é naturalmente resistente a todos os macrolídeos, lincomicina, clindamicina, streptogramins, rifampicina, ácido fusídico e fosfomicinas, e

susceptível a alguns antibióticos, como tetraciclina, aminoglicosídeos, numerosos β -lactâmicos, cloranfenicol, antifolatos e quinolonas (Drudy et al., 2006; Stock & Wiedemann, 2002). As infecções pelo microrganismo têm sido tradicionalmente tratadas com ampicilina-gentamicina ou ampicilina-cloranfenicol (Drudy et al., 2006; Lai, 2001). Entretanto, a resistência a ampicilina tem emergido devido à aquisição de elementos de transposição e à produção de β -lactamases, o que tem implicado no uso de cefalosporinas de terceira e quarta gerações como alternativa terapêutica (Lehner & Stephan, 2004).

Pioneiro na região Norte-Nordeste do Brasil, o presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de *C. sakazakii* e outras enterobactérias em fórmulas lácteas infantis e utensílios usados no preparo de mamadeiras em lactários de hospitais, a fim de determinar possíveis rotas de veiculação dos patógenos e auxiliar na adoção de medidas corretivas. Em adição, foi investigado o perfil antimicrobiano dos isolados de *C. sakazakii* como contribuição na escolha dos antibióticos a serem utilizados na terapia humana para o controle da infecção em neonatos.

2. Material e Métodos

2.1. Amostras e amostragem

Um total de 225 amostras foram adquiridas em três lactários (A, B e C) de hospitais particulares de Salvador, BA, no período de abril a outubro de 2015. Em cada lactário foram realizadas cinco visitas distintas, e em cada uma dessas visitas foram adquiridas cinco amostras de fórmulas lácteas infantis em pó industriais para crianças de

0-6 meses; cinco amostras da fórmula láctea reconstituída imediatamente antes da distribuição e cinco amostras de utensílios envolvidos no preparo das mamadeiras. Dessa forma, a cada visita 15 amostras eram adquiridas, totalizando 75 amostras por hospital, sendo distribuídas em 150 amostras de alimentos e 75 amostras de utensílios da preparação. As amostras de utensílios compreenderam as mamadeiras, jarras de preparo, colheres dosadoras, peneiras e bicos de mamadeiras.

Após a coleta, todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e imediatamente transportadas ao Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Carne e Derivados (LABCARNE), da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, para realização das análises num prazo máximo de 2 horas.

2.2. Isolamento e identificação de Cronobacter sakazakii

A detecção de *Cronobacter sakazakii* nos alimentos e utensílios foi realizada conforme a metodologia proposta pela *International Organization for Standardization - ISO/TS 22964* (ISO, 2006), modificada. Este método se baseia na capacidade das bactérias do gênero *Cronobacter* produzirem α -glucosidase, característica que as distingue de outras enterobactérias. Essa enzima degrada o cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D glicopiranosídeo (X α Glc) presente nos meios cromogênicos, produzindo colônias de pigmento azul que são características para *Cronobacter* spp.

Para a etapa de isolamento, 100 g das amostras das fórmulas lácteas infantis em pó (FIP) e 100 mL da fórmula láctea infantil reconstituída (FIR) foram homogeneizadas

em 900 mL de água peptonada tamponada (APT, Himedia, São Paulo, SP, Brasil) a 1% e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18+2h para o pré-enriquecimento. As amostras de utensílios foram coletadas com auxílio de suabes, homogeneizadas em 10 mL da mesma solução, e incubadas sob as mesmas condições que as amostras de alimentos. Após esse período, alíquotas de 1 ml foram transferidas para tubos contendo 10 ml de caldo lauril sulfato triptose modificado e adicionado de vancomicina (MLSTv, Fluka, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Os tubos com o caldo de enriquecimento seletivo foram incubados à $44^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h em banho maria. A partir do crescimento seletivo em cada tubo, foram realizadas sementeiras na superfície do Ágar “HiCrome™ *Cronobacter* spp. (Fluka), seguida de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24+2h. Para confirmação da bactéria, colônias típicas de cada placa foram inoculadas em Ágar Tripticase de Soja (TSA, Himedia) seguido de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}/44-48\text{h}$, para verificação da produção de pigmento amarelo. Paralelamente, colônias não típicas também foram selecionadas no Ágar “HiCrome™ *Cronobacter* spp., com o objetivo de identificar outros possíveis patógenos. A confirmação bioquímica foi realizada através do kit miniaturizado galeria Bactray® (I) (Laborclin, São Paulo, SP, Brasil), adicionado de outras sete provas convencionais, fermentação dos carboidratos glicose, sacarose, lactose, manitol e D-sorbitol, redução do vermelho de metila e motilidade

Cronobacter sakazakii ATCC 13048 foi utilizada como cepa de referência e controle positivo em todas as etapas do presente estudo.

2.3. Resistência dos isolados de Cronobacter sakazakii aos antimicrobianos

O perfil de resistência/sensibilidade dos isolados de *C. sakazakii* das fórmulas infantis foi avaliado pelo método de difusão em disco estabelecido pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Foram testados 11 antimicrobianos: ampicilina (AMP), amicacina (AMI), aztreonam (ATM), cefalotina (CFL), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CFT), cloranfenicol (CLO), gentamicina (GEN), imipenem (IPM), sulfazotrim (SZT) e tetraciclina (TET).

Os isolados de *C. sakazakii* foram estocados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia) com 10% de glicerol estéril a -80°C. No momento do uso, foram recuperados em placas contendo Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Himedia) e incubadas a 37°C por 24h. Com o auxílio de uma alça de inoculação descartável, colônias foram colhidas das placas de BHI e suspensas em 5 ml de solução salina estéril (NaCl 0,85%) até o alcance do padrão de turbidimetria de 0,5 pela escala de McFarland (c.a. 10⁸ UFC/ml). Em seguida, um suabe estéril foi embebido na suspensão, retirado o excesso, e semeado de forma suave em todas as direções da placa contendo ágar Mueller Hinton (MH, Himedia) de forma a abranger toda a superfície. Após a secagem do inóculo nas placas, os discos dos 11 antimicrobianos foram adicionados e as placas foram incubadas a 35 ± 2°C por 24h. Posteriormente, foi realizada a leitura do tamanho do diâmetro dos halos formados ao redor de cada disco para detectar a susceptibilidade a determinado antibiótico. *Cronobacter sakazakii* ATCC 13048 foi utilizada como cepa controle.

3. Resultados e Discussão

3.1. Detecção de *Cronobacter sakazakii* e outras enterobactérias

Devido ao fato de existirem ainda poucos estudos sobre *C. sakazakii*, depara-se com pouca informação epidemiológica e poucos dados sobre o habitat, ecologia, taxonomia e virulência dessa bactéria na literatura (Yan et al., 2012). No Brasil também são escassos os relatos, sendo este, o primeiro estudo da região Norte-Nordeste visando a detecção do patógeno e a obtenção de informações sobre o nicho ecológico de *Cronobacter* spp..

Nesse estudo investigou-se amostras de fórmulas lácteas infantis e utensílios da preparação de mamadeiras em três lactários de hospitais particulares de Salvador, BA, Brasil (taxa de adesão de 50%). De forma geral, os resultados indicaram que 112 (49,7%) amostras apresentaram algum tipo de contaminação microbiana, sendo 102 (45,3%) por microrganismos da família Enterobacteriaceae. Este resultado representa um risco à saúde dos neonatos que se alimentam a partir das fórmulas infantis reconstituídas nos lactários investigados, uma vez que a presença de enterobactérias em alimentos pode indicar a presença de espécies patogênicas e oportunistas.

Além de *C. sakazakii*, foram isolados das amostras contaminadas os seguintes microrganismos: *Klebsiella pneumoniae* (36,6%), *Enterobacter cancerogenus* (33,9%), *Pseudomonas* spp. (14,2%), *Enterobacter amnigenus* (10,7%), *Hafnia alvei* (9,8%), *Enterobacter cloacae* (8,0%), *Serratia rubidea* (7,1%), *Enterobacter gergoviae* (5,3%), *Cedecea davisae* (4,4%), *Serratia fonticola* e *Acinetobacter baumannii* (2,6%). Foram ainda identificadas as espécies *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae* e

Serratia odorifera biogrupo 2 (1,8%) e *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Salmonella spp.*, *Cedecea neteri*, *Cedecea lapagei*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella planticola* (0,9%).

De uma maneira geral, observou-se que o índice de detecção de enterobactérias nas amostras de utensílios e nas fórmulas lácteas infantis foi similar entre os lactários B (60,0%) e C (62,6%), enquanto que no lactário A esse índice foi bem inferior, apenas 13,3%. Analisando sob o prisma de contaminação apenas dos utensílios, verificou-se que 84,0% e 80,0% dos utensílios dos lactários B e C, respectivamente, estavam contaminados por enterobactérias, enquanto que no lactário A esse índice foi de 16,0%. Situação semelhante foi verificada na análise das fórmulas lácteas infantis, ou seja, em se tratando de fórmulas lácteas em pó, os resultados demonstraram índices de contaminação de 16,0%, 40,0% e 52,0% para os lactários A, B e C, respectivamente, e no caso das fórmulas lácteas reconstituídas, encontrou-se índices de detecção de 8,0%, 56,0% e 56,0% na mesma ordem.

Importante mencionar que todas as amostras de bicos de mamadeiras e jarras de preparo do lactário C e todas as amostras das colheres dosadoras do lactário B estavam contaminadas por enterobactérias (Tabelas 1 e 2). Os resultados observados indicam a possibilidade dos utensílios utilizados durante a reconstituição e armazenamento das fórmulas lácteas, funcionarem como veículos de contaminação cruzada, carreando enterobactérias e outros contaminantes para os alimentos prontos para o consumo. Assim, estes resultados apontam a necessidade de realizar controle efetivo nas etapas do preparo das mamadeiras, com atendimento às boas práticas de fabricação e sanitização eficiente da área de produção.

Esses resultados podem ser decorrentes de métodos de higienização e sanitização dos utensílios distintos entre os lactários estudados, já que nos lactários B e

C os métodos consistiam da lavagem e sanitização com hipoclorito de sódio, enquanto no lactário A era realizada, em adição, a sanitização com peróxido de hidrogênio. O uso da etapa adicional no protocolo de higienização dos utensílios do lactário A, mostrou-se eficiente, uma vez que os níveis de contaminação das amostras de utensílios deste lactário foram cinco vezes menores, em comparação com os demais.

Tabela 1

Frequência de contaminação por enterobactérias em utensílios utilizados no preparo e distribuição de fórmulas lácteas infantis (0 a 6 meses), por lactário avaliado.

Lactário	Utensílios				
	Mamadeira	Jarra	Colher	Bicos de	Peneira
	n (%)	Preparo n (%)	dosadora n (%)	Mamadeira n (%)	n (%)
A	2 (40,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	ND	ND
B	4 (80,0)	4 (80,0)	5 (100,0)	4 (80,0)	4 (80,0)
C	4 (80,0)	5 (100,0)	4 (80,0)	5 (100,0)	2 (40,0)
Total	10 (66,6)	10 (66,6)	10 (66,6)	9 (60,0)	6 (40,0)

ND = Não Detectado

Escherichia coli foi isolada de uma amostra da jarra de preparo das fórmulas, e *Salmonella* spp. de uma amostra da FIP (Tabela 2). *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie mais recuperada a partir das amostras de utensílios, tendo sido isolada em 23 (30,6%) das mesmas, com os bicos das mamadeiras apresentando 46,6% das amostras contaminadas pela bactéria (Tabela 2). Este resultado aponta para a necessidade de substituir com maior frequência os bicos de mamadeira utilizados na alimentação dos neonatos ou adotar o descarte após o uso, já que 60% de todos os bicos de mamadeira analisados apresentaram contaminação por enterobactérias.

Tabela 2

Bactérias isoladas em utensílios usados no preparo das fórmulas lácteas infantis.

Espécies	Utensílios					Total
	Mamadeira	Jarra	Colher	Bicos	Peneira	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 (33,3)	3 (20,0)	5 (33,3)	7 (46,6)	3 (20,0)	23
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	3 (20,0)	4 (26,6)	3 (20,0)	2 (13,3)	2 (13,3)	14
<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	ND	2 (13,3)	3 (20,0)	1 (6,6)	2 (13,3)	8
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (6,6)	2 (13,3)	ND	1 (6,6)	1 (6,6)	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (6,6)	ND	ND	ND	ND	1
<i>Enterobacter gergoviae</i>	ND	ND	ND	ND	1 (6,6)	1
<i>Hafnia alvei</i>	ND	ND	5 (33,3)	1 (6,6)	ND	6
<i>Cedecea davisae</i>	ND	1 (6,6)	ND	3 (20,0)	ND	4
<i>Serratia rubidae</i>	2 (13,3)	1 (6,6)	1 (6,6)	ND	ND	4
<i>Serratia fonticola</i>	ND	ND	ND	2 (13,3)	ND	2
<i>Escherichia coli</i>	ND	1 (6,6)	ND	ND	ND	1

<i>Klebsiella planticola</i>	ND	ND	1 (6,6%)	ND	ND	1
<i>Pseudomonas</i> spp.	2 (13,3)	2 (13,3)	1 (6,6)	4 (26,6)	2 (13,3)	11

ND = Não Detectado

Do mesmo modo que os resultados obtidos no presente trabalho, a espécie *K. pneumoniae* tem sido uma das mais isoladas a partir de amostras de fórmulas lácteas infantis em estudos anteriores que investigaram a presença de *Cronobacter* spp. (Chap et al., 2009; Iversen & Forsythe, 2004; Oonaka et al. 2010; Wang et al., 2009; Zhou et al., 2011), de ambientes da produção de leite em pó, como também de equipamentos hospitalares (Hurrell et al., 2009; Mullane, Healy, Meade, Whyte, Wall & Fanning, 2008).

Quanto a *C. sakazakii*, a bactéria foi detectada em duas amostras (1,8%) das fórmulas lácteas infantis, sendo uma proveniente da Fórmula Infantil em Pó (FIP) do lactário C e outra da Fórmula Infantil Reconstituída (FIR) do lactário B (Tabela 3). A espécie não foi isolada a partir de amostras de utensílios dos três lactários e das fórmulas infantis do lactário A. Como já relatado em outros estudos (Chap et al., 2009; Iversen & Forsythe, 2004; Oonaka et al. 2010; Wang et al., 2009; Zhou et al., 2011), a presença da bactéria nas fórmulas lácteas infantis indica que as mesmas são fontes de contaminação e disseminação do patógeno no ambiente hospitalar, principalmente devido à alta resistência apresentada (Huertas et al., 2015).

Resultado também importante está relacionado à contaminação das FIP e FIR pelas espécies *Enterobacter cancerogenus* e *K. pneumoniae*, respectivamente (Tabela 3). Este resultado era esperado uma vez que estas duas espécies foram as mais isoladas a partir das amostras de utensílios, fato que reforça a possibilidade dos utensílios serem fontes de contaminação cruzada dentro dos lactários.

A espécie *E. cancerogenus* foi, também, isolada por Hurrell et al. (2009) em estudo para verificar a colonização por bactérias em tubos para alimentação enteral de neonatos em 41% das amostras. Nesta pesquisa os autores demonstram que além do caráter ubíquo, essa bactéria tem a capacidade de formar biofilmes, aderindo a equipamentos, tornando-os fontes potenciais de contaminação.

Tabela 3

Bactérias isoladas em fórmulas lácteas infantis em lactários de Salvador, BA.

Espécies	Fórmulas lácteas		Total N
	Desidratada n (%)	Reconstituída n (%)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 (13,3)	8 (10,6)	18
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	11 (14,6)	14 (18,6)	25
<i>Enterobacter asburiae</i>	ND	2 (2,6)	2
<i>Enterobacter amnigenus</i>	3 (4,0)	1 (1,3)	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ND	1 (1,3)	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (2,6)	2 (2,6)	4
<i>Enterobacter intermedium</i>	1 (1,3)	1 (1,3)	2
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1 (1,3)	3 (4,0)	4
<i>Hafnia alvei</i>	1 (1,3)	4 (5,3)	5
<i>Cedecea davisae</i>	ND	1 (1,3)	1
<i>Cedecea neteri</i>	ND	1 (1,3)	1
<i>Cedecea lapagei</i>	ND	1 (1,3)	1
<i>Serratia odorífera</i>	1 (1,3)	1 (1,3)	2
<i>Serratia fonticola</i>	ND	1 (1,3)	1
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1 (1,3)	ND	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (1,3)	ND	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (1,3)	1 (1,3)	2

<i>Salmonella</i> spp.	1 (1,3)	ND	1
<i>Pseudomonas</i> spp.	2 (2,6)	3 (4,0)	5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (1,3)	2 (2,6)	3
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1 (1,3)	1 (1,3)	2

ND = Não Detectado

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam o caráter nosocomial da *K. pneumoniae*, que é uma das mais prevalentes bactérias Gram negativas do ambiente hospitalar, responsável por severos quadros infecciosos em unidades de terapia intensiva, quadros causados sobretudo, por cepas carbapenem resistentes (Snitkin et al., 2012). Assim, é possível sugerir que a ocorrência da bactéria nas amostras de utensílios (Tabela 2) se deve a contaminação no ambiente hospitalar ou contaminação através da manipulação por funcionários do lactário.

É importante mencionar que nenhum dos lactários tinha a prática de controlar a temperatura da água de reconstituição das fórmulas lácteas, como recomendado (CAC/RCP 66) (CODEX ALIMENTARIUS, 2008), ou seja, uso de água a 70°C para reconstituição das FIP, o que poderia reduzir consideravelmente o nível da contaminação por enterobactérias e, conseqüentemente, o risco da presença de *C. sakazakii* e outros patógenos.

Corroborando com as práticas recomendadas no CAC/RCP 66, resultados apresentados por Huertas et al. (2015) demonstraram que embora o uso de água a temperaturas entre 50 e 65°C na reconstituição das FIP não proporcionaram inativação significativa das células de *C. sakazakii*, a utilização de água a 70°C levou a redução para níveis abaixo do limite de detecção.

Também não se observou a prática de controle da temperatura no armazenamento e distribuição das fórmulas lácteas nos lactários, o que segundo Huertas et al. (2015), contribui para a proliferação das células bacterianas que sobrevivem na etapa de reconstituição do alimento.

A falta de padronização e controle do binômio tempo-temperatura no aquecimento das FIR é relatado por Rossi et al. (2010) como responsável por reduzir a eficiência do processo. Os autores apontam para a necessidade de determinar um valor padrão de tempo e temperatura para que o tratamento térmico da FIR antes da distribuição seja eficiente na redução da carga microbiana a níveis seguros.

Quanto ao isolamento de enterobactérias nas fórmulas infantis, o trabalho de Oonaka et al. (2010) relata que 24,6% das amostras oriundas de vários países estavam contaminadas por diversas espécies de enterobactérias. Dentre as espécies isoladas, os autores detectaram a presença de *C. sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *E. coli*, *Escherichia vulneris*, dentre outras. Apenas uma amostra (25%) proveniente do Brasil estava contaminada. Shaker et al. (2007) também isolaram as espécies *C. sakazakii*, *E. cloacae* e *Pantoea agglomerans* a partir de amostras de fórmula láctea infantil e leite em pó. Wang et al. (2009) detectaram em fórmulas infantis em pó além de *C. sakazakii*, diversas outras enterobactérias como *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, e *Escherichia coli* O157. Ainda, Zhou et al. (2011) identificaram as espécies *C. sakazakii* e *K. pneumoniae* em 26,7% das amostras de fórmulas para lactentes analisadas na China.

Especificamente, quanto a *C. sakazakii*, Lou et al. (2014), Gičová, Orieskova, Oslanecova, Drahovska & Kaclicova (2014) e Hoque, Ahmed, Shahidullah, Hossain, Mannan & Noor (2010) relatam a presença da bactéria em 2,1%, 0,9% e 3,1% das

amostras de fórmulas lácteas infantis, respectivamente; índices esses semelhantes aos encontrados no presente estudo. Gičová et al. (2014) sugerem que o baixo índice de contaminação se deve ao processo de pasteurização a que são submetidas as fórmulas, reduzindo a possibilidade da presença do patógeno.

Outros estudos, entretanto, relatam índices mais elevados de detecção da bactéria em amostras de fórmulas infantis em pó para lactentes (Iversen & Forsythe 2004; Shaker et al. 2007), variando de 10,2% e 17,4%.

Observa-se que apesar das fórmulas lácteas serem submetidas a tratamento térmico durante o processamento industrial (pasteurização), ainda é possível isolar *C. sakazakii* a partir destes produtos (Huertas et al. 2015; Shaker et al. 2007), levando à necessidade de cuidados adicionais na preparação das mamadeiras para os lactentes.

3.2. Perfil antimicrobiano dos isolados de *Cronobacter sakazakii*

Os resultados referentes ao comportamento dos três isolados (dois a partir de FIP e um de FIR) de *C. sakazakii* perante aos 11 antimicrobianos testados estão demonstrados na Tabela 4.

Todos os isolados foram sensíveis a amicacina, cloranfenicol, gentamicina e imipenem, enquanto 66,6% apresentaram sensibilidade a aztreonam e 33,3% mostraram sensibilidade a sulfazotrim e ceftriaxona. O isolado proveniente da amostra de FIR apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Dessa forma, o uso de gentamicina, clorafenicol e amicacina representam uma alternativa viável e eficaz no tratamento de uma infecção causada pelos isolados avaliados.

Em consonância com os resultados encontrados nesse trabalho, estudos relatam que as cepas de *C. sakazakii* são sensíveis a gentamicina (Li et al., 2014; Kilonzo-

Ntheng, Rotich, Godwin, Nahashon & Chen, 2012; Oonaka et al. 2010; Vojkowska et al., 2016; Xu et al., 2015; Zhou et al., 2011) e sensíveis a amicacina (Li et al., 2014; Zhou et al., 2011).

Quanto ao perfil de resistência, dentre os isolados analisados, 66,6% apresentaram índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) igual a 54%, evidenciando um caráter multirresistente dos dois isolados oriundos da amostra de FIP (resistentes a 4 antimicrobianos concomitantemente). Os isolados apresentaram resistência a ampicilina, cefalotina, tetraciclina e sulfazotrim, além disso, observou-se ainda um valor intermediário de resistência a ceftriaxona (66,6%) e cefotaxima (33,3%).

Tabela 4- Perfil de resistência/susceptibilidade de *Cronobacter sakazakii* isolados.

Antimicrobianos	Tamanho do halo (mm)			Isolados de <i>Cronobacter sakazakii</i> (%)		
	Resistente	Intermediário	Susceptível	Resistente	Intermediário	Susceptível
Amicacina	≤ 14	15-16	≥ 17	0,0	0,0	100
Ampicilina	≤ 13	14-16	≥ 17	66,6	0,0	33,3
Aztreonam	≤ 17	18-20	≥ 21	33,3	0,0	66,6
Cefalotina	≤ 14	15-17	≥ 18	66,6	0,0	33,3
Cefotaxima	≤ 22	23-25	≥ 26	33,3	33,3	33,3
Ceftriaxona	≤ 19	20-22	≥ 23	0,0	66,6	33,3
Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18	0,0	0,0	100
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥15	0,0	0,0	100
Imipenem	≤ 19	20-22	≥23	0,0	0,0	100
Sulfazotrim	≤ 10	11-15	≥16	66,6	0,0	33,3
Tetraciclina	≤ 11	12-14	≥15	66,6	0,0	33,3

A presença de cepas multirresistentes da bactéria nesse e em outros estudos pode ser explicada pelo mecanismo da seleção, envolvendo fatores que remetem ao uso indiscriminado e inadequado de antibióticos na medicina humana, o uso de drogas para promoção do crescimento e tratamento de animais na medicina veterinária, e também uso de drogas no campo para eliminação de pragas na agricultura.

De modo similar, a resistência a ampicilina foi descrita também a partir de isolados clínicos de *C. sakazakii* durante a investigação de um surto com neonatos na França (Conde et al., 2007), em um caso de sepse neonatal na Espanha (Caubilla-Barron et al., 2007) e em isolados a partir de fórmulas lácteas infantis em pó no Japão (Oonaka et al. 2010). Entretanto, outros autores relatam sensibilidade de cepas de origem alimentar testadas frente a esse antibiótico (Li et al., 2014; Vojkowska et al., 2015).

Os quadros clínicos gerados pela infecção por *C. sakazakii* exigem tratamento rápido e eficaz, por essa razão conhecer o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pode significar o sucesso do tratamento. Nesse contexto, os resultados aqui apresentados demonstram que a utilização das cefalosporinas como alternativa terapêutica, em substituição à ampicilina, para os casos de infecção por *C. sakazakii* deve ser avaliada, visto que outras pesquisas vem demonstrando a mesma tendência de resistência do patógeno às cefalosporinas (See, Than, & Tang, 2007; Xu et al., 2015; Zhou et al., 2011).

4. Conclusão

Embora a ocorrência de *C. sakazakii* encontrada nesse estudo tenha sido baixa, não se pode minimizar os riscos, sobretudo em se tratando de um alimento destinado a recém-nascidos. Os resultados alcançados fornecem evidências de que os utensílios utilizados na reconstituição das fórmulas lácteas são veículos de transmissão de patógenos, uma vez que as FIP e as FIR apresentaram altos índices de contaminação por enterobactérias. A presença de cepas de *C. sakazakii* multirresistentes aos antibióticos testados indica a necessidade de sempre aliar à clínica a avaliação *in vitro* da susceptibilidade da cepa, na terapia dos casos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e à Dra. Marise Dutra Asensi do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ) pelo fornecimento da cepa de *Cronobacter sakazakii*.

Conflito de interesse

Todos os autores declaram que não existe conflito de interesse, incluindo suporte financeiro, ou outros relacionamentos com outras pessoas ou organizações, no período de três anos a partir do início dessa submissão, que possa influenciar inapropriadamente ou apresentar influência sobre esse trabalho.

Declaração de submissão e verificação

Declaramos que esse trabalho não foi publicado anteriormente (exceto na forma de abstract, ou como parte de uma palestra, ou como dissertação) e nem se encontra em consideração em outro local. Esse manuscrito foi aprovado por todos os autores, e, se aceito, não será publicado em nenhum outro local, em Inglês ou em qualquer outra língua, incluindo eletronicamente, sem o consentimento do editor de direitos autorais.

Referências

- Barreira, E. R., Souza, D. C., Góis, P. F., & Fernandes, J. C. (2003). *Enterobacter sakazakii meningitis in a newborn infant: case report. Peditria (São Paulo)*, 25, 65-70.
- Caubilla-Barron, J., Hurrell, E., Townsend, S., Cheetham, P., Loc-Carrillo, C., Fayet, O., Prere, M.F., & Forsythe, S. J. (2007). Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3979–3985.
- Chap J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park, J., Osaili, T., Shaker, R., Jaradat, Z., Hartantyo, S.H.P., Abdullah Sani, N., Estuningsih, S., Forsythe, S. J. (2009). International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 185-188.

Clinical Laboratory Standards Institute- CLSI publication M100-S24. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. (2014). http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S24.pdf. Acessado em 15.02.14.

Conde, A. A., Legorburu, P. A., Urcelay, E. I., Zárata, H. Z, & Zugazabeitia, A. J. K. (2007). Sepsis neonatal por *Enterobacter sakazakii*. *An. Pediatr (Barcelona)*, 66, 196–197.

Drudy, D., Mullane, N. R., Quinn, T., Wall, P. G., & Fanning, S. (2006). *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 996-1002.

Emami, C. N., Mittal, R., Wang, L., Ford, H. R., & Prasadarao, N. V. (2011). Recruitment of dendritic cells is responsible for intestinal epithelial damage in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*. *J. Immunol.*, 186, 7067-7079.

Food and Agricultural Organization. *Codex Alimentarius*: code of hygienic practice for foods for infants and children. CAC/RCP 66, (2008). http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11026/CXP_066e.pdf>. Acessado 22.09.14.

Freitas, L. G., Ristori, C. A., Jakabi, M., Paula, A. M. R., & Rowlands, R. E. G. (2011). Occurrence of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Infant food purchased in a public hospital. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 70, 548-553.

- Friedemann, M. (2007). *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int. J. Food Microbiol.*, *116*, 1–10.
- Friedemann, M. (2009). Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *European J. Clin. Microbiol Infect. Dis.*, *28*, 1297–1304.
- Gičová, A., Orieskova, M., Oslanecova, L., Drahovska, H., & Kaclikova, E. (2014). Identification and characterization of *Cronobacter* strains isolated from powdered infant foods. *Lett. Appl. Microbiol.*, *58*, 242-247.
- Gosney M. A., Martin, M. V., Wright, A. E., & Gallagher, M. (2006). *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. *Europ. J. Internal Med.*, *17*, 185–188.
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J.J., & Fanning, S. (2010). *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog. Dis.*, *4*, 339-350.
- Hoque, A., Ahmed, T., Shahidullah, M., Hossain, A., Mannan, A., Noor, K., et al. (2010). Isolation and molecular identification of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula (PIF) in Bangladesh. *Int. J. Food Microbiol.*, *142*, 375-378.
- Huertas, J.P.A.; Álvarez-Ordóñez, A.B.; Morrissey, R.C.D.; Chumillas, R.M.; Esteban, M.D.A.; Maté, J.A.; Palop, A.A.; Hill, C. (2015). Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula. *Food Research International*, *69*, 401–409.

- Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Hilton, A., Armstrong, R., Smith, C., Grant, J., Shoo, S., & Forsythe, S. (2009). Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonization by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infect. Dis.*, 9:146, 1-9.
- International Organization for Standardization. *ISO/TS 22964:2006* (2006). *Milk and milk products – Detection of Enterobacter sakazakii*.
<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:22964:ed-1:v1:en>.
- Iversen, C. & Forsythe, S. (2004). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.*, 21, 771–777.
- Joshi, S. S., Howell, A.B. & D'Souza, D. H. (2014). *Cronobacter sakazakii* reduction by blueberry proanthocyanidins. *Food Microbiol.*, 39, 127–131.
- Kandhai, M. C., Reij, M. W. , Gorris, L. G. M. , Guillaume-Gentil, O., & Van Schothorst, M. (2004). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Food Production Environ.*, 363, 39–40.
- Kilonzo-Nthenge, A., Rotich, E., Godwin, S., Nahashon, S., & Chen, F. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in middle Tennessee, United States. *J. Food Prot.*, 8, 1366-1541.
- Lai, K.K. (2001). *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Medicine*, 80, 113–122.

- Lehner, A., & Stephan, R. (2004). Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Prot.*, *67*, 2850-2857.
- Li, Y., Chen, Q., Zhao, J., Jiang, H., Lu, F., Bie, X., & Lu, Z. (2014). Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control*, *37*, 109-114.
- Lou, X., Si, G., Yu, H., Qi, J., Liu, T., & Fang, Z. (2014). Possible reservoir and routes of transmission of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) via wheat flour. *Food Control*, *43*, 258-262.
- Mohammed, M.A., Sallam, K.I., & Tamura, T. (2015). Prevalence, identification and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* isolated from retail meat products, *Food Control*, *53*, 206–211.
- Mullane, N., Healy, B., Meade, J., Whyte, P., Wall, P., & Fanning, S. (2008). Dissemination of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. *Appl. Environ. Microbiol.*, *74*, 5913–5917.
- Muytjens, H.L., Zanen, H.C., Sonderkamp, H.J., Kolee, L.A., Wachsmuth, I.K., & Farmer, J.J. (1983). Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.*, *18*, 115– 120.
- Oonaka, K., Fururata, K., Hara, M., & Fukuyama, M. (2010). Powder infant formula milk contaminated with *Enterobacter sakazakii*. *Japanese J. Infect. Dis.*, *63*, 103–107.

- Rossi, P. Kabuki, D. Y., & Kuaye, A. Y. (2010). Microbiological quality in preparing the infant milk formula in hospital milk dispensary. *Revista Inst. Adolfo Lutz*, *69*, 503-509.
- Simón, M., Sabate, S., Osanz, A. C., Bartolome, R., & Ferrer, M. D. (2010). Investigación de um caso de infección neonatal por *Enterobacter sakazakii* asociada a um preparado em polvo para lactantes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *28*, 713–715.
- See, K.C., Than, H.A., & Tang, T. (2007). *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. *Age and Ageing*, *36*, 595–596.
- Shaker, R., Osaili, T., Al-Omary, W., Jaradat, Z., & Al-Zuby, M. (2007). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*, *18*, 1241-1245.
- Snitkin, E.S., Zelazny, A.M., Thomas, P.J., Stock, F., Henderson, D. K., Palmore, T.N., Segre, J. A. (2012). Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. *Science Translational Medicine*, *4*, 1-8.
- Stock, I., & Wiedemann, B. (2002). Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, *8*, 564–578.

- Van Acker, J., Smet, F., Muyldermans, G., Bougatef, A., Naessens, A., & Lauwers, S. (2001). Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.*, *39*, 293–297.
- Vojkowska, H.; Karpiskova, R.; Orieskova, M.; Drahovska, H. (2016). Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic. *Int. J. Food Microbiol.*, *217*, 130–136.
- Wang, M., Cao, B., Gao, Q., Sun, Y., Liu, P., Feng, L., & Wang, L. (2009). Detection of *Enterobacter sakazakii* and other pathogens associated with infant formula powder by use of a DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.*, *47*, 3178–3184.
- WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agricultural Organization (2008). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting Report. Geneva, 90 p. Microbiological Risk Assessment Series, 15, 2008. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_followup.pdf Acessado 21.04.14.
- WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agricultural Organization. Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula Guidelines (2007). http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf. Acessado 21.04.14.
- Xu, X.; Li, C.; Wu, Q.; Zhang, J.; Huang, J.; Yang, G. (2015). Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, *204*, 17–23.

- Yan, Q. Q., Condell, O., Power, K., Butler, F., Tall, B. D., & Fanning, S. (2012). *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1), 1-15.
- Zhou, X., Gao, J., Huang, Y., Fu, S., & Chen, H. (2011). Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *African J. Microbiol.*, 5, 3073–3077.