



Pesquisa de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil e identificação das espécies por *Multiplex-PCR*

Meier GOS¹, Brandao MLL¹, Medeiros VM¹, Silva DAF¹, Carvalho CT¹, Silvia CC¹, Umeda NS¹, Rosas CO¹, Bricio SML¹

¹INCQS/Fiocruz

Introdução

O leite humano é internacionalmente reconhecido como a melhor forma de nutrição para neonatos. Contudo, existem casos em que ele pode ser insuficiente ou não estar disponível e uma das opções para dieta é o uso de fórmulas infantis desidratadas (FID)(1). *Cronobacter* spp. emergiu como perigo microbiológico em FID, causando infecções em crianças, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunodeficientes(2). As síndromes clínicas incluem enterocolite necrosante, bacteremia e meningite, com uma taxa de mortalidade variando de 10-41,9% e os sobreviventes podem apresentar sequelas graves(3). Desta forma o *Codex Alimentarius* revisou o código de práticas para produção de FID definindo critérios específicos para o controle de *Cronobacter* spp.(1).

O gênero *Cronobacter* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo composto por dez espécies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter universalis*, *Cronobacter condimentii*, *Cronobacter helveticus*, *Cronobacter pulveris* e *Cronobacter zurichensis*(4). Contudo, apenas as seis primeiras supracitadas foram associadas a casos de infecções(5). Surtos causados por *Cronobacter* spp. já foram reportados em diversos países, incluindo o Brasil(6). Contudo, em muitos surtos o veículo de contaminação não pode ser identificado e muitos pacientes não ingeriram FID, indicando que outras fontes poderiam ser o veículo de contaminação destes patógenos (7).

Apesar das infecções por *Cronobacter* spp. estarem, a princípio, associadas a neonatos, já existem relatos em crianças de maior idade e adultos(1,7,8). Em um estudo realizado nos Estados Unidos, a incidência de casos de infecções por *Cronobacter* spp. foi estimada em 0,66 casos/100.000 habitantes, sendo crianças com <5 anos e idosos os mais afetados(8). O relato de casos de infecções nestes grupos indica que existem potenciais fontes de contaminação por *Cronobacter* spp. nos alimentos ingeridos por estes indivíduos. Pacientes idosos, principalmente os que apresentam disfagia, ingerem alimentos semi-sólidos na sua dieta, como papas e mingaus de cereais(9). A presença frequente de *Cronobacter* spp. nestes tipos de alimentos pode representar um risco a estes indivíduos.



Devido à indicação de que alimentos infantis diferentes de FID podem atuar como veículos de contaminação em casos de infecções por *Cronobacter* spp., o objetivo deste estudo foi pesquisar e identificar as espécies de *Cronobacter* spp. nestes produtos.

Material e Métodos

Amostras

Foi analisado um total de 47 amostras de alimentos destinados a alimentação infantil no período de março-maio/2015. Deste total, 16 foram à base de variados cereais(TU1-16), 11 de arroz(AR1-11), 9 de milho(MI1-9), duas de aveia(AV1-2), quatro de farinhas lácteas (FL1-4) e cinco de amidos de milho(AM1-5). As amostras foram obtidas no comércio do Estado do RJ e enviadas ao laboratório para análise.

Análise microbiológica

A pesquisa de foi realizada de acordo com Iversen et al.(10). Vinte e cinco gramas da amostra foram pesados em um saco plástico *Whirl-Pak* (Nasco, EUA) seguido da adição de 225 mL de água peptonada tamponada (Merck, Alemanha) e homogeneizado em aparelho *Stomacher* durante 60s. O homogenato foi incubado a 35°C/24h. Após a incubação, uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada à 10 mL de *Cronobacter Screening Broth* contendo vancomicina (CSB/v; Oxoid,Inglaterra) e este foi incubado a 42°C/24-48h. Após a incubação, uma alçada das amostras que apresentaram alteração da coloração do meio para amarelo foi semeada na superfície do *Enterobacter sakazakii Isolation agar* (ESIA; AES-Chemunex,França). As placas foram incubadas a 44°C/24h. As colônias características foram semeadas em ágar nutriente (BD,EUA) e submetidas à confirmação no sistema Vitek 2.0 (bioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante.

Identificação das espécies

Para a identificação das espécies de *Cronobacter* spp. foi utilizado o protocolo de reação múltipla da polimerase em cadeia (M-PCR) com alvo no gene *cgcA* que permite a identificação simultânea das espécies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* e *C. universalis* (11). Água livre de DNase/RNase (BioBasic, Canada) e as cepas de referência *C.sakazakii* ATCC 29544(INCQS 00578), *C.malonaticus* LMG 23826(INCQS 00619), *C.muytjensii* ATCC 51329(INCQS 00579), *C.dublinensis* LMG 23823(INCQS 00618) e *C.universalis* NCTC 9529(INCQS 00599) foram utilizadas como controles. A extração de DNA foi realizada com o kit *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi dosada em espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA). As reações foram preparadas em um volume total de 25µL contendo: 5µL de DNA molde (20-60ng/µl), 5pmol de cada iniciador e



PCR MasterMix 1X (ThermoScientific, EUA). A amplificação foi realizada no *SimpliAmp ThermalCycler* (AppliedBiosystems, Singapore) nas seguintes condições: 94°C/3min; 25 ciclos de 94°C/30s, 62°C/30s e 72°C/1min; e extensão final a 72°C/5min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 100 V/50min. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (Sigma, EUA) por 15 min e visualizado em analisador de imagens (GE-Healthcare, Inglaterra).

Resultados e Discussão

Das 47 amostras analisadas foi detectada a presença de *Cronobacter* spp. em 11(23,4%). A maior ocorrência foi observada em amostras à base de aveia(100,0%) e arroz(54,5%), seguido das amostras de farinha láctea (25,0%) e de cereal à base de milho(11,1%). A amostra TU1 foi a única à base de cereais variados contaminada, sendo esta à base de aveia e arroz. Nenhuma amostra de amido de milho apresentou contaminação(Tabela 1).

Tabela 1 - Ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras para alimentação infantil

Produto(n.º de amostras analisadas)	CSB/v	ESIA	V i t e k	N.º amostras positivas(%)
	a	b	2.0 ^c	
À base de cereais variados(16)	8/16	1/8	1/1	1(6,3)
À base de arroz(11)	9/11	7/9	6/7	6(54,5)
À base de milho(9)	3/9	1/3	1/1	1(11,1)
À base de aveia(2)	2/2	2/2	2/2	2(100,0)
Farinha láctea(4)	4/4	1/4	1/1	1(25,0)
Amido de milho(5)	4/5	0/4	NR	0(0)
Total(47)	30/47	12/30	11/12	11(23,4)

a-n.º de amostras que viraram o meio para amarelo/total; b-n.º de amostras que apresentaram colônias características/n.º amostras semeadas; c-n.º de amostras confirmadas como *Cronobacter* spp./n.º amostras testadas.

O uso do CSB/v permite a decisão de liberar amostras não contaminadas após 48h(10). Neste estudo, 17 amostras não apresentaram viragem da coloração do meio, não sendo necessária a realização da etapa de isolamento. Após a semeadura das amostras positivas no ESIA, foram observadas colônias características em 12 amostras e 11 foram confirmadas como *Cronobacter* spp. pelo Vitek 2.0. A cepa não confirmada foi isolada da amostra AR6 e identificada como *Enterobacter aerogenes*. O isolamento de outras enterobactérias que apresentam atividade α-glicosidase já foi relatado, o que demonstra a importância do uso de técnicas de identificação de *Cronobacter* spp.confíáveis após o isolamento(10).

Cronobacter spp. foi isolada de amostras de cereais à base de aveia, arroz, milho e em farinha láctea. O isolamento desta bactéria nestes tipos de alimentos já foi reportado anteriormente, com uma ocorrência variando de 11,2-45,0%(12,13,14). Estes resultados foram similares ao observado no



nosso estudo, uma vez que *Cronobacter* spp. foi detectada em 23,4% das amostras. No Brasil, Freitas et al.(12) isolaram *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos infantis a base de farinha de milho, mas, em contraste, não detectaram em amostras à base de arroz e aveia.

As instruções nos rótulos de determinados alimentos analisados informa que estes são pré-cozidos e não necessitam de aquecimento antes do consumo. Como *Cronobacter* spp. não sobrevive a pasteurização normal(15), provavelmente a contaminação ocorre porque o binômio tempo/temperatura utilizado pelos produtores não é suficiente para eliminação do patógeno. Outra possibilidade é que a contaminação ocorra em etapas após o tratamento térmico, uma vez que *Cronobacter* spp. já foi isolada de amostras de ambientes de fábrica(16). A ingestão destes alimentos por indivíduos pertencentes ao grupo de risco representa um perigo em potencial. Logo os consumidores devem estar atentos aos rótulos dos produtos para ofertar-los as crianças apenas na idade recomendada. No Brasil, o uso incorreto destes produtos é comum, uma vez que muitas famílias não adquirem FID devido ao alto custo e a falta de conhecimento quanto do risco do uso destes alimentos na idade incorreta. Além disso, estes alimentos semi-sólidos são comumente utilizados por idosos, principalmente os que possuem disfagia, podendo atuar como um veículo de contaminação em casos de infecções nestes indivíduos(9). O rótulo da maioria dos produtos analisados recomenda ao usuário que misture uma porção do cereal com leite líquido morno ou água aquecida antes do consumo. Logo, o risco aumenta se a mistura for preparada e mantida a temperatura ambiente, uma vez que pode promover a multiplicação do patógeno(15).

Dos 11 isolados de *Cronobacter* spp., 8(72,7%) foram identificados como *C.sakazakii*, dois(18,2%) como *C.malonaticus* e um(9,1%) como *C.dublinensis*. Os isolados apresentaram 9 fenótipos distintos baseados no perfil do Vitek 2.0(Tabela 2).

Tabela 2- Caracterização fenotípica e molecular dos isolados de *Cronobacter* spp.

Amostr a	N.º do isolado	Perfil Vitek 2.0	Fenótipo	Espécie
TU1	C163	0625734151622010	A	<i>C.sakazakii</i>
AR3	C167	0625734151722010	B	<i>C.sakazakii</i>
AR4	C168	0607737151720010	C	<i>C.sakazakii</i>
AR7	C171	0625734151622010	A	<i>C.sakazakii</i>
AR8	C174	0607736151720011	D	<i>C.sakazakii</i>
AR9	C175	0625734353722010	E	<i>C.dublinensis</i>
AR11	C176	0621736051222010	F	<i>C.sakazakii</i>
AV1	C165	0621736053222010	G	<i>C.sakazakii</i>
AV2	C177	0627734053622010	H	<i>C.malonaticus</i>
MI5	C169	0625736153222011	I	<i>C.sakazakii</i>
FL2	C173	0607737151720010	C	<i>C.malonaticus</i>



Os resultados obtidos foram similares aos de outros estudos, que relatam a maior ocorrência da espécie *C.sakazakii* em produtos alimentícios e outras fontes(13,14). Os isolados de *C.sakazakii* foram agrupados em sete fenótipos distintos(A,B,C,D,F,G e I), sendo as cepas C163 e C171 agrupadas no mesmo fenótipo. A cepa de *C. sakazakii* C168 apresentou o mesmo fenótipo da cepa C173 identificada como *C. malonaticus*. Este resultado não é incomum, pois estas duas espécies são muito próximas geneticamente e inicialmente foram descritas como pertencentes à mesma espécie (5). O outro isolado de *C. malonaticus* C177 e o único isolado de *C. dublinensis* C175 apresentaram fenótipos únicos.

CONCLUSÃO

Cronobacter spp. foi detectada em produtos destinados a alimentação infantil sendo sua maior ocorrência em produtos à base de aveia e arroz. Foram isoladas cepas de *Cronobacter* spp. de três espécies, sendo a maioria dos isolados identificada como *C.sakazakii*.

REFERÊNCIAS

- 1-Codex Alimentarius Commission. Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for infants and children. CAC/RCP66, 2008.
- 2-Food and Agricultural Organization/World Health Organization(FAO/WHO). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting Report. Genova:WHO,2008. 90p.(Microbiological Risk Assessment Series,15).
- 3-Friedemann M. Epidemiological of invasive *Cronobacter*(*Enterobacter sakazakii*) infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(11):1297-304.
- 4-Euzéby JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature-Genus *Cronobacter*. 2015.
- 5-Joseph S, Sonbol H, Hariri S, Desai P, McClelland M, Forsythe SJ. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multi locus sequence typing. J Clin Microbiol. 2012;50(9):3031-9.
- 6-Brandao MLL, Umeda NS, Carvalho KR, 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. 2015; Ahead of Print.
- 7-Tsai HY, Liao CH, Huang YT, Lee PI, Hsueh PR. *Cronobacter* Infections Not from Infant Formula, Taiwan. Emerg Infec Dis. 2013;19(1):167-9.



8-Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A, Wymore K, et al. Incidence of *Cronobacter* spp. Infections, United States, 2003-2009. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(9):1520-3.

9-Gosney MA, Martin MV, Wright AE, Gallagher M. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. *Eur J Int Med.* 2006;17(3):185-8.

10-Iversen C, Druggan P, Schumacher S, Lehner A, Feer C, Gschwend K, et al. Development of a novel screening method for the isolation of "Cronobacter" spp.(*Enterobacter sakazakii*). *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(8):2550-3.

11-Carter L, Lindsey LA, Grim CJ, Sathyamoorthy V, Jarvis KG, Gopinath G, et al. Multiplex PCR Assay Targeting a DiguanylateCyclase-Encoding Gene, *cgcA*, To Differentiate Species within the Genus *Cronobacter*. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(2):734-7.

12-Freitas LG, Ristori CA, Jakabi M, Paula AMR, Rowlands REG. Ocorrência de *Cronobacter* spp.(*Enterobacter sakazakii*) em alimentos infantis adquiridos em um hospital público. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2011;70(4):548-53.

13-Hochel I, Růžičková H, Krásný L, Demnerová K. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. *J Appl Microbiol.* 2012;112(6):1257-65.

14-Singh N, Goel G, Raghav M. Prevalence and Characterization of *Cronobacter* spp. from Various Foods, Medicinal Plants, and Environmental Samples. *Curr Microbiol.* 2015;71(1):31-8.

15-Osaili T, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int J Food Microbiol.* 2009;136(2):214-20.

16-Jacobs C, Braun P, Hammer P. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii*(*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *J Dairy Sci.* 2011;94(8):3801-10.