

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Marcelo Luiz Lima Brandão

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS
DE *Cronobacter* spp. DE ALIMENTOS E DE ORIGEM CLÍNICA NO BRASIL**

Rio de Janeiro

2016

Marcelo Luiz Lima Brandão

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS
DE *Cronobacter* spp. DE ALIMENTOS E DE ORIGEM CLÍNICA NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis
Capasso

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Brandão, Marcelo Luiz Lima

Isolamento, caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Cronobacter* spp. de alimentos e de origem clínica no Brasil / Marcelo Luiz Lima Brandão. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2016.

153 f., il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

1. *Cronobacter*. 2. Contaminação de Alimentos. 3. Alimentos Infantis. 4. Fórmulas Infantis. 5. Tipagem de Sequências Multilocus. 6. Testes de Sensibilidade Microbiana I. Título

Isolation, phenotypic and molecular characterization of *Cronobacter* spp. strains from foods and clinical origin in Brazil

Marcelo Luiz Lima Brandão

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS
DE *Cronobacter* spp. DE ALIMENTOS E DE ORIGEM CLÍNICA NO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Paola Cardarelli-Leite (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

Angela Corrêa de Freitas Almeida (Doutora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Maria Regina Branquinho (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

Aos meus pais Roberto e Gildete,
meus avós Amara e Ozório, e em
especial à minha tia Gilcélia.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Aos meus pais e avós pelo carinho e amor.

A minha cadela Coli pela companhia.

Ao meu irmão Rodrigo.

Ao meu orientador Dr. Ivano de Filippis pela orientação e contribuição no meu aprendizado.

A Natália Umeda pelo companheirismo, paciência e grande ajuda na realização deste trabalho.

A Cátia Chaia pela ajuda na realização dos experimentos e na análise de dados, principalmente no Bionumerics.

Aos amigos do Setor de Alimentos e aos que nele estiveram presentes: Carla Rosas, Márcia Warnken, Silvia Bricio, Valéria Medeiros, Gisele Meier, Débora da Silva, Carla Trece, Maximiliano Dias, Maria Luiza, Karine Gaglianone, Rodrigo Tavares e Cátia Cardoso, pelo otimismo, ajuda em todos os momentos que solicitei.

Ao meu amigo Josué Coutinho.

A chefia de Departamento de Microbiologia, Dra. Suely Fracalanza pelo apoio e autorização para realização do doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação e ao INCQS pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica a Natália Umeda, que participou ativamente da realização deste projeto.

Às Vigilâncias Sanitárias do Estado do Piauí pela colaboração e envio das amostras do surto de toxinfecção alimentar.

Ao Setor de Bactérias de Referência do INCQS pela provisão das cepas de referência.

Aos companheiros dos Setores de Meios de Cultura e Esterilização pela atenção e eficiência ao atendimento dos pedidos para realização deste trabalho.

Aos companheiros do Setor de Bactérias de Referência pela ajuda na realização dos experimentos.

À equipe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do IOC, pelo uso das dependências do laboratório na realização da PCR em tempo real.

Aos colegas de turma, pelos momentos compartilhados e a todos os professores.

À plataforma de sequenciamento do IOC pela realização de determinadas etapas do sequenciamento das amostras.

Ao professor Stephen Forsythe e a Dra Emily Jackson pela colaboração e revisão de um dos artigos científicos oriundos deste trabalho.

À Karyne Carvalho pela realização da técnica de PFGE e colaboração na publicação de um artigo científico.

Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista.

Aldo Novak

RESUMO

Cronobacter é uma bactéria oportunista que causa infecções em neonatos devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas contaminadas (FID). Atualmente, sabe-se que *Cronobacter* pode causar infecções em indivíduos de qualquer idade, sendo em idosos e imunossuprimidos sua maior prevalência. Nestes grupos, outros alimentos foram sugeridos como veículos de contaminação. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar cepas de *Cronobacter* spp. de alimentos, utensílios e sítios clínicos. Foi realizada a pesquisa de *Cronobacter* spp. em 30 amostras de FID para crianças de 0-6 meses, 30 de FID de seguimento para crianças >6 meses, 30 de alimentos infantis para crianças de maior idade, 30 de temperos/condimentos e 30 de produtos farináceos. Foram avaliadas três metodologias para o isolamento de *Cronobacter* spp. e três protocolos da reação em cadeia pela polimerase (PCR) com alvo nos genes *rpoB*, *cgcA* e *gyrB*. Os isolados foram avaliados pelo esquema de biogrupos, perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e *Multi Locus Sequence Typing*. Em paralelo, foi realizada uma investigação de um surto causado por *Cronobacter* spp. em um hospital na cidade de Teresina-PI. *Cronobacter* spp. não foi detectada em nenhuma amostra de FID, mas foi isolada a partir de amostras de alimentos infantis destinados a crianças de maior idade (7/30; 23,3%), produtos farináceos (20/30; 66,7%) e temperos/condimentos (11/30; 36,7%). O uso do *Cronobacter Screening Broth* no enriquecimento-seletivo e do ágar DFI para o isolamento foi considerado o método mais eficiente. Foram identificadas cepas de quatro espécies: *C. sakazakii* (n=41), *C. malonaticus* (n=8), *C. dublinensis* (n=3) e *C. muytjensii* (n=2), e os três protocolos de PCR utilizados para identificação das espécies de *Cronobacter* foram considerados eficazes por apresentaram resultados concordantes com o sequenciamento do gene *fusA*. As cepas foram classificadas em nove biogrupos e apenas uma cepa de origem clínica de *C. malonaticus* apresentou resistência intermediária a ampicilina-sulbactam e resistência a ceftriaxona e cefuroxima. Dois clones distintos da espécie *C. malonaticus* ST394 e ST440, que não foram agrupados em nenhum complexo clonal, foram identificados como responsáveis pelas infecções dos pacientes no surto. Não foi possível identificar o veículo de contaminação do surto, uma vez

que o patógeno não foi isolado nas amostras de alimentos suspeitas que foram ingeridas pelos pacientes. Foram identificados 32 tipos sequenciais (ST), incluindo cinco cepas identificadas como ST4, que é o mais patogênico descrito até o momento. Dezesesseis ST novos foram descritos neste estudo: ST394, ST395, ST396, ST397, ST398, ST402, ST413, ST432, ST433, ST434, ST435, ST436, ST437, ST438, ST439 e ST440; e foram descritos 25 alelos novos. A relação de 1,5 cepas por ST encontrada neste estudo demonstra uma baixa clonalidade do gênero. A identificação de 16 novos ST entre os 36 ST encontrados, que corresponde quase à metade (44,4%), indica que a realização de mais estudos sobre a genética de populações do gênero *Cronobacter* são necessários para identificação dos ST com maior potencial patogênico e suas relações com cepas ambientais, auxiliando assim na criação de medidas de controle destes patógenos e na identificação de surtos.

Palavras-chave: *Cronobacter*. Alimentos. Isolamento. Identificação. MLST. Antibiograma.

ABSTRACT

Cronobacter is an opportunistic bacteria that cause infections in neonates due to consumption of powdered infant formulas (PIF). Currently, it is known that *Cronobacter* can cause infections in individuals of any age, with elderly and immunocompromised having the higher prevalence. In these groups, other foods have been suggested as vehicles for contamination. The objective of this study was to isolate and characterize strains of *Cronobacter* spp. from food, utensils and clinical sites. The detection of *Cronobacter* spp. was performed with 30 samples of PIF for children 0-6 months, 30 follow-up PIF for children >6 months, 30 baby foods for children, 30 spices/herbs and 30 flours. Three methodologies were evaluated for the isolation of *Cronobacter* spp. and three polymerase chain reaction (PCR) protocols targeting the genes *rpoB*, *cgcA* and *gyrB* were used. Isolates were evaluated by biogrupos scheme, antimicrobial susceptibility profile and Multi Locus Sequence Typing. In parallel, an investigation of an outbreak caused by *Cronobacter* spp. was carried out in a hospital in the city of Teresina-PI. *Cronobacter* spp. was not detected in any sample of PIF but was isolated from samples of baby foods for children (7/30; 23.3%), flours (20/30; 66.7%) and spices/herbs (11/30; 36.7%). The use of *Cronobacter* Screening Broth for the selective-enrichment and DFI agar for the isolation was considered the most efficient method. Four species were identified: *C. sakazakii* (n=41), *C. malonaticus* (n=8), *C. dublinensis* (n=3) and *C. muytjensii* (n=2), and the three PCR protocols used to identify the species of *Cronobacter* were considered effective by showed concordant results with the *fusA* gene sequencing. The strains were classified into nine biogrupos and only one strain of clinical origin *C. malonaticus* showed intermediate resistance to ampicillin-sulbactam and resistance to ceftriaxone and cefuroxime. Two different clones of *C. malonaticus* ST394 and ST440, which were not grouped into any clonal complex, have been identified as responsables for the infections of patients in the outbreak. It was not possible to identify the contamination vehicle, since the pathogen was not isolated in any suspected food samples that were eaten by the patients. Thirty-two sequence types (ST) have been identified, including five strains identified as ST4, which is the most pathogenic described until now. Sixteen new ST were

described in this study: ST394, ST395, ST396, ST397, ST398, ST402, ST413, ST432, ST433, ST434, ST435, ST436, ST437, ST438, ST439 and ST440; and 25 new alleles have been described. The 1.5 ratio strain by ST found in this study demonstrates a low clonality of the genera. The identification of 16 new ST between 36 ST found, which corresponds to almost half (44.4%), indicates that further studies about genetic populations of the *Cronobacter* genera are necessary to identify the ST with greater pathogenic potential and its relations with environmental strains, thereby assisting in the development of control measures for these pathogens and outbreaks identification.

Keywords: *Cronobacter*. Food. Isolation. Identification. MLST. Antibiogram.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Árvore filogenética “ <i>maximum likelihood</i> ” das 54 cepas de <i>Cronobacter</i> spp., cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp., <i>Citrobacter koseri</i> e <i>Enterobacter</i> spp. como outgroup baseado na sequência do alelo <i>fusA</i> (438 pb) do banco de dados do MLST.	90
Figura 2	Árvore filogenética “ <i>neighbor-net</i> ” construída com o programa Splits Tree4 baseada nas sequências do gene <i>fusA</i> (438 pb) das 54 cepas de <i>Cronobacter</i> spp. e das cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp.	91
Figura 3	Árvore filogenética “ <i>maximum likelihood</i> ” baseada nas sequências dos sete genes do MLST concatenados (3096 pb) das 54 cepas de <i>Cronobacter</i> spp. e a cepa de <i>Enterobacter</i> spp. como <i>outgroup</i> .	92
Figura 4	Árvore filogenética “ <i>neighbor-net</i> ” construída com programa Splits Tree4 baseada nas sequências dos sete genes do MLST concatenados (3096 pb) das 54 cepas de <i>Cronobacter</i> spp. e cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp.	93
Figura 5	“ <i>Minimum spanig tree</i> ” (MST) dos ST das 54 cepas de <i>Cronobacter</i> spp. avaliadas neste estudo.	94
Figura 6	Polimorfismo genético dos três isolados clínicos de <i>Cronobacter malonaticus</i> P4968, P4969 e P4970 determinado por eletroforese em gel de campo pulsado após digestão do DNA com enzima de restrição <i>SpeI</i> .	97
Quadro 1	Perfil fenotípico dos biogrupos de <i>Cronobacter</i> spp.	28
Quadro 2	Critérios microbiológicos para fórmulas infantis em pó para lactantes, fórmulas infantis em pó para lactantes com propósitos médicos especiais e fortificantes de leite humano	38
Quadro 3	Protocolo de amplificação da reação de qPCR para identificação de <i>Cronobacter</i> spp.	62
Quadro 4	Protocolo de amplificação da PCR com alvo no gene <i>gluA</i>	67

Quadro 5	Protocolo de amplificação da PCR com alvo no gene <i>rpoB</i>	71
Quadro 6	Protocolo de amplificação da PCR com alvo no gene <i>gyrB</i>	72
Quadro 7	Protocolo de amplificação da M-PCR com alvo no gene <i>cgcA</i>	72
Quadro 8	Iniciadores utilizados nos protocolos de amplificação dos genes do MLST	73
Quadro 9	Protocolo de amplificação da PCR com alvo nos genes do MLST	74
Quadro 10	Protocolo de purificação dos produtos amplificados pela PCR	75
Quadro 11	Protocolo da reação de sequenciamento dos genes do MLST	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ocorrência de <i>Cronobacter</i> spp. em produtos alimentícios analisados no mundo	46
Tabela 2	Prevalência de <i>Cronobacter</i> spp. em amostras de alimentos comercializados no Brasil	52
Tabela 3	Grupos de produtos alimentícios analisados para pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp.	57
Tabela 4	Lista de iniciadores, sonda, genes-alvo, condições de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados utilizados neste estudo para identificação de gênero e das espécies de <i>Cronobacter</i>	63
Tabela 5	Ocorrência das espécies de <i>Cronobacter</i> nos alimentos comercializados analisados	81
Tabela 6	Avaliação de três métodos para o isolamento de <i>Cronobacter</i> spp. a partir de produtos alimentícios diferentes de FID	83
Tabela 7	Caracterização fenotípica e molecular das cepas de <i>Cronobacter</i> spp.	85
Tabela 8	Resultado da análise das amostras de alimentos envolvidos no surto de toxinfecção alimentar causado por <i>Cronobacter malonaticus</i> em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina, PI, em 2013	96

LISTA DE ABREVIATURAS

A	adenina
AI	alimentos infantis
AMC	amoxicilina-clavulanato
APT	água peptonada tamponada
BHI	caldo infusão cérebro-coração
C	citossina
CC	complexo clonal
CIP	ciprofloxacina
CRO	ceftriaxona
CRX	cefuroxima
CSB/v	<i>Cronobacter Screening Broth</i> com vancomicina
DFI	água Brilliance <i>Enterobacter sakazakii</i> formulação Druggan, Forsythe e Iversen
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DTA	doenças transmitidas por alimentos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	caldo de enriquecimento <i>Enterobacteriaceae</i>
ESIA	água para isolamento de <i>Enterobacter sakazakii</i>
ESPM	água para plaqueamento de <i>Enterobacter sakazakii</i>
FA	farináceos
FID	fórmula infantil desidratada
FIL	fórmula infantil para lactantes
FIS	fórmula infantil de seguimento para lactantes
G	guanina
GEN	gentamicina
HCl	ácido clorídrico
MER	meropenem
MgCl ₂	cloreto de magnésio

MLSA	<i>Multilocus sequence analysis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mLST/v	caldo lauril sulfato triptose modificado com vancomicina
M-PCR	múltipla reação em cadeia pela polimerase
MST	<i>Minimum spanning tree</i>
MYP	metil- α -D-glicopiranosídeo
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PFGE	eletroforese em gel de campo pulsado
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Piauí
PPT	piperacilina-tazobactam
qPCR	reação em cadeia pela polimerase em tempo real
q.s.p.	quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	ácido ribonucléico
SAM	ampicilina-sulbactam
ST	tipo sequencial
SXT	trimetoprim-sulfametoxazola
T	timina
TAE	tampão tris-acetato ácido etilenodiamino tetra-acético
TC	temperos e condimentos
TE	tetraciclina
UFC	unidade formadora de colônia
UTI	unidade de terapia intensiva
X-celobiose	5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β ,D-glicopiranosídeo- β , D-glicopiranosídeo
VNC	viável mas não cultivável
°C	graus centígrados

LISTA DE SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção Americana de Culturas do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CCFH	Comitê de Higiene de Alimentar Codex do inglês <i>Codex Committee on Food Hygiene</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
DM	Departamento de Microbiologia
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	Agência Americana de Controle de Medicamentos e Alimentos do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Funed	Fundação Ezequiel Dias
ICMSF	Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas para Alimentos do inglês <i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ISO	Organização Internacional de Normalização do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
Lacen	Laboratório Central de Saúde Pública
LMR	Laboratório de Microrganismos de Referência
Mapa	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>

PNSAN	Política Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional
Sisan	Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional
SUS	Sistema Único de Saúde
WHO	Organização Mundial da Saúde do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA E SUA RELAÇÃO COM OS ALIMENTOS	22
1.2 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	24
1.3 GÊNERO <i>Cronobacter</i>	26
1.3.1 Taxonomia.....	26
1.3.2 Patogênese e fatores de virulência	30
1.3.3 Epidemiologia: surtos e casos de infecções.....	32
1.3.4 Regulação em alimentos	36
1.3.5 Métodos de isolamento/detecção de <i>Cronobacter</i> spp. a partir de alimentos.....	40
1.3.6 Métodos para identificação das espécies de <i>Cronobacter</i>	43
1.3.7 Ocorrência em alimentos.....	45
1.3.8 <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST).....	53
1.4 JUSTIFICATIVA	54
2 OBJETIVOS	55
2.1 OBJETIVO GERAL	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1 AMOSTRAS	56
3.1.1 Amostras de alimentos obtidas no comércio	56
3.1.2 Amostras de alimentos provenientes do surto ocorrido no hospital maternidade na cidade de Teresina-PI	59
3.2 MICRORGANISMOS.....	59
3.2.1 Cepas de referência	59
3.2.2 Cepas provenientes do surto ocorrido na cidade de Teresina, PI	60
3.2.2 Cepas provenientes da coleção biológica da Fundação Ezequiel Dias	60
3.2.3 Cepas isoladas de amostras de alimentos neste estudo.....	60
3.3 DETECÇÃO/ISOLAMENTO A PARTIR DE FID.....	60
3.3.1 Processamento das amostras	61
3.3.2 qPCR utilizado como triagem para detecção de <i>Cronobacter</i> spp.	61
3.3.3 Isolamento.....	65

3.3.4	Caracterização fenotípica de <i>Cronobacter</i> spp.	65
3.3.5	Identificação de <i>Cronobacter</i> spp. por qPCR	66
3.3.6	Identificação de <i>Cronobacter</i> spp. por PCR com alvo no gene <i>gluA</i>	67
3.4	DETECÇÃO/ISOLAMENTO A PARTIR DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS DIFERENTES DE FID.....	68
3.4.1	Pré-enriquecimento	68
3.4.2	Enriquecimento seletivo	69
3.4.3	Isolamento.....	69
3.4.4	Caracterização fenotípica de <i>Cronobacter</i> spp.	69
3.4.5	Identificação de <i>Cronobacter</i> spp. por qPCR	69
3.4.6	Identificação de <i>Cronobacter</i> spp. por PCR com alvo no gene <i>gluA</i>	69
3.4.7	Avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos	70
3.5	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Cronobacter</i> spp. POR PCR.....	70
3.5.1	Extração e dosagem do DNA	70
3.5.2	PCR com alvo no gene <i>rpoB</i>	71
3.5.3	PCR com alvo no gene <i>gyrB</i>	71
3.5.4	M-PCR com alvo no gene <i>cgcA</i>	72
3.6	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE <i>Cronobacter</i> spp. POR MLST.....	73
3.6.1	Extração e dosagem do DNA	74
3.6.2	Reação de amplificação	74
3.6.3	Purificação dos produtos amplificados	75
3.6.4	Reação de sequenciamento.....	75
3.6.5	Precipitação.....	76
3.6.6	Eletroforese capilar	76
3.6.7	<i>Multi Locus Sequence Analysis</i> (MLSA).....	76
3.6.8	Identificação das espécies de <i>Cronobacter</i> spp. através da análise da sequência do gene <i>fusA</i>	77
3.6.9	Análise filogenética dos isolados de <i>Cronobacter</i> spp.	77
3.7	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS CEPAS DE <i>Cronobacter</i> spp.....	77
3.8	INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE <i>Cronobacter</i> spp. OCORRIDO NO HOSPITAL MATERNIDADE DA CIDADE DE TERESINA-PI	78
3.8.1	Análises microbiológicas	78

3.8.2 Caracterização fenotípica dos isolados clínicos	78
3.8.3 Caracterização molecular dos isolados clínicos	78
4 RESULTADOS	80
4.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FID	80
4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS DIFERENTES DE FID.....	80
4.2.1. Ocorrência de <i>Cronobacter</i> spp.	80
4.2.2. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos	82
4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DAS CEPAS DE <i>Cronobacter</i> spp.	84
4.4 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE <i>Cronobacter</i> spp.	95
4.5 INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE <i>Cronobacter</i> spp. OCORRIDO NA CIDADE DE TERESINA, PI.....	95
5 DISCUSSÃO	98
5.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FID	98
5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS DIFERENTES DE FID.....	99
5.2.1. Ocorrência de <i>Cronobacter</i> spp.	99
5.2.2. Avaliação dos métodos para isolamento de <i>Cronobacter</i> spp.....	102
5.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DAS CEPAS DE <i>Cronobacter</i> spp.	104
5.4 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE <i>Cronobacter</i> spp.	110
5.5 INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE <i>Cronobacter</i> spp. OCORRIDO NO HOSPITAL MATERNIDADE DA CIDADE DE TERESINA-PI	111
6 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS.....	116
GLOSSÁRIO	136
ANEXO A - REAGENTES PREPARADOS NO LABORATÓRIO PARA ESTE ESTUDO	138
APÊNDICE A - PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS ORIUNDAS DESTE TRABALHO.....	139
APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO 1	141
APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO 2	147

1 INTRODUÇÃO

1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA E SUA RELAÇÃO COM OS ALIMENTOS

A alimentação e nutrição constituem requisitos básicos para a promoção e a proteção da saúde, possibilitando a afirmação plena do potencial de crescimento e desenvolvimento humano, com qualidade de vida e cidadania (BRASIL, 2012). É direito fundamental do ser humano a adequada alimentação, inerente à dignidade da pessoa e indispensável à realização dos direitos consagrados na Constituição Brasileira (BRASIL, 1988). Assim, o poder público deve adotar as políticas e ações que se façam necessárias para promover e garantir a segurança alimentar e nutricional da população (BRASIL, 2006).

No Brasil, a consecução do direito à alimentação adequada e da segurança alimentar e nutricional é realizado pelo Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (Sisan), que é formado por um conjunto de órgãos públicos e privados. O Sisan tem por objetivos formular e implementar a Política Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (PNSAN), bem como promover o acompanhamento, o monitoramento e a avaliação da segurança alimentar e nutricional no País (BRASIL, 2006). A PNSAN e a Vigilância Sanitária convergem na finalidade de promover e proteger a saúde da população na perspectiva do direito humano à alimentação, por meio da normatização e do controle sanitário da produção, comercialização e distribuição de alimentos (BRASIL, 2012).

O termo vigilância sanitária tem sua origem na denominação “política sanitária”, que a partir do século XVIII era responsável pelo controle do exercício profissional e o saneamento, com o objetivo maior de evitar a propagação de doenças (GERMANO; GERMANO, 2011). Atualmente, a definição de vigilância sanitária está contida no artigo 6, §1º da Lei n.º 8.080 de 19 de setembro de 1990, que regula em todo território nacional as ações e serviços de saúde. De acordo com o parágrafo 1º: *Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde* (BRASIL, 1990).

A primeira legislação relacionada ao controle sanitário de alimentos no Brasil foi publicada através do Decreto-Lei n.º 986 de 21 de outubro de 1969 (BRASIL, 1969), que instiu normas básicas sobre alimentos. Em janeiro de 1999, foi promulgada a Lei n.º 9.782, que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que tem como uma de suas atribuições exercer atividades de regulação, normatização, controle e fiscalização na área de alimentos (BRASIL, 1999). A Anvisa surge como um dos braços executivos que estruturam e operacionalizam o Sistema Único de Saúde (SUS) na busca de concretização do direito social à saúde, por meio de sua função principal de eliminar ou minimizar o risco sanitário envolvido na produção, processos e serviços (LUCCHESI, 2001).

De acordo com a Lei n.º 9.782, os alimentos são considerados bens e produtos submetidos ao controle e fiscalização sanitária pela Anvisa (BRASIL, 1999). O controle higiênico-sanitário dos alimentos é uma das grandes preocupações da vigilância sanitária, pois estes podem ser veículos de patógenos. Esta competência é tanto do Ministério da Saúde (MS) como do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa), cabendo ao primeiro o controle sanitário e o registro dos produtos alimentícios industrializados, com exceção daqueles de origem animal, e o controle das águas de consumo humano. Quanto às águas minerais, a competência é compartilhada com o Ministério de Minas e Energia (BRASIL, 2011d).

Na tentativa de minimizar danos à saúde, autoridades do mundo inteiro vêm intensificando esforços para melhorar a segurança dos alimentos (NEWLL et al, 2010). Os produtores/prestadores, responsáveis técnicos, fornecedores e comerciantes são responsáveis pela qualidade de produtos e serviços ofertados à população e, conseqüentemente, pelos eventuais danos à saúde deles decorrentes, mas também compete ao Estado cumprir e fazer cumprir normas específicas de proteção à saúde (BRASIL, 2011d).

O laboratório é parte integrante da estrutura de vigilância sanitária e instrumento imprescindível para o controle sanitário de produtos para a saúde. Atua na produção da base científica e tecnológica, por meio das análises fiscais e de controle de qualidade que realiza, para a avaliação de conformidade de produtos e é fundamental para a análise e gerenciamento de risco (BRASIL, 2011d). Os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen) dos Estados,

Laboratórios Municipais e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) formam uma rede de sustentação às ações da vigilância sanitária. O INCQS atua como órgão de referência nacional para controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária, que tem ainda o papel de assessorar os Lacen sobre metodologias analíticas, questões tecnológicas e normativas (BRASIL, 2011d).

1.2 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são definidas como doenças originadas pela ingestão de alimentos e/ou de água que contenham agentes contaminantes (bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príon, produtos químicos, agrotóxicos ou metais tóxicos) em quantidades tais que afetem a saúde do consumidor, em nível individual ou grupos de população. Surto de DTA é o episódio em que duas ou mais pessoas apresentam doença semelhante após ingerirem alimentos, inclusive água, da mesma origem e no qual a evidência epidemiológica ou análise laboratorial aponta os alimentos e/ou água como veículos da doença (BRASIL, 2009).

As DTA transmitidas por microrganismos ocorrem pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio de transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico (BRASIL, 2001). Essas doenças têm sido abordadas como um problema de Saúde Pública, que acarreta a redução da produtividade (absenteísmo), perdas econômicas e afeta a confiança do consumidor, levando a perda da credibilidade do produtor. Dependendo da quantidade do alimento contaminado ingerido, do tipo de microrganismo ou toxina e do estado de saúde do indivíduo acometido, as DTA podem levar até a morte (NEWLL et al, 2010).

Define-se vigilância epidemiológica como um conjunto de ações que permite reunir informações indispensáveis para conhecer, a qualquer momento, o comportamento ou história natural das doenças, bem como, detectar ou prever alterações de seus fatores condicionantes, com a finalidade de recomendar, sobre bases firmes as medidas indicadas que levem à prevenção e ao controle de determinadas doenças (BRASIL, 1990). Dentre as suas atribuições, a vigilância

epidemiológica investiga o surgimento de doenças emergentes, identifica surtos epidêmicos e investiga mudanças nos padrões de resistência de microrganismos aos antimicrobianos, que são pontos de grande importância para a saúde pública (WALDMAN; FREITAS, 2008). As informações obtidas neste sistema são compartilhadas com sistemas de vigilância internacionais, oferecendo subsídios às autoridades sanitárias para respostas rápidas dirigidas ao controle de riscos à saúde pública (BRASIL, 2009).

No Brasil a vigilância epidemiológica das DTA foi implantada em 1999 em uma parceria da Anvisa, o Mapa e o Instituto Pan-Americano de Alimentos da Organização Pan-Americana da Saúde. Seu objetivo é de reduzir a incidência das DTA no Brasil, a partir do conhecimento do problema e de sua magnitude, com vistas a subsidiar as medidas de prevenção e controle, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida da população (BRASIL, 2005). Os dados mais atuais deste sistema mostram que, de 2000 até agosto de 2014, foram notificados 9.719 surtos de DTA no Brasil, levando ao adoecimento de 192.803 indivíduos (BRASIL, 2014).

Diversos fatores têm contribuído para as mudanças e tendências no panorama das DTA pelo mundo. Entre esses se destacam: o rápido crescimento populacional e mudança do perfil demográfico (tendência a uma população mais idosa); o aumento do comércio global de alimentos; o aumento do deslocamento de pessoas; as mudanças nos hábitos alimentares, como o aumento do consumo de alimentos crus ou brandamente cozidos; o aumento da proporção de indivíduos imunodeficientes; as mudanças nas práticas de produção; a intrusão do homem em ambientes selvagens; e as mudanças no clima, favorecendo o aparecimento de novos vetores em regiões alteradas (NEWLL et al, 2010). Desta forma, as ações da vigilância epidemiológica devem ser desenvolvidas de modo contínuo, visando o conhecimento da doença como um todo, de forma que as medidas de intervenção possam ser operacionalizadas com eficácia. Quanto mais claros e abundantes os dados e informações, melhor será a compreensão do quadro sanitário do local de estudo e, conseqüentemente, o planejamento adequado das ações e medidas a serem executadas (BRASIL, 2009).

O aumento da importância das DTA em saúde pública tornou necessária uma complexa regulamentação das atividades desenvolvidas em todos os pontos da cadeia produtiva. O setor de saúde tem importante parcela de responsabilidade pelo contínuo processo da elaboração de normas e a fiscalização de seu cumprimento,

sendo a vigilância epidemiológica um importante instrumento na identificação de grupos e fatores de risco associados às DTA participando da fundamentação técnica para elaboração e atualização dessas normas. A vigilância epidemiológica age como um ponto de articulação com outros serviços de saúde pública. Essa articulação se estabelece à medida que a vigilância pode assumir o papel de indutor de linhas de pesquisa científica que respondam a questões prioritárias ou de emergência em saúde pública. Em contrapartida, a incorporação do conhecimento produzido subsidiará a atualização de recomendações técnicas e normatização de medidas de controle de riscos (WALDMAN; FREITAS, 2008). É neste contexto que se insere o presente estudo, que visa estudar a ecologia e epidemiologia das espécies do gênero *Cronobacter*, que são considerados patógenos emergentes de origem alimentar.

1.3 GÊNERO *Cronobacter*

1.3.1 Taxonomia

Cronobacter é um gênero bacteriano composto por bacilos Gram-negativos, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (IVERSEN et al, 2007a; IVERSEN et al, 2008a; JOSEPH et al, 2012a). Estes microrganismos foram originalmente classificados como *Enterobacter cloacae* produtor de pigmento amarelo, e posteriormente reclassificados como uma nova espécie denominada na época *Enterobacter sakazakii* (FARMER et al, 1980). Inicialmente, quando Farmer e colaboradores (1980) descreveram esta espécie, eles agruparam as 57 cepas estudadas em 15 biogrupos distintos baseados no perfil fenotípico das mesmas (Quadro 1). Posteriormente foi descrito um 16º biogrupo além de variações dentro dos biogrupos já descritos (IVERSEN et al, 2006). Recentemente, Huang e colaboradores (2015) identificaram quatro cepas que apresentaram fenótipos classificados em três biogrupos nunca antes descritos.

Quadro 1 - Perfil fenotípico dos biogrupos de *Cronobacter* spp.

Biogrupo	Variações	Fenótipo ¹											Espécies
		VP	VM	Nit	Orn	Mob	Ino	Dul	Ind	Malo	Gli	α-D-gli	
1		+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i>
2		+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i> , <i>C. dublinensis</i>
	2a	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	<i>C. malonaticus</i>
3		+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i>
4		+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i>
	4a	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i> , <i>C. malonaticus</i>
5		+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	<i>C. malonaticus</i> , <i>C. turicensis</i>
	5a	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	<i>C. malonaticus</i> , <i>C. sakazakii</i>
6		+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	<i>C. sakazakii</i> , <i>C. turicensis</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>C. dublinensis</i>
7		+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>C. sakazakii</i>
8		+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i>
	8a	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i> , <i>C. malonaticus</i>
	8b	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	<i>C. malonaticus</i>
	8c	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>C. malonaticus</i>
9		+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>C. malonaticus</i>
	9a	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>C. malonaticus</i>
10		+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	<i>C. sakazakii</i> , <i>C. dublinensis</i>
	10a	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	<i>C. condimentii</i>
11		+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i>
12		+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i> , <i>C. malonaticus</i> , <i>C. dublinensis</i>
13		-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i>
	13a	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i> , <i>C. malonaticus</i>
	13b	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	<i>C. malonaticus</i>
	13c	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>C. malonaticus</i>

14		+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	<i>C. malonaticus</i>
	14a	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	<i>C. sakazakii</i>
15		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>C. sakazakii</i> , <i>C. turicensis</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>C. dublinensis</i>
16		+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>C. turicensis</i>
	16a	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>C. universalis</i> , <i>C. turicensis</i>
	16b	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>C. turicensis</i>
	16c	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>C. universalis</i>
Desconhecido 1		+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>C. sakazakii</i>
Desconhecido 2		+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	<i>C. muytjensii</i>
Desconhecido 3		+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	<i>C. muytjensii</i>

¹-VP, Voges-Proskauer; VM, vermelho de metila; Nit, redução de nitrato; Orn, descarboxilação da ornitina; Mob, mobilidade a 37°C; Ino, produção de ácido a partir de inositol; Dul, produção de ácido a partir de dulcitol; Ind, produção de indol; Malo, utilização do malonato; Gli, produção de gás a partir da glicose; α-D-gli, produção de gás a partir do α-metil-D-glicopiranosídeo. fonte: (FARMER et al, 1980; IVERSEN et al, 2006; JOSEPH et al, 2012a, 2013; HUANG et al, 2015).

Em 2004, Iversen e colaboradores (2004a) realizaram um estudo da filogenia de *E. sakazakii* com relação às espécies de *Enterobacter* e *Citrobacter*. A comparação de sequências do gene 16S rRNA mostrou que a cepa tipo de *E. sakazakii* apresentou maior similaridade com a espécie *Citrobacter koseri* (97,8%) do que qualquer outra espécie de *Enterobacter*. Em adição, Lehner e colaboradores (2004), através da análise de sequências completas do gene 16S rRNA obtidas de isolados de diferentes origens, relataram a existência de duas linhagens filogeneticamente distintas dentro da espécie *E. sakazakii*. Posteriormente, Iversen e colaboradores (2006) realizaram uma análise filogenética baseados na análise de sequências parciais do gene 16S rRNA e na caracterização fenotípica de 189 cepas de *E. sakazakii*. Estes autores observaram que as cepas apresentavam quatro grupos filogeneticamente distintos.

Em 2007, uma extensa análise polifásica foi realizada utilizando 210 estirpes de *E. sakazakii* e 102 estirpes de outras espécies relacionadas. As cepas de *E. sakazakii* foram separadas em grupos a partir de perfis obtidos por amplificação de fragmentos polimórficos fluorescentes de ácido desoxirribonucléico (DNA), perfis de ribotipagem, análise de sequências gênicas completas de 16S rRNA e hibridização DNA-DNA. A hibridização DNA-DNA revelou cinco genomoespécies cujos perfis fenotípicos foram determinados. Assim, foi proposta a reclassificação do microrganismo *E. sakazakii*, dentro da família *Enterobacteriaceae*, como um novo gênero, *Cronobacter* spp., com quatro espécies, duas subespécies e uma genomoespécie, conforme relacionado a seguir: *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter turicensis* e *Cronobacter* genomoespecies 1 (IVERSEN et al, 2007a).

Em 2008, um novo estudo foi realizado por Iversen e colaboradores (2008a), utilizando-se as provas bioquímicas de utilização do malonato, produção de indol, os sistemas Biotype 100 (bioMérieux) e Biolog Phenotype MicroArray data (Biolog) e novos experimentos de hibridização DNA-DNA. A hibridização DNA-DNA mostrou que as cepas malonato-positivas dentro de *C. sakazakii* representavam na verdade uma espécie distinta, não uma subespécie, e mostrou que cepas fenotipicamente diferentes propostas como sendo de uma mesma espécie, *Cronobacter dublinensis* sp. nov., poderiam ser consideradas como subespécies. Desta forma, uma nova classificação foi proposta, compreendendo cinco espécies e uma genomoespécie: *C.*

sakazakii, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* e *C. genomoespecies 1*; e três subespécies, *C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* e *C. dublinensis* subsp. *lactaridi*.

Em 2012, uma reavaliação da classificação taxonômica de cinco estirpes; uma caracterizada como *C. sakazakii*, duas previamente identificadas como *C. genomoespecies 1*, e duas como *C. turicensis*; foi realizada utilizando uma análise polifásica, incluindo caracterização fenotípica, análise de sequências gênicas completas de 16S rRNA, *Multilocus sequence analysis* (MLSA) e hibridização DNA-DNA. Os autores observaram que a cepa previamente caracterizada como *C. sakazakii* formava uma linhagem filogenética independente e a hibridização DNA-DNA determinou sua identidade como uma nova espécie, denominada *Cronobacter condimentii*. Esta estirpe apresentou um perfil fenotípico único, sendo classificada posteriormente como biogrupo 10a (Quadro 1) (JOSEPH et al, 2013). Em adição, utilizando a técnica de MLSA, foi observado que as duas cepas de *C. genomoespecies 1* e as outras duas de *C. turicensis* apresentavam-se no mesmo grupo, formando uma linhagem filogenética independente. Os dados da hibridização DNA-DNA e caracterização fenotípica confirmaram que estas estirpes representavam uma única espécie, que foi denominada *Cronobacter universalis*.

1.3.2 Patogênese e fatores de virulência

As espécies de *Cronobacter* são consideradas patógenos oportunistas, tendo sido associadas a diversos casos de infecções em neonatos devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas (FID) (LAI, 2001; FAO/WHO, 2006; YAN et al, 2012). Os primeiros casos de infecção em neonatos foram reportados em 1958 na Inglaterra (URMENYI; FRANKLIN, 1961). Desde então, estas bactérias são reconhecidas como patógenos que causam infecções raras, mas com sérias consequências em neonatos em diversos locais no mundo (JASON, 2012).

As síndromes clínicas das infecções incluem a meningite, que pode levar a quadros de ventriculite, abscesso cerebral, hidrocefalia e formação de cistos; enterocolite necrosante caracterizada por necrose e pneumatose das células intestinais; além de infecções pulmonares, urinárias e bacteremia (LAI, 2001; JASON, 2012; STRYDOM et al, 2012). Inicialmente, a taxa de mortalidade nos casos de meningite variava de 40-80% e a maioria dos sobreviventes apresenta sequelas

graves, como: problemas no desenvolvimento do sistema motor, retardo mental e outros tipos de comprometimento neurológicos (LAI, 2001; FAO/WHO, 2004; BOWEN; BRADEN, 2006). Em um estudo recente, a letalidade nos casos de meningite, bacteremia, e enterocolite necrosante foi calculado em 41,9; 10,0 e 19,0%, respectivamente (FRIEDEMANN et al, 2009).

A meningite bacteriana em neonatos necessita de tratamento rápido e eficiente, levando a uma preocupação quanto à suscetibilidade a antimicrobianos nas infecções por *Cronobacter* spp. (LAI, 2001). A antibioticoterapia, utilizando ampicilina combinada à gentamicina ou cloranfenicol, é o procedimento adotado no tratamento inicial de suspeita de infecção por *Cronobacter* spp. Entretanto, vários autores têm relatado o desenvolvimento de resistência do microrganismo a essas drogas (LAI, 2001; BARREIRA et al, 2003; KIM et al, 2008; WARNKEN, 2010). Cepas resistentes a outros antimicrobianos como ceftazidima (BARREIRA et al, 2003), cefoxitina (KIM et al, 2008; WARNKEN, 2010), neomicina e trimetropim (EL-SHAROUND et al, 2009), cefalotina (WARNKEN, 2010), eritromicina e tetraciclina (HOCHERL et al, 2012), cefazolina (TSAI et al, 2013) e produtoras de β -lactamases (HO et al, 2005; CAUBILLA-BARRON et al, 2007; TOWNSEND et al, 2008) também já foram identificadas. Estes dados demonstram que existe variabilidade no perfil de resistência das cepas de *Cronobacter* spp., demonstrando a importância de se conhecer o perfil de resistência das espécies deste gênero, de forma a identificar as classes de antimicrobianos que apresentem ação rápida e eficiente no tratamento das infecções.

Devido à limitação de informações sobre a carga microbiana a qual os pacientes foram expostos, ainda não foi determinada uma curva dose-resposta para este patógeno (FAO/WHO, 2004). As infecções parecem ter uma dose infectante baixa e um período de incubação curto (BOWEN; BRADEN, 2006). Iversen e Forsythe (2003) consideram razoável estimar a dose infectante se encontre na faixa de 1.000 células/g ou mL. Contudo, para Farmer III (2015) o período de incubação e a dose infectante nos casos de meningite em neonatos e dos outros tipos de infecções causados por *Cronobacter* são desconhecidos. Devido às dificuldades técnicas será muito difícil determinar uma média e desvio-padrão do período de incubação e a dose infectante.

A severidade das infecções causadas por *Cronobacter* spp. tem chamado a atenção das Instituições de saúde e estudos extensivos relativos à virulência das

cepas deste gênero foram realizados. Pagotto e colaboradores (2003) descreveram a produção de compostos semelhantes à enterotoxinas em isolados de *Cronobacter* spp., enquanto Warnken (2010) identificou cepas capazes de produzir citotoxinas termo-lábeis e termo-estáveis. Alguns pesquisadores observaram que *Cronobacter* spp. pode formar biofilme em superfícies de metal, silicone, látex, policarbonato, vidro e cloreto de polivinil (IVERSEN et al., 2004b). Warnken (2010) estudou cepas de *Cronobacter* spp. que apresentaram atividade β -hemolítica em sangue de coelho, cavalo, e cobaio e α -hemolítica em sangue de carneiro; e algumas cepas que expressaram hemaglutininas associadas a pili tipo 1 e 3. A capacidade de produzir cápsula em ágar leite e produção de uma protease capaz de degradar a caseína do leite já foram descritas em cepas de *Cronobacter* spp. (CAUBILLA-BARRON et al, 2007; KOTHARY et al, 2007; WARNKEN, 2010).

Nair e Ventitanaratanan (2006) descreveram uma proteína de membrana externa A, codificada pelo gene *ompA* de *Cronobacter* spp., que é necessária para adesão da bactéria às células endoteliais do cérebro. Estudos relacionados à resposta inflamatória do hospedeiro, aderência e invasão celular com cepas de *Cronobacter* spp. foram realizados por Townsend e colaboradores (2007, 2008). Esses estudos mostraram que cepas de *Cronobacter* spp. podem persistir e se replicar em macrófagos, além de apresentarem moderada capacidade de aderência e invasão de células do endotélio humano. Hunter e colaboradores (2008) demonstraram, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que *Cronobacter* spp. adere ao epitélio intestinal durante o processo de infecção, induzindo à apoptose/necrose dessas células de uma forma dose-dependente.

1.3.3 Epidemiologia: surtos e casos de infecções

As infecções causadas por *Cronobacter* spp. em neonatos são raras e geralmente não são reportadas. A maioria dos casos de infecções descritos na literatura é proveniente de países desenvolvidos, enquanto que a situação parece ser radicalmente diferente nos demais países (BOWEN; BRADEN, 2006; FRIEDEMANN et al, 2009). Essa ambiguidade pode ser atribuída às diferenças socioculturais nas práticas de alimentação infantil, uma vez que o uso de FID na alimentação de neonatos é menos frequente em países em desenvolvimento (RAY et al, 2008). Além disso, muitos países não possuem um sistema de vigilância para

notificação dos casos de infecções por *Cronobacter* spp., o que leva a uma subestimação da sua real prevalência (STRYDOM et al, 2012). Isso porque muitos laboratórios clínicos, independentemente do país, não incluem a pesquisa de *Cronobacter* spp. na sua rotina e, na maioria dos casos, o relato das infecções por esses patógenos não é obrigatório. Desta forma, o conhecimento da epidemiologia das infecções causadas pelas espécies de *Cronobacter* spp. se torna incompleto (JOSEPH et al, 2012b; YAN et al, 2012).

Nem todas as cepas de *Cronobacter* spp. foram associadas a infecções, e a severidade da virulência varia entre as diferentes estirpes do gênero (FAO/WHO, 2008; WARNKEN, 2010; JOSEPH et al, 2012b). Até o momento, apenas três espécies foram isoladas em infecções neonatais: *C. sakazakii*, *C. malonaticus* e *C. turicensis* (JOSEPH; FORSYTHE, 2011; ASATO et al, 2013; HARIRI et al, 2013). *C. malonaticus* também parece estar associado a infecções em adultos (JOSEPH et al, 2012b). As espécies *C. muytjensii*, *C. dublinensis* e *C. universalis* já foram isoladas de sítios clínicos (FAO/WHO, 2008). A única estirpe da espécie *C. condimenti* foi isolada a partir de uma amostra de carne temperada (JOSEPH et al, 2012a) assim, pouco se conhece sobre esta espécie. Grim e colaboradores (2013) observaram que o gênero *Cronobacter* divergiu a partir de um ancestral comum em dois grupos distintos, um compreendendo as espécies *C. dublinensis* e *C. muytjensii*; e o outro as espécies *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. universalis* e *C. turicensis*. De acordo com os autores, as espécies de *C. dublinensis* e *C. muytjensii* contêm regiões genômicas importantes para sobrevivência em ambientes associados a vegetais, enquanto que as demais espécies apresentam numerosas sequências de genes associadas a fatores de virulência.

As infecções por *Cronobacter* spp. podem ocorrer em todas as faixas etárias e a literatura apresenta relatos de surtos e casos isolados de infecções em diversos países, inclusive no Brasil (OLIVEIRA et al, 1999; PESSOA-SILVA et al, 2000; BARREIRA et al, 2003; FAO/WHO, 2008; ASATO et al, 2013). Apesar das infecções estarem, a princípio, associadas a neonatos, já existem relatos de casos em crianças de maior idade (BOWEN; BRADEN, 2006; RAY et al, 2008) e em adultos (JIMENEZ; GIMENEZ, 1982; PRIBYL et al, 1985; LAI, 2001; BHAT et al, 2009; TSAI et al, 2013).

Em um estudo de revisão realizado por Bowen e Braden (2006), foram identificados 46 casos de infecção por *Cronobacter* spp. em crianças com menos de

12 meses de idade no período compreendido entre 1958 a 2005. Ray e colaboradores (2008) relataram um caso, ocorrido em 2002 na Índia, de septicemia fulminante e meningite em uma criança prematura. Os autores especularam que a contaminação por *Cronobacter* spp. foi devido a FID, contudo isso não pode ser comprovado pois não foram realizadas análises nas amostras utilizadas na alimentação da criança.

Dados do Reino Unido durante o período de 1999 a 2007 mostraram que a mais alta taxa de incidência de infecção por *Cronobacter* spp. foi atribuída à faixa etária de ≥ 75 anos (3,75 por milhão de indivíduos) seguida pela faixa de 65 a 74 anos (2,65 por milhão de indivíduos). A taxa de incidência em bebês foi apresentada como 2,45 e para crianças de 1 a 4 anos como 0,65 por milhão de indivíduos. Esses relatos sugerem que os idosos podem representar a população mais suscetível às infecções por *Cronobacter* spp. (KYNE, 2009). Gosney e colaboradores (2006) relataram o isolamento de *Cronobacter* spp. na cavidade oral de pacientes cometidos por acidente vascular cerebral e consideraram que o espessante contendo amido de milho, que era utilizado na alimentação destes pacientes, poderia ter sido a fonte de exposição destes indivíduos. Kim e colaboradores (2008) pesquisaram *Cronobacter* spp. em 1.146 amostras de fezes de indivíduos na Coreia com idade entre menos de 1 ano e mais de 70 anos de idade, e observaram maior prevalência do patógenos nas fezes dos idosos.

Patrick e colaboradores (2014) avaliaram a incidência de infecções por *Cronobacter* spp. nos EUA no período de 2003-2009. Os autores identificaram 544 casos com o maior percentual de infecções invasivas em crianças <5 anos de idade; e de infecções urinárias em adultos. A incidência das infecções foi calculada em 0,66 casos/100.000 habitantes, sendo indivíduos muito jovens e muito idosos os mais afetados.

O primeiro relato do isolamento de *Cronobacter* spp. de um adulto ocorreu na Espanha, onde o paciente apresentou um quadro de bacteremia (JIMENEZ; GIMENEZ, 1982). Posteriormente, Pribyl e colaboradores (1985) relataram a ocorrência de infecção por *Cronobacter* spp. associada a osteomielite em um adulto diabético dentre casos estudados no período de 1982 a 1985 em um hospital nos EUA. Lai (2001) relatou cinco casos de infecção nosocomial por *Cronobacter* spp., envolvendo uma criança e quatro adultos, ocorridos entre janeiro de 1995 a dezembro de 1996 nos EUA. See e colaboradores (2007) descreveram um caso de

infecção por *Cronobacter* spp. em uma paciente de 75 anos não imunodeficiente. Os autores especulam que a paciente já apresentava colonização oral pelo patógeno, o que resultou em quadro de pneumonia e complicação para abscesso esplênico. Em 2008, Bhat e colaboradores (2009) relataram um caso de infecção urinária causada por *Cronobacter* spp. em uma paciente de 63 anos com falência renal crônica. Segundo os autores, a paciente pode ter se contaminado com o patógeno por fontes ambientais. Tsai e colaboradores (2013) relataram quatro casos de infecção por *C. sakazakii* em pacientes adultos ocorrido entre 2002 a 2011 em Taiwan. Três destes apresentavam idade entre 64 e 77 anos e problemas de saúde (*diabetes mellitus*, câncer, e/ou tuberculose pulmonar). O quarto paciente era uma mulher de 37 anos que não apresentava nenhum problema de saúde prévio. A paciente apresentava um quadro de dor abdominal e foi identificada com colecistite aguda, sendo e *C. sakazakii* isolada a partir de uma amostra de bile.

O relato de infecções em crianças que não ingeriram FID e adultos indica que existem potenciais fontes de contaminação por *Cronobacter* spp. para estes grupos de indivíduos (YAN et al, 2012). Pacientes idosos ou que sofreram acidente vascular cerebral podem apresentar disfagia, tendo que recorrer à alimentação por alimentos semi-sólidos (ex., cereais, mingaus, suplementos protéicos, etc) como parte de sua dieta (GOSNEY et al, 2006; KYNE, 2009). A presença da bactéria na nasofaringe também é plausível, o que explica os casos de pneumonia e o isolamento em amostras escarro (HOLÝ & FORSYTHE, 2014).

Os epidemiologistas sugerem que as possíveis fontes de contaminação por *Cronobacter* spp. são: o ambiente doméstico (KILLER et al, 2015) e a ingestão de alimentos diversos (HOCHERL et al, 2012)) ou água de abastecimento (LIU et al, 2013) contendo o microrganismo. Desta forma, investigar a distribuição destes patógenos em diferentes classes de alimentos é importante para determinar possíveis rotas de transmissão e entender sua epidemiologia. Estudos desta natureza poderão contribuir positivamente na redução de riscos à saúde de indivíduos vulneráveis (TURCOCKSKÝ et al, 2011; HOCHERL et al, 2012; YAN et al, 2012).

1.3.3.1 Relatos de casos de infecções por *Cronobacter* spp. no Brasil

O primeiro relato de um surto de infecção por *Cronobacter* spp. ocorreu em 1997 entre os recém-nascidos de alto risco da Unidade de Neonatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (OLIVEIRA et al, 1999). Neste episódio, não houve uma investigação para determinar o veículo de contaminação destes pacientes.

Em 1998, sete episódios de septicemia causados por *Cronobacter* spp. foram identificados: dois em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) para adultos, um em uma UTI pediátrica e dois em uma UTI neonatal em quatro hospitais privados no Estado do Rio de Janeiro (SANTOS et al, 2000). O patógeno foi isolado do sangue periférico e identificado com uso do sistema Vitek. O veículo de contaminação identificado foi a solução de nutrição parenteral para crianças e neonatos; e a solução de lactato ringer contendo 5% de albumina para os adultos, uma vez que *Cronobacter* spp. foi identificado em bolsas fechadas destas suas soluções.

Em 2003, Barreira e colaboradores (2003) relataram um caso de infecção por *Cronobacter* spp. em uma menina de 14 dias de vida no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. A paciente apresentou quadro de meningite e evoluiu para choque séptico e posterior óbito, sendo o patógeno isolado a partir de uma amostra de liquor.

1.3.4 Regulação em alimentos

A Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) classificou *Cronobacter* spp. como “microrganismos de risco severo para populações restritas, que representam ameaça à vida ou desenvolvimento de sequelas crônicas ou de longa duração” (ICMSF, 2002).

Mesmo *Cronobacter* spp. podendo ser encontrado em uma série de produtos alimentícios, apenas FID foram epidemiologicamente identificadas como veículo de contaminação (CAC, 2008). A presença destes patógenos em FID acarretou no recolhimento destes produtos por diferentes produtores em diversos países, incluindo o Brasil (IBFAN, 2015). No caso mais recente, um lote de FID da marca “SANCOR BEBÉ 2” foi retirado do mercado em 14 de julho de 2015 na Argentina

devido às autoridades sanitárias do país terem detectado contaminação por *C. sakazakii* (ANMAT, 2015).

Diferente das fórmulas infantis líquidas que são prontas para o consumo, as FID não são produtos estéreis e podem ser facilmente contaminados. Mesmo com os avanços tecnológicos, ainda não foi possível desenvolver um método para produzir fórmulas em pó estéreis ou eliminar completamente os microrganismos potencialmente patogênicos. Logo, a garantia da sua segurança microbiológica requer uma forte adesão às boas práticas de higiene durante a produção e uso destas fórmulas (FAO/WHO, 2006, 2007).

Devido à emergência de uma questão de saúde pública que era a ocorrência de infecções severas em neonatos e crianças associadas ao consumo de FID contendo *Cronobacter* spp., a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (WHO) emitiram um relatório que recomendou a realização de estudos sobre a detecção e tipificação molecular de *Cronobacter* spp., além do desenvolvimento de pesquisas sobre a ecologia, taxonomia, virulência e outras características destes microrganismos que possibilitassem a redução de sua concentração nas fórmulas infantis reconstituídas (FAO/WHO, 2004). Concluiu-se então o perfil de risco de *Cronobacter* spp. e foi destacado que “*E. sakazakii* emergiu como perigo microbiológico em FID, causando infecções, apesar de não frequentes, em crianças, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunodeficientes, internados em hospitais”. Os lactantes (<12 meses de idade) foram identificados como a população em particular risco para infecções por *Cronobacter* spp. Dentro deste grupo, aqueles em maior risco são recém-nascidos (<28 dias), particularmente pré-termo, de baixo peso (<2.500 g), e lactantes imunodeficientes, e aqueles com menos de dois meses de idades. Neonatos cuja mãe é portadora da síndrome da imunodeficiência adquirida também estão em risco, porque eles necessitam especificamente de fórmulas infantis, podendo assim estar mais susceptíveis a infecção (FAO/WHO, 2004, 2006).

Em consequência, foi decidido que o Código de Práticas de Higiene para Fórmulas Infantis Desidratadas para Crianças do *Codex Alimentarius* deveria ser revisado, de forma a estabelecer critérios microbiológicos apropriados para *Cronobacter* spp. em FID e que métodos de detecção e de tipagem molecular deveriam ser desenvolvidos e internacionalmente validados. Em 2006, o *Codex Alimentarius*, a FAO e a WHO promoveram uma reunião técnica para avaliação de

dados científicos para aplicação de um modelo de análise de risco quantitativo para *Cronobacter* spp. em FID. Com base nessa avaliação, foi elaborado um manual sobre preparo, uso, manipulação e armazenamento de FID (FAO/WHO, 2007), além do início da revisão do Código de Práticas de Higiene para Fórmulas Infantis Desidratadas para Crianças.

Em 2008, foi adotado o Código de Prática de Higiene para fórmulas em pó para lactantes de primeira infância do *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 66 – 2008), que em seu Anexo I (Fórmulas infantis em pó para lactantes, fórmulas infantis em pó para lactantes com propósitos médicos especiais e fortificantes de leite humano) contempla *Cronobacter* spp. como um dos critérios conforme descrito no Quadro 2. Foi adotado um plano de duas classes, que é comumente utilizado para patógenos, onde o microrganismo não pode estar presente em nenhuma amostra analisada.

Quadro 2 – Critérios microbiológicos para fórmulas infantis em pó para lactantes, fórmulas infantis em pó para lactantes com propósitos médicos especiais e fortificantes de leite humano

Microrganismos	n	c	m	Plano de classe
<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.)	30	0	0/10 g	2
<i>Salmonella</i>	60	0	0/25 g	2

n- número de amostras que devem estar em conformidade com o critério; c- número máximo de unidades defeituosas da amostra em um plano de duas classes; m- limite microbiológico que, em um plano de duas classes, separa o produto com qualidade satisfatória do produto defeituoso. fonte: (CAC, 2008).

Na elaboração deste documento, houve intensa discussão sobre o Anexo II (Fórmulas de seguimento em pó e fórmulas para necessidades médicas especiais para crianças de primeira infância), especificamente relativo aos critérios microbiológicos para fórmulas infantis de seguimento para lactantes (FIS), deixando clara a divisão de opiniões entre os países membros do *Codex Alimentarius*. Algumas delegações declararam não haver justificativa científica para o estabelecimento de critério para *Cronobacter* spp. nesse tipo de produto, enquanto outras consideraram esse critério necessário devido ao relato de casos de infecção em crianças com até doze meses de idade. Então, a FAO/WHO elaboraram uma

consulta científica aos países sobre a questão, sendo formado um grupo de discussão eletrônica. Como decisão final, o limite para *Cronobacter* spp. não foi adotado para FIS. Entretanto, a Comissão decidiu que, em países com substancial população de bebês até doze meses com comprometimento imunológico, devem ser adotados para FIS os mesmos critérios para FIL de 0 a 6 meses.

O mesmo critério determinado pelo documento do *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 66 – 2008) já havia sido adotado desde de 2007 pela União Europeia para amostras de FIL em pó e alimentos lácteos desidratados com propósitos médicos especiais para lactantes com até seis meses de idade (COMMISSION REGULATION, 2007).

No Brasil, a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) n.º 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) que é legislação que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos atualmente em vigor, não contempla o padrão de pesquisa de *Cronobacter* spp. em nenhum grupo de alimentos. Logo, a RDC supracitada se encontra em desacordo com os critérios dispostos no Código de Prática de Higiene do *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 66 – 2008) para as FIL em pó, FIL em pó com propósitos médicos especiais e fortificantes de leite humano. A revisão da RDC n.º12/2001 é um dos assuntos prioritários da Agenda Regulatória Biênio 2015-2016 da Anvisa (Anvisa, 2015) e espera-se que o critério para *Cronobacter* spp. em FID seja contemplado nesta revisão.

Em 2011, a Anvisa publicou as RDC n.º 43, 44 e 45, que estabelecem o regulamento técnico para FIL; para FIS e crianças de primeira infância; e para FIL destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e FIS e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, respectivamente (BRASIL, 2011a,b,c). Nestas resoluções, foi adotado que os produtos devem cumprir o disposto no Código de Prática de Higiene para fórmulas em pó para lactantes e crianças de primeira infância do *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 66 – 2008) e suas atualizações e as Diretrizes para preparação, armazenamento e manipulação em condições higiênicas de preparações em pó para lactantes da FAO/WHO (2007). Além disso, as resoluções determinaram que os rótulos das fórmulas devem conter instruções claras de que o produto deve ser preparado com água fervida e posteriormente resfriada a temperatura não inferior a 70°C, para produtos que necessitam reconstituição, e instruções sobre a importância do consumo imediato da fórmula reconstituída e a informação de que, quando necessário o preparo com

antecedência do produto, a fórmula reconstituída deve ser refrigerada a uma temperatura inferior a 5 °C, por no máximo 24 h. Posteriormente, a Anvisa (2014a) publicou o Informe Técnico n.º 59, relativo a diluição de fórmulas infantis a temperatura de 70°C e risco de infecção por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), explicitando os motivos que levaram da adoção destas medidas de segurança. Essa medida acabou levantando diversos questionamentos por parte do setor produtivo, como: à possível perda de nutrientes termo-sensíveis, à eventual formação de grumos, o risco de queimaduras dos profissionais que preparam as fórmulas, à ativação de esporos de outras bactérias, à inviabilidade do uso de probióticos e à dificuldade de se mensurar a temperatura em questão. Desta forma, a fim de subsidiar e qualificar essa discussão, a Anvisa (2014b) realizou uma consulta aos especialistas no tema e ao setor produtivo, a fim de esclarecer algumas questões importantes a respeito do risco de infecção por *Cronobacter* spp. de lactantes maiores de seis meses. Como conclusão, a obrigatoriedade da rotulagem contendo as informações supracitadas foram mantidas e continuam atualmente em vigor.

Os critérios adotados pelo *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 66 – 2008) preconizam a ausência de qualquer espécie do gênero *Cronobacter* em FID (Quadro 2). Contudo, somente três espécies foram epidemiologicamente relacionadas a casos de infecções tendo FID como veículo de contaminação (JOSEPH et al, 2012b).

1.3.5 Métodos de isolamento/deteção de *Cronobacter* spp. a partir de alimentos

Após as investigações epidemiológicas terem identificado as FID como veículos de contaminação por *Cronobacter* spp. nos casos de infecções em neonatos, muitos estudos foram realizados de forma a se desenvolver métodos para deteção destes patógenos nestes produtos (DRUGGAN; IVERSEN, 2009).

O primeiro método desenvolvido para deteção de *Cronobacter* spp. em alimentos foi proposto por Muytjens e colaboradores (1988). Baseado neste procedimento, o FDA publicou em 2002 um método para isolamento e enumeração em FID (FDA, 2002). Contudo, este protocolo não era específico para *Cronobacter* spp. e necessitava de uma semana para identificação dos microrganismos. Além disso, o teste de produção de pigmento amarelo não era suficiente para deteção de

todas as cepas e o uso do API 20E na etapa de identificação poderia gerar resultados falso-positivos (RESTAINO et al, 2006; IVERSEN et al, 2007b).

A concentração de *Cronobacter* spp. em lotes de FID foi estimada a partir de dados da prevalência publicados na literatura e estudos não publicados que foram enviados a FAO/WHO (2006). Até este período, a concentração mínima e máxima era, respectivamente, -5,3 e -2,8 log Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g, com média de $-3,84 \pm 0,696$ log UFC/g.

Em 2006, a *International Organization for Standardization* (ISO) publicou a norma ISO/TS 22964, atualmente em vigor, para isolamento de *Cronobacter* spp. a partir de leite e produtos lácteos. Esta metodologia recomenda o uso de meios seletivos e específicos para o gênero *Cronobacter*. Contudo, vários relatos de cepas de *Cronobacter* que não apresentavam crescimento no caldo lauril sulfato de sódio modificado com vancomicina (mLST/v), que não produziam pigmento amarelo e novamente os resultados falso-positivos no kit de identificação API 20E demonstraram que esta metodologia não era confiável e precisava ser melhorada (RESTAINO et al, 2006; IVERSEN et al, 2007b; WARNKEN, 2010).

Devido aos problemas dos kits utilizados para identificação dos isolados e ao tempo para obtenção dos resultados, protocolos que utilizam a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do gênero *Cronobacter* spp. foram desenvolvidos. Estes mais diversos protocolos tiveram com alvos principais o gene responsável pela atividade 1,6 α -glicosidase (*gluA*) (LEHNER et al, 2006; IVERSEN et al, 2007b), o gene *ompA* que codifica uma proteína externa de membrana A (NAIR; VENKITANARAYANAN, 2006), o espaço intertranscricional entre os genes 16S e 23S rDNA (LIU et al, 2006), o gene 16S rRNA (HASSAN et al, 2007), o gene *zpx* que codifica uma metalloprotease (KOTHARY et al, 2007), entre outros. Contudo, alguns autores que avaliaram estes protocolos na identificação de cepas de *Cronobacter* spp. relataram resultados falso-positivos e/ou falso-negativos (CAWTHORN et al, 2008; JARADAT et al, 2009; JACKSON et al, 2014). Seo e Brackett (2005) desenvolveram um protocolo de PCR em tempo real (qPCR) com alvo no gene *dnaG*, presente no *operon* de síntese macromolecular, que codifica uma DNA primase envolvida na replicação inicial do cromossomo. De acordo com os autores que desenvolveram o protocolo de qPCR e estudos que utilizaram ou avaliaram este protocolo, ele apresenta 100% de sensibilidade para o gênero *Cronobacter* spp. (SEO; BRACKETT, 2005; IVERSEN et al, 2007b; LAMPEL; CHEN,

2009). Posteriormente, este procedimento foi adaptado por Warnken e colaboradores (2012) em um protocolo de PCR convencional, e apresentou os mesmos resultados de sensibilidade, sendo considerado uma boa alternativa para laboratórios que não possuam o equipamento para qPCR.

Devido às deficiências apontadas nos métodos internacionalmente reconhecidos que haviam sido publicados até o momento, novos estudos foram realizados com vistas a desenvolver métodos mais sensíveis e específicos para detecção de *Cronobacter* spp. (IVERSEN et al, 2007b; DRUGGAN; IVERSEN, 2009). Em 2009, um novo método para isolamento e detecção de *Cronobacter* spp. em FID foi proposto pelo FDA (LAMPEL; CHEN, 2009). Este método foi submetido a um estudo pré-colaborativo como um dos requisitos necessários para sua validação (CHEN et al, 2009). Posteriormente, o método foi aperfeiçoado e publicado com modificações (CHEN et al, 2010). Essa nova metodologia apresentava uma técnica de triagem rápida por qPCR e um método de cultivo através de um pré-enriquecimento em água peptonada tamponada (APT) por 24 h e isolamento em meios cromogênicos. A confirmação das culturas suspeitas seria realizada por qPCR ou com uso do Rapid ID 32E. O protocolo de qPCR desenvolvido por Seo e Brackett (2005) foi escolhido devido ao tempo de análise necessário para liberação de amostras negativas e a grande quantidade de relatos na literatura com resultados satisfatórios utilizando o protocolo. Posteriormente, um controle interno foi incluído na etapa de qPCR para evitar resultados falso-negativos devido a possível presença de inibidores da PCR provenientes da matriz alimentícia (CHEN et al, 2011). Em seguida, um novo estudo colaborativo foi realizado para avaliação do método e suas modificações. Neste estudo, o sistema semi-automatizado Vitek 2.0 foi incluído como uma alternativa para identificação bioquímica dos isolados e a validação foi finalizada (CHEN et al, 2012a). Desta forma, em janeiro de 2012, o FDA publicou oficialmente a metodologia para detecção/isolamento de *Cronobacter* spp. em fórmulas infantis como um capítulo do *Bacteriological Analytical Manual Online* (CHEN et al, 2012b).

Atualmente, já se encontra disponível um rascunho da metodologia ISO/DIS 22964, sendo agora esta denominada “Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.” (ISO, 2015). Nesta nova revisão, o escopo foi ampliado para produtos alimentícios e ingredientes para o consumo de humanos e animais; amostras ambientais de áreas de produção; e de manipuladores

de alimentos. O *Cronobacter Screening Broth* contendo vancomicina (CSB/v) foi incluído na etapa de enriquecimento seletivo em substituição ao mLST/v. A utilização do CSB/v foi comparada com a metodologia ISO/TS 22964 (2006) e obteve 100% de sensibilidade com a vantagem de permitir descarte de amostras que não contenham *Cronobacter* spp. após 48 h, reduzindo assim o tempo de análise e os gastos laboratoriais. O método utilizando CSB/v também demonstrou ser sensível para detecção do gênero *Cronobacter*, uma vez que foram isolados exemplares de diversas espécies (IVERSEN et al, 2008b).

1.3.6 Métodos para identificação das espécies de *Cronobacter*

Inicialmente, muitos pesquisadores utilizavam a classificação dos biogrupos e suas variações para identificação das espécies do gênero *Cronobacter*, uma vez que na época existia uma correlação entre os biogrupos e suas variações e as espécies de *Cronobacter* spp. Contudo, Joseph e colaboradores (2013) demonstraram que esta classificação não é mais confiável, uma vez que existem biogrupos que pertencem a mais de uma espécie e determinadas espécies, como *C. muytjensii* e *C. dublinensis*, não possuem nenhum biogrupo exclusivo. Os métodos moleculares demonstraram possuir maior acurácia para identificação das espécies do gênero.

A identificação das cepas de *Cronobacter* spp. a nível de espécie e perfil clonal é importante para a realização de estudos epidemiológicos. Os métodos de tipagem molecular permitem a comparação direta dos isolados nos casos de surtos, auxiliando no rastreamento das cepas até a origem da contaminação (TURCOVSKÝ et al, 2011).

A análise de sequências do gene 16S rRNA também era comumente utilizada, contudo essa técnica possui limitações devido à baixa diversidade na sequência em determinadas cepas, principalmente entre as espécies *C. sakazakii* e *C. malonaticus*, o que poderia levar a uma identificação errada destas bactérias (IVERSEN et al, 2008a; BALDWIN et al, 2009).

Um esquema de tipificação por *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) baseado no sequenciamento de sete genes *housekeeping*: *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB* e *pps* (concatenando 3.036 nucleotídeos) foi desenvolvido por Baldwin e colaboradores (2009), que permitiu uma identificação fidedigna das espécies do gênero *Cronobacter*, incluindo as espécies *C. sakazakii* e *C. malonaticus*. Contudo,

este procedimento é demorado em relação a outras técnicas de PCR desenvolvidas, por requerer múltiplas PCR e a etapa de sequenciamento para caracterização das estirpes.

Stoop e colaboradores (2009) desenvolveram uma PCR com alvo no gene *rpoB* para identificação das seis espécies de *Cronobacter* spp. propostas na época. Em adição, Lehner e colaboradores (2012) complementaram a técnica e descreveram iniciadores para identificação da espécie *C. condimentii*. O gene *rpoB* codifica a subunidade β da polimerase ribossomal bacteriana, que é reconhecida como marcador polimórfico e amplamente utilizado para identificação de bactérias. Contudo, Jackson e colaboradores (2014) reportaram que este protocolo não é mais confiável para correta identificação dos isolados de *Cronobacter*, pois cepas não-*Cronobacter* com atividade α -glicosidase positiva dos gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Franconibacter* e *Siccibacter* também apresentaram amplificação com determinados iniciadores, o que poderia levar a uma identificação errônea das cepas.

Huang e colaboradores (2013) desenvolveram um protocolo com alvo no gene *gyrB* para identificação das espécies *C. sakazakii* e *C. dublinensis*. Este gene codifica a subunidade B da proteína da DNA girase, uma topoisomerase tipo II, que possui papel crucial na replicação do DNA e é distribuída universalmente entre as espécies bacterianas.

Carter e colaboradores (2013) desenvolveram um protocolo de Multiplex-PCR (M-PCR) com alvo no gene *cgcA* que codifica a diguanilato ciclase para diferenciar as espécies de *Cronobacter* spp. com exceção da espécie *C. condimentii*. Estas técnicas parecem ser alternativas mais rápidas e menos dispendiosas para identificação das espécies de *Cronobacter* spp. Contudo já existe o relato de cepas de *C. sakazakii* e *C. dublinensis* que não possuem o gene *cgcA* ou as regiões gênicas do gene necessárias para a amplificação utilizando este protocolo (JACKSON et al, 2014).

Atualmente, um procedimento rápido e confiável para identificar as espécies de *Cronobacter* spp. é o uso da sequência do alelo *fusA*, uma vez que não foi observado um perfil do alelo *fusA* compartilhado entre duas ou mais espécies do gênero *Cronobacter* (JOSEPH et al, 2012b). Este gene já foi sequenciado em um grande número de cepas de *Cronobacter* spp. e as sequências são de livre acesso no banco de dados do MLST (<http://pubmlst.org/cronobacter/>).

1.3.7 Ocorrência em alimentos

Inicialmente o reservatório de *Cronobacter* spp. era considerado desconhecido (FAO/WHO, 2008). Atualmente, acredita-se que o nicho primário e maior reservatório destes microrganismos sejam os vegetais (SCHMID et al, 2009; JOSEPH et al, 2012b). Algumas características como a produção de pigmento amarelo, sideróforos e ácido acético indólico; sua habilidade de persistir em ambientes desidratados, solubilizar minerais fosfatados e colonizar tomates e raízes de milho indica a associação destes microrganismos com plantas (SCHMID et al, 2009). A presença de regiões no genoma de *Cronobacter* spp. contendo um *operon* de transporte de maltose e α -glicosidases que hidrolisam maltose também indica associação destas bactérias a nichos contendo vegetais, pois a maltose é um carboidrato presente somente em plantas, principalmente nos tecidos das sementes (GRIM et al, 2013). Além disso, na maioria dos estudos que pesquisaram o patógeno em diversas classes de produtos alimentícios, os produtos de origem vegetal são os que apresentam maior frequência de amostras positivas (JARADAT et al, 2009; MOLLOY et al, 2009; TURCOCKSKÝ et al, 2011; HOCHÉL et al, 2012; LEE et al, 2012; MOZROVÁ et al, 2014; GARBOWSKA et al, 2015; KILLER et al, 2015).

Cronobacter já foi isolada de uma série de produtos alimentícios, incluindo cereais, farináceos, legumes, ervas e condimentos, bebidas, frutas e hortaliças, carne e produtos cárneos, leite e laticínios, ovos e pescados; conforme visualizado num panorama global da ocorrência de *Cronobacter* spp. em diversas classes de alimentos em diferentes países apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Ocorrência de *Cronobacter* spp. em produtos alimentícios analisados no mundo.

País (Período)	Produtos (n.º de amostras analisadas)	Microrganismo(s)	Total de amostras positivas (%)	Referência
Áustria (Dezembro/2004- Outubro/2005)	Leite em pó - Produto pré-finalizado (237)	<i>Cronobacter</i> spp.	34 (14,3)	HEIN et al, 2009
	Leite em pó - Produto final pré-embalado (575)		22 (3,8)	
	Leite em pó - Produto final embalado (1120)		23 (2,1)	
África do Sul (NI ^a)	Fórmula infantil láctea em pó (50)	<i>Cronobacter</i> spp.	7 (14,0)	CAWTHORN et al, 2008
Eslováquia (2006-2009)	Condimentos (21)	<i>C. sakazakii</i> (n=11)	13 (61,9)	TURCOCKSKÝ et al, 2011
		<i>C. malonaticus</i> (n=1)		
		<i>C. muytjensii</i> (n=1)		
	Chá (5)	<i>C. sakazakii</i> (n=3)	3 (60,0)	
	Produtos de chocolate (37)	<i>C. sakazakii</i> (n=9)	11 (29,7)	
		<i>C. malonaticus</i> (n=2)		
	Pastéis (9)	<i>C. sakazakii</i> (n=4)	5 (55,5)	
		<i>C. malonaticus</i> (n=1)		
	Nozes (2)	<i>C. sakazakii</i> (n=2)	2 (100,0)	
	Sopas instantâneas (13)	<i>C. malonaticus</i> (n=1)	2 (15,4)	
<i>C. dublinensis</i> (n=1)				
Vegetais (12)	<i>C. sakazakii</i> (n=2)	5 (41,7)		
	<i>C. turicensis</i> (n=2)			
	<i>C. muytjensii</i> (n=1)			
Carne crua (64)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (1,6)		
Carne crua apimentada ou mareada (48)	<i>C. sakazakii</i> (n=14)	17 (35,4)		

		<i>C. malonaticus</i> (n=1)		
		<i>C. dublinensis</i> (n=1)		
		<i>Cronobacter</i> spp. (n=1)		
	Produtos cárneos prontos para o consumo (81)	<i>C. sakazakii</i> (n=7)	9 (11,1)	
		<i>C. malonaticus</i> (n=2)		
	Leite em pó e produtos derivados (55)	<i>C. malonaticus</i> (n=1)	1 (1,8)	
	Swab de carnes cruas (13)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (7,7)	
Bangladesh (NI)	Fórmula infantil desidratada (32)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (3,1)	HOQUE et al, 2010
China (NI)	Fórmula infantil (28); leite em pó (23); alimentos desidratados para crianças (19); cereais (11)	<i>Cronobacter</i> spp.	7 (8,6)	YE et al, 2008
China (NI)	Fórmula infantil 6-12 meses (81); 1-3 anos (81); 3-6 anos (81)	<i>Cronobacter</i> spp.	10 (4,1)	YE et al, 2009
China (NI)	Camarão desidratado (28)	<i>Cronobacter</i> spp.	3 (10,7)	YE et al, 2012
	Peixe seco (23)		2 (8,7)	
	Marisco seco (19)		1 (5,3)	
	Farinha de peixe seca (11)		2 (18,2)	
China (Dezembro/2011- Abril/2013)	Carne em conseva (200)	<i>Cronobacter</i> spp.	29 (14,5)	Xu et al, 2015
	Pratos vegetarianos com molho (31)		13 (41,9)	
	Macarrão com molho (22)		8 (36,4)	
	Arroz frito ou macarrão (27)		2 (7,4))	
Egito (NI)	Leite em pó desnatado (37)	<i>C. sakazakii</i> (n=5)	5 (13,5)	EL-SHAROUD et al, 2009
	Sahlab ^b (10)	<i>C. sakazakii</i> (n=4)	4 (40,0)	
	Fórmulas infantis lácteas desidratadas (35)	<i>C. sakazakii</i> (n=2)	2 (5,7)	
	Queijo fresco tipo Domiati (10)	<i>C. malonaticus</i> (n=4)	4 (40,0)	

Irlanda (NI)	Hambúrguer bovino (12)	<i>Cronobacter</i> spp.	3 (25)	MOLLOY et al, 2009
	Carne moída (1)		1 (100)	
	Hortaliças (6)		2 (33,3)	
	Cereais orgânicos (20)		9 (45)	
Jordânia (NI)	Alimentos infantis e leite em pó (69)	<i>Cronobacter</i> spp.	1 (1,4)	JARADAT et al, 2009
	Ervas e condimentos (67)		26 (89,6)	
República Tcheca (Janeiro- Dezembro/2010)	Leite em pó (20)	<i>C. sakazakii</i> (n=2)	2 (10)	HOCHERL et al, 2012
	Ovos (10)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (10)	
	Flocos de aveia (10)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (10)	
	Farinha de arroz (16)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	6 (37,5)	
		<i>C. malonaticus</i> (n=3)		
		<i>C. dublinensis</i> (n=2)		
	Broto de trigo (9)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (21,1)	
	Sopa instantânea de lentilha (10)	<i>C. sakazakii</i> (n=2)	6 (60)	
		<i>C. malonaticus</i> (n=4)		
	Lentilha (11)	<i>C. dublinensis</i> (n=1)	1 (9,1)	
	Tofu (11)	<i>C. sakazakii</i> (n=3)	4 (36,4)	
		<i>C. dublinensis</i> (n=1)		
	Manjericão (10)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	4 (40)	
		<i>C. muytjensii</i> (n=3)		
	Cominho (15)	<i>C. sakazakii</i> (n=2)	2 (13,3)	
	Gengibre (10)	<i>C. sakazakii</i> (n=2)	3 (30)	
		<i>C. malonaticus</i> (n=1)		
	Manjerona (12)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	2 (16,7)	
		<i>C. muytjensii</i> (n=1)		
	Pimenta (14)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (7,1)	
Pimentão (10)	<i>C. malonaticus</i> (n=2)	2 (20)		
Semente de papoula (11)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (9,1)		

	Semente de abóbora (11)	<i>C. sakazakii</i> (n=2) <i>C. malonaticus</i> (n=2) <i>C. turicensis</i> (n=1)	5 (45,4)	
	Semente de gergelim (12)	<i>C. sakazakii</i> (n=6) <i>C. malonaticus</i> (n=2)	8 (66,7)	
	Coco ralado (10)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (10)	
	Biscoito de coco (1)	<i>C. malonaticus</i> (n=1)	1 (100)	
República Tcheca (Outubro/2010- Outubro/2012)	Temperos (31)	<i>Cronobacter</i> spp.(n=6); <i>C. sakazakii</i> (n=1)	7 (22,6)	MOZROVÁ et al, 2014
	Chá instantâneo (6)	<i>Cronobacter</i> spp.(n=1); <i>C. sakazakii</i> (n=2)	3 (50,0)	
	Vegetais (45)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (2,2)	
	Sopas instantâneas (11)	<i>Cronobacter</i> spp.(n=2)	2 (18,2)	
	Doces e confeitos (40)	<i>C. sakazakii</i> (n=6)	6 (15,0)	
	Biscoitos e batatas fritas (22)	<i>C. sakazakii</i> (n=1)	1 (4,5)	
Síria (NI)	Temperos (60)	<i>Cronobacter</i> spp.	31 (51,7)	BELAL et al, 2013
	Plantas medicinais (68)	<i>Cronobacter</i> spp.	22 (32,4)	
	Alçaçuz (16)	<i>Cronobacter</i> spp.	15 (93,8)	
Turquia (NI)	Farinha de arroz (1)	<i>C. malonaticus</i> ST ^o 55(n=1)	1 (100,0)	CETINKAYA et al, 2013
	Farinha de centeio (1)	<i>C. sakazakii</i> ST58 e <i>C. universalis</i> ST51 (isolados da mesma amostra)	1 (100,0)	
	Farinha de aveia (1)	<i>C. sakazakii</i> ST1 e <i>C. sakazakii</i> ST52(isolados da mesma amostra)	1 (100,0)	
	Erva doce (1)	<i>C. sakazakii</i> ST13	1 (100,0)	

Coréia do Sul (Janeiro/2009- Janeiro/2010)	Produtos marinhos dessecados (40)	<i>C. sakazakii</i> (n=2)	3 (7,5)	CHON et al, 2012
		<i>C. universalis</i> (n=1)		
	Vegetais (10)	<i>C. sakazakii</i> (n=3)	3 (30,0)	
	Temperos e ervas (26)	<i>C. sakazakii</i> (n=4)	5 (19,2)	
	Grãos (39)	<i>C. dublinensis</i> (n=1)		
		<i>C. sakazakii</i> (n=6)	7 (17,9)	
		<i>C. dublinensis</i> (n=1)		
Europa (NI)	Cereais hidrolisados (24)	<i>Cronobacter</i> spp.(n=1)	1 (4,2)	SOLER et al, 2012
Polônia (NI)	Ervas (38)	<i>Cronobacter</i> spp.(n=9)	9 (23,7)	GARBOWSKA et al, 2015
	Misturas de temperos (16)	<i>Cronobacter</i> spp.(n=1)	1 (6,3)	

^a- não identificado; ^b- mistura desidratada contendo leite em pó desnatado, amido e amendoins que é reconstituído com água fervente e servido como bebida quente; ^c- Tipo Sequencial.

A grande prevalência de *Cronobacter* spp. em ervas e condimentos sugere que cuidados devem ser tomados com o preparo e utilização de remédios caseiros que contenham estas substâncias, que são geralmente utilizados para aliviar desconfortos gastrointestinais (JARADAT et al, 2009). Para indivíduos com o sistema imunológico debilitado, em particular neonatos, idosos e pessoas com doenças graves, a ocorrência de *Cronobacter* spp. em alimentos, principalmente nos prontos para o consumo, e no ambiente pode representar um risco (LAI, 2001; FRIEDEMANN, 2007; TURCOCKSKÝ et al, 2011). Além disso, determinados ingredientes derivados de vegetais que são adicionados às FID sem tratamento térmico, como flocos de laranja, de banana, lecitina e amido de arroz e trigo, têm sido apontados como potencial fonte de contaminação durante o preparo de fórmulas (FAO/WHO, 2006).

1.3.7.1 Prevalência no Brasil

Dados relativos à pesquisa de *Cronobacter* spp. em alimentos no Brasil ainda são limitados. A maioria dos trabalhos pesquisou o patógeno em amostras de alimentos desidratados destinados a crianças de primeira infância ou amostras de leite UHT, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Prevalência de *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos comercializados no Brasil.

Amostra	N.º positivo/total (%)	Ano da amostragem	Referência
Fórmula infantil para prematuros e recém-nascidos de baixo peso	3/14 (21,4)	2007	SANTOS, 2006; SANTOS et al, 2013
Fórmula infantil (0-6 meses)	3/45 (6,7)		
Fórmula de seguimento (6-12 meses)	8/33 (24,2)		
Fórmula infantil (até 1 ano)	0/6 (0)		
Amido em pó	4/7 (57,1)		
Leite UHT integral	0/3 (0)		
Fórmula infantil (0-6 meses)	0/4 (0)	2008	FREITAS et al, 2011
Fórmula infantil (6-12 meses)	0/7 (0)		
Alimento infantil à base de farinha de milho (6-36 meses)	4/8 (50,0)		
Alimento infantil à base de cereais de farinha de arroz (6-36 meses)	0/3 (0)		
Aveia em flocos (6-36 meses)	0/1 (0)		
Fórmula infantil (0-6 meses)	1/186 (0,5)	2008	PALCICH et al, 2009
Fórmula infantil (6-12 meses)	0/31 (0)	2009	CHAP et al, 2009
Alimento infantil à base de cereais variados	1/16 (6,3)	2015	MEIER et al, 2015
Alimento infantil à base de cereais de arroz	6/11 (54,5)		
Alimento infantil à base de cereais de milho	1/9 (11,1)		
Alimento infantil à base de cereais de aveia	2/2 (100,0)		
Farinha láctea	1/4 (25,0)		
Amido de milho	0/5 (0)		

Freitas e colaboradores (2011) também isolaram *Cronobacter* spp. em uma amostra de alimento infantil à base de farinha de milho destinado a crianças de 6-36 meses que já se encontrava reconstituído no momento da coleta. Contudo os autores identificaram o isolado apenas por provas bioquímicas convencionais e pelo kit API 20E e, atualmente, sabe-se que estas técnicas podem levar a resultados falso-positivos (IVERSEN et al, 2007b). *Cronobacter* spp. também já foi isolada de

amostras de crustáceos marinhos da espécie *Amphibalanus amphitrife* coletadas no estado de Pernambuco (FARRAPEIRA et al, 2010).

Quanto ao isolamento em amostras de ambientes de preparações de alimentação infantil, Palcich e colaboradores (2009) detectaram *Cronobacter* spp. no resíduo de uma mamadeira e em uma esponja utilizada para lavagem de mamadeiras provenientes de dois Hospitais Maternidade do Estado de São Paulo. Oliveira e colaboradores (2011) detectaram *Cronobacter* spp. em três amostras de enxágue de utensílios utilizados para o preparo de mamadeiras provenientes de uma mesma Maternidade da cidade de Belo Horizonte no Estado de Minas Gerais.

1.3.8 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

O protocolo de MLST utiliza uma base de dados que recebe, organiza, compara e disponibiliza informações sobre sequências de DNA de determinados genes-alvo para toda a comunidade científica. O objetivo desse sistema é prover a identificação precisa e de alta discriminação de determinados microrganismos. A grande vantagem desse sistema é que a diferença entre linhagens é indexada diretamente nas sequências de DNA. Como esses genes evoluem muito lentamente, se tornam ideais para estudos epidemiológicos e de identificação de longo prazo (COOPER; FEIL, 2004).

O MLST é considerado um método molecular eficiente e robusto para tipificação das cepas bacterianas e para monitoramento de surtos com alto nível de discriminação entre os isolados de *Cronobacter* spp. Este método apresenta grande potencial na identificação de grupos podendo rastrear surtos nacionais e internacionais de origem alimentar (JOSEPH et al, 2012b).

O banco de dados onde os perfis de MLST são depositados foi desenvolvido por Keith Jolley da Universidade de Oxford (JOLLEY et al, 2004) e pode ser acessado pelo link <http://pubmlst.org/cronobacter/>. Ele já conta com 1528 estirpes depositadas e 440 "Tipos Sequenciais" (ST) e 50 complexos clonais (CC) que agrupam ST com 4 ou mais alelos em comum (último acesso: 26/03/2016).

1.4 JUSTIFICATIVA

O INCQS tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos vinculados à Vigilância Sanitária. Logo, a implantação da metodologia de detecção/isolamento de *Cronobacter* spp. no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DM) do INCQS é de suma importância para que o país possua laboratórios pertencentes ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária aptos a realizar esse tipo de análise no caso de suspeita de contaminação de alimentos por estes patógenos.

Tendo em vista a extrema importância para a saúde pública em se minimizar os casos de infecções por *Cronobacter* spp. e com o surgimento de infecções em indivíduos de maior idade e/ou com algum tipo de imunossupressão, a determinação da ocorrência destes patógenos em alimentos no Brasil se faz necessária para investigar o potencial risco que eles representam.

A caracterização molecular para determinação das espécies e dos ST de *Cronobacter* spp. permitirá identificar as cepas circulantes em diferentes classes de alimentos no Brasil. Os dados obtidos neste estudo poderão ser utilizados para análise de risco destas bactérias em alimentos e pelas agências reguladoras como subsídio para futuras alterações nas legislações vigentes que regulam padrões microbiológicos em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar por técnicas fenotípicas e moleculares cepas de *Cronobacter* spp. isoladas de amostras de alimentos e de origem clínica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos;
- Avaliar três metodologias de isolamento de *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos diferentes de fórmulas infantis desidratadas;
- Identificar os biogrupos dos isolados de *Cronobacter* spp. através de provas bioquímicas convencionais;
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Cronobacter* spp. frente a antimicrobianos;
- Identificar as espécies dos isolados de *Cronobacter* spp. por diferentes protocolos de reação em cadeia pela polimerase (PCR) com alvo em genes distintos e comparar com o sequenciamento do gene *fusA*;
- Caracterizar genotipicamente as cepas de *Cronobacter* spp. pela técnica de *Multi Locus Sequencing Typing*;
- Analisar alimentos e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente cepas de *Cronobacter* spp. oriundas de um surto ocorrido em uma Hospital Maternidade na cidade de Teresina, Piauí.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

3.1.1 Amostras de alimentos obtidas no comércio

Um total de 150 amostras de alimentos foi analisado, sendo 30 de fórmulas infantis desidratadas para crianças de primeira infância de 0-6 meses (FIL), 30 de fórmulas infantis desidratadas de seguimento para crianças de primeira infância acima de 6 meses (FS), 30 de alimentos infantis para crianças de maior idade (AI), 30 de temperos e condimentos (TC) e 30 de produtos farináceos (FA) (Tabela 3).

As amostras foram coletadas de forma aleatória, em diferentes estabelecimentos comerciais (supermercados, drogarias, feiras-livres, entre outros) nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói do Estado do Rio de Janeiro no período de março/2013 a fevereiro/2014. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio durante o período de análises. Após a coleta, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente e enviadas ao Setor de Alimentos do INCQS/Fiocruz para realização dos ensaios.

A escolha dos alimentos analisados dentro de cada grupo foi baseada nos relatos da literatura referente a prevalência de *Cronobacter* spp. em alimentos em outros países (Tabela 1).

Tabela 3 - Grupos de produtos alimentícios analisados para pesquisa de *Cronobacter* spp.

Grupos de produtos alimentícios	Produto (n.º de amostras)	Código das amostras
Fórmula infantil para lactantes em pó (0-6 meses)	Fórmula infantil para lactantes em pó (FIL) (15)	FIL1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 16, 19, 20, 23, 26, 27, 28, 29
	FIL destinadas a necessidades dietoterápicas específicas à base de proteína de soja (5)	FIL3, 5, 22, 25, 30
	FIL destinadas a necessidades dietoterápicas específicas anti-regurtição (3)	FIL9, 11, 21
	FIL destinadas a necessidades dietoterápicas específicas sem lactose (4)	FIL12, 15, 17, 24
	FIL destinadas a necessidades dietoterápicas específicas hipoalergênicas (2)	FIL13, 14
Fórmula infantil de seguimento desidratada (>6 meses)	FIL destinada a necessidades dietoterápicas específicas sem lactose e à base de proteína de soja (1)	FIL18
	Fórmula infantil de seguimento para lactantes em pó (FS) (24)	FS1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 30
Alimentos infantis para crianças de primeira infância	FS destinadas a necessidades dietoterápicas específicas à base de proteína de soja (6)	FS8, 11, 16, 19, 24, 29
	Cereais e misturas à base de aveia (4)	AI1, 11, 14, 21
	Cereais e misturas à base de arroz (9)	AI2, 3, 6, 9, 12, 13, 17, 20, 26
	Cereais e misturas à base de milho (9)	AI4, 5, 10, 16, 22, 24, 28, 29, 30
	Farinha láctea (2)	AI7, 8
	Cereais e misturas à base de aveia e arroz (3)	AI15, 25, 27
Temperos e condimentos	Farinha de cereais de trigo, cevada e arroz (1)	AI18
	Mistura à base de amido de milho e farinha de arroz (1)	AI19
	Cereal à base de trigo, arroz, aveia, cevada e milho (1)	AI23
	Alçaçuz (1)	TC1
	Erva-doce (2)	TC2, 20

	Alecrim (1)	TC3
	Pimenta (5)	TC4, 14, 19, 21, 30
	Cravo da Índia em grãos (1)	TC5
	Canela em pó (2)	TC6, 22
	Manjeriçao (1)	TC7
	Camomila (1)	TC8
	Açafrão-da-terra (1)	TC9
	Louro em pó (1)	TC10
	Orégano (1)	TC11
	Picão - <i>Bidens pilosus</i> (1)	TC12
	Coentro em pó (1)	TC13
	Curry (1)	TC15
	Colorífero - mistura de fubá de milho e urucum (1)	TC16
	Páprica doce (1)	TC17
	Alho desidratado (1)	TC18
	Salsa desidratada (1)	TC23
	Tempero misto - mistura de cominho, pimenta do reino e louro (1)	TC24
	Tomilho em flocos (1)	TC25
	Gengibre moído (1)	TC26
	Cominho moído (1)	TC27
	Noz moscada (1)	TC28
	Tempero baiano - mistura de coentro, pimenta calabresa, cominho, páprica picante, pimenta do reino, cúrcuma, orégano (1)	TC29
Produtos farináceos	Fubá de milho (8)	FA1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 14
	Amido de milho (3)	FA6, 7, 8
	Farinha de milho (3)	FA10, 12, 13
	Farinha de linhaça (1)	FA15
	Farinha de mandioca (5)	FA16, 21, 23, 28, 29
	Farinha de rosca (6)	FA17, 18, 19, 20, 24, 30
	Trigo para quibe (1)	FA22
	Farinha de trigo (3)	FA25, 26, 27

3.1.2 Amostras de alimentos provenientes do surto ocorrido no hospital maternidade na cidade de Teresina-PI

Em 2013, um surto causado por *Cronobacter* spp. ocorreu em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina no Estado do Piauí (PI), Brasil. Neste episódio, amostras de alimentos ingeridos pelas pacientes coletadas pelo Lacen do Estado do Piauí foram enviados ao INCQS/Fiocruz para análises. Foram recebidas quatro amostras de alimentos: uma lata aberta contendo aproximadamente 343 g de fórmula infantil para recém-nascidos pré-termo e/ou de alto risco (amostra 1), uma lata aberta contendo aproximadamente 229 g de FIL de 0-6 meses (amostra 2), e duas garrafas de borosilicato contendo em cada 300 mL de leite humano pasteurizado de lotes diferentes (amostras 3 e 4). As amostras 1 e 2 foram mantidas em temperatura ambiente e as amostras 3 e 4 foram acondicionadas em freezer a temperatura de -20 ± 4 °C até o momento das análises.

3.2 MICRORGANISMOS

3.2.1 Cepas de referência

As cepas de referência *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578), *C. sakazakii* ATCC 12868 (INCQS 00580), *C. sakazakii* ATCC 29004 (INCQS 00115), *C. sakazakii* ATCC BAA-894 (INCQS 00583), *C. malonaticus* LMG 23826 (INCQS 00619), *C. muytjensii* ATCC 51329 (INCQS 00579), *C. universalis* NCTC 9529 (INCQS 00599), *C. turicensis* LMG 23827 (INCQS 00615), *C. dublinensis* subsp. *dublinensis* LMG 23823 (INCQS 00618), *C. dublinensis* subsp. *lactaridi* LMG 23825 (INCQS 00617), *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* LMG 23824 (INCQS 00616), *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (INCQS 00015) foram utilizados como controles nas diferentes etapas realizadas neste estudo. As cepas de referência foram oriundas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS).

3.2.2 Cepas provenientes do surto ocorrido na cidade de Teresina, PI

Três isolados clínicos (P4968, P4969 e P4970) provenientes do Lacen/PI foram enviados ao INCQS/Fiocruz. Estes isolados foram obtidos da hemocultura de três pacientes distintas do sexo feminino que apresentaram quadro de bacteremia durante o mesmo período em que estiveram internadas no hospital em 2013. Após o recebimento, as culturas foram avaliadas quanto a sua pureza em ágar Columbia (Merck, Alemanha) contendo 5% de sangue de carneiro incubado a 35°C/24 h e posteriormente foram estocadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI; Merck, Alemanha) contendo 20 % de glicerol (Merck, Alemanha) em ultrafreezer (Thermo, EUA) a temperatura inferior a -70°C. Para realização dos experimentos, uma alçada desta cultura foi semeada em caldo BHI e em ágar nutriente (Merck, Alemanha) e incubados a 35 °C/24 h.

3.2.2 Cepas provenientes da coleção biológica da Fundação Ezequiel Dias

Seis cepas identificadas como: 139, 140, 154, 157, 194 e 197 foram doadas pela coleção biológica da Fundação Ezequiel Dias (Funed) para este estudo. As cepas 139 e 140 foram isoladas de enxaguadura de bico de mamadeira, e as cepas 154, 157, 194 e 197 de amostras de leite em pó. Estes microrganismos foram submetidos aos ensaios de caracterização fenotípica e molecular e ao antibiograma.

3.2.3 Cepas isoladas de amostras de alimentos neste estudo

Quarenta e cinco cepas foram isoladas das amostras de alimentos e avaliadas neste estudo. As cepas foram depositadas na coleção de pesquisa da CMRVS com numeração P4773 a P4801 e P4483 a P4505.

3.3 DETECÇÃO/ISOLAMENTO A PARTIR DE FID

O processamento das amostras de FID obtidas no comércio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Chen e colaboradores (2012b). As cepas de *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) e de *Escherichia coli* ATCC 25922

(INCQS 00033) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas.

3.3.1 Processamento das amostras

Em condições assépticas, foram pesados 100 g da amostra em um frasco apropriado seguido da adição de 900 mL de APT (Merck, Alemanha). O frasco foi homogeneizado até que o pó estivesse totalmente suspenso na solução. O homogenato foi incubado em estufa bacteriológica (Fanem, Brasil) por 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, o enriquecimento foi homogeneizado e quatro alíquotas de 40 mL foram transferidas para quatro tubos de centrifugação com capacidade de 50 mL (Falcon, EUA). Os tubos foram centrifugados a 3.000 g/10 min (Eppendorf 5810R, A-4-81, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 μL de salina tamponada fosfatada. Duas alíquotas foram utilizadas para o ensaio de triagem pela qPCR e as outras duas foram utilizadas para o método de cultivo.

3.3.2 qPCR utilizado como triagem para detecção de *Cronobacter* spp.

3.3.2.1 *Extração de DNA*

A partir de duas alíquotas (item 3.3.1), 200 μL da suspensão de cada alíquota foram centrifugados a 3.000 g/5 min (Eppendorf 5418, FA-45-18-11, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 400 μL do reagente PrepMan Ultra® (Applied Biosystems, EUA) a cada microtubo. Estes foram homogeneizados em aparelho agitador de tubos (Ika, EUA) em velocidade máxima até a completa homogeneização do material. Posteriormente as amostras foram aquecidas em banho-seco (Boekel, EUA) a $100^\circ\text{C}/10$ min e resfriadas a temperatura ambiente por 2 min. O DNA extraído foi centrifugado a 15.000 g/2 min e uma alíquota de 50 μL do sobrenadante foi utilizada para qPCR.

3.3.2.2 Preparo das reações

Uma amostra de DNA extraído da cepa *C. sakazakii* ATCC 12868 (INCQS 00580) foi utilizada como controle positivo e água DNase/RNase livre (BioBasic, Canadá) como controle negativo. Foram realizadas diluições seriadas do DNA extraído da cepa *C. sakazakii* ATCC 12868 (INCQS 00580) para determinação do limite de detecção do qPCR. Os iniciadores, sonda para identificação de *Cronobacter* spp. e condições de amplificação estão descritos no Tabela 4.

As misturas das reações de amplificação foram preparadas e distribuídas em microplacas de 96 cavidades (Applied Biosystems, EUA) conforme descrito no Quadro 3.

Quadro 3 – Protocolo de amplificação da reação de qPCR para identificação de *Cronobacter* spp.

Reagentes[concentração]	Volume (µL)
Universal Master Mix [2X] ^a	12,5
CronoF [10 pmol/µL] ^b	1,0
CronoR [10 pmol/µL] ^b	1,0
CronoP [100 µM] ^a	0,075
DNA molde	2,0
Água DNase/RNase livre ^c	8,425
Volume total	25,0

^a- Applied Biosystems, EUA; ^b- Integrated DNA Technologies, EUA; ^c- BioBasic, Canadá.

A amplificação foi realizada em plataforma ABI Prism 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA). A fluorescência foi captada no final de cada etapa de anelamento.

Tabela 4 – Lista de iniciadores, sonda, genes-alvo, condições de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados utilizados neste estudo para identificação de gênero e das espécies de *Cronobacter*.

Gene alvo	Microrganismo alvo	Sequência de iniciadores e sondas	Condições de amplificação	Tamanho (pb)	Referência
<i>gluA</i>	<i>Cronobacter</i> spp.	EsAg5f: TATCAGATCTACCCGCGC EsAg5_5r: TTGATGCCAAGCTGTTGC	94 °C-2 min; 30x(94°C-30 s, 62°C-30 s, 72°C - 30 s); 72°C-5 min	105	IVERSEN et al, 2007
<i>dnaG</i>	<i>Cronobacter</i> spp.	CronoF: GGGATATTGTCCCCTGAAACAG CronoR: CGAGAATAAGCCGCGCATT CronoP: ^{6FAM} -AGAGTAGTAGTTGTAGAGGCC GTGCTTCCGAAAG- ^{TAMRA}	50°C-2 min; 95°C-3 min; 40x(95°C-15 s, 52°C-40 s, 72°C-15 s)	58	CHEN et al, 2012b
<i>rpoB</i>	<i>C. sakazakii</i> e <i>C. malonaticus</i>	Csakf: ACGCCAAGCCTATCTCCGCG Csakr: ACGGTTGGCGTCATCGTG	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 67°C-30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min	514	STOOP et al, 2009
	<i>C. malonaticus</i>	Cmalf: CGTCGTATCTCTGCTCTC Cmalr: AGGTTGGTGTTCGCCTGA	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 60°C-30 s, 72°C-30 s); 72°C-5 min	251	
	<i>C. turicensis</i> -	Cturf: CGGTAAAAGAGTTCTTCGGC Cturr: GTACCGCCACGTTTCGCC	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 61°C-30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min	628	
	<i>C. dublinensis</i>	Cdublf: GCACAAGCGTCGTATCTCC Cdublrr: TTGGCGTCATCGTGTTCC	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 62°C-30 s, 72°C-30 s); 72°C-5 min	418	
	<i>C. muytjensii</i>	Cmuyf: TGTCCGTGTATGCGCAGACC Cmuyr: TGTTTCGCACCCATCAATGCG	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 61°C-30 s, 72°C-30 s); 72°C-5 min	289	

	<i>C. universalis</i>	Cgenomf: ACAAACGTCGTATCTCTGCG Cgenomr: AGCACGTTCCATACCGGTC	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 61°C-30 s, 72°C-30 s); 72°C-5 min	506	
	<i>C. condimenti</i>	Ccon-f: AACGCCAAGCCAATCTCG Ccon-r: GTACCGCCACGTTTTGCT	95°C-2 min; 30x(95°C-1 min, 58°C-30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min	689	LEHNER et al, 2012
<i>cgcA</i>	<i>C. dublinensis</i>	Cdub-40F: GATACCTCTCTGGGCCGCGAGC Cdm-469R ^a : CCACATGGCCGATATGCACGCC	94°C-3 min; 25x(94°C-30 s, 58°C-30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min	430	CARTER et al, 2013
	<i>C. muytjensii</i>	Cmuy-209F: TTCTTCAGGCGGAGCTGACCT		260	
	<i>C. turicensis</i>	Cmstu-825F ^b : GGTGGCSGGGTATGACAAAGAC Ctur-1036R: TCGCCATCGAGTGCAGCGTAT		211	
	<i>C. universalis</i>	Cuni-1133R: GAAACAGGCTGTCCGGTCACG		308	
	<i>C. sakazakii</i>	Csak-1317R: GGCGGACGAAGCCTCAGAGAGT		492	
	<i>C. malonaticus</i>	Cmal-1410R:GGTGACCACACCTTCAGGCAGA		585	
<i>gyrB</i>	<i>C. sakazakii</i>	SpeCronsaka-F- AGGTAAAATCCACCAGCAAAC SpeCronsaka-R- CAGAATATCGTATTCAAACCTC	94°C-5 min; 30x(94°C/1 min, 62°C-1 min, 72°C-1,5 min);72°C-7 min	151	HUANG et al, 2012
	<i>C. dublinensis</i>	SpeCrondubl-F- CGCCTATCCACCCGAACATT SpeCrondubl-R- CGCRTCAGACGGGTTYTCCA	94°C-5 min; 20x(94°C-1 min, 67°C-1 min, 72°C-1,5 min); 72°C-7 min	404	

^a- O iniciador Cdm-469R é utilizado no M-PCR em conjunto com os iniciadores Cdub-40F e Cmuy-209F para identificar as cepas de *C. dublinensis* e *C. muytjensii*, respectivamente; ^b- O iniciador Cmstu-825F é utilizado no M-PCR em conjunto com os iniciadores Ctur-1036R, Cuni-1133R, Csak-1317R e Cmal-1410R para identificar as cepas de *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. sakazakii* e *C. malonaticus*, respectivamente. Fonte: (CARTER et al, 2013).

3.3.3 Isolamento

A partir de cada uma das outras duas alíquotas (item 3.3.1), 100 µL da suspensão foram uniformemente espalhados na superfície de uma placa de Petri contendo ágar Brilliance *Enterobacter sakazakii* formulação Druggan, Forsythe e Iversen (DFI; Oxoid, Inglaterra) e uma de ágar para plaqueamento de *Enterobacter sakazakii* (ESPM; R&F Products Inc., EUA) com auxílio de alça de Drigalsky descartável. Uma alçada da suspensão de células foi semeada, pela técnica de esgotamento, nos meios DFI, ESPM e, em adição, no ágar para isolamento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA; AES Chemunex, França). Mesmo o ESIA não sendo recomendado pela metodologia, este foi incluído e avaliado neste estudo por ser o meio cromogênico recomendando na metodologia ISO/TS 22964 (ISO, 2006). As placas de DFI e ESPM foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18 a 24 h e as de ESIA a 44 ± 2 °C por 24 h.

As colônias presuntivas de *Cronobacter* spp. no DFI se apresentam na coloração verde claro a escuras, ou verde amarronzadas. Algumas colônias apenas têm centro verde com borda branca ou amarela. No ágar ESPM as colônias suspeitas se apresentam com coloração azul a pretas, ou azul a cinza com no fundo vermelho do ágar. O fundo vermelho pode parecer vermelho arroxeadado com diferentes cepas ou sobre diferentes condições de luminosidade. As cepas de *Cronobacter* spp. não alteram a cor do ágar ESPM, mas na presença de uma flora acompanhante o que altera a cor do fundo para amarelo, as colônias de *Cronobacter* podem parecer verdes. As colônias típicas no ágar ESIA possuem tamanho de pequenas a médias (1 a 3 mm) com coloração verde a azul-esverdeadas. Colônias não-típicas são geralmente pouco transparentes e de coloração violeta.

As colônias características foram semeadas em ágar nutriente (BD, EUA) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h para realização dos ensaios posteriores.

3.3.4 Caracterização fenotípica de *Cronobacter* spp.

3.3.4.1 Sistema Vitek 2.0

As culturas crescidas no ágar nutriente (item 3.2.3) foram submetidas à confirmação com uso de cartões GN TEST KIT VTK2 (bioMérieux, EUA) do sistema

semi-automatizado Vitek 2.0 (bioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.4.2 *Provas bioquímicas adicionais para identificação dos biogrupos de Cronobacter spp.*

As cepas confirmadas como *Cronobacter* spp. no sistema Vitek 2.0 (item 3.3.4.1 e as cepas de origem clínica (item 3.2.2) foram cultivadas em ágar nutriente a 35°C/24 h e submetidas às provas bioquímicas convencionais descritas por Farmer e colaboradores (1980) e complementadas por Iversen e colaboradores (2006) para identificação dos biogrupos. Foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), descarboxilação da ornitina, mobilidade a 37 °C, produção de indol, utilização do malonato, utilização e produção de gás a partir da glicose, dulcitol, inositol e metil- α -D-glicopiranosídeo (MYP), e redução do nitrato a nitrito. A partir destes resultados, as cepas foram classificadas em seus respectivos biogrupos de acordo com o esquema descrito no Quadro 1.

3.3.5 Identificação de *Cronobacter* spp. por qPCR

3.3.5.1 *Extração e dosagem do DNA*

As cepas foram cultivadas em caldo BHI (Merck, Alemanha) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Posteriormente, foi realizada a extração de DNA com uso do kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em cada extração foi eluído um volume final de 100 μL . A concentração do DNA foi determinada em aparelho *NanoDrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific, EUA) e a pureza checada através de eletroforese em gel.

3.3.5.2 *Preparo das reações*

Dois microlitros do DNA de cada cepa foram utilizados como molde no qPCR, seguindo o procedimento descrito no item 3.3.2.

3.3.6 Identificação de *Cronobacter* spp. por PCR com alvo no gene *gluA*

O protocolo de PCR que amplifica um fragmento de 105 pares de base (pb) do gene *gluA* (IVERSEN et al, 2007b) foi aplicado as culturas suspeitas. Uma amostra de DNA extraído da cepa *C. sakazakii* ATCC 12868 (INCQS 00580) foi utilizada como controle positivo e água DNase/RNase livre (BioBasic, Canadá) como controle negativo.

3.3.6.1 Extração e dosagem do DNA

A extração e dosagem do DNA foi realizada conforme descrito no item 3.3.5.1.

3.3.6.2 Preparo das reações e análise dos produtos amplificados

As misturas das reações foram preparadas conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 – Protocolo de amplificação da PCR com alvo no gene *gluA*

Reagentes [concentração]	Volume (μL)
Tampão [10 X] ^a	2,5
MgCl ₂ [50 mM] ^a	1,0
dNTP [10 mM] ^a	0,25
Taq DNA Polimerase [5U/ μL] ^a	0,2
Iniciador EsAg5f [10 pmol/ μL] ^a	0,5
Iniciador EsAg5_5r [10 pmol/ μL] ^a	0,5
Água DNase/RNase livre ^b	18,55
DNA molde [5-20 ng]	1,5
Volume total	25,0

^a-Invitrogen, EUA; ^b- BioBasic, Canadá.

A amplificação foi realizada em aparelho *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems®, Singapore) de acordo com as condições descritas na Tabela 4.

Para análise dos produtos amplificados, 10 μL do produto foram acrescidos a 2 μL de tampão de aplicação corado (ANEXO A) e esta mistura submetida à

eletroforese (PowerPac Basic/Bio-Rad, EUA) em gel de agarose (Sigma, EUA) a 2,0% em tampão Tris-Acetato ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1X (TAE; Invitrogen, EUA) a 100 V/ 50 min. Como marcador de peso molecular foram utilizados 4 µL do peso *TrackIt™ 100 bp DNA Ladder* (Invitrogen, EUA). Posteriormente o gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL (Sigma, EUA) por 15 min e visualizado em analisador de imagens (GE Healthcare, Inglaterra).

3.4 DETECÇÃO/ISOLAMENTO A PARTIR DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS DIFERENTES DE FID

Na análise das amostras de alimentos diferentes de FID (Tabela 3) foi realizada uma etapa de pré-enriquecimento, seguido de um enriquecimento-seletivo utilizando três caldos distintos: o caldo de enriquecimento *Enterobacteriaceae* (EE; Acumedia, EUA), o mLST/v (Oxoid, CM1133, Inglaterra) contendo vancomicina (SR0247E, Oxoid, Inglaterra) e o CSB/v. O emprego desta etapa teve como objetivo eliminar a flora contaminante e favorecer o crescimento de *Cronobacter* spp. Como a literatura descreve a existência de cepas que são sensíveis a determinados componentes destes meios seletivos associados à temperatura de incubação (DRUGGAN; IVERSEN, 2009; WARNKEN, 2010), a utilização de três caldos visou aumentar a probabilidade de isolar cepas que apresentem este comportamento.

As cepas de *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578), *E. coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) e *S. aureus* ATCC 25923 (INCQS 00015) foram utilizadas como controles dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas.

3.4.1 Pré-enriquecimento

Vinte e cinco gramas da amostra foram pesados em um saco plástico estéril *Whirl-Pak® Bag* (Nasco, EUA) seguido da adição de 225 mL de APT e homogeneizado em aparelho *Stomacher®* (Seward, Fisher Scientific, Canadá) durante 60 s. O homogenato foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h.

3.4.2 Enriquecimento seletivo

Após o período de incubação, 10 mL do pré-enriquecimento foram adicionados a 90 mL de caldo EE que foi incubado a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Uma outra alíquota de 0,1 mL do pré-enriquecimento foi adicionada à 10 mL de caldo mLST/v que foi incubado a 44 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Outra alíquota de 0,1 mL do pré-enriquecimento foi adicionada a 10 mL do CSB/v que foi incubado a 42 ± 2 °C por 24 ± 2 h. As amostras que não apresentaram viragem do CSB/v para coloração amarela foram incubadas por mais 24 ± 2 h. As amostras que não apresentaram viragem do CSB/v após este período de incubação adicional foram consideradas negativas e não foram submetidas a etapa de isolamento.

3.4.3 Isolamento

Após o período de incubação dos caldos de enriquecimento seletivo, uma alçada (cerca de 10 µL) foi semeada, pela técnica de esgotamento, na superfície dos meios cromogênicos ESIA (incubado a 44 ± 2 °C / 24 ± 2 h), DFI e ESPM (incubados a 35 ± 2 °C / 24 ± 2 h).

3.4.4 Caracterização fenotípica de *Cronobacter* spp.

A identificação das culturas suspeitas foi realizada conforme descrito nos itens 3.3.4.1 e 3.3.4.2.

3.4.5 Identificação de *Cronobacter* spp. por qPCR

A identificação por qPCR foi realizada conforme descrito no item 3.3.5.

3.4.6 Identificação de *Cronobacter* spp. por PCR com alvo no gene *gluA*

A identificação por PCR com alvo no gene *gluA* foi realizada conforme descrito no item 3.3.6.

3.4.7 Avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos

Foi calculado o valor de sensibilidade e especificidade dos três métodos de isolamento de *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos diferentes de FID segundo Greenhalgh (1977). Amostras verdadeiro-positivas foram consideradas aquelas em que *Cronobacter* spp. foi isolada em pelo menos um dos três métodos e confirmadas pelo PCR com alvo no gene *gluA* (considerado neste estudo como método de referência para identificação de *Cronobacter* spp.). A sensibilidade foi definida como número de verdadeiro-positivos dividido pela soma de verdadeiro-positivos mais falso-negativos, expressos em percentual. A especificidade foi definida como o número de verdadeiro-negativos dividido pela soma de falso-positivos mais verdadeiro-negativos, expressos em percentual.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Cronobacter* spp. POR PCR

As espécies das cepas de *Cronobacter* spp. foram determinadas por diferentes protocolos de PCR. Foram aplicados: o protocolo com alvo no gene *rpoB* (STOOP et al, 2009; LEHNER et al, 2012) para identificação das espécies *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. universalis* e *C. condimenti*; o protocolo com alvo no gene *gyrB* (Huang et al, 2012) para identificação das espécies *C. sakazakii* e *C. dublinensis*; e o protocolo de M-PCR com alvo no gene *cgcA* (CARTER et al, 2013) para identificar as espécies *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. turicensis* e *C. universalis*.

O DNA extraído das cepas de referência de *Cronobacter* spp. (item 3.2) foi utilizado como controle positivo ou negativo nas reações específicas para cada espécie e água DNase/RNase livre como controle negativo em todas as reações. As reações foram realizadas em aparelho *SimpliAmp Thermal Cyclor* (Applied Biosystems®, Singapore).

3.5.1 Extração e dosagem do DNA

A extração e dosagem do DNA foi realizada conforme descrito no item 3.3.5.1.

3.5.2 PCR com alvo no gene *rpoB*

As condições de amplificação, iniciadores e tamanho dos fragmentos esperados estão descritos na Tabela 4. As misturas de reação foram preparadas conforme descrito no Quadro 5, utilizando os iniciadores específicos para cada espécie.

Quadro 5 – Protocolo de amplificação da PCR com alvo no gene *rpoB*.

Reagentes [concentração]	Volume (μL)
Tampão [10 X] ^a	2,5
MgCl ₂ [50 mM] ^a	0,75
dNTP [10 mM] ^a	0,5
Taq DNA Polimerase [5U/ μL] ^a	0,125
Iniciador senso [10 pmol/ μL] ^a	0,5
Iniciador antisenso [10 pmol/ μL] ^a	0,5
Água DNase/RNase livre ^b	17,625
DNA molde [5-20 ng]	2,5
Volume total	25,0

^a- Invitrogen, EUA; ^b- BioBasic, Canadá.

Como as espécies *C. sakazakii* e *C. malonaticus* apresentam amplificação com o uso dos iniciadores de *C. sakazakii*, gerando um fragmento de 514 pb, foi realizada uma segunda PCR utilizando os iniciadores de *C. malonaticus*, onde apenas as cepas da espécie *C. malonaticus* apresentam amplificação gerando um fragmento de 251 pb (Tabela 4).

A análise dos produtos amplificados foi realizada conforme descrito no item 3.3.6.2, sendo realizada em gel a 1,5% e a corrida a 80 V/ 70 min.

3.5.3 PCR com alvo no gene *gyrB*

Os isolados identificados como *C. sakazakii* e *C. dublinensis* no protocolo descrito anteriormente (item 3.5.2) foram submetidos a PCR com alvo no gene *gyrB*. As condições de amplificação, iniciadores e tamanho dos fragmentos esperados

estão descritos na Tabela 4. As misturas de reação foram preparadas utilizando os iniciadores específicos para cada espécie, conforme descrito no Quadro 6.

Quadro 6 – Protocolo de amplificação da PCR com alvo no gene *gyrB*.

Reagentes [concentração]	Volume (μL)
Tampão [10 X] ^a	2,5
MgCl ₂ [50 mM] ^a	0,75
dNTP [10 mM] ^a	0,5
Taq DNA Polimerase [5U/ μL] ^a	0,125
Iniciador senso [10 pmol/ μL] ^b	0,5
Iniciador antisenso [10 pmol/ μL] ^b	0,5
Água DNase/RNase livre ^c	17,625
DNA molde[5-20 ng]	2,5
Volume total	25,0

^a- Invitrogen, EUA; ^b- Integrated DNA Technologies, EUA; ^c- BioBasic, Canadá.

A análise dos produtos amplificados foi realizada conforme descrito no item 3.3.6.2, sendo realizada em gel a 1,5% e a corrida a 80 V/ 75 min

3.5.4 M-PCR com alvo no gene *cgcA*

Os iniciadores, condições de amplificação e tamanho dos fragmentos esperados na M-PCR estão descritos na Tabela 4. As misturas de reação foram preparadas conforme descrito no Quadro 7.

Quadro 7 – Protocolo de amplificação da M-PCR com alvo no gene *cgcA*.

Reagentes [concentração]	Volume (μL)
Tampão [10 X] ^a	5,0
MgCl ₂ [50 mM] ^a	1,5
dNTP [10 mM] ^a	1,0
Taq DNA Polimerase [5U/ μL] ^a	0,25
Iniciador Cdm-469R [10 pmol/ μL] ^a	0,5
Iniciador Cdub-40F [10 pmol/ μL] ^a	0,5

Iniciador Cmuy-209F [10 pmol/ μ L] ^a	0,5
IniciadorCmstu-825F[10 pmol/ μ L] ^a	0,5
IniciadorCtur-1036R [10 pmol/ μ L] ^a	0,5
IniciadorCuni-1133R [10 pmol/ μ L] ^a	0,5
IniciadorCsak-1317R [10 pmol/ μ L] ^a	0,5
IniciadorCmal-1410R [10 pmol/ μ L] ^a	0,5
Água <i>DNAse/RNAse</i> livre ^b	8,25
DNA molde[5-20 ng]	5,0
Volume total	25,0

^a- Invitrogen, EUA; ^b- BioBasic, Ontario, Canadá.

A análise dos produtos amplificados foi realizada conforme descrito no item 3.3.6.2, sendo realizada em gel a 1,5% e a corrida a 100 V/ 60 min.

3.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE *Cronobacter* spp. POR MLST

Foi realizada a caracterização de sete genes *housekeeping* (*atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB* e *pps*) das cepas de *Cronobacter* spp. conforme o protocolo disponível no banco de dados online com acesso em <http://pubmlst.org/cronobacter/>. Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação e de sequenciamento estão descritos no Quadro 8.

Quadro 8 - Iniciadores utilizados nos protocolos de amplificação dos genes do MLST.

Gene	Direção	Amplificação(5'-3')	Sequenciamento(5'-3')
<i>atpD</i>	Senso	CGA CAT GAA AGG CGA CAT	CGA AAT GAC CGA CTC CAA
	Antisenso	TTA AAG CCA CGG ATG GTG	GGA TGG CGA TGA TGT CTT
<i>fusA</i>	Senso	GAA ACC GTA TGG CGT CAG	GCT GGA TGC GGT AAT TGA
	Antisenso	AGA ACC GAA GTG CAG ACG	CCC ATA CCA GCG ATG ATG
<i>glnS</i>	Senso	GCA TCT ACC CGA TGT ACG	GGG TGC TGG ATA ACA TCA
	Antisenso	TTG GCA CGC TGA ACA GAC	CTT GTT GGC TTC TTC ACG
<i>gltB</i>	Senso	CAT CTC GAC CAT CGC TTC	GCG AAT ACC ACG CCT ACA
	Antisenso	CAG CAC TTC CAC CAG CTC	GCG TAT TTC ACG GAG GAG
<i>gyrB</i>	Senso	TGC ACC ACA TGG TAT TCG	CTC GCG GGT CAC TGT AAA
	Antisenso	CAC CGG TCA CAA ACT CGT	ACG CCG ATA CCG TCT TTT
<i>infB</i>	Senso	GAA GAA GCG GTA ATG AGC	TGA CCA CGG TAA AAC CTC
	Antisenso	CGA TAC CAC ATT CCA TGC	GGA CCA CGA CCT TTA TCC

<i>pps</i>	Senso Antisenso	GTC CAA CAA TGG CTC GTC CAG ACT CAG CCA GGT TTG	ACC CTG ACG AAT TCT ACG CAG ATC CGG CAT GGT ATC
------------	--------------------	--	--

fonte: (<http://pubmlst.org/cronobacter/>)

3.6.1 Extração e dosagem do DNA

A extração e a dosagem do DNA foram realizadas conforme descrito no item 3.3.5.1.

3.6.2 Reação de amplificação

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 50 μ L utilizando-se os iniciadores específicos para cada gene (Quadro 8). A mistura de reação foi realizada conforme descrito no Quadro 9.

Quadro 9 – Protocolo de amplificação da PCR com alvo nos genes do MLST.

Reagentes [concentração]	Volume (μ L)
Tampão [10 X] ^a	5,0
MgCl ₂ [50 mM] ^a	1,5
dNTP [10 mM] ^a	1,0
Iniciador senso [10 pmol/ μ L] ^a	2,0
Iniciador antisenso [10 pmol/ μ L] ^a	2,0
Taq DNA Polimerase [5U/ μ L] ^a	0,25
Água DNase/RNase livre ^b	34,25
DNA molde [5-20 ng/ μ L] ^a	4,0
Volume total	50,0

^a-Invitrogen, EUA; ^b- BioBasic, Canadá.

As misturas de reação foram acondicionadas em aparelho termociclador e submetidas ao programa de: desnaturação inicial a 96°C/1 min; seguido de 30 ciclos de 96°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/2 min; e extensão final a 72°C/5 min.

3.6.3 Purificação dos produtos amplificados

Os produtos da reação de amplificação foram purificados com uso do kit EXOSAP (Thermo Fischer, EUA) segundo as instruções do fabricante.

As misturas de reação foram preparadas em microplacas de 96 cavidades conforme descrito no Quadro 10.

Quadro 10 – Protocolo de purificação dos produtos amplificados pela PCR.

Reagentes [concentração]	Volume (µL)
EXOSAP ^a	1,5
Fosfatase alcalina ^a	3,0
Produto amplificado	15,0
Volume total	19,5

^a-ThermoScientific, EUA

A placa foi acondicionada em aparelho termociclador e submetida ao programa de: 37°C/15 min seguido de 80°C/15 min.

3.6.4 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *Big Dye® Terminator Direct Sequencing v3.1* (Applied Biosystems, EUA) e os iniciadores específicos para o sequenciamento de cada gene (Quadro 8). As misturas de reação foram preparadas em microplacas de 96 cavidades conforme descrito no Quadro 11.

Quadro 11 – Protocolo da reação de sequenciamento dos genes do MLST.

Reagentes [concentração]	Volume (µL)
Tampão [5X] ^a	1,5
Iniciador ^b	2,0
Big Dye ^a	1,0
Produto amplificado	5,5
Volume total	10,0

^a- Applied Biosystems, EUA; ^b-Invitrogen, EUA.

A placa acondicionada em aparelho termociclador e submetida ao programa de 40 ciclos: 94°C/10 s, 50°C/5 s e 60°C/4 min.

3.6.5 Precipitação

A cada poço da placa foram adicionados 30 µL de isopropanol 75% (ANEXO A). A placa foi vedada com microfilme (Applied Biosystems, EUA) e centrifugada a 1000 rpm /10 s (Spinlab, Mini-Plate Centrifuge, Mini-P25, EUA). Posteriormente, a placa foi mantida em repouso sob abrigo de luz por 15 min e centrifugada a 4000 rpm/ 45 min (BOECO Germany, U32-R, Alemanha). O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 50 µL de etanol 75% (ANEXO A) em cada poço. A placa foi vedada e centrifugada a 4000 rpm/ 15 min. O sobrenadante foi desprezado e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 1- 2 h ao abrigo de luz. Posteriormente, a placa foi vedada e mantida em freezer a temperatura de $-20 \pm 4^{\circ}\text{C}$.

3.6.6 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar foi realizada pela Plataforma-PDTIS de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz utilizando o Sequenciador Automático *ABI Prism 3730XL GeneticAnalyzer* (Applied Biosystems, EUA) segundo o protocolo descrito por Otto e colaboradores (2008).

3.6.7 *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA)

As sequências obtidas dos sete genes foram submetidas ao banco de dados de MLST de *Cronobacter* spp. para a determinação dos alelos. As sequências que não apresentarem 100% de similaridade com alelos já depositados foram submetidas ao curador do banco para a designação de novos alelos. A partir da combinação dos sete alelos foi determinado o ST e o CC, quando existente, das cepas de *Cronobacter* spp.

3.6.8 Identificação das espécies de *Cronobacter* spp. através da análise da sequência do gene *fusA*

Para identificar as espécies de *Cronobacter* spp. das cepas avaliadas neste estudo, as sequências do gene *fusA* foram alinhadas com as sequências correspondentes de *Cronobacter* spp. de livre acesso do banco de dados (www.pubMLST.org/cronobacter). A análise das sequências (438 pb) foi realizada utilizando o algoritmo *ClustalW* do programa BioEdit 7.09 (Informer Technologies Inc., Shingle Springs, CA, EUA) (HALL, 1999), seguido de análise utilizando o *maximum likelihood algorithm* do programa MEGA 6 (versão 6.06) (TAMURA et al, 2013) com 1000 *bootstrap replicates* e o programa SplitsTree4 (Center for Bioinformatics, Tübingen University, Alemanha) (HUSON; BRYANT, 2006).

3.6.9 Análise filogenética dos isolados de *Cronobacter* spp.

As sequências dos genes do MLST foram concatenadas (3.036 pb) e analisadas utilizando o *maximum likelihood algorithm* do programa MEGA 6 (versão 6.06) (TAMURA et al, 2013) com 1000 *bootstrap replicates*. O programa SplitsTree4 (Center for Bioinformatics, Tübingen University, Alemanha) (HUSON; BRYANT, 2006) também foi aplicado para avaliação da população de cepas de *Cronobacter* spp. estudadas.

Em adição, foi realizada a análise dos ST identificados neste estudo por local de origem através da *Minimum spanning tree* (MST) com uso do programa BioNumerics 6.6 versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

3.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS CEPAS DE *Cronobacter* spp.

A determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das cepas de *Cronobacter* spp. foi realizada pelo método de difusão (Kirby-Bauer) em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, CM0337, Inglaterra) seguindo os critérios do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foram testados os antimicrobianos (produzidos por BIO-RAD Laboratories Inc, França) recomendados para avaliação de cepas da família Enterobacteriaceae listados a seguir nas seguintes

concentrações: ampicilina-sulbactam (SAM; 10/10 µg), amoxicilina-clavulanato (AMC; 20/10 µg), piperacilina-tazobactam (PPT; 100/10 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), cefuroxima (CRX; 30 µg), meropenem (MER; 10 µg), gentamicina (GEN; 10 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg) e trimetoprim-sulfametoxazola (SXT; 1,25/23,75 µg). O diâmetro da zona de inibição foi mensurado e as cepas classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes de acordo com as recomendações do CLSI (2015).

3.8 INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE *Cronobacter* spp. OCORRIDO NO HOSPITAL MATERNIDADE DA CIDADE DE TERESINA-PI

3.8.1 Análises microbiológicas

A pesquisa de *Cronobacter* spp. nas amostras de alimentos ingeridas pelas pacientes foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Chen e colaboradores (2012b) (item 3.3) e de acordo com a metodologia ISO/TS 22964:2006 (ISO, 2006), que consiste na combinação de enriquecimento em APT, pré-enriquecimento em mLST/v e isolamento em ESIA conforme descrito no item 3.4. Nas amostras 1 e 2, foi analisado todo o conteúdo da lata, sendo a amostra 1 dividida em quatro alíquotas (três de 100 g e uma de 43 g) e a amostra 2 em três alíquotas (duas de 100 g e uma de 29 g). Nas amostras 3 e 4 foi analisado uma alíquota de 50 mL de cada amostra.

3.8.2 Caracterização fenotípica dos isolados clínicos

As cepas de origem clínica oriundas do surto de toxinfecção alimentar (item 3.2.2) foram submetidas aos ensaios fenotípicos descritos no item 3.3.4 e foi avaliado o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos conforme descrito no item 3.7.

3.8.3 Caracterização molecular dos isolados clínicos

As cepas de origem clínica recebidas (item 3.2.2) foram submetidas aos ensaios moleculares descritos nos itens 3.3.2, 3.3.6, 3.4.6, 3.5 e 3.6.

Em adição as cepas foram submetidas à avaliação do polimorfismo genético por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de acordo com o protocolo *Pulsenet* (NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, 2004), com algumas modificações. O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose (1% *Seaken Gold Agarose*) com 1% dodecil sulfato de sódio. Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano em fase exponencial foi suspensa em tampão BSC (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8,0) para a obtenção da turvação correspondente a 3,0 da escala de McFarland ($9,0 \times 10^8$ /mL). A 500 μ L da suspensão de células, foi adicionado volume igual de agarose *low melting* (1,1 % *Seaken Gold Agarose*) na temperatura de 50°C e 0,5 μ L de proteinase K (Sigma, EUA). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos, contendo 2 mL de solução de lise (Tris-HCl 50 mM: 50 mM EDTA, pH 8,0 + sarcosil a 1%) e 0,5 μ L de proteinase K e foram incubados a 50°C/2 h. Em seguida, o tampão foi retirado e os blocos lavados três vezes com 10 mL de água Milli-Q por 15 min a 50°C e uma vez com tampão Tris-EDTA nas mesmas condições. Os blocos foram incubados com 10 U da enzima de restrição *SpeI* (Sigma, EUA) durante 2 h a 37°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose à 1% preparado em tampão Tris-EDTA através da eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, EUA). A eletroforese foi realizada nas condições descritas por Brengi e colaboradores (2012): tempo de pulso crescente de 1,8 a 25 s, por 18 h a 6V/cm, a 14°C, com ângulo de 120°. Após a corrida os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL), observados e fotografados no *ImageQuant 300 Imager* (GE Healthcare, Inglaterra). A análise dos genótipos foi realizada através de inspeção visual dos géis de agarose com base nos critérios estabelecidos por Tenover e colaboradores (1995). Os resultados obtidos foram analisados através de dendrogramas confeccionados a partir da análise da foto do gel no *software* Gel Compar II versão 4.0.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FID

Nenhuma amostra de FID analisada apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. Todas as amostras apresentaram resultado negativo no qPCR utilizado como triagem. Contudo, visando avaliar este procedimento, as amostras foram plaqueadas e submetidas à etapa de isolamento. Após o plaqueamento, as amostras de FIS não apresentaram crescimento de colônias em nenhum dos meios cromogênicos utilizados e dentre as amostras de FIL, apenas uma amostra (FIL21) apresentou colônias características (atividade α -glicosidase positiva) nos três meios cromogênicos. Contudo, as colônias suspeitas selecionadas não foram confirmadas como *Cronobacter* spp. tanto com o uso do Vitek 2.0 como pela PCR com alvo no gene *gluA* e qPCR. O sistema Vitek 2.0 identificou as culturas suspeitas como: *Pantoea* spp. (Muito Boa Identificação - 93% - Bionúmero 4607730450720010). A única prova que contradiz o perfil de identificação da cepa como *Pantoea* spp. é a atividade α -glicosidase, que é exatamente o marcador utilizado nos meios cromogênicos.

4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS DIFERENTES DE FID

4.2.1. Ocorrência de *Cronobacter* spp.

A ocorrência de *Cronobacter* spp. nas amostras de alimentos diferentes de FID analisadas está descrita na Tabela 5. Das 90 amostras analisadas foi detectada a presença de *Cronobacter* spp. em 38 (42,2%). A maior ocorrência foi observada em produtos farináceos (66,7%), seguido das amostras de temperos e condimentos (36,7%) e de alimentos infantis para crianças de maior idade (23,3%). Foram isoladas quatro espécies distintas de *Cronobacter* spp., sendo a maior ocorrência da espécie *C. sakazakii* nos três grupos de alimentos analisados.

Tabela 5 – Ocorrência das espécies de *Cronobacter* nos alimentos comercializados analisados.

Grupo de alimentos (n.º amostras analisadas)	N.º de amostras positivas (identificação) [%]	Espécies isoladas ^a (identificação da amostra) [%]			
		<i>C. sakazakii</i>	<i>C.malonaticus</i>	<i>C. dublinensis</i>	<i>C.muytjensii</i>
Alimentos infantis para crianças de maior idade (30)	7 (AI2, 4, 5, 6, 7, 13, 25) [23,3]	7 (AI2, 4, 5, 6, 7, 13, 25) [23,3]	1 (AI13) [3,3]	ND ^a [0]	ND [0]
Temperos e condimentos (30)	11 (TC2, 4, 7, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28, 29) [36,7%]	8 (TC4, 16, 21, 24, 26, 27, 28, 29) [26,7]	1 (TC7) [3,3]	1 (TC15) [3,3]	2 (TC2, 27) [6,7]
Produtos farináceos (30)	20 (FA1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 29) [66,7]	18 (FA1, 2, 3, 4, 5, 9, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 29)	1 (FA16) [3,3]	3 (FA11, 15, 16) [10,0]	ND [0]
Total (90)	38 [42,2]	33 [36,7]	3 [3,3]	4 [4,4]	2 [2,2]

^a- não detectada.

4.2.2. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos

Os resultados da sensibilidade e da especificidade de cada caldo utilizado no enriquecimento seletivo associado aos diferentes ágaros cromogênicos para isolamento estão apresentados na Tabela 6. Para as amostras de alimentos infantis para crianças de maior idade, a sensibilidade para todas as combinações foi de 85,7%, pois os caldos EE e mLST/v não detectaram a amostra positiva AI5 e o CSB/v não detectou a amostra positiva AI25. Os resultados de especificidade variaram de 86,9 a 95,7% (Tabela 6) com a combinação do caldo EE e DFI provendo o pior resultado. A sensibilidade dos métodos para análise de temperos e condimentos variou de 72,7 a 100,0%. O caldo EE em combinação com o ESIA falhou na detecção de duas amostras positivas (TC7 e TC28) e três amostras positivas em combinação com DFI (TC4, TC7 e TC28) e com ESPM (TC26, TC28 e TC29). O caldo mLST/v não detectou a amostra positiva TC28 em combinação com todos os ágaros, a amostra TC7 com DFI e TC29 com ESPM. O CBS/v apresentou 100,0% de sensibilidade em combinação com ESIA e DFI e 90,9% com ESPM (não detectou amostra TC28). A especificidade variou de 73,7 a 89,5%, sendo que o ESPM apresentou o pior resultado em combinação com todos os caldos de enriquecimento seletivo (Tabela 6). Na análise de produtos farináceos, 100,0% de sensibilidade e especificidade foi observada na combinação do mLST/v com ESIA e DFI e do caldo EE com ESIA (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação de três métodos para o isolamento de *Cronobacter* spp. a partir de produtos alimentícios diferentes de FID

Enriquecimento seletivo + ágar de isolamento		Alimentos infantis para crianças de maior idade (n=30)		Temperos e condimentos (n=30)		Produtos farináceos (n=30)		Total (n=90)	
		SE ^a (%)	EP ^b (%)	SE(%)	EP(%)	SE(%)	EP(%)	SE(%)	EP(%)
mLST/	ESIA ^d	85,7	95,7	90,9	84,2	100,0	100,0	94,7	92,3
v ^c	DFI ^e	85,7	95,7	81,8	89,5	100,0	100,0	92,1	94,2
	ESPM ^f	85,7	95,7	81,8	84,2	90,0	100,0	86,8	92,3
EE ^g	ESIA	85,7	91,3	81,8	89,5	100,0	100,0	92,1	92,3
	DFI	85,7	86,9	72,7	78,9	75,0	100,0	76,3	86,5
	ESPM	85,7	95,7	72,7	73,7	55,0	100,0	65,8	88,5
CSB/v ^h	ESIA	85,7	91,3	100,0	78,9	100,0	90,0	97,4	86,5
	DFI	85,7	91,3	100,0	84,2	100,0	90,0	97,4	88,5
	ESPM	85,7	91,3	90,9	78,9	95,0	100,0	92,1	88,5

^a- sensibilidade; ^b- especificidade; ^c- caldo lauril sulfato de sódio modificado com vancomicina; ^d- ágar para isolamento de *Enterobacter sakazakii*; ^e- ágar Brilliance *Enterobacter sakazakii* formulação Druggan, Forsythe e Iversen; ^f- ágar para plaqueamento de *Enterobacter sakazakii*; ^g- caldo de enriquecimento *Enterobacteriaceae*; ^h- *Cronobacter Screening Broth* com vancomicina.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DAS CEPAS DE *Cronobacter* spp.

Os resultados da caracterização fenotípica e molecular das cepas de *Cronobacter* spp. estão apresentados na Tabela 7. Isolados de uma mesma amostra identificados como sendo da mesma espécie e ST foram considerados clones e apenas uma cepa foi selecionada. Com isso, 45 isolados foram selecionados das 38 amostras de alimentos positivas. Nas amostras AI13, TC27 e FA15 mais de uma espécie de *Cronobacter* foi isolada (Tabela 5). Nas amostras TC16, TC21, TC26 e FA5 dois diferentes ST de *C. sakazakii* foram isolados da amostra (Tabela 7).

Tabela 7 – Caracterização fenotípica e molecular das cepas de *Cronobacter* spp.

Amostra	N.º do isolado	Perfil do Vitek 2.0	Bio grupo	PCR <i>gluA</i>	qPCR <i>dnaG</i>	PCR <i>rpoB</i>	PCR <i>cgcA</i>	PCR <i>gyrB</i>	Alelo <i>fusA</i>	ST ^a	CC ^b
AI2	P4496	0627734151722010	1	+ ^c	+	<i>C. sak</i> ^d	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	8	31	31
AI4	P4781	0627734151722010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	10	33	ND ^e
AI5	P4497	0625734051722010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	16	83	65
AI6	P4498	0627734051722010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	16	83	65
AI7	P4499	0607734151722010	8a	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	1	1	1
AI13	P4786	0625734153722010	9	+	+	<i>C. mal</i>	<i>C. mal</i>	NR ^g	13	413 ^l	ND
	P4787	0625734151722011	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	10	33	ND
AI25	P4795	0627734151622010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	38	103	ND
TC2	P4502	0607730153722011	15	+	+	<i>C. muy</i> ^h	<i>C. muy</i>	NR	115	432 ^l	ND
TC4	P4785	0625734051622010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	3	397 ^l	ND
TC7	P4775	0625734053222010	5	+	Neg ⁱ	<i>C. mal</i>	<i>C. mal</i>	NR	7	438 ^l	ND
TC15	P4503	0607734151722010	6	+	+	<i>C. dub</i> ^j	<i>C. dub</i>	<i>C. dub</i>	135 ^k	434 ^l	ND
TC16	P4788	0625734053222010	5	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	18	136	ND
	P4504	0627734151622011	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	18	23	23
TC21	P4789	0625734051622010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	18	136	ND
	P4790	0627734151722010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	15	40	40
TC24	P4505	0627734151622010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	17	117	ND
TC26	P4791	0605736151622010	3	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	8	226	8
	P4792	0627734151722210	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	10	188	ND
TC27	P4774	0625730053722010	15	+	+	<i>C. muy</i>	<i>C. muy</i>	NR	35	436 ^l	ND

	P4793	0627730151722010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	37	398 ^l	ND
TC28	P4794	0625734151722010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	15	402 ^l	ND
TC29	P4492	0627734153622010	5	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	8	64	64
FA1	P4773	0625734151722010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	15	40	40
FA2	P4776	0625734151722010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	1	4	4
FA3	P4777	0625734151622010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	12	17	17
FA4	P4778	0625736051622010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	3	3	3
FA5	P4780	0625734151622011	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	1	1	1
	P4779	0625736151722010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	15	40	40
FA9	P4500	0625734051622010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	18	23	23
FA11	P4783	0627732151722010	6	+	+	<i>C. dub</i>	<i>C. dub</i>	<i>C. dub</i>	20	433 ^l	ND
FA13	P4784	0625734053622010	5	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	37	233	ND
FA14	P4501	0625736051622010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	1	4	4
FA15	P4483	0625734051622010	1	+	+	<i>C. dub</i>	<i>C. dub</i>	<i>C. dub</i>	20	437 ^l	ND
	P4484	0625734151722011	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	36	395 ^l	40
FA16	P4486	0627734153722010	16	+	+	<i>C. mal</i>	<i>C. mal</i>	NR	40	435 ^l	ND
FA17	P4487	0625734151722010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	8	439 ^l	ND
FA18	P4488	0625734051622011	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	37	321	ND
FA19	P4489	0627734151622010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	3	3	3
FA20	P4490	0625734051622011	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	12	17	17
FA22	P4491	0627734151622010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	37	283	ND
FA23	P4797	0627734151622010	2	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	18	136	ND
FA24	P4798	0625734153622011	5	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	8	64	64

FA25	P4799	0627734151622010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	14	13	13
FA29	P4801	0627734151622010	1	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	14	13	13
Funed	139	NR	NR	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	1	4	4
Funed	140	NR	NR	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	1	4	4
Funed	154	NR	NR	+	+	<i>C. mal</i>	<i>C. mal</i>	NR	7	69	ND
Funed	157	NR	NR	+	+	<i>C. mal</i>	<i>C. mal</i>	NR	7	69	ND
Funed	194	NR	NR	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	1	4	4
Funed	197	NR	NR	+	+	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	<i>C. sak</i>	3	396 ^l	3
Hemocultura	P4968	0625734053622010	9	+	+	<i>C. mal</i>	<i>C. mal</i>	NR	13	440	ND
Hemocultura	P4969	0625734053622010	9	+	+	<i>C. mal</i>	<i>C. mal</i>	NR	13	440	ND
Hemocultura	P4970	0625736053302010	5	+	+	<i>C. mal</i>	<i>C. mal</i>	NR	7	394 ^l	ND

^a- tipo sequencial; ^b- complexo clonal; ^c- positivo; ^d- *Cronobacter sakazakii*; ^e- não determinado; ^f- *Cronobacter malonaticus*; ^g- não realizado; ^h- *Cronobacter muytjensii*; ⁱ- negativo; ^j- *Cronobacter dublinensis*; ^k- sequência descrita neste estudo; ^l- tipo sequencial descrito neste estudo.

As 54 cepas foram classificadas em nove biogrupos (1, 2, 3, 5, 6, 8a, 9, 15 e 16). A maioria dos isolados foi identificada no biogrupo 1 (n = 21), seguido pelo biogrupo 2 (n = 11) e biogrupo 5 (n = 6). A identificação pelo sistema Vitek 2.0 apresentou 26 fenótipos distintos (Tabela 7).

A PCR com alvo no gene *gluA* resultou no fragmento de 105 pb em todas as cepas estudadas. O qPCR falhou apenas na detecção da cepa *C. malonaticus* P4775, isolada a partir de uma amostra de manjerição (TC7). O limite de detecção do qPCR a partir do DNA extraído da cepa de referência de *C. sakazakii* ATCC 12868 (INCQS 00580) foi de 6,7 pg/uL.

As 54 cepas de *Cronobacter* spp. foram identificadas em quatro espécies baseadas no alelo *fusA* (JOSEPH et al, 2012b): *C. sakazakii* (41 isolados), *C. malonaticus* (oito isolados), *C. dublinensis* (três isolados) e *C. muytjensii* (dois isolados) (Figura 1). Dezenove alelos do gene *fusA* (1, 3, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 35, 36, 37, 38, 40 e 115) foram identificados utilizando o banco de dados do MLST, uma sequência não identificada foi enviada ao curador do banco e gerou um novo alelo (*fusA* 135), que foi identificado como pertencente a espécie *C. dublinensis*. Os três protocolos de PCR convencionias utilizados para identificar as espécies de *Cronobacter* spp. apresentaram resultados concordantes com os obtidos com o sequenciamento do gene *fusA*. Todas as cepas de referência utilizadas como controles apresentaram os resultados esperados.

A maioria das cepas isoladas de amostras de alimentos foi identificada como *C. sakazakii* (n=37), seguido da espécie *C. malonaticus* (n = 3) e *C. dublinensis* (n = 3), e *C. muytjensii* (n = 2). Das cepas oriundas da Funed, quatro foram identificadas como *C. sakazakii* e duas como *C. malonaticus*. As três cepas clínicas foram identificadas como *C. malonaticus* (Tabela 7).

Os resultados do MLST geraram 36 ST, sendo destes 16 ST novos descritos no banco (ST394, ST395, ST396, ST397, ST398, ST402, ST413, ST432, ST433, ST434, ST435, ST436, ST437, ST438, ST439 e ST440). Vinte e cinco alelos novos foram descritos: *gltB177*, *gltB181*, *gltB200*, *gltB201*, *gltB202*, *gltB203*, *gltB204*, *gyrB186*, *gyrB187*, *gyrB188*, *glnS151*, *glnS152*, *glnS172*, *infB164*, *infB165*, *infB182*, *infB183*, *atpD124*, *fusA135*, *pps239*, *pps240*, *pps241*, *pps242*, *pps243* e *pps244*. De acordo com banco de dados, 26 cepas, todas da espécie *C. sakazakii*, foram agrupadas em 11 CC distintos (CC1, CC3, CC4, CC8, CC13, CC17, CC23, CC31,

CC40, CC64 e CC65) já previamente descritos no banco de dados. Contudo, o CC17, que é composto somente pelo ST17 e ST149, foi descontinuado, pois o ST149 na verdade foi criado por engano (contato pessoal com o curador do banco S. Forsythe).

As cepas de *C. sakazakii* (n = 41) foram classificadas em 25 ST distintos (ST1, ST3, ST4, ST13, ST17, ST23, ST31, ST33, ST40, ST64, ST83, ST103, ST117, ST136, ST188, ST226, ST233, ST283, ST321, ST395, ST396, ST397, ST398, ST402 e ST439). *C. malonaticus* (n = 8) foi classificado em seis ST distintos (ST69, ST394, ST413, ST435, ST438 e ST440). As cepas de *C. dublinensis* (n = 3) foram classificadas como ST433, ST434 e ST437. Os isolados de *C. muytjensii* (n = 2) foram classificados nos ST432 e ST436. As cepas foram depositadas no banco de dados do MLST com identificação "id" 1402 a 1440, 1446 a 1449 e 1453 a 1475. O ST de maior ocorrência foi o ST4 (9,3%), seguido dos ST40 (5,6%) e ST136 (5,6%).

As árvores filogenéticas baseadas no sequenciamento do alelo *fusA* (Figura 1 e 2) e na sequência dos sete genes do MLST concatenadas (Figura 3 e 4) estão apresentadas a seguir. A distribuição dos ST identificados de acordo com a origem do isolamento está apresentada na Figura 5. As duas cepas identificadas como ST3 (P4489 e P4778) formaram um CC com a cepa 197 identificada como ST396; e as três cepas identificadas como ST40 (P4773, P4779 e P4790) formaram CC com a cepa P4484 identificada como ST395 (Figura 5).

Figura 1. Árvore filogenética “*maximum likelihood*” das 54 cepas de *Cronobacter* spp., cepas de referência de *Cronobacter* spp., *Citrobacter koseri* e *Enterobacter* spp. como outgroup baseado na sequência do alelo *fusA* (438 pb) do banco de dados do MLST.

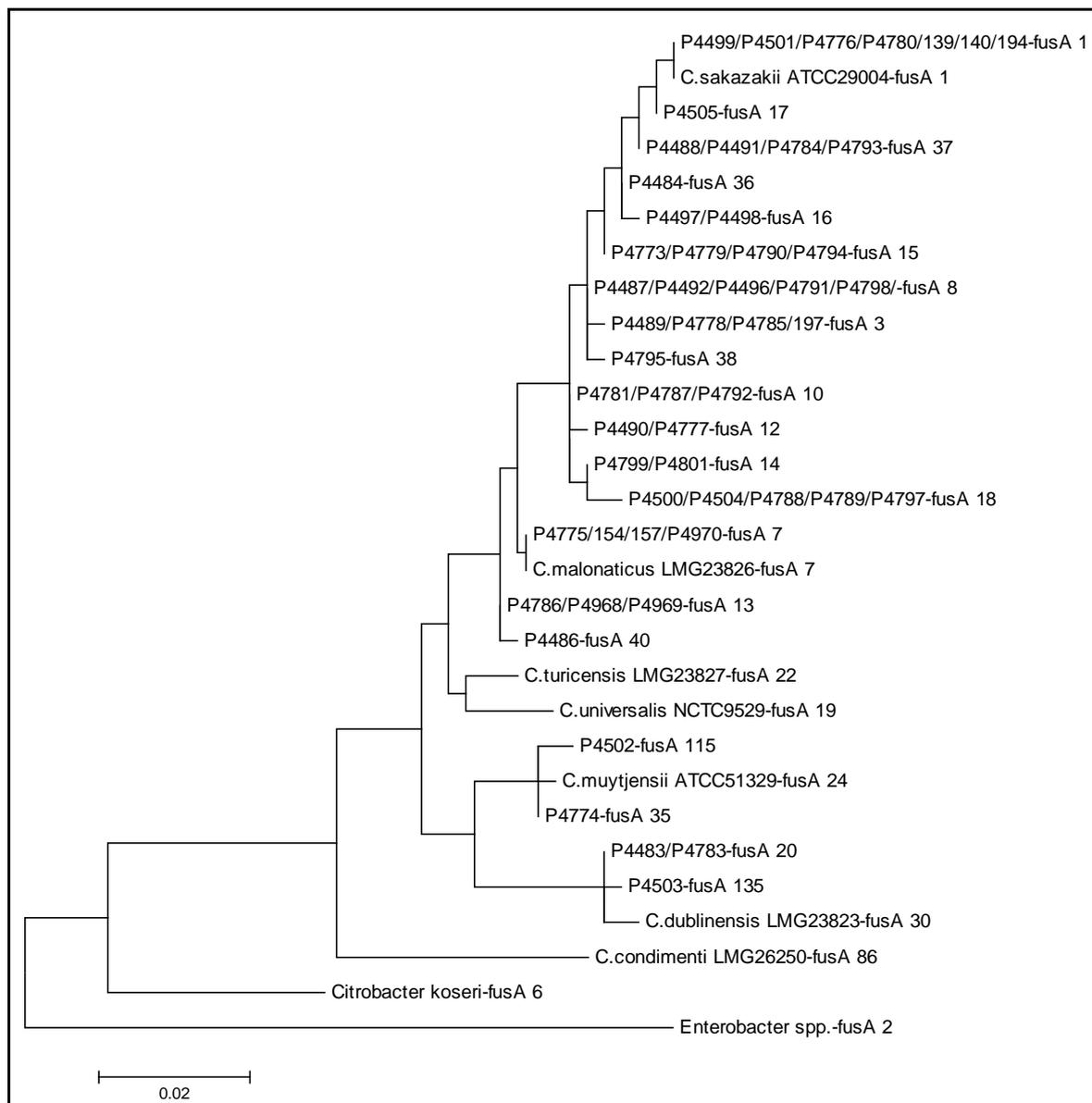


Figura 2. Árvore filogenética “neighbor-net” construída com o programa Splits Tree4 baseada nas sequências do gene *fusA* (438 pb) das 54 cepas de *Cronobacter* spp. e das cepas de referência de *Cronobacter* spp.

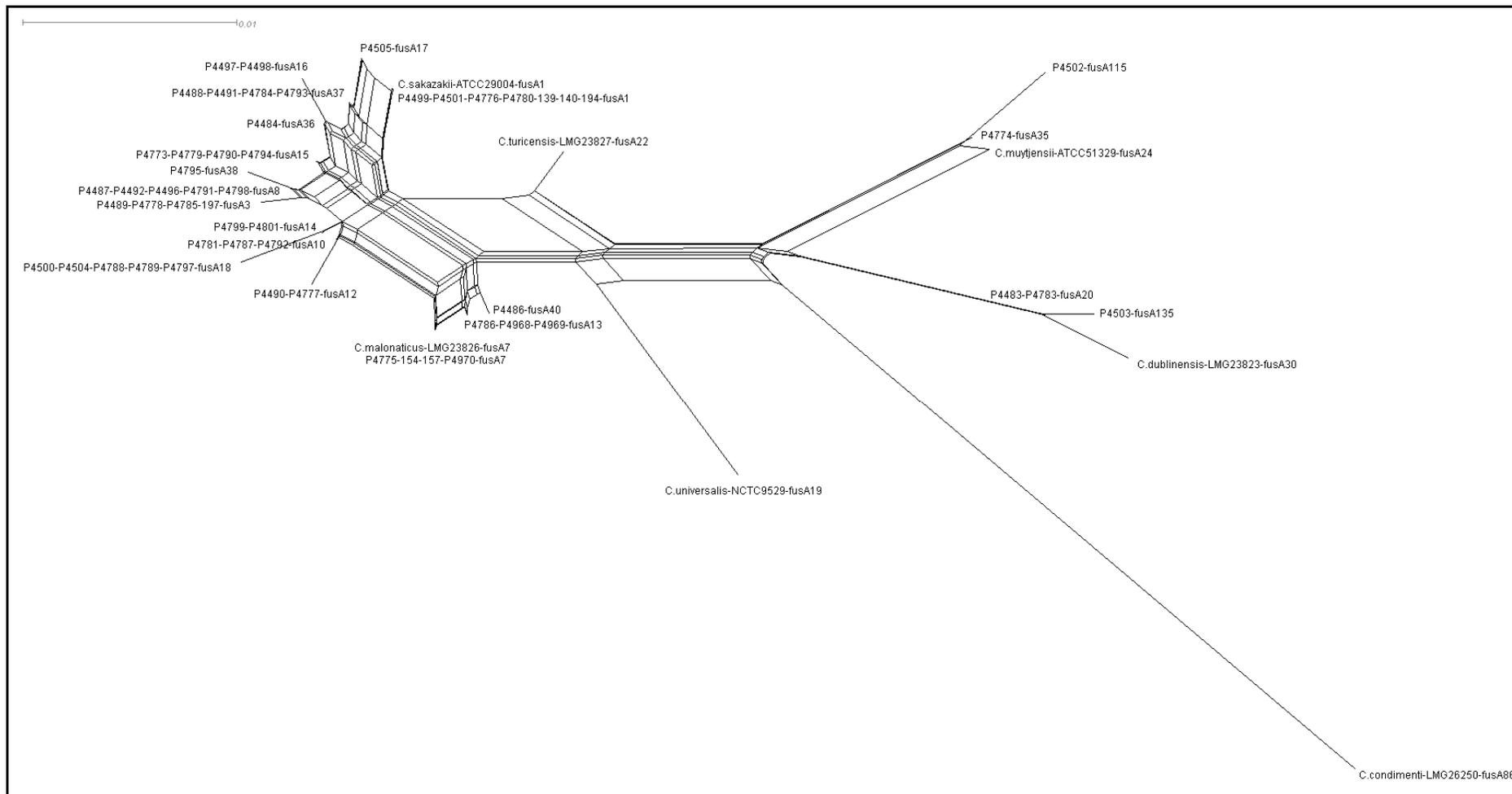


Figura 3. Árvore filogenética “*maximum likelihood*” baseada nas sequências dos sete genes do MLST concatenados (3096 pb) das 54 cepas de *Cronobacter* spp. e a cepa de *Enterobacter* spp. como *outgroup*.

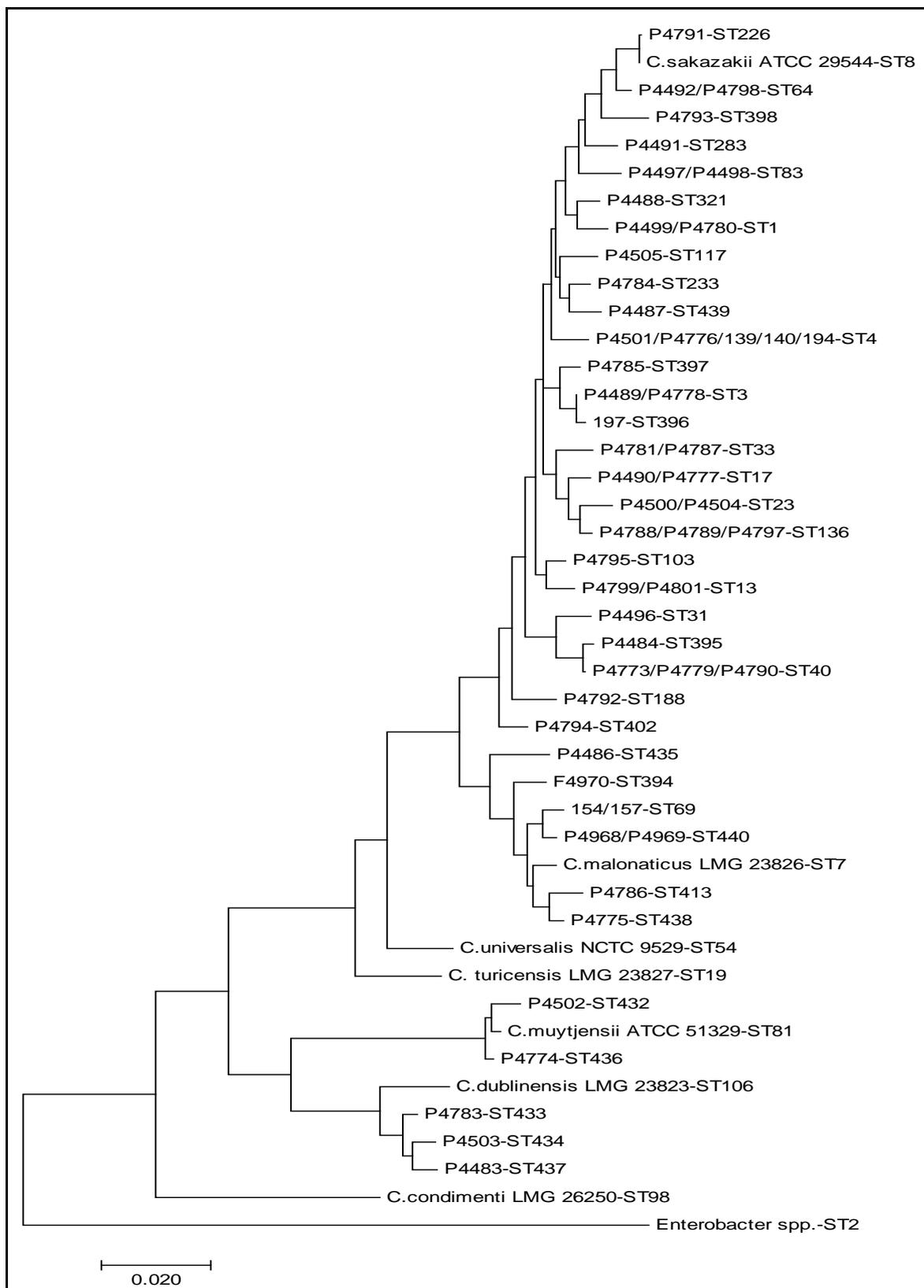


Figura 4. Árvore filogenética “neighbor-net” construída com programa Splits Tree4 baseada nas seq concatenados (3096 pb) das 54 cepas de *Cronobacter* spp. e cepas de referência de *Cronobacter* spp.

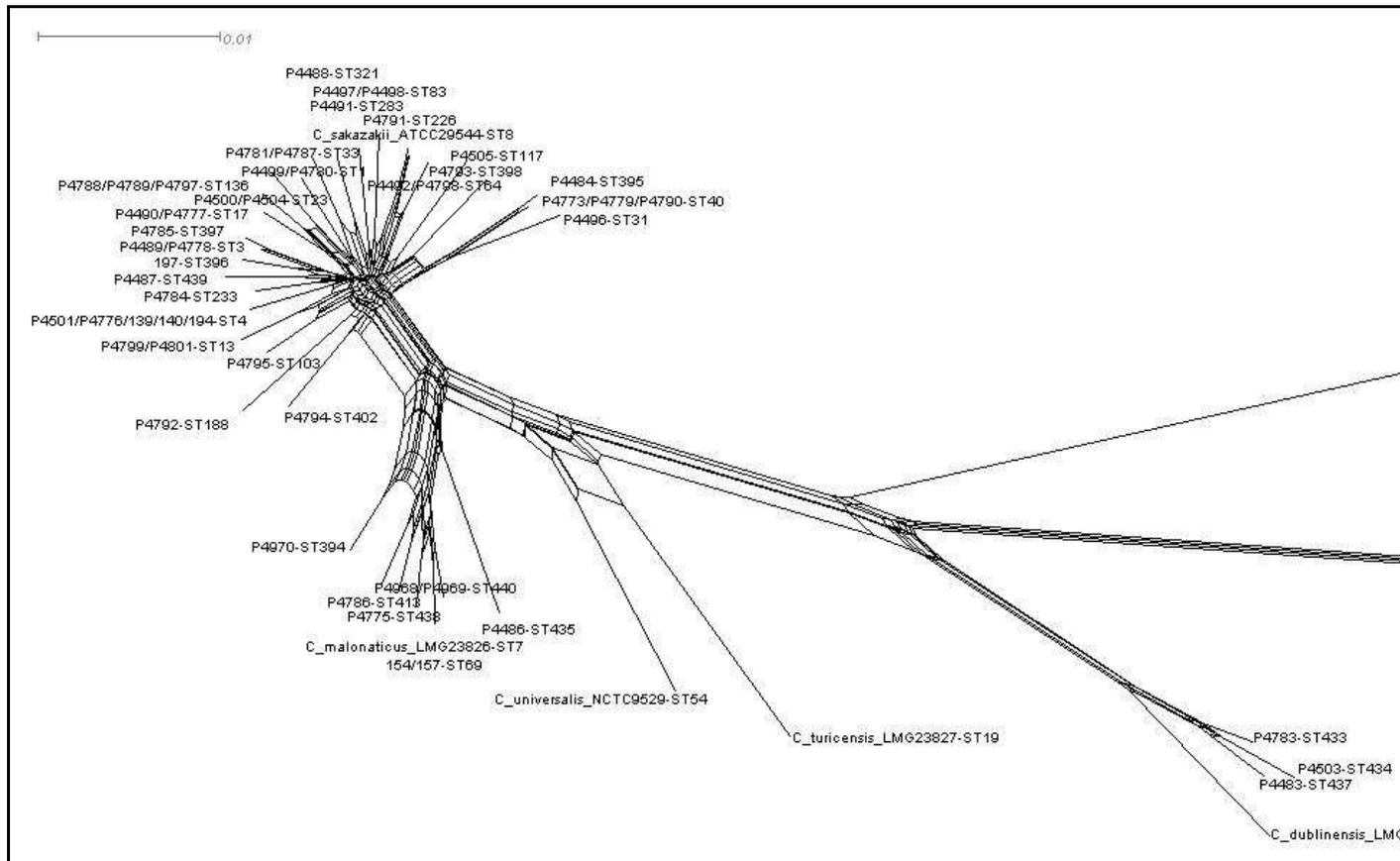
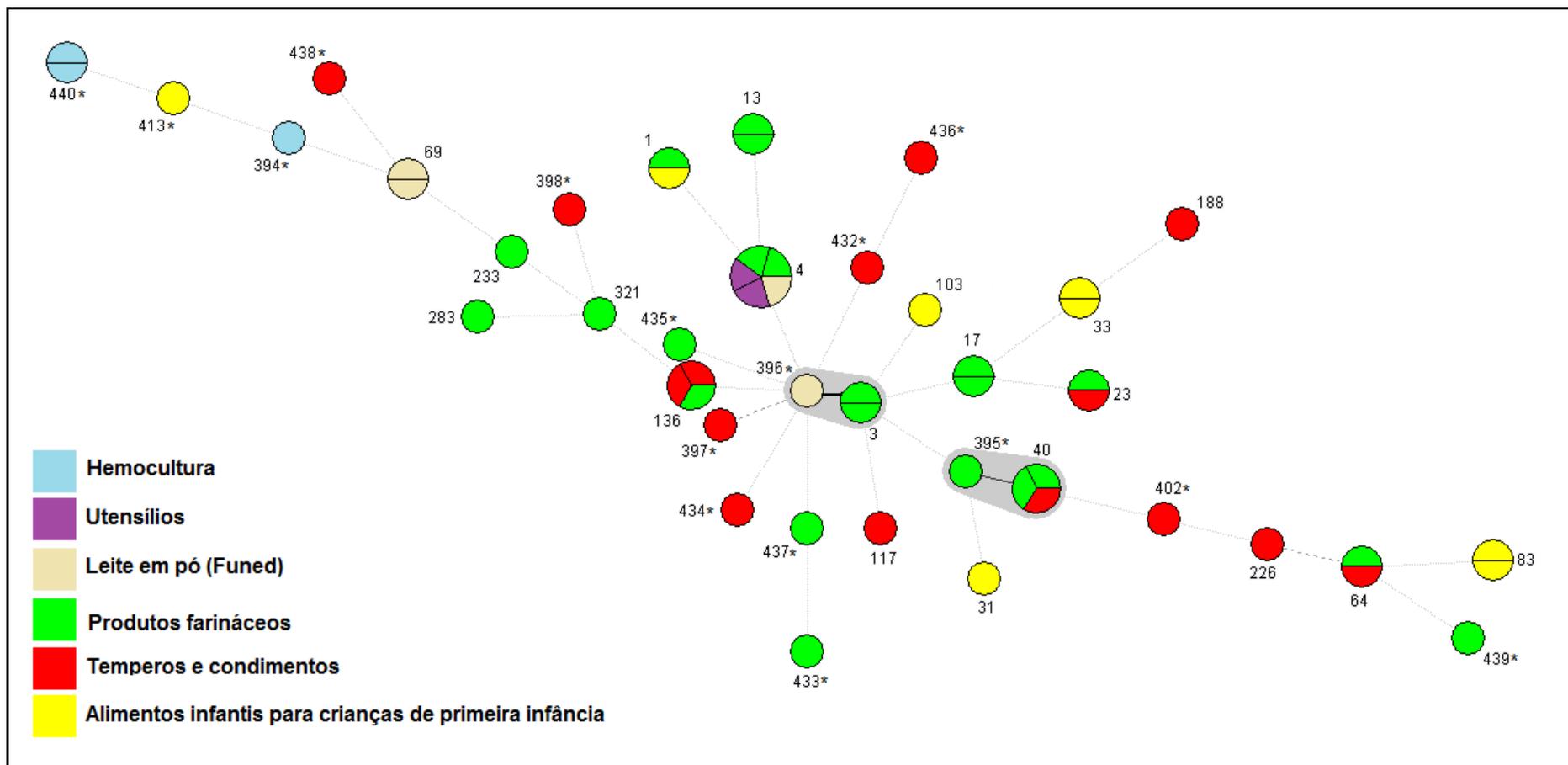


Figura 5. “Minimum spaning tree” (MST) dos ST das 54 cepas de *Cronobacter* spp. avaliadas neste estudo.



A árvore foi baseada na análise do perfil alélico dos genes *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB* e *pps*. Círculos indicam o ST específico e o número de isolados de acordo com o tamanho do círculo. As cores dos círculos indicam a origem do isolamento da cepa. Novos ST estão marcados com (*). Linhas que ligam os ST, indicam que eles diferem em um alelo (linha grossa sólida), ou 3 a 5 locus (linhas finas e pontilhadas). O halo que circula o ST396 e ST3 indica a formação de um complexo clonal (CC3). O halo que circula o ST395 e ST40 indica a formação de um complexo clonal (CC40). A relação entre os ST foi determinada pela análise com BioNumerics (BioNumerics 6.6) onde o CC foi formado com ST com um, dois ou três loci variáveis.

4.4 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE *Cronobacter* spp.

Os 45 isolados de amostras de alimentos, as seis cepas provenientes da coleção da Funed e as cepas clínicas P4968 e P4969 provenientes do surto foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O isolado clínico P4970 apresentou resistência intermediária a SAM (2,2%) e resistência a CRO (2,2%) e CRX (2,2%).

4.5 INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE *Cronobacter* spp. OCORRIDO NA CIDADE DE TERESINA, PI

Cronobacter spp. não foi detectada em nenhuma amostra de alimento analisada (Tabela 8). Na análise pela metodologia ISO (2006) todas as amostras apresentaram turvação no caldo mLST/v, contudo não houve crescimento de colônias características no ESIA. Na metodologia descrita por Chen e colaboradores (2012b), as amostras 1, 2 e 3 apresentaram crescimento de colônias suspeitas no ESPM, contudo as cepas não foram confirmadas pela PCR com alvo no gene *gluA* e pelo qPCR. Uma colônia de cada amostra foi selecionada e submetida à identificação no sistema Vitek 2.0. As cepas foram identificadas como pertencente ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *A. baumannii* (amostra 1 e 3) e como *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae* (amostra 2).

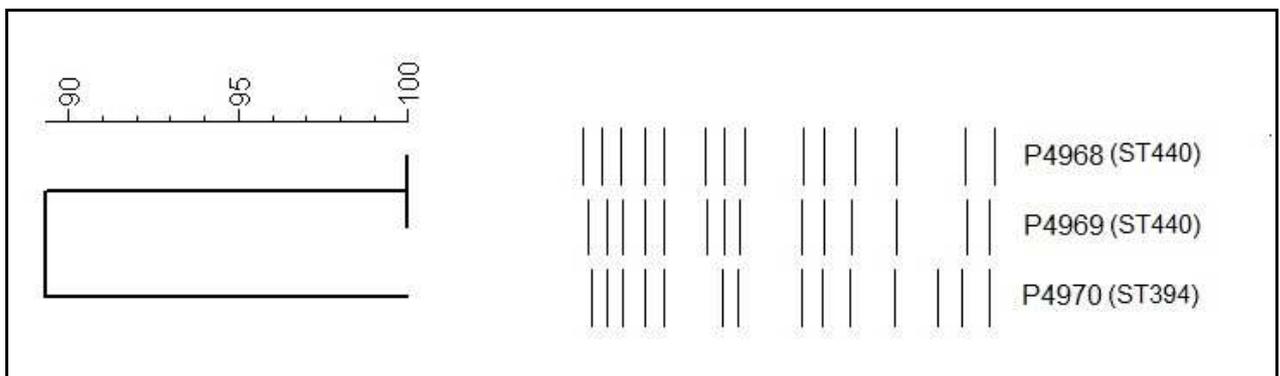
Tabela 8. Resultado da análise das amostras de alimentos envolvidos no surto de toxinfecção alimentar causado por *Cronobacter malonaticus* em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina, PI, em 2013.

N.º da amostra	Alíquota (massa ou volume)	CHEN et al (2012b)		ISO/TS 22964:2006		Identificação		Resultado
		ESPM ¹	DFI ²	mLST/v ³	ESIA ⁴	PCR/qPCR ⁵	Vitek 2.0 (% de probabilidade)	
1 - Lata aberta de fórmula infantil para recém-nascidos pré-termo e/ou de alto risco amostra	1 (100 g)	Pos ⁶	Aus ⁷	Tur ⁸	Aus	Neg ⁹	NR ¹⁰	Ausência em 343 g
	2 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR	
	3 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i> (99)	
	4 (43 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR	
2 - Lata aberta contendo de fórmula infantil para lactantes de 0 a 6 meses	1 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> (99)	Ausência em 229 g
	2 (100 g)	Aus	Aus	Tur	Aus	NR	NR	
	3 (29 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR	
3 - Leite humano pasteurizado	50 mL	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	complexo <i>A. calcoaceticus</i> – <i>A. baumannii</i> (99)	Ausência em 50 mL
4- Leite humano pasteurizado	50 mL	Aus	Aus	Tur	Aus	NR	NR	Ausência em 50 mL

¹- ágar cromogênico para plaqueamento de *Enterobacter sakazakii*; ²-*Brilliance Enterobacter sakazakii agar*; ³-Caldo lauril sulfato de sódio modificado contendo vancomicina; ⁴- ágar para isolamento de *Enterobacter sakazakii*; ⁵- reação em cadeia pela polimerase com alvo no gene *gluA* (IVERSEN et al., 2007) e reação em cadeia pela polimerase com alvo no gene *dnaG* (CHEN et al., 2012b); ⁶- crescimento de colônias características; ⁷- ausência de colônias características; ⁸- presença de turvação; ⁹- negativo; ¹⁰- não realizado.

Os três isolados clínicos foram confirmados como *Cronobacter* spp. na PCR com alvo no gene *gluA*, no qPCR e no sistema Vitek 2.0 (Tabela 7). As cepas P4968 e P4969 apresentaram o mesmo perfil bioquímico no sistema Vitek 2.0, enquanto que a cepa P4970 divergiu em quatro provas, apresentando resultado positivo para alcalinização de L-lactato e produção de lipase, e resultado negativo para alcalinização de succinato e α -galactosidade. Também foi observada diferença na classificação dos biogrupos, uma vez que as cepas P4968 e P4969 foram classificadas no biogrupo 9 enquanto que a cepa P4970 foi classificada como biogrupo 5, tendo como única diferença o resultado positivo para utilização do inositol. As cepas foram identificadas como *C. malonaticus* pelo sequenciamento do alelo *fusA* e pelas técnicas de PCR (Tabela 7). A cepa P4970 foi identificada como ST394 e as cepas P4968 e P4969 como ST440 (Tabela 7). A tipificação por PFGE classificou os três isolados com o mesmo pulstotipo com 89,3% de similaridade entre a cepa P4970 e as cepas P4968 e P4969 e 100,0% de similaridade entre as cepas P4968 e P4969 (Figura 6).

Figura 6. Polimorfismo genético dos três isolados de *Cronobacter malonaticus* P4968, P4969 e P4970 determinado por eletroforese em gel de campo pulsado após digestão do DNA com enzima de restrição *SpeI*.



5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FID

A realização da qPCR utilizado como triagem permite a liberação de amostras negativas em até 24 h, o que reduz significativamente o tempo de análise. No presente estudo, todas as amostras apresentaram resultado negativo no qPCR e na etapa posterior de isolamento/identificação. Isso indica que este procedimento é realmente confiável conforme descrito pelos autores do método (CHEN et al, 2012b).

Os resultados obtidos na avaliação das amostras de FIL foram similares a trabalhos realizados no período de 2010 a 2012, que pesquisaram *Cronobacter* spp. e não encontraram nenhuma amostra contaminada (HOCHERL et al, 2012; SOLER et al, 2012; ABDULLAH SANI et al, 2013; MOZROVÁ et al, 2014). No Brasil, Santos e colaboradores (2013) detectaram *Cronobacter* spp. em 29% (12/42) das amostras de FID que analisaram na cidade de Campinas, SP. Contudo, este maior índice pode estar associado ao fato de que no período do estudo (2007) os fabricantes não necessitavam cumprir o disposto no CAC/RCP 66 – 2008. Nas pesquisas realizadas no Brasil após a publicação do Código, nenhuma amostra de FID contaminada com *Cronobacter* spp. foi encontrada (CHAP et al, 2009; PALCICH et al, 2009).

A FAO/WHO (2004, 2006) recomenda a pesquisa de Enterobacteriaceae em FID. Estas enterobactérias não-*Cronobacter* foram classificadas como "categoria B - plausíveis de causarem infecções, mas sem o apoio de evidências epidemiológicas" pelas comissões de especialistas. Neste estudo, a cepa da família Enterobacteriaceae não-*Cronobacter* isolada a partir de FIL foi *Pantoea* spp. Outros autores já relataram a identificação destes microrganismos em amostras de FID comercializadas no Brasil (SANTOS et al, 2013) e em outros países (YE et al, 2008; ABDULLAH SANI et al, 2013). *Pantoea* spp. já foi associada com infecções neonatais; no entanto, FID nunca foram identificadas como o veículo de contaminação (FAO/WHO, 2006). Contudo, Jackson e colaboradores (2015) reportaram os possíveis primeiros casos de infecções por *Enterobacter* spp. em neonatos devido a ingestão de FID contaminadas. Logo, mais estudos são necessários para identificar o risco da presença destas outras enterobactérias neste produto, uma vez que os critérios microbiológicos internacionais em vigor para

controle de FID podem levar a liberação de lotes contendo estas bactérias (CAC, 2008).

5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS DIFERENTES DE FID

5.2.1. Ocorrência de *Cronobacter* spp.

Diversas pesquisas realizadas em países distintos isolaram *Cronobacter* spp. dos mais diversos tipos de alimentos (Tabela 1). No presente estudo, foram analisados três grupos de alimentos distintos, baseado nos dados de ocorrência das pesquisas identificadas na literatura, e *Cronobacter* spp. foi detectada em 38 (42,2%) das 90 amostras (Tabela 5). Na Suíça, Baumgartner e colaboradores (2009) reportaram que 8,9% de 268 amostras de alimentos prontos para o consumo analisados estavam contaminados com *Cronobacter* spp. Turcovský e colaboradores (2011) observaram uma ocorrência de 11,8% (71/602) de *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos analisadas na Eslováquia. Na Coreia, Chon e colaboradores (2012) isolaram *Cronobacter* spp. em 18 (15,7%) de 115 amostras de alimentos desidratados. Na República Tcheca, os percentuais de ocorrência variaram de 6,9-13,3% em alimentos obtidos no comércio (HOCHÉL et al, 2012; MOZROVÁ et al, 2014). Xu e colaboradores (2015) analisaram 280 amostras de alimentos prontos para o consumo na China e detectaram *Cronobacter* spp. em 52 (18,6%) amostras. Essa grande variabilidade observada nos diferentes estudos se deve principalmente ao número e tipo de amostras analisadas, uma vez que é conhecido que *Cronobacter* spp. é mais presente em alimentos de origem vegetal e alimentos desidratados (HOCHÉL et al, 2012; MOZROVÁ et al, 2014; GARBOWSKA et al, 2015; SINGH et al, 2015).

Em nosso estudo, a ocorrência de *Cronobacter* spp. foi particularmente alta, 66,7% (20/30), em amostras de farináceos (Tabela 5). Esta alta ocorrência foi devido ao grande número de amostras de fubás/farinhas de milho contaminadas (9/11) (Tabela 5). *Cronobacter* spp. também foi isolada de amostras de farinha de linhaça, farinha de mandioca, farinha de rosca, farinha de trigo e trigo para quibe. A contaminação de produtos farináceos por *Cronobacter* spp. já foi reportada em outros estudos (HOCHÉL et al, 2012, CETINKAYA et al, 2013). Schimed e colaboradores (2009) mostraram que *Cronobacter* spp. pode ser facilmente isolado

de raízes de plantas e desenvolver colonização epífitas e endofíticas em raízes de milho. Isso indica contaminação intrínseca destes produtos, uma vez que as plantas parecem ser o habitat natural de *Cronobacter* spp. Farinhas são utilizadas para produção de amido, que é um ingrediente comum em FID podendo atuar como fonte de contaminação por *Cronobacter* spp. nestes produtos (FAO/WHO, 2008). Além disso, o consumo de certos tipos de farinhas cruas na dieta é um hábito comum em determinadas regiões do Brasil, como o consumo de farinha de mandioca nas regiões Norte e Nordeste (DIAS; LEONEL, 2006). Logo, estes alimentos podem agir como um veículo nos casos de infecções por *Cronobacter* spp. nestes indivíduos.

Cronobacter spp. foi isolada em 36,7% das amostras de temperos e condimentos, sendo esta detectada em uma grande diversidade de amostras: erva-doce, pimentas, manjeriço, curry, colorífico, misturas de temperos, gengibre, cominho e noz-moscada (Tabela 5). Este resultado corresponde a outros estudos que focaram no isolamento desta bactéria em temperos e condimentos. Baumgarten e colaboradores (2009) isolaram o microrganismo de ervas e pimentas. Garbowska e colaboradores (2015) isolaram *Cronobacter* spp. em nove (23,7%) de 38 amostras de ervas analisadas. O grande número de estudos com isolamento de espécies de *Cronobacter* a partir de produtos de origem vegetal (JARADAT et al, 2009; MOLLOY et al, 2009; TURCOCKÝ et al, 2011; HOCHÉL et al, 2012; BELAL et al, 2013; MOZROVÁ et al, 2014; GARBOWSKA et al, 2015; SINGH et al, 2015) corrobora a evidência que as plantas são o reservatório desta bactéria.

Cronobacter spp. foi isolada de amostras de cereais e misturas à base de arroz (AI2, AI6 e AI13), milho (AI4 e AI5), farinha láctea (AI25) e misturas à base de aveia e arroz (AI25) (Tabela 5). O isolamento deste patógeno nestes tipos de alimentos já foi reportado em outros estudos, com uma ocorrência variando de 11,2 a 45,0% (MOLLOY et al, 2009; HOCHÉL et al, 2012; MEIER et al, 2015; SINGH et al, 2015), o que foi similar ao observado nesse estudo (7/30, 23,3%). A instrução nos rótulos de determinados alimentos analisados informa que estes são pré-cozidos e não necessitam de aquecimento antes do consumo. De acordo com a revisão na literatura realizada por Osaili e Forsythe (2009), bactérias do gênero *Cronobacter* quando presentes em produtos desidratados por longos períodos apresentam maior resistência a temperatura. Contudo, os trabalhos levantados pelos autores mostram que *Cronobacter* spp. não sobrevive a tratamentos térmicos como de 58°C/32s em FID reconstituídas artificialmente contaminadas. Estas características do

microrganismo sugerem que a contaminação nos produtos destinados a alimentação infantil analisados neste estudo possa ter ocorrido porque o binômio tempo/temperatura ou algum outro processo utilizado pelos produtores no pré-cozimento, não seja 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 (JACOBS et al, 2011). 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 ofertá-los as crianças apenas na idade recomendada. 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. De acordo com Richard e colaboradores (2005), populações muito baixas de *Cronobacter* spp. podem se multiplicar rapidamente em cereais infantis à base de arroz reconstituídos com água ou leite. Desta forma, o risco aumenta se a mistura for preparada e mantida a temperatura ambiente por longos períodos, uma vez que pode promover a multiplicação do patógeno.

No Brasil, o uso incorreto de alimentos infantis destinados a crianças com idade inadequada da orientada pelo fabricante 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 (ANIVSA, 2014b). 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 (GOSNEY et al, 2006; KYNE, 2009). Alsonosi e colaboradores (2015) avaliaram uma coleção de 51 isolados de *Cronobacter* spp. de amostras de pacientes hospitalizados e observaram que a maioria das cepas (43/51) foi isolada de pacientes adultos e de amostras do trato respiratório superior (ex.: swab de garganta e amostras de escarro). Estes dados indicam que pode existir uma associação entre a ingestão destes alimentos contaminados com os casos de infecções por *Cronobacter* spp.

5.2.2. Avaliação dos métodos para isolamento de *Cronobacter* spp.

Os métodos desenvolvidos para detecção de *Cronobacter* spp. focaram no isolamento do microrganismo a partir de FID e produtos lácteos desidratados. As metodologias se baseiam em uma etapa de pré-enriquecimento para recuperar as células-alvo dessecadas/estressadas, seguido por um enriquecimento seletivo ou diferencial (FDA, 2002; ISO, 2006; IVERSEN et al, 2008b). Neste estudo, foram feitas adaptações destes métodos para o isolamento de *Cronobacter* spp. a partir de outros tipos de produtos alimentícios. Com objetivo de suprimir as bactérias da flora presentes que poderiam inibir o crescimento do *Cronobacter* na matriz, três caldos (EE, mLST/v e CSB/v) contendo diferentes agentes seletivos foram utilizados antes da etapa de isolamento das colônias nos meios cromogênicos.

O EE apresentou os menores valores de sensibilidade e especificidade em combinação com todos os meios de isolamento comparado com o mLST/v e o CSB/v. Este resultado foi similar ao relatado por Iversen e colaboradores (2008b), que ao utilizarem o método antigo do FDA (2002), que utiliza o caldo EE, observaram 52,2% e 73,5% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, apresentando o pior resultado em comparação com o método ISO (2006), que utiliza mLST/v, e o método que utiliza o CSB/v. O caldo EE foi desenvolvido para inibir bactérias Gram-positivas devido a combinação do verde brilhante e sais biliares; e possui glicose para promover o crescimento de membros da família Enterobacteriaceae. Contudo, ele não é exclusivo para bactérias do gênero *Cronobacter* e o crescimento de uma flora competitiva de outras enterobactérias pode ocorrer com uso deste meio (DRUGGAN; IVERSEN, 2009). A existência de cepas de *Cronobacter* spp. que são inibidas pelo verde brilhante já foi relatado (IVERSEN et al, 2008b). Além disso, a incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ não favorece as cepas de *Cronobacter* spp. em relação a flora competitiva.

Neste estudo, a sensibilidade do CSB/v foi um pouco maior que a do mLST/v, o que foi de acordo com o estudo que descreveu este meio (IVERSEN et al, 2008b). Além disso, o CSB/v permite a decisão de descartar amostras não contaminadas após 48 h, o que representa economia de material por eliminar as etapas posteriores do ensaio. Neste estudo, 34,4% (31/90) das amostras seriam corretamente identificadas como negativas após 48 h uma vez que elas não viraram a coloração do meio para amarelo. Apenas a amostra AI25 não apresentou viragem do CSB/v

mas foi considerada positiva, uma vez que *Cronobacter* spp. foi isolada a partir das outras metodologias empregadas. As cepas que foram recuperadas utilizando o CBS/v mas não pelo mLST/v e vice-versa foram testadas para verificar o crescimento no respectivo meio. A cepa P4795 apresentou crescimento com viragem da coloração do CSB/v após 24 h a $42 \pm 1^\circ\text{C}$. A cepa P4497 apresentou crescimento no mLST/v após 24 h a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$. As cepas também foram capazes de crescer no ESIA, DFIA e ESPM apresentando colônias características. Estes resultados indicam que a inabilidade do CSB/v e do mLST/v em recuperar estas cepas a partir das amostras AI25 e AI5, respectivamente, foi provavelmente devido a presença de uma flora competidora na amostra, que reduziram a taxa de crescimento das cepas nos respectivos meios.

Os valores de especificidade do ESIA e DFI foram próximos, enquanto que o ESPM apresentou os valores mais baixos (Tabela 6). Este meio inclui 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- α ,D-glicopiranosídeo e 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β ,D-glicopiranosídeo- β , D-glicopiranosídeo (X-celobiose) como substratos cromogênicos (RESTAINO et al, 2006). É conhecido que o segundo substrato cromogênico X-celobiose, incluído para aumentar a sensibilidade do meio para *Cronobacter* spp., também pode ser hidrolisado por muitas outras espécies de bactérias, reduzindo assim a especificidade do meio. De acordo com Druggan e Iversen (2009), o ESPM pode não ser aplicável para análise de amostras com altas contagens de enterobactérias porque a fermentação dos açúcares presentes com consequente redução do pH altera a coloração das colônias de *Cronobacter* spp. e pode reduzir a especificidade do meio. A menor especificidade do ESPM em relação aos demais meios no presente estudo pode estar relacionada a estes fatores. Esse fato fica mais evidente quando se observa os resultados da especificidade das amostras de temperos e condimentos, que são as que se espera uma maior carga de enterobactérias, e foi onde se obteve os menores valores de especificidade dos meios de cromogênicos em relação aos outros tipos de amostras (Tabela 6).

As cepas não-*Cronobacter* isoladas que apresentaram atividade α -glicosidase nos meios cromogênicos foram identificadas pelo Vitek 2.0 como: *Pantoea* spp./*Buttiauxella* *agrestis* (Bionúmero - 4627710143730010), *Pantoea* spp. (Bionúmero - 4627710142720010 e 0607730050720010) e *Shigella* spp. (Bionúmero - 0205610040300210). Estas cepas também apresentaram atividade α -

glicosidase na galeria de identificação do Vitek 2.0. Outros estudos já reportaram o isolamento de cepas de *Pantoea* spp. que apresentaram colônias típicas nos meios cromogênicos de isolamento de *Cronobacter* spp. (BELAL et al, 2013; SANTOS et al, 2013; GARBOWSKA et al, 2015; MEIER et al, 2015).

Sensibilidade, também chamado de taxa de verdadeiro-positivos, indica a eficiência do ensaio em detectar isolados que são verdadeiramente *Cronobacter* spp. Especificidade, também chamado de taxa de verdadeiro-negativos, indica a eficiência do ensaio em corretamente excluir isolados que não são *Cronobacter* spp. Considerando estes dois parâmetros supracitados, a combinação do CSB/v com DFI foi considerada a mais eficiente para isolamento de *Cronobacter* spp. nas categorias de produtos avaliados (Tabela 6).

5.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DAS CEPAS DE *Cronobacter* spp.

Devido as diferenças fenotípicas entre as diferentes espécies e estirpes de *Cronobacter* spp., é difícil confirmar a identidade dos isolados utilizando apenas um método ou um conjunto específico de iniciadores de PCR (JARADAT et al, 2009). Neste estudo, testes fenotípicos (esquema de biogrupos e Vitek 2.0) e moleculares foram utilizados para identificação dos isolados a nível de gênero e espécie.

O sistema semi-automatizado Vitek 2.0 e o PCR com alvo no gene *gluA* se apresentaram eficazes na identificação correta das colônias presuntivas de *Cronobacter* spp. Estes resultados estão de acordo com os descritos pelos autores que descreveram o protocolo com alvo no fragmento menor do gene *gluA* e observaram 100% de sensibilidade na detecção de cepas do gênero (IVERSEN et al, 2007b) e por Chen e colaboradores (2012a) que incluíram o Vitek 2.0 como uma técnica fenotípica para identificação de cepas de *Cronobacter* spp. O qPCR com alvo no gene *dnaG* não identificou a cepa de *C. malonaticus* P4775, que foi confirmada pelos outros métodos. Novas extrações de DNA e diluições seriadas do DNA desta cepa foram realizadas e utilizadas em novas reações de qPCR mas novamente não apresentaram resultado positivo de amplificação (dados não publicados). Estudos posteriores, incluindo o sequenciamento do gene *dnaG* da cepa P4775, são necessários para verificar se a cepa possui alterações na

sequência deste gene que não permitem a amplificação utilizando os iniciadores e sonda do protocolo de qPCR.

As cepas P4486, P4492, P4784, P4788 e P4798 não apresentaram correspondência entre a identificação das espécies (Tabela 7) e o esquema biogrupos descrito no Quadro 1. As cepas P4492, P4784, P4788 e P4798 foram classificadas no biogrupo 5 que seria exclusivo das espécies *C. malonaticus* e *C. turicensis*. Contudo, estas foram identificadas como *C. sakazakii* pelo sequenciamento do alelo *fusA*. A cepa P4486 foi classificada no biogrupo 16 que é exclusivo da espécie *C. turicensis*, mas foi identificada como *C. malonaticus* pelo sequenciamento do alelo *fusA*. Como existem biogrupos que são compartilhados por mais de uma espécie, os resultados obtidos neste estudo indicam que as espécies *C. sakazakii* e *C. malonaticus* também apresentam cepas pertencentes aos biogrupos 5 e 16, respectivamente. A falta de acurácia na identificação das espécies de *Cronobacter* spp. pelo esquema de biogrupos já foi descrita na literatura, ressaltando que o uso de técnicas moleculares mais sofisticadas apresenta maior confiabilidade e evita a subjetividade que ocorre na interpretação dos testes fenotípicos (JOSEPH et al, 2013).

Os três protocolos de PCR utilizados para identificação das espécies de *Cronobacter* spp. foram considerados eficazes uma vez que apresentaram o mesmo resultado de identificação obtido pelo sequenciamento do gene *fusA*. Contudo, estudos atuais demonstraram que o protocolo com alvo no gene *rpoB*, que é comumente utilizado em estudos para identificação das espécies de *Cronobacter* spp. (MOZROVÁ et al, 2014; KILLER et al, 2015), pode levar a resultados errôneos devido a reações inespecíficas com cepas não-*Cronobacter* com atividade α -glicosidase (JACKSON et al, 2014). Já o protocolo descrito por Haung e colaboradores (2013) é limitado, pois somente consegue identificar duas espécies do gênero. Por sua vez, o protocolo de M-PCR descrito por Carter e colaboradores (2013) permite a identificação de uma grande variedade de espécies do gênero *Cronobacter* em apenas uma reação, mas como desvantagem não possui iniciadores para identificação da espécie *C. condimenti*. Além disso, Jackson e colaboradores (2014) relataram a ausência do gene *cgcA* em uma cepa da espécie *C. sakazakii* e apenas parte da sequência do gene em uma cepa da espécie *C. dublinensis*. De acordo com os autores, os resultados indicam que o uso deste

protocolo poderia comprometer a identificação correta de determinadas cepas de *Cronobacter* spp.

A análise por MLST mostrou que *C. sakazakii* possui nove ST (ST1, ST3, ST4, ST13, ST23, ST31, ST40, ST64 e ST83) que já foram associados com casos clínicos em outros países e foram agrupados em 10 CC já descritos no banco de dados.

O CC4 hoje abrange 21 ST (ST4, ST15, ST97, ST107, ST108, ST110, ST121, ST183, ST192, ST203, ST218, ST235, ST241, ST242, ST255, ST266, ST267, ST268, ST287, ST295 e ST310) e é o CC com o maior número de ST e cepas depositadas no banco de dados. Neste estudo, cinco cepas de *C. sakazakii* ST4 foram identificadas em três sítios distintos: duas cepas (P4501 e P4776) de amostras de fubá de milho, duas cepas (139 e 140) isoladas de utensílios para preparo de mamadeiras e uma cepa (194) de leite em pó (Figura 5). Este achado é significativo, uma vez que o grupo *C. sakazakii* ST4 é altamente estável dentro da espécie e o mais prevalente no banco. O ST4 já foi identificado como agente etiológico em um grande número de infecções severas em neonatos, incluindo meningites, em sete continentes num período de 50 anos (JOSEPH; FORSYTHE, 2011; JOSEPH et al, 2012b; HARIRI et al, 2013).

O CC1 é, no momento, o segundo maior complexo do banco, compreendendo 11 ST (ST1, ST14, ST57, ST134, ST141, ST181, ST240, ST298, ST383, ST384 e ST391). Neste estudo, duas cepas (P4499 e P4780) foram identificadas como ST1, tendo sido isoladas de sítios distintos, uma a partir de uma amostra de farinha láctea e outra de uma amostra de fubá de milho (Figura 5). O ST1 foi isolado de amostras de FID (CUI et al, 2014), alimentos prontos para o consumo (XU et al, 2015) e de amostras clínicas, sendo responsável por casos de meningite e bacteremia em neonatos (JOSEPH; FORSYTHE, 2011; JOSEPH et al, 2012b). A identificação do ST1 em uma amostra de alimento infantil neste estudo demonstra que este pode representar um risco ainda maior caso seja ingerido por neonatos.

O CC3 compreende hoje seis ST (ST3, ST9, ST197, ST314, ST315 e ST396) e somente o ST3 foi isolado a partir amostras clínicas (JOSEPH et al, 2012b). No presente estudo, as cepas P4489 e P4778 foram identificadas como ST3, sendo ambas isoladas de amostras de produtos farináceos (Figura 5). Estudos anteriores já relataram o isolamento do ST3 a partir de amostras de alimentos, como macarrão (CUI et al, 2014), FID (CUI et al, 2014) e alimentos prontos para o consumo (XU et

al, 2015). A cepa 197, isolada de leite em pó, foi identificada como ST396 (Tabela 7). O ST396 representa um único locus variante do ST3, devido a diferença no alelo *atpD*, que foi descrito no presente estudo, sendo único no banco de dados.

O CC8 é composto por sete ST (ST8, ST111, ST124, ST130, ST133, ST226 e ST279). Neste estudo, somente a cepa P4791 ST226, isolada a partir de uma amostra de gengibre moído, foi identificada neste complexo (Tabela 7). Esse resultado foi similar ao relatado por Xu e colaboradores (2015), que também isolaram cepas ST226 a partir de uma amostra de alimento pronto para o consumo na China.

CC13 é composto pelos ST13, ST182, ST206 e ST319. As cepas P4799 e P4801, identificadas como ST13 e isoladas de amostras de farinhas (Tabela 7), foram as únicas deste complexo isoladas neste estudo. O ST13 já foi isolado de amostras de FIS (CUI et al, 2014) e de alimentos prontos para o consumo (XU et al, 2015). O ST13 também já foi isolado a partir de amostras de fezes de crianças durante um surto ocorrido na França, onde os pacientes apresentaram quadro de enterocolite necrosante (CAUBILLA-BARRON et al, 2007).

O CC23 é composto pelos ST18, ST23, ST292 e ST376. Neste estudo, dois isolados foram identificados como ST23 (P4500 e P4504, isolados de fubá de milho e colorífero, respectivamente). O ST23 já foi isolado de amostras de alimentos, incluindo FID, e a partir de amostras de secreção brônquica (JOSEPH et al, 2012b).

O CC31 abriga apenas os ST31 e ST334. Neste estudo, uma cepa (P4496) ST31 foi isolada a partir de uma amostra de cereal à base de arroz (Tabela 7). O ST31 já foi identificado como responsável pelo óbito de uma criança no Reino Unido (JOSEPH et al, 2012b). Logo, da mesma forma que descrito previamente em relação ao ST1, a presença do ST31 em alimentos infatis representa um risco ainda maior caso estes sejam ingeridos por neonatos.

O CC40 é composto por 11 ST (ST40, ST45, ST105, ST128, ST135, ST144, ST185, ST194, ST248, ST296 e ST395). O ST395 foi identificado neste estudo (cepa P4484) em uma amostra de farinha de linhaça (Tabela 7). O ST395 é um duplo locus variante do ST40, devido as diferenças nos alelos *fusA* e *glnS*, que foi descrito no presente estudo, sendo único no banco de dados. Três cepas foram identificadas como ST40, sendo duas cepas (P4773 e P4779) isoladas a partir de amostras distintas de fubá de milho e uma cepa (P4790) de uma amostra de pimenta (Figura 5). O ST40 já foi identificado em amostras de alimentos prontos para o

consumo (XU et al, 2015), de FID (CUI et al, 2014), de amostras ambientais e clínicas (JOSEPH et al, 2012b; CUI et al, 2014).

O CC64 é composto por oito ST (ST64, ST131, ST150, ST193, ST195, ST214, ST261 e ST282). Duas cepas foram identificadas como ST64: P4492, isolada de uma amostra de tempero; e P4798, isolada a partir de uma amostra de farinha de rosca (Figura 5). Estudos anteriores já identificaram a presença do ST64 em FID e macarrão (CUI et al, 2014); alimentos prontos para o consumo (XU et al, 2015), amostras ambientais e amostras clínicas (JOSEPH et al, 2012b).

CC65 abriga os ST83 e ST243. Neste estudo, as cepas P4497 e P4498, isoladas a partir de cereais à base de milho e arroz, respectivamente, foram identificadas como ST83 (Tabela 7). O ST83 já foi isolado de amostras de leite em pó na Austrália (JOSEPH et al, 2012b) e também de amostras de hemoculturas de neonatos na China (JOSEPH et al, 2012b) e em Israel (BLOCK et al, 2002). Logo, da mesma forma que descrito previamente em relação aos ST1 e ST31, a presença do ST83 nos alimentos infantis analisados representa um perigo em potencial.

Os ST17, ST33, ST103, ST117, ST136, ST188, ST233, ST283 e ST321 já foram isolados a partir de amostras de ambientes e/ou água e alimentos em diferentes países, mas nunca associados a casos clínicos (JOSEPH et al, 2012b; KILLER et al, 2015; XU et al, 2015).

O ST69 foi identificado em duas cepas (154 e 157) de *C. malonaticus* isoladas de amostras de leite em pó. O ST69 só possui mais uma única cepa depositada no banco de dados, tendo sido isolada de uma amostra de erva no Reino Unido em 2010 (JOSEPH et al, 2012b).

Os ST397, ST398, ST402, ST413, ST432, ST433, ST434, ST435, ST436 e ST439 foram descritos neste estudo e são únicos no banco de dados, sabendo-se então, até a presente data, que estes só foram identificados a em amostras de alimentos.

Os ST394 e ST440 também foram descritos neste estudo e representam o primeiro depósito de cepas da espécie *C. malonaticus* isoladas de amostras clínicas no Brasil. Estes ST recém-descritos não foram identificados em nenhum CC do banco de dados até o momento (Tabela 7).

Baseado na análise das sequências do gene *fusA*, foram identificadas quatro espécies dentre os isolados de amostras de alimentos, sendo as espécies *C. sakazakii* e *C. malonaticus* as mais frequentes (40/45). Este resultado é similar ao

observado em outros estudos que avaliaram a ocorrência de espécies de *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos (TURCOCKSKÝ et al, 2011; HOCHÉL et al, 2012; MOZROVÁ et al, 2014; KILLER et al, 2015). Além disso, estas espécies também são as mais frequentemente isoladas de amostras clínicas e associadas a casos de infecção em humanos (FAO/WHO, 2008; JOSEPH et al, 2012b; STRYDOM et al, 2012; ALSONOSI et al, 2015).

As análises filogenéticas baseadas nas sequências do alelo *fusA* e dos sete genes do MLST concatenados apresentaram resultado similar, uma vez que as espécies foram agrupadas nos seus respectivos grupos (Figuras 1, 2, 3 e 4). Os resultados das análises obtidos neste estudo corroboram com o descrito na literatura, que preconiza que a análise do gene *fusA* já é suficiente para determinação das espécies de *Cronobacter* (JOSEPH et al, 2012b). A cepa P4503 que apresentou uma sequência nova no banco de dados, identificada como alelo *fusA* 135 foi agrupada na clade da espécie *C. dublinensis* (Figuras 1 e 2) e classificada no biogrupo 6, que também é pertencente a esta espécie (Quadro 1).

As 54 cepas de *Cronobacter* estudadas foram classificadas em 36 ST, apresentando assim uma relação de 1,5 cepas por ST. Isso demonstra uma baixa clonalidade do gênero. No momento, o banco de dados de MLST de *Cronobacter* inclui sete espécies, o que pode ser uma das razões para essa baixa clonalidade encontrada entre as cepas depositadas. O aumento do depósito de sequências no futuro talvez permita a criação de um banco de dados específico para cada espécie de *Cronobacter* e, assim, mostrar uma relação clonal mais real desses microrganismos. Outro fato que mostra a expansão genética das espécies deste gênero foi a identificação de 16 novos ST entre os 36 ST encontrados neste estudo, que corresponde quase à metade de todos os ST descritos (44,4%). Logo, o contínuo incentivo à realização de estudos sobre a genética de populações de cepas do gênero *Cronobacter* se torna de grande importância para identificação dos ST e CC com maior potencial patogênico e suas relações com cepas ambientais, auxiliando assim na criação de medidas de controle destes patógenos e na identificação de surtos.

5.4 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS DE *Cronobacter* spp.

O antibiograma mostrou que a maioria das cepas avaliadas neste estudo foi sensível aos antimicrobianos testados. Estes resultados foram similares aos obtidos por outros autores que também isolaram cepas de *Cronobacter* spp. de alimentos susceptíveis a maioria dos antimicrobianos testados (KIM et al, 2008; MOLLOY et al, 2009; TERRAGO et al, 2009; LEE et al, 2012).

Das cepas clínicas, apenas a cepa P4970 (*C. malonaticus* ST394) apresentou diminuição da susceptibilidade a determinados antibióticos. Alguns autores reportaram o isolamento de cepas de *Cronobacter* spp. que apresentaram resistência ou com resistência intermediária a tetraciclina (CHON et al, 2012; HOCHERL et al, 2012; LEE et al, 2012), gentamicina (XU et al, 2015), penicilina G (XU et al, 2015), ampicilina (CAUBILLA-BARRON et al, 2007; KIM et al, 2008; CHON et al, 2012; LEE et al, 2012), cefotaxima (CAUBILLA-BARRON et al, 2007), estreptomicina (LEE et al, 2012), cefalotina (XU et al, 2015) e clorofenicol (LEE et al, 2012; XU et al, 2015). Contudo, a ocorrência destas cepas é sempre baixa dentro do total de cepas avaliadas.

A ampicilina é um antimicrobiano do grupo das aminopenicilinas e da classe dos β -lactâmicos, que tem ação bactericida, enquanto que o sulbactam age como inibidor de β -lactamase (KONEMAN et al, 2001). Caubilla-Barron e colaboradores (2007) já reportaram o isolamento de cepas de *Cronobacter* spp. resistentes a ampicilina-clavulanato e cefuroxima de amostras clínicas. A cefuroxima e ceftrixoana também são antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, pertencendo ao grupo das cefalosporinas de 2ª e 3ª geração, respectivamente (KONEMAN et al, 2001). O relato do isolamento de cepas de *Cronobacter* spp. resistentes a ceftrixoana não foi encontrado em estudos que testaram este antimicrobiano (HOCHERL et al, 2012). A resistência intermediária a SAM e resistência a CRX e CRO da cepa *C. malonaticus* P4970 pode estar associada à produção de β -lactamases, uma vez que esta característica já foi descrita em cepas de *Cronobacter* spp. (CAUBILLA-BARRON et al, 2007). Além disso, outros mecanismos de resistência a β -lactâmicos que já foram descritos dentro da família Enterobacteriaceae podem estar envolvidos, como: difusão deficiente, alteração de porinas, proteínas fixadoras de penicilinas alteradas e baixa força motriz de prótons (KONEMAN et al, 2001).

5.5 INVESTIGAÇÃO DO SURTO DE *Cronobacter* spp. OCORRIDO NO HOSPITAL MATERNIDADE DA CIDADE DE TERESINA-PI

Neste surto, não foi possível confirmar se o leite humano pasteurizado ou as FID foram o veículo de contaminação do *Cronobacter* spp., uma vez que não foi detectado contaminação deste patógeno nestas amostras. Esse fato pode estar associado à ausência real do patógeno ou a concentração da bactéria nas amostras estar abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados. De acordo com o relatório emitido pela FAO/WHO (2006), a concentração média de *Cronobacter* spp. em lotes de FID contaminados foi estimada em 0,01 UFC/100 g; demonstrando a importância de analisar uma quantidade representativa de amostras e de possuir um método com limite de detecção suficiente para identificar a contaminação quando presente. Além disso, a contaminação por *Cronobacter* spp. em lotes de FID tende a não ser homogênea, devido a formação de agregados celulares e biofilme, limitando assim a eficiência da amostragem aleatória no controle de qualidade para liberação de lotes de FID (JONGENBURGER et al, 2011).

Outra hipótese é que os microrganismos poderiam se encontrar presentes no estado viável mas não cultivável (VNC), uma vez que já foi descrito esse mecanismo em espécies do gênero *Cronobacter* (LEHNER, 2009; NĂȘCUȚIU, 2010). A existência de cepas de *Cronobacter* spp. no estado VNC é uma possível explicação do porque uma amostra de FID ou de outros produtos podem ser analisados tendo como resultado “negativo para contaminação por *Cronobacter* spp.” mas na verdade estariam contaminados (FARMER III, 2015).

K. pneumoniae subsp. *pneumoniae* foi detectada em uma das amostras de FID. Contudo, como a amostra analisada já estava aberta não é possível afirmar se a bactéria é de origem do produto ou se a contaminação ocorreu no momento da manipulação da fórmula. Outros autores já relataram a identificação desta bactéria em amostras de FID comercializadas no Brasil (CHAP et al, 2009; PALCICH et al, 2009). O outro microrganismo isolado, tanto de uma amostra de FID quanto de leite humano pasteurizado foi pertencente ao complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (Tabela 8). O patógeno oportunista *A. baumannii* já foi isolado de amostras de FIS comercializadas no Brasil em 2009 (CHAP et al, 2009). Logo, há forte indício de que a contaminação pela bactéria do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* na fórmula analisada neste surto tenha sido oriunda do próprio produto.

Outras fontes de contaminação, como o ambiente hospitalar, equipamentos de limpeza, utensílios para preparo da alimentação dos pacientes (ex: bicos de mamadeira, liquidificadores, etc), entre outros, podem ter sido o veículo de contaminação das cepas de *C. malonaticus*, uma vez que cepas de *Cronobacter* spp. já foram isoladas destes tipos de amostras em outros estudos (FRIEDEMANN et al, 2009; PALCICH et al, 2009). Contudo, essa suposição não pôde ser investigada no surto descrito, pois não foram coletadas amostras destes sítios para análise. Outros autores já relataram casos de infecções por *Cronobacter* spp. em neonatos em que não foi possível identificar nenhum alimento como veículo de contaminação, e o ambiente hospitalar foi sugerido como a possível fonte de contaminação (RAY et al, 2008; BROGE; LEE, 2013).

Neste estudo, cepas da espécie *C. malonaticus* ST394 e ST440 foram as responsáveis pelas infecções nas três pacientes. Mesmo sendo a espécie *C. sakazakii* a mais prevalente em casos de infecções em neonatos, outros estudos já relataram casos causados pela espécie *C. malonaticus*. Na Argentina, foram relatados dois casos de infecção por *C. malonaticus* em pacientes diferentes, sendo um caso em 2009 e outro em 2010. Análises posteriores revelaram que as duas cepas apresentavam o mesmo perfil de PFGE, demonstrando que o mesmo clone estava presente no segundo caso após um ano (ASATO et al, 2013). Hariri e colaboradores (2013) identificaram uma cepa isolada de hemocultura como *C. malonaticus* ST112, que causou meningite em um neonato com menos de um mês e posteriormente levou ao óbito do paciente.

A PFGE é considerada uma técnica de referência para tipificação de bactérias, sendo uma importante ferramenta para investigações epidemiológicas (TENOVER et al, 1995). No momento da realização da investigação ainda não existia um protocolo oficial para a técnica de PFGE. Neste estudo, os perfis obtidos na PFGE revelaram polimorfismo genético semelhante entre as três cepas o que sugeriria que as infecções teriam sido provocadas por uma mesma cepa ou por cepas fortemente relacionadas. Contudo, as diferenças no perfil fenotípico e molecular da cepa P4970 em relação às cepas P4968 e P4969, indica que protocolo utilizando apenas a enzima *SpeI* parece não possuir poder discriminatório suficiente para avaliação do perfil clonal de cepas de *C. malonaticus*. Outra questão é que o critério preconizado por Tenover e colaboradores (1995), que preconiza diferenças no perfil quando exista um número igual ou superior a três bandas de diferença,

talvez não seja suficientemente resolutivo para diferenciação de cepas de *C. malonaticus*. Cui e colaboradores (2014) reportaram que cepas de *Cronobacter* spp. que apresentaram o mesmo perfil de PFGE digeridos com a enzima *SpeI* apresentaram perfils diferentes de PFGE quando digeridos com a enzima *XbaI*, e vice-versa. De acordo com os autores, estes resultados indicam que, para melhor poder de resolução, pelo menos duas enzimas de restrição são necessárias no uso desta técnica para avaliações epidemiológica de cepas de *Cronobacter* spp. Outro fato reportado pelos autores foi que isolados com o mesmo perfil de PFGE foram classificados em ST diferentes. Este resultado foi similiar ao obtido presente estudo, uma vez que a cepa P4970 foi identificada como ST394 e as cepas P4968 e P4969 como ST440 (Tabela 7), mesmo as três cepas possuindo um perfil no PFGE muito similar (Figura 6). Atualmente, já se encontra disponível no site do *PulseNet* do CDC um protocolo de PFGE para *Cronobacter* spp. (CDC, 2016). Este protocolo preconiza o uso da enzima primária *XbaI* e *SpeI* como enzima secundária. Desta forma, caso no momento do estudo estas duas enzimas tivessem sido utilizadas, a técnica do PFGE poderia ter tido uma melhor resolução na tipificação dos isolados.

6 CONCLUSÕES

- *Cronobacter* spp. não foi detectada nas amostras de FID analisadas. Indicando baixa ocorrência nos produtos comercializados no local de estudo;
- *Cronobacter* spp. foi isolada a partir de amostras de alimentos infantis destinados a crianças de maior idade (23,3%), produtos farináceos (66,7%) e temperos e condimentos (36,7%), sendo a maior ocorrência em farinhas à base de milho. A presença de *Cronobacter* spp. em alimentos infantis destinados a crianças de maior idade representa um sério risco caso estes sejam ingeridos por neonatos;
- O uso do CSB/v no enriquecimento-seletivo e do DFI como meio de isolamento foi considerado o método mais eficiente para isolamento de *Cronobacter* spp. nas três categorias de produtos avaliados (alimentos infantis destinados a crianças de maior idade, produtos farináceos e temperos e condimentos);
- As cepas de *Cronobacter* spp. foram classificadas em nove biogrupos distintos (1, 2, 3, 5, 6, 8a, 9, 15 e 16), mas alguns biogrupos não apresentaram correspondência com as espécies de *Cronobacter* identificadas pelas técnicas moleculares, reforçando que esta técnica não é mais fidedigna para identificação das espécies de *Cronobacter*;
- Apenas uma cepa da espécie *C. malonaticus* de origem clínica apresentou resistência intermediária a ampicilina-sulbactam (2,2%) e resistência a ceftriaxona (2,2%) e cefuroxima (2,2%), sendo as demais cepas sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Estes resultados indicam que cepas isoladas de alimentos parecem possuir baixo potencial de resistência, mas isolados clínicos podem apresentar um perfil mais resistente;
- Foram isoladas cepas de quatro espécies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. dublinensis* e *C. muytjensii*, e os três protocolos de PCR utilizados para identificação das espécies de *Cronobacter* foram considerados eficazes por apresentaram resultados concordantes com o sequenciamento do gene *fusA*. Desta forma, o PCR convencional com alvo no gene *rpoB* e o M-PCR com alvo no gene *cgcA* parecem boas alternativas para identificação mais rápida das espécies de *Cronobacter*;
- Foram identificados 36 ST, sendo 16 ST novos descritos no banco: ST394, ST395, ST396, ST397, ST398, ST402, ST413, ST432, ST433, ST434, ST435, ST436, ST437, ST438, ST439 e ST440; e foram descritos 25 alelos novos;

- O isolamento de cepas *C. sakazakii* ST4 de leite em pó, utensílio para o preparo de mamadeiras e produtos farináceos é preocupante, uma vez que este ST é conhecido por causar infecções severas em neonatos;
- Dois clones distintos da espécie *C. malonaticus* identificados como ST394 e ST440 foram os responsáveis pelas infecções dos pacientes no surto ocorrido na cidade de Teresina-PI. Contudo, não foi possível identificar o veículo de contaminação do surto, uma vez que o patógeno não foi isolado nas amostras de alimentos suspeitas que foram ingeridas pelos pacientes;
- Foi observada uma relação de 1,5 cepas por ST, o que demonstra uma baixa clonalidade do gênero. A identificação de 16 novos ST entre os 36 ST encontrados neste estudo, que corresponde quase à metade de todos os ST descritos (44,4%), indica que a realização de mais estudos sobre a genética de populações das cepas do gênero *Cronobacter* são necessários para identificação dos ST e CC com maior potencial patogênico e suas relações com cepas ambientais, auxiliando assim na criação de medidas de controle destes patógenos e na identificação de surtos;
- O isolamento de cepas de *Cronobacter* em alimentos infantis e algumas ainda identificadas como ST já associados a casos de infecções severas em neonatos é um achado de extrema relevância. O uso incorreto destes produtos por neonatos poderá ter consequências graves. Logo, é de grande importância que os órgãos de Vigilância em Saúde realizem ações de comunicação de risco ou tomem outras medidas de forma a evitar o uso destes alimentos por neonatos.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH SANI, N. et al. Microbiological assessment and evaluation of rehydration instructions on powdered infant formulas, follow-up formulas, and infant foods in Malaysia. **J Dairy Sci**, v. 96, n. 1, p.1-8, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Câmara Técnica de Alimentos - CAT. **Informe Técnico n.º 59**. Brasília, DF. 22 jul. 2014a.

_____. Edital de Chamamento n.º 2, de 29 de julho de 2014. Edital de Chamamento para coletar dados e informações a respeito do risco de infecções de lactantes maiores de seis meses por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, ISSN 1677-7069, n.144, 30 jul. 2014b. Seção 3, p. 92-93.

_____. Regulação Sanitária / Assuntos de interesse / Agenda Regulatória Biênio 2015-2016. **Ciclo Quadrienal - Agenda Regulatória Biênio 2015-2016**. Brasília, DF. 2015.

ALSONOSI, A. et al. The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalized patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 34, n. 10, p. 1979-1988, 2015.

ARGENTINA NATIONAL ADMINISTRATION OF DRUGS, FOOD AND MEDICAL TECHNOLOGY (ANMAT). Retiro preventivo del mercado de un lote de fórmula infantil "SANCOR BEBÉ 2" Disponível na Internet: http://www.anmat.gov.ar/comunicados/Sancor_Bebe_2_14-07-15.pdf. Acesso em: 5 mar. 2016.

ASATO, V. C. et al. First clinical isolates of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Argentina: Characterization and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. **Rev Argent Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 160-164, 2013.

BALDWIN, A. et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 223, 2009.

BARREIRA, E. R. et al. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatria (São Paulo)**, v. 25, n. 1/2, p. 65-70, 2003.

BAUMGARTNER, A. et al. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. **Int J Food Microbiol**, v. 136 n. 2, p. 189-192, 2009.

BELAL, M. et al. Detection of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from medicinal plants and spices in Syria. **J Infect Dev Ctries**, v. 7, n. 2, p. 82-89, 2013.

BHAT, G. K. et al. Urinary tract infection due to *Enterobacter sakazakii*. **Int J Pathol M**, v. 52, n. 3, p. 430-431, 2009.

BLOCK, C. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 21, n. 8, p. 613-616, 2002.

BLOCK, C. Urinary tract infection due to *Enterobacter sakazakii*. **Int J Pathol M**, v. 52, n. 3, p. 430-431, 2009.

BOWEN, A. B.; BRADEN, C. R. Invasive *Enterobacter sakazakii* in infants. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 8, p. 1185-1189, 2006.

BRASIL. Presidência da República. Decreto-Lei n.º 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Seção 1, Parte I, 21 out. 1969.

BRASIL. Presidência da República. Constituição da República Federativa do Brasil de 5 de outubro 1998. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 out. 1988.

_____. Congresso Nacional. Lei n.º 8.080, de 19 de setembro de 1990. Regula em todo o território nacional, as ações e serviços de saúde, executados isolados ou conjuntamente, em caráter permanente ou eventual, por pessoas naturais ou jurídicas de direito público ou privado. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990.

_____. Congresso Nacional. Lei n.º 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 30 jan. 1999.

_____. Resolução RDC n.º 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção1, p. 45.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico**. Ano 5, n. 6, 2005. Disponível na Internet: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf. Acesso em: 1 out. 2013.

_____. Lei n.º 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, 18 set. 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Resolução RDC n.º 43 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactantes. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n.182, ISSN 1677-7042, p.90-92, 21 set. 2011a. Seção1.

_____. Resolução RDC n.º 44 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n.182, ISSN 1677-7042, p.92-94, 21 set. 2011b. Seção1.

_____. Resolução RDC n.º 45 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis lactantes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n.182, ISSN 1677-7042, p.94-96, 21 set. 2011c. Seção1.

_____. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. **Vigilância Em Saúde. Parte 2 Coleção Para Entender a Gestão do SUS**. 1ª. ed. Brasília: CONASS. v. 06. 113 p., 2011d.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: **Série B - Textos Básicos de Saúde**, ISBN 978-85-334-1911-7, 84 p., 2012.

_____. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos – Situação Epidemiológica – Dados Epidemiológicos – DTA 2010 a 2014**. 2014. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2014/>>. Acesso em: 17 jul. 2015.

BRENGI, S. P. et al. Development and validation of a PulseNet standardized protocol for subtyping isolates of Cronobacter species. **Foodborne Pathog Dis**, v. 9, n. 9, p. 861-867, 2012.

BROGE T, LEE A. A Case of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) Bacteremia in a Breastfed Infant. **J Ped Infect Dis**, v. 2, n. 4, p. 1-2, 2013.

CARTER, L. et al. Multiplex PCR Assay Targeting a Diguanylate Cyclase-Encoding Gene, *cgcA*, To Differentiate Species within the Genus *Cronobacter*. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, n. 2, p.734-737, 2013.

CAUBILLA-BARRON, J. C. et al. 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, n. 12, p.3979-3985, 2007.

CAWTHORN, D. et al. Evaluation of different method for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* from South African infant formula milks and the processing environmental. **Int J Food Microbiol**, v. 127, n. 1-2, p. 129-138, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). **PulseNet**. [internet]. Pathogens & Protocols. PulseNet Pathogens & Protocols. Atlanta, GA 30333, USA, 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>. Acesso em: 5 mar. 2016.

CETINKAYA, E. et al. Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. **Mol Cell Probes**, v. 27, n. 1, p. 60-64, 2013.

CHAP, J. et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. **Int J Food Microbiol**, v. 136, n. 2, p. 185-188, 2009.

CHEN, Y. et al. Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollaborative study. **J AOAC Int**, v. 92, n. 3, p. 862-872, 2009.

CHEN, Y. et al. Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. **J Food Prot**, v. 73, n. 6, p. 1016-1022, 2010.

CHEN, Y. et al. Incorporation of an Internal Control into the PCR Assay Published in "Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula". *J Food Prot*. 73(6):1016-1022. **J Food Prot**, v. 74, n. 6, p. 872-873, 2011.

CHEN, Y. et al. Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration Method for the Detection of *Cronobacter* in Powdered Infant Formula: A Collaborative Study. **J Food Prot**, v. 75, n. 6, p. 1144-1147, 2012a.

CHEN, Y. et al. **Cronobacter**. In: Bacteriological analytical manual. 8^a ed. Revision A, 1998. United States: Food and Drug Administration. Chapter 29, mar. 2012b.

CHON, J. et al. Isolation and Characterization of *Cronobacter* from Desiccated Foods in Korea. **J Food Sci**, v. 77, n. 7, p. M354-M358, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. **CLSI document M100-S25**. Wayne, PA, v. 35, n. 3, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for powdered formulae for infants and young children. **CAC/RCP 66**, 2008.

COMMISSION REGULATION (EC). The commissions of the European communities, Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L322, 12-29.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing - what is resolved?. **Trends Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 373-377, 2004.

CUI, J. et al. The Genotypic and Characterization of *Cronobacter* spp. isolated in China. **PloS One**, v. 9, n. 7, p. e102179, 2014.

DIAS, L. T.; LEONEL, M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciênc agrotec**, v. 30, n. 4, p. 692-700, 2006.

DRUGGAN, P.; IVERSEN, C. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. **Int J Food Microbiol**, v. 136, n. 2, p. 169-178, 2009.

EL-SHAROUD, W. M. et al. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. **BMC Microbiol**, v. 9, n. 24, p. 1-9, 2009.

FARMER, J. J. III. et al. The Enterobacteriaceae Study Group (USA). *Enterobacter sakazakii*: a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical species. **Int J Syst Evol Bacteriol**, v. 30, n. 3, p. 569-584, 1980.

FARMER, J. J. III. My 40-Year History with *Cronobacter/Enterobacter sakazakii* - Lessons Learned, Myths Debunked, and Recommendations. **Front Pediatr**, v. 3, n. 84, 2015.

FARRAPEIRA, C. M. R. et al. Coliform accumulation in *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) (Cirripedia) and its use as an organic pollution bioindicator in the estuarine area of Recife, Pernambuco, Brazil. **Braz J Biol**, v. 70, n. 2, p. 301-309, 2010.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Joint FAO/WHO workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Geneva, 2-5 February, 2004. **Proceedings**.

_____. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Meeting Report. Geneva: WHO, 2006. 115p. (Microbiological Risk Assessment Series n.º 10).

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula. **Guidelines**. Geneva: WHO, 2007. 26p.

_____. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting Report. Genova:WHO, 2008. 90p. (Microbiological Risk Assessment Series, 15).

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Isolation and Enumeration of *Enterobacter sakazakii* from Dehydrated Powdered Infant Formula. In: **Bacteriological analytical manual**: Archived Content. United States. July 2002; Revised August 2002.

FREITAS, L. G. et al. Ocorrência de *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) em alimentos infantis adquiridos em um hospital público. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 548-553, 2011.

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

FRIEDEMANN, M. et al. Epidemiological of invasive *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 28, n. 11, p. 1297-1304, 2009.

GARBOWSKA, M. et al. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. **Food Microbiol**, v. 49, p. 1-5, 2015.

GERMANO, P. M. L. G.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância Sanitária de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1088p, 2011.

GOSNEY, M. A. et al. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. **Eur J Int Med**, v. 17, n. 3, p.185-188, 2006.

GREENHALGH, T. How to read a paper: papers that report diagnostic or screening tests. **British Medical Journal**, v. 315, p. 540-543, 1997.

GRIM, C. et al. Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. **BMC Genomics**, v. 14, p. 366, 2013.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, v.41, p. 95-98, 1999.

HARIRI, S. et al. *Cronobacter sakazakii* ST4 Strains and Neonatal Meningitis, United States. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 175-177, 2013.

HASSAN, A. A. et al. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. **Int J Food Microbiol**, v. 116, n. 2, p.214-220, 2007.

HEIN, I. et al. Temporal and Spatial Distribution of *Cronobacter* Isolates in a Milk Powder Processing Plant Determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Foodborne Pathog Dis**, v. 6, n. 2, p. 225-33, 2009.

HO, P. L. et al. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases among bloodstream isolates of *Enterobacter* spp. in Hong Kong, 2000-2002. **J Antimicrob Chem**, v. 55, n. 3, p. 326-332, 2005.

HOCHTEL, I. et al. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. **J Appl Microbiol**, v. 112, n. 6, p.1257-1265, 2012.

HOLÝ, O.; FORSYTHE, S. *Cronobacter* spp. as emerging causes of health-care-associated infection. **J Hosp Infect**, v. 86, n. 3, p.169-177, 2014.

HOQUE, et al. Isolation and molecular identification of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula (PIF) in Bangladesh. **Int J Food Microbiol**, v. 142, n. 3, p. 375-378, 2010.

HUANG, C. et al. Use of novel species-specific PCR primers targeted to DNA gyrase subunit B (*gyrB*) gene for species identification of the *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter dublinensis*. **Mol Cell Probes**, v. 27, n. 1, p. 15-18, 2013.

HUANG, Y. et al. Occurrence and Characterization of *Cronobacter* spp. in Dehydrated Rice Powder from Chinese Supermarket. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. 1-11, 2015.

HUNTER, C. J. et al. *Enterobacter sakazakii*: An Emergent Pathogen In Infants and Neonates. **Surg Infect**, v. 9, n. 5, p. 533-539, 2008.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

INTERNATIONAL BABY FOOD ACTION NETWORK (IBFAN). **Reports and briefings on Contaminants in Baby Foods (and Product Recall List)**. ICDC [IBFAN International Code Documentation Centre] - Product Recall List. 2015. Disponível em: <<http://ibfan.org/fact-contaminants-reports-recall>>. Acesso em: 5 mar. 2016.

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

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO/TS 22964**. Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*. 2006.

_____. **ISO/DIS 22964**. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. (Under development). 2015. Disponível em: <<http://www.iso.org/iso/home/search.htm?qt=cronobacter&sort=rel&type=simple&published=on>>. Acesso em: 5 mar. 2016.

IVERSEN, C. et al. Identification and Phylogeny of *Enterobacter sakazakii* Relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* Species. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5368-5370, 2004a.

IVERSEN, C. et al. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* growth infant formula milk. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, p. 378-382, 2004b.

IVERSEN, C. et al. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. **BMC Microbiol**, v. 6, n. 94, p. 1-7, 2006.

IVERSEN, C. et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, com. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. **BMC Evol Biol**, v. 7, p. 64, 2007a.

IVERSEN, C. et al. The identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 11, p. 3814-3816, 2007b.

IVERSEN, C. et al. *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 Evol Microbiol**, v. 58, n. Pt6, p. 1442-1447, 2008a.

IVERSEN, C. et al. Development of a novel screening method for the isolation of "Cronobacter" spp. (*Enterobacter sakazakii*). **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 8, p. 2550-2553, 2008b.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 11, p. 443-454, 2003.

JACKSON, E. E. et al. Genotypic and phenotypic characteristics of *Cronobacter* species, with particular attention to the newly reclassified species *C. helveticus*, *C. pulveris* and *C. zurichensis*. **Food Microbiol**, v. 44, p. 226-235, 2014.

JACKSON, E. E. et al. Reevaluation of a Suspected *Cronobacter sakazakii* Outbreak in Mexico. **J Food Protect**, v. 78, n. 6, p. 1191-1196, 2015.

JACOBS, C. et al. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 8, p. 3801-3810, 2011.

JARADAT, Z. W. et al. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 225, 2009.

JASON, J. Prevention of Invasive *Cronobacter* Infections in Young Infants Fed Powdered Infant Formulas. **Pediatrics**, v. 130, n. 5, p. 1076-1084, 2012.

JIMENEZ, E.; GIMENEZ, C. Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. **Clin Microbiol Newsletter**, v. 4, p. 30, 1982.

JOLLEY, K. A. et al. mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 86, 2004.

JONGENBURGER, I. et al. Actual distribution of *Cronobacter* spp. in industrial batches of powdered infant formula and consequences for performance of sampling strategies. **Int J Food Microbiol**, v. 151, n. 1, p. 62-69, 2011.

JOSEPH, S.; FORSYTHE, S. J. Predominance of *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 4 in Neonatal Infections. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 9, p. 1713-1715, 2011.

JOSEPH, S. et al. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from leg infection, water, and food ingredients. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 62, n. 6, p. 1277-1283, 2012a.

JOSEPH, S. et al. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multi locus sequence typing. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 9, p. 3031-3039, 2012b.

JOSEPH, S. et al. Lack of continuity between *Cronobacter* biotypes and species as determined using multilocus sequence typing. **Mol Cell Probes**, v. 27, n. 3-4, p. 137-139, 2013.

KILLER, J. et al. Multilocus Sequence Typing of *Cronobacter* Strains Isolated from Retail Foods and Environmental Samples. **Foodborne Pathog Dis**, v. 12, n. 6, p. 514-521, 2015.

KIM, J. B. et al. Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. **Yonsei Med J**, v. 49, n. 6, p. 1017-1022, 2008.

KONEMAN, E. W. et al. Provas de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. In: _____. **Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido**. 5 ed. Editora Medsi, 2001. Cap 15, p. 795-865, 2001.

KOTHARY, M. H. et al. Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 13, p. 4142-4151, 2007.

KYNE, L. *Cronobacter* in elderly. In: Conferência Internacional sobre *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*), 1, UCD, Dublin, Irlanda, 2009. **Anais**. Disponível em: <<http://abeetle.tripod.com/kyne.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2015.

- LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults: case reports and a review of the literature. **Medicine**, v. 80, n. 2, p. 113-122, 2001.
- LAMPEL, K. A.; CHEN, Y. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. **Int J Food Microbiol**, v. 136, n. 2, p. 179-184, 2009.
- LEE, Y., et al. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. **Food Control**, v. 24, n. 1-2, p. 225-230, 2012.
- LEHNER, A. et al. 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. 43, 2004.
- LEHNER, A. et al. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. **BMC Microbiol**, v. 6, p. 15, 2006.
- LEHNER, A. Highlighting environmental reservoir aspects for *Cronobacter* spp. In: Conferência Internacional sobre *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*), 1, UCD, Dublin, Irlanda, 2009. **Anais**. Disponível em: < <http://crono09.tripod.com/lehner.pdf> >. Acesso em: 27 fev. 2016.
- LEHNER, A. et al. Identification of the recently described *Cronobacter condimenti* by an *rpoB*-gene-based PCR system. **J Med Microbiol**, v. 61, n. 7, p. 1034-1035, 2012.
- LIU, H. et al. Evaluation and implementation of a membrane filter method for *Cronobacter* detection in drinking water. **FEMS Microbiol Lett**, v. 344, n. 1, p. 60-68, 2013.
- LIU, Y. et al. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Mol Cell Probes**, v. 20, n. 1, p. 11-17, 2006.

LUCCHESE, G. A. A Vigilância Sanitária no Sistema Único de Saúde. 1ª Conferência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cadernos de Textos**. Brasília, ANVISA, 2001.

MEIER, G. O. et al. Pesquisa de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil e identificação das espécies por *Multiplex-PCR*. In: XIX ENCONTRO NACIONAL E V CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 2015, Natal, Rio Grande do Norte. **Anais...** Natal: SBAAL, 2015.

MOLLOY, C. et al. Surveillance and characterization by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. **Int J Food Microbiol**, v. 136, n. 2, p. 198-203, 2009.

MOZROVÁ, V. et al. Surveillance and characterization of *Cronobacter* spp. in Czech retail food and environmental samples. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 59, n. 1, p. 63-68, 2014.

MUYTJENS, H. L. et al. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family. **J Clin Microbiol**, v. 26, p. 743-746, 1988.

NAIR, M. K. M.; VENKITANARAYANAN, K. S. Cloning and Sequencing of the ompA Gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an ompA-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 4, p. 2539-2546, 2006.

NĂȘCUȚIU, A. M. Viable non-culturable bacteria. **Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol**, v. 55, n. 1, p. 11-18, 2010.

NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, CDC, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Foodborne and Diarrheal Diseases Branch. Subtipificación de patógenos bacterianos de transmisión alimentaria. **Manual de Procedimientos Laboratório – Traducción del “Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis”**. Buenos Aires, 2004.

NEWLL, D. G. et al. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **Int J Food Microbiol**, v. 139, Supl. 1, p. S13-S15, 2010.

OLIVEIRA, A. C. et al. Investigação de surto por *Enterobacter sakazakii* na Unidade de Neonatologia do HC/UFMG. In: **Anais da 2ª Bienal de Extensão da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 8 a 12 de novembro de 1999. p. 103.

OLIVEIRA, J. V. et al. Avaliação da Incidência de *Cronobacter* spp. em Maternidades Públicas de Belo Horizonte-MG. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia - 2011, 108-1, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2011. **Anais**. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R0108-1.html/>>. Acesso em: 8 set. 2015.

OSAILI, T.; FORSYTHE, S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. **Int. J. Food Microbiol**, v. 136, n. 2, p. 214-220, 2009.

OTTO, T. D. et al. ChromaPipe: A pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genet Mol Res**, v. 7, n. 3, p. 861–871, 2008.

PAGOTTO, F. J. et al. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. **J Food Prot**, v. 66, n. 3, p. 370-375, 2003.

PALCICH, G. et al. *Enterobacter sakazakii* in Dried Infant Formulas and Milk Kitchens of Maternity Wards in São Paulo, Brazil. **J Food Prot**, v. 72, n. 1, p. 37-42, 2009.

PATRICK, M. E. et al. Incidence of *Cronobacter* spp. Infections, United States, 2003-2009. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 9, p. 1520-1523, 2014.

PESSOA-SILVA, C. L. et al. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Inf Control and Hospital Epidemiol**, v. 21, p. 140, 2000.

PRIBYL, C. et al. Aztreonam in the treatment of serious orthopedic infections. **American J Medicine**, v.8, n.78, p. 51-56, 1985.

RAY, P. et al. *Enterobacter sakazakii* in infants: novel phenomenon in India. **Indian J Medical Microbiol**, v. 25, n. 4, p. 408-10, 2008.

RESTAINO, L. et al. A Chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources. **J Food Prot**, v. 69, n. 2, p. 315-322, 2006.

RICHARDS, G. M. et al. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. **J Food Prot**, v. 99, n. 4, p. 844-850, 2005.

SANTOS, M. et al. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. 2000.

SANTOS, R. F. S. **Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospitais e maternidades da região de Campinas / SP**. Campinas: UNICAMP, 2006. 91p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo.

SANTOS, R. F. S. et al. Screening for Cronobacter Species in Powdered and Reconstituted Infant Formulas and from Equipment Used in Formula Preparation in Maternity Hospitals. **Ann Nutr Metab**, v. 63, n. 1-2, p. 62-68, 2013.

SCHMID, M. et al. Evidence for plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. **Res Microbiol**, v. 160, n. 8, p. 608-614, 2009.

SEE, K. C. et al. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. **Age and Ageing**, v. 36, n. 5, p. 595-596, 2007.

SEO, K. H.; BRACKETT, R. E. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. **J Food Prot**, v. 68, n. 1, p. 59-63, 2005.

SINGH, N. et al. Prevalence and Characterization of *Cronobacter* spp. from Various Foods, Medicinal Plants, and Environmental Samples. **Curr Microbiol**, v. 71, n. 1, p. 31-38, 2015.

SOLER, M. et al. A New Validated Real-Time PCR-Based Method for the Specific and Fast Detection of *Cronobacter* spp. in Infant Formula. **Food Anal Methods**, v. 5, n. 2, p. 179-187, 2012.

STOOP, B. et al. Development and evaluation of rpoB based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. **Int J Food Microbiol**, v. 136, n. 2, p. 165-168, 2009.

STRYDOM, A. et al. Species of *Cronobacter*– A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. **I Dairy J**, v. 27, n. 1-2, p. 3-12, 2012.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TERRAGNO, R. et al. Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in Argentina. **Int J Food Microbiol**, v. 136, n. 2, p. 193-197, 2009.

TOWNSEND, S. et al. *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. **Microbiology**, v. 153, p. 3538-3547, 2007.

TOWNSEND, S. et al. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 64, 2008.

TSAI, H. et al. *Cronobacter* Infections Not from Infant Formula, Taiwan. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 167-169, 2013.

TURCOCKÝ, I. et al. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 2, p. 257-269, 2011.

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

XU, X. et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. **Int J Food Microbiol**, v. 204, p. 17-23, 2015.

YAN, Q. Q. et al. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. **J Appl Microbiol**, v. 113, n. 1, p.1-15, 2012.

YE, Y. et al. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *Ent.sakazakii* in dry food samples. **J Microbiol Methods**, v. 75, n. 3, p. 392-397, 2008.

YE, Y. et al. Comparison of Polymerase Chain Reaction and International Organization for Standardization Methods for Determination of *Enterobacter sakazakii* Contamination of Infant Formulas from Chinese Mainland Markets. **Foodborne Pathog Dis**, v. 6, n. 10, p. 1229-1234, 2009.

YE, Y. et al. Detection of Viable *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) by One-Step RT-PCR in Dry Aquatic Product. **J Food Sci**, v. 77, n. 11, p. M616-619, 2012.

WALDMAN, E. A.; FREITAS, F. R. M. A Vigilância epidemiológica e sua interface com as práticas de vigilância sanitária. In: COSTA, E. A. (Org.). **Vigilância Sanitária Desvendando o Enigma**. Salvador: Ed. Universidade Federal da Bahia, 2008. p. 135-148.

WARNKEN, M. B. ***Cronobacter* spp.: do isolamento à pesquisa de marcadores de virulência**. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2010. 140p. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

WARNKEN, M. B. et al. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 21-31, 2012.

GLOSSÁRIO

Criança de primeira infância – criança de doze meses até três anos de idade (36 meses) (BRASIL, 2011b).

Fórmula infantil– substituto do leite humano especialmente fabricado para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais dos lactantes durante os primeiros meses de vida até a introdução de alimentação complementar apropriada (CAC, 2008).

Fórmula infantil de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância – produto, em forma líquida ou em pó, utilizado quando indicado, para lactantes saudáveis a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e para crianças de primeira infância saudáveis, constituindo-se o principal elemento líquido de uma dieta progressivamente diversificada (BRASIL, 2011b).

Fórmula infantil de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância destinada a necessidades dietoterápicas específicas – aquela cuja composição foi alterada ou especialmente formulada para atender às necessidades específicas decorrentes de alterações fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes e/ou para a redução de riscos a alergias em indivíduos predispostos de lactantes a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e de crianças de primeira infância, constituindo-se o principal elemento líquido de uma dieta progressivamente diversificada (BRASIL, 2011c).

Fórmula infantil para lactantes– produto, em forma líquida ou em pó, utilizado sob prescrição, especialmente fabricado para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais dos lactantes saudáveis durante os primeiros seis meses de vida (5 meses e 29 dias) (BRASIL, 2011a).

Fórmula infantil para lactantes destinada a necessidades dietoterápicas específicas –aquela cuja composição foi alterada ou especialmente formulada para atender, por si só, às necessidades específicas decorrentes de alterações

fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes e/ou para a redução de riscos a alergias em indivíduos predispostos de lactantes até o sexto mês de vida (5 meses e 29 dias) (BRASIL, 2011c).

Fortificante de leite humano – produto que deve ser adicionado ao leite humano para prover nutrientes adicionais para alimentação de lactantes de baixo peso e prematuros (CAC, 2008).

Lactante– criança de zero a doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) (BRASIL, 2011a).

Recém-nascido – criança de zero a vinte e oito dias de idade incompletos (27 dias) (CAC, 2008).

Recém-nascido de alto risco – aquele que nasce prematuro de muito baixo peso (com menos de 34 semanas de idade gestacional), aquele de muito baixo peso ao nascer (peso inferior a 1.500 gramas), ou aquele que nasce com - ou logo após o nascimento apresenta – doença que necessita de tratamento intensivo (BRASIL, 2011c).

Recém-nascido pré-termo – aquele que nasce prematuro, ou seja, com menos de 37 semanas de idade gestacional (BRASIL, 2011c).

ANEXO A - REAGENTES PREPARADOS NO LABORATÓRIO PARA ESTE ESTUDO

Tampão de aplicação corado

Azul de bromofenol ¹	0,25 g
Xileno cianol ¹	0,25 g
Glicerol ¹	30,0 mL
Tris HCl 20 mM pH 8,0	q.s.p. 100 mL

¹- Invitrogen, EUA

Etanol 75%

Etanol P.A. (96%) ¹	31,25 mL
Água milli-Q estéril	8,75 mL

¹- Merck, Alemanha

Isopropanol 75%

Isopropanol P.A. (99,9%) ¹	30,3 mL
Água milli-Q estéril	9,7 mL

¹- Merck, Alemanha

**APÊNDICE A - PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS
ORIUNDAS DESTE TRABALHO**

Artigos Científicos

Título	Revista	Status
Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em fórmulas infantis desidratadas	Revista do Instituto Adolfo Lutz	Publicado
Investigação de um surto causado por <i>Cronobacter malonaticus</i> em um hospital maternidade em Teresina, Piauí: caracterização e tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado	Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia	Publicado
<i>Cronobacter</i> spp.: patógenos oportunistas de origem alimentar - uma revisão no Brasil	Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos	Submetido (aguardando avaliação)
Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of <i>Cronobacter</i> spp. in Brazil retail foods	Food Microbiology	Em elaboração

Apresentação de trabalhos em eventos científicos

Título	Evento	Ano
Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em alimentos infantis e identificação das espécies por PCR e sequenciamento do gene <i>fusA</i>	XVIII Congresso da Federación Farmacéutica Sudamericana e 8º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas	2015
Pesquisa de fatores de virulência em cepas de <i>Cronobacter</i> spp. isoladas no Brasil	IV Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	2015

Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em fórmulas infantis e fórmulas infantis de seguimento e identificação das espécies por reação da polimerase em cadeia	III Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	2014
Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em Fórmulas Infantis Desidratadas Comercializadas no Município de Rio de Janeiro, Brasil	VI Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária - SIMBRAVISA	2013

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO 1

Pesquisa de *Cronobacter* spp. em fórmulas infantis desidratadas

Screening the dehydrated powdered infant formulae for *Cronobacter* spp.

RIALA6/1607

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO^{1*}, Natália Scudeller UMEDA¹, Ivano de FILIPPIS²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel: (21) 3865-5161. E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br

²Laboratório de Micro-organismos de Referência, Setor de Bactérias e Arqueas de Referência, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 10.01.2014 - Aceito para publicação: 26.06.2014

RESUMO

Cronobacter spp. é uma bactéria oportunista associada a surtos de infecção em neonatos e crianças em virtude de consumo de fórmulas infantis desidratadas (FID). Neste contexto, o setor regulador tem criado normas específicas para o controle destes agentes patogênicos nas fórmulas infantis. Neste estudo foi pesquisada a ocorrência de *Cronobacter* spp. em 60 amostras de FID comercializadas no Rio de Janeiro, Brasil. Foram analisadas 30 amostras de fórmulas infantis para lactantes (0-6 meses) e 30 de fórmulas infantis de seguimento para lactantes (> 6 meses) seguindo-se a metodologia de cultivo descrita no *Bacteriological Analytical Manual Online-FDA* (2012). A identificação das colônias características foi realizada com uso de kits ID32E, API20E e do sistema Vitek 2.0; e pela reação da polimerase em cadeia (PCR) com alvo no gene *gluA*. Nenhuma amostra apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. Concluiu-se que a ocorrência de *Cronobacter* spp. em FID parece ser baixa, o que indica que os produtores estão cumprindo o disposto nas normas brasileiras vigentes de forma a evitar a contaminação dos produtos por este micro-organismo.

Palavras-chave. *Cronobacter* spp., formula infantil desidratada, PCR.

ABSTRACT

Cronobacter spp. is an opportunistic bacterium that is associated with infection outbreaks in neonates and infants due to the consumption of powdered infant formulas (PIF). In this context, the official regulator sector has created the specific standards for the industries to control these pathogens in the PIF. The present study aimed at evaluating the occurrence of *Cronobacter* spp. in 60 samples of PIF commercialized in Rio de Janeiro, Brazil. Thirty samples of infant formulas (0-6 months) and 30 samples of follow-up infant formulas (> 6 months) were analyzed according to the conventional methodologies described in the *Bacteriological Analytical Manual Online-FDA* (2012). The identification of characteristic colonies was performed using kits ID32E, API20E and Vitek 2.0 system and polymerase chain reaction (PCR) targeting the *gluA* gene. No sample showed contamination by *Cronobacter* spp. The occurrence of *Cronobacter* spp. in PIF seems to be low, indicating that the producers are complying with the provisions of the Brazilian standards in force to avoid the product contamination by this microorganism.

Keywords. *Cronobacter* spp., powdered infant formulae, PCR.

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. Nestes casos, uma das opções para dieta dos neonatos é o uso de fórmulas infantis desidratadas (FID)¹. *Cronobacter* spp. é considerado um patógeno emergente que representa perigo microbiológico em FID, por causar infecções, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunodeficientes, internados em hospitais. As principais síndromes clínicas das infecções por *Cronobacter* spp. incluem meningite, enterocolite necrosante e bacteremia; associadas com alta taxa de mortalidade².

As infecções causadas por *Cronobacter* spp. são raras e geralmente não são notificadas². No Brasil, casos de infecções por *Cronobacter* spp. em crianças e neonatos já foram reportados³. Contudo, este número é provavelmente subestimado, uma vez que a identificação correta destes micro-organismos nos serviços de assistência à saúde é dificultada pela ausência de métodos adequados disponíveis nestes serviços⁴.

Em 2008, o *Codex Alimentarius* publicou uma revisão do Código de Prática de Higiene para fórmulas em pó para lactantes de primeira infância (CAC/RCP 66 – 2008)¹, que cria um critério para *Cronobacter* spp. no controle da qualidade de fórmulas infantis em pó para lactantes (FIL) e FIS com propósitos médicos especiais, sendo estipulado um plano de duas classes com: $n = 30$, $c = 0$, e $m = 0/10g$; onde 'n' é o número de amostras que devem estar em conformidade com o critério; 'c' é o número máximo de unidades defeituosas da amostra em um plano de duas classes; e 'm' é o limite microbiológico que, em um plano de duas classes, separa o produto com qualidade satisfatória do produto defeituoso. Já para fórmulas de seguimento para lactantes em pó (FIS), a Comissão decidiu que, em países com substancial população de bebês até doze meses com comprometimento imunológico, devem ser adotados para FIS os mesmos critérios para FIL. No Brasil, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n.º 12/2001⁵, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, não contempla o padrão de pesquisa de *Cronobacter* spp. para FIL. Entretanto, tendo em vista a preocupação com o risco da contaminação de FID por *Cronobacter* spp., a ANVISA publicou em 2011 as RDC n.º 43⁶, 44⁷ e 45⁸, que estabelecem o regulamento técnico para FIL; para FIS; e

para FIL e FIS destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, respectivamente. Nestas resoluções, foi adotado que os fabricantes devem cumprir o disposto no CAC/RCP 66 – 2008¹ e suas atualizações.

A maioria dos trabalhos que pesquisaram *Cronobacter* spp. em FID utilizaram a norma ISO/TS 22964⁹, atualmente ainda em vigor. Contudo, relatos de resultados errôneos demonstraram que esta metodologia não é confiável e precisa ser melhorada⁴. Recentemente, o *Food and Drug Administration* (FDA) publicou uma revisão da metodologia para detecção/isolamento de *Cronobacter* spp. em FID¹⁰. Essa nova metodologia apresentou sensibilidade e especificidade satisfatória para identificação de *Cronobacter* spp. nestes produtos e ainda não foram observados trabalhos na literatura que apontem falhas nesta técnica.

Tendo em vista a escassez de dados relativos à prevalência de *Cronobacter* spp. em FID comercializadas no Brasil, o objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência deste patógeno em FIL e FIS.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Um total de 60 amostras de FID foi analisado. As amostras foram compostas por 24 amostras de FIL (0-6 meses); seis de FIL destinadas a necessidades dietoterápicas específicas à base de proteína de soja (0-6 meses); 21 de FIS (6-12 meses); seis de FIS destinadas a necessidades dietoterápicas específicas à base de proteína de soja (6-12 meses) e três de FIS (10-12 meses). As FIL foram produzidas por cinco fabricantes e compostas por 21 marcas distintas. As FIS foram produzidas por quatro fabricantes e compostas por 10 marcas distintas. As amostras foram coletadas de forma aleatória, em diferentes estabelecimentos (supermercados e drogarias) nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói do Estado do Rio de Janeiro no período de março a agosto de 2013. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio durante o período de análises.

Cepas bacterianas

As cepas de *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) e de *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas. A cepa de *C. sakazakii* também foi utilizada como controle positivo dos

testes utilizados na caracterização fenotípica.

Análise microbiológica

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada pelo método de cultivo descrito por Chen e colaboradores¹⁰. Cem gramas da amostra foram homogeneizadas com 900 mL de água peptonada tamponada (Merck, Inglaterra) com incubação a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Posteriormente, o pré-enriquecimento foi homogeneizado e duas alíquotas de 40 mL foram centrifugadas a 3.000 g/10 min (Eppendorf 5810R, A-4-81, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 200 µL de salina tamponada fosfatada. A partir de cada alíquota, foi realizada uma semeadura pela técnica de esgotamento e *spread plate* (100 µL da suspensão) em “Brilliance *Enterobacter sakazakii* agar” (DFI formulation; Oxoid, Inglaterra), “*Enterobacter sakazakii* chromogenic plating agar” (ESPM; R&F Products Inc., EUA) e “*Enterobacter sakazakii* isolation agar” (ESIA; AES Chemunex, França). As placas de DFI e ESPM foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. As placas de ESIA foram incubadas a 44 ± 2 °C por 24 h. As colônias características foram semeadas em ágar nutriente (BD, EUA) e caldo infusão cérebro-coração (BHI; Merck, Alemanha) incubados a 35 ± 2 °C por 24 h para realização dos ensaios posteriores.

Identificação de *Cronobacter* spp. por caracterização fenotípica

As culturas crescidas no ágar nutriente foram submetidas à confirmação bioquímica com uso dos kits miniaturizado ID 32E e API 20E (bioMérieux, França) e do sistema semi-automatizado Vitek 2.0 com uso de cartões GN TEST KIT VTK2 (bioMérieux, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Identificação de *Cronobacter* spp. por reação da polimerase em cadeia

A partir das culturas crescidas em BHI, foi realizada a extração de DNA com uso do kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, sendo eluído um volume final de 100 µL. Posteriormente as culturas foram submetidas a reação da polimerase em cadeia (PCR) com alvo no gene *gluA*, responsável pela atividade 1,6 α-glicosidase, para amplificação de um fragmento de 105 pares de base (pb) segundo o protocolo descrito por Iversen e colaboradores¹¹.

O DNA extraído da cepa de *C. sakazakii* ATCC

29544 (INCQS 00578) e água livre de DNA/RNA (BioBasic, Canadá) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Foram utilizadas salas segregadas para extração de DNA, preparo das reações, amplificação do DNA e eletroforese, de forma a evitar contaminação cruzada das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhuma amostra de FID analisada apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. As amostras de FIS não apresentaram crescimento de colônias em nenhum dos meios cromogênicos utilizados e dentre as amostras de FIL, apenas uma amostra apresentou colônias características (atividade α-glicosidase positiva) nos três meios cromogênicos. Contudo, as colônias suspeitas selecionadas não foram confirmadas como *Cronobacter* spp. tanto com o uso de técnicas fenotípicas como pela PCR. Apesar do ESIA não ser recomendado pela metodologia do FDA¹⁰, o mesmo foi incluído neste estudo por ser o meio cromogênico recomendando na metodologia ISO/TS 22964⁹. O ESIA apresentou o mesmo resultado dos meios DFI e ESPM, propiciando apenas o crescimento da cepa não-*Cronobacter* na amostra de FIS. Na caracterização fenotípica, a cepa não-*Cronobacter* também apresentou atividade α-glicosidase positiva, tanto no ID 32E quanto no Vitek 2.0, que é exatamente o marcador utilizado nos meios cromogênicos.

O protocolo de PCR utilizado neste estudo foi considerado 100 % sensível e específico para identificação do gênero *Cronobacter* pelos autores que o descreveram¹¹. O protocolo já foi aplicado na identificação de *Cronobacter* spp. em outros estudos e também apresentou resultados satisfatórios⁴. Logo, considerando o resultado obtido na PCR como método de referência, as técnicas fenotípicas empregadas neste estudo foram consideradas eficazes na identificação correta da cepa não-*Cronobacter* na amostra de FIS. Contudo, problemas na sensibilidade e especificidade com o uso do API 20E^{4,11} e do ID 32E^{11,12} já foram observados. Logo, o Vitek 2.0 parece ser o método fenotípico mais confiável, sendo considerado uma ferramenta de acurácia para identificação de cepas de *Cronobacter* spp.¹⁰.

Os resultados obtidos na avaliação das amostras de FIL foram similares a estudos realizados em outros países após a publicação do documento do *Codex Alimentarius*¹, que pesquisaram *Cronobacter* spp. e não encontraram nenhuma amostra contaminada^{13,14}. No

Brasil, Santos e colaboradores¹² detectaram *Cronobacter* spp. em 20,0 % (3/15) e em 85,7 % (6/7) das amostras de FIL e FIS, respectivamente, que analisaram na cidade de Campinas/SP. Contudo, este percentual pode estar associado ao fato de que no período do estudo (2007) os fabricantes não necessitavam cumprir o disposto no CAC/RCP 66 – 2008¹. Em pesquisas realizadas também no Estado de São Paulo após a publicação do CAC/RCP 66 – 2008¹, nenhuma amostra de FID contaminada com *Cronobacter* spp. foi encontrada^{14,15}.

A FAO/WHO² recomenda a pesquisa de *Enterobacteriaceae* em FID. Estas enterobactérias não-*Cronobacter* foram classificadas como “categoria B - plausíveis de causarem infecções, mas sem o apoio de evidências epidemiológicas” pelas comissões de especialistas. Neste estudo, as cepas da família *Enterobacteriaceae* não-*Cronobacter* isoladas a partir de uma amostra de FIL que apresentaram maior percentual de identificação foram *Pantoea* spp. (93,0 %), *Serratia ficaria* (99,8 %) ou *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Ozaenae* (48,8 %) de acordo com o Vitek 2.0, ID 32 E e API 20E, respectivamente. Outros autores já relataram a identificação destes micro-organismos em amostras de FID comercializadas no Brasil¹² e em outros países¹³. Bactérias do gênero *Klebsiella* e *Pantoea* já foram associadas com infecções neonatais, mas nunca tendo FID identificadas como o veículo de contaminação².

Em conclusão, a ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras de FID comercializadas parece ser baixa, indicando que os fabricantes estão cumprindo o disposto nas normas brasileiras vigentes de forma a evitar a contaminação dos produtos por este micro-organismo. Além disso, a ausência do patógeno nas formulações avaliadas também pode estar associada a uma fiscalização mais efetiva por parte do setor regulador.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo e ao CNPq por concessão de bolsa PIBIC a Natália Umeda. Ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz no qual Marcelo Brandão é aluno de doutorado.

REFERÊNCIAS

1. Codex Alimentarius Comission - CAC. Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for powdered formulae for infants and young children. CAC/RCP 66. 2008. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?no_cache=1].
2. Food and Agricultural Organization /World Health Organization – FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Meeting Report. Genova: WHO, 2006. 115p. Microbiological Risk Assessment Series N° 10. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/].
3. Santos M, Pessoa da Silva CL, Sampaio J, Marangoni DV, Pinto M, Moreira BM. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Control Hosp Ep*.2000;21(2):140.
4. Warnken MB, Brandao MLL, Souza AE, Romão CMCP, Nogueira ACMA, Destro MT. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71(1):21-31.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção 1, p 45.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º43 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactantes. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 90-2.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º44 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 92-4.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º45 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis lactantes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 94-6.
9. International Organization for Standardization - ISO. ISO/TS 22964 (IDF/RM 210:2006). Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*. 2006. 13p.
10. Chen Y, Lampel K, Hammack T. *Cronobacter*. In: Bacteriological analytical manual. 8ª ed. Revision A, 1998. United States: Food and Drug Administration. Chapter 29, mar. 2012. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm].
11. Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R, et al. The identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J Clin Microbiol*.2007;45(11):3814-16.

12. Santos RFS, Silva N, Junqueira VCA, Kajsik M, Forsythe S, Pereira JL. Screening for *Cronobacter* Species in Powdered and Reconstituted Infant Formulas and from Equipment Used in Formula Preparation in Maternity Hospitals. *Ann Nutr Metab*.2013;63(1-2):62-8.
13. Abdullah Sani N, Hartantyo SH, Forsythe SJ. Microbiological assessment and evaluation of rehydration instructions on powdered infant formulas, follow-up formulas, and infant foods in Malaysia. *J Dairy Sci*.2013;96(1):1-8.
14. Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J, et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol*.2009;136(2):185-8.
15. 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.

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO 2

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

Investigation of an outbreak caused by *Cronobacter malonaticus* in a Maternity Hospital in Teresina, Piauí: Characterization and typing by pulsed-field gel electrophoresis

Marcelo Luiz Lima Brandão*

Natália Scudeller Umeda

Karyne Rangel Carvalho

Ivano de Filippis

RESUMO

Cronobacter spp. são considerados patógenos oportunistas que causam infecções severas em neonatos devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas. Em 2013, três casos de infecção em neonatos associados à *Cronobacter* spp. foram relatados em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina, Piauí. O objetivo deste trabalho foi investigar o surto para elucidar o veículo de contaminação, identificar a espécie envolvida e avaliar a relação genética entre os isolados clínicos. As amostras de fórmulas infantis desidratadas e de leite humano pasteurizado ingeridas pelos neonatos foram analisadas por diferentes métodos de cultivo. As cepas clínicas foram caracterizadas fenotipicamente pelo sistema Vitek 2.0 e por provas bioquímicas convencionais. Para identificação do gênero e espécie, foi realizada a reação em cadeia pela polimerase (PCR) com alvo nos genes *gluA* e *rpoB*, respectivamente. Os isolados foram tipificados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) utilizando-se a enzima de restrição *SpeI*. Nenhuma amostra de alimento apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. Três isolados de hemocultura foram identificados como *C. malonaticus*, sendo duas classificadas no biogrupo 9 e uma no 5, e foram agrupados no mesmo genótipo. Os resultados sugerem que o mesmo clone foi responsável pela infecção nas três pacientes, porém não foi possível identificar a fonte de contaminação.

PALAVRAS-CHAVE: *Cronobacter* spp.; PFGE; Caracterização Fenotípica; Caracterização Genotípica; Fórmula Infantil

ABSTRACT

Cronobacter spp. are considered opportunistic pathogens that cause severe infections in newborns due to the consumption of powdered infant formulas. In 2013, three cases of infection in neonates caused by the *Cronobacter* spp. were reported in a Maternity Hospital at Teresina, Piauí. The objective of this study was to investigate the outbreak to elucidate the source of contamination, identify the species involved, and assess the genetic relatedness among the clinical isolates. The samples of powdered infant formulas and pasteurized human milk that were ingested by the neonates were analyzed by different cultivation methods. The clinical strains were phenotypically characterized by the Vitek 2.0 system and conventional biochemical tests. To identify the genus and species, polymerase chain reaction targeting *gluA* and *rpoB*, respectively, was performed. The isolates were typed by pulsed-field gel electrophoresis using the restriction enzyme *SpeI*. No food sample showed contamination by *Cronobacter* spp. Three blood isolates were identified as *C. malonaticus*, two classified as biogroup 9 and one as biogroup 5, and were grouped in the same genotype. Our results suggest that the same clone was responsible for infection in three patients, but the source of contamination could not be identified.

KEYWORDS: *Cronobacter* spp.; PFGE; Phenotypic Characterization; Genotypic Characterization; Infant Formulae

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br

Recebido: 10 jul 2014
Aprovado: 07 abr 2015



INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Cronobacter* são consideradas patógenos emergentes, tendo sido associadas a infecções em neonatos, principalmente devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas (FID) contaminadas^{1,2,3}. Os primeiros casos de infecção em neonatos foram reportados em 1958 na Inglaterra⁴. Desde então, estas bactérias são consideradas patógenos oportunistas que causam infecções com sérias consequências em neonatos². As síndromes clínicas das infecções incluem a meningite, enterocolite necrosante, além de infecções pulmonares, urinárias e bacteremia^{2,5,6}. A taxa de mortalidade nos casos de meningite é de aproximadamente 40% e a maioria dos sobreviventes apresenta sequelas graves⁷. Já nos casos de bacteremia e enterocolite necrosante, a taxa de mortalidade é estimada em 10,0% e 19,0%, respectivamente⁸.

Cepas de *Cronobacter* spp. já foram isoladas de uma série de produtos alimentícios, incluindo cereais, farináceos, legumes, ervas e condimentos, bebidas, frutas, hortaliças, carne e produtos cárneos, leite e laticínios, ovos e pescado^{9,10,11}. Contudo, apenas FID foram epidemiologicamente identificadas como veículo de contaminação em casos de infecções¹². A presença destes patógenos em FID levou ao recolhimento destes produtos por diferentes produtores em diversos países, incluindo o Brasil¹³.

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), acredita-se que as infecções causadas por *Cronobacter* spp. não sejam muito frequentes, sendo reportados de quatro a seis casos em neonatos por ano no mundo. Contudo, esse dado é subestimado, uma vez que a maioria dos casos não é notificada⁷. Grande parte dos casos de infecções descritos na literatura é proveniente de países desenvolvidos, no entanto a situação parece ser muito diferente nos demais países^{9,14}. Este fato pode estar relacionado à falta de um sistema de vigilância para notificação dos casos de infecções por *Cronobacter* spp.⁵. Além disso, muitos laboratórios clínicos, independentemente do país, não incluem a pesquisa de *Cronobacter* spp. em sua rotina e, na maioria dos casos, o relato das infecções por esses patógenos não é obrigatório. Desta forma, o conhecimento da epidemiologia das espécies de *Cronobacter* spp. se torna incompleto. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS)¹, existe um grande apelo para que se notifiquem os casos de infecções ocorridos, de forma a tentar elucidar a real incidência deste patógeno para que se possa traçar medidas de controle mais eficazes.

Em 2013, um surto causado por *Cronobacter* spp. ocorreu em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina no Estado do Piauí (PI), Brasil. Neste episódio, amostras de alimentos ingeridos pelos pacientes e isolados clínicos dos pacientes foram enviados ao INCQS/Fiocruz para análise. Este estudo teve por objetivo investigar um surto causado por *Cronobacter* spp. em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina-PI, para elucidar o veículo de contaminação e identificar as possíveis espécies envolvidas e suas relações genéticas.

METODOLOGIA

Amostras

Foram recebidas quatro amostras para análise: uma lata aberta contendo aproximadamente 343 g de fórmula infantil para recém-nascidos pré-termo e/ou de alto risco (amostra 1), uma lata aberta contendo aproximadamente 229 g de fórmula infantil para lactantes de 0 a 6 meses (amostra 2), e duas garrafas de borosilicato contendo em cada 300 mL de leite humano pasteurizado de lotes diferentes (amostras 3 e 4). As amostras foram coletadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública (Lacen) do Estado do Piauí (Lacen/PI) e enviadas ao INCQS/Fiocruz para análise. As amostras 1 e 2 foram mantidas em temperatura ambiente e as amostras 3 e 4 foram acondicionadas em freezer a temperatura de $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ até o momento das análises.

Análises microbiológicas

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada pelo método de cultivo descrito no *Bacteriological Analytical Manual do Food and Drug Administration* (BAM-FDA)¹⁵ e pela técnica de enriquecimento seletivo descrito na norma ISO/TS 22964:2006¹⁶. Nas amostras 1 e 2, foi analisado todo o conteúdo da lata, sendo a amostra 1 dividida em quatro alíquotas (três de 100 g e uma de 43 g) e a amostra 2 em três alíquotas (duas de 100 g e uma de 29 g). Nas amostras 3 e 4 foi analisada uma alíquota de 50 mL de cada amostra.

No ensaio realizado de acordo com a Metodologia BAM-FDA¹⁵, as alíquotas das amostras foram pesadas (amostras 1 e 2) ou aferidas em uma proveta estéril (amostras 3 e 4) e homogeneizadas com água peptonada tamponada (Merck, Inglaterra), na proporção 1:10, e incubadas a $35^\circ\text{C}/24$ h. Posteriormente, o pré-enriquecimento foi homogeneizado e duas alíquotas de 40 mL foram centrifugadas a 3.000 g/10 min (Eppendorf 5810R, A-4-81, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 μL de salina tamponada fosfatada. A partir de cada alíquota, foi realizada uma semeadura pela técnica de esgotamento e *spread plate* (100 μL da suspensão) em "*Brilliance Enterobacter sakazakii agar*" (DFI formulation; Oxoid, Inglaterra) e "*Enterobacter sakazakii chromogenic plating agar*" (ESPM; R&F Products Inc., EUA). As placas foram incubadas a $35^\circ\text{C}/24$ h.

No ensaio realizado de acordo com a norma ISO/TS 22964:2006¹⁶, a partir do pré-enriquecimento (descrito no texto acima), uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio modificado (mLST, Oxoid, CM1133, Inglaterra) contendo vancomicina (SR0247E, Oxoid, Inglaterra). O meio foi incubado a $44^\circ\text{C}/24$ h. Posteriormente foi realizado o isolamento no "*Enterobacter sakazakii Isolation agar*" (ESIA; AES Chemunex, França) e as placas incubadas a $44^\circ\text{C}/24$ h.

Isolados bacterianos

Em 2013, três isolados clínicos (C89, C90 e C91) provenientes do Lacen-PI foram enviados ao INCQS/Fiocruz. Estes isolados foram



obtidos da hemocultura de três pacientes distintas do sexo feminino que apresentaram quadro de bacteremia durante o mesmo período em que estiveram internadas no hospital em 2013. Após o recebimento, as culturas foram avaliadas quanto a sua pureza em ágar Columbia contendo 5% de sangue de carneiro (Merck, Alemanha) incubado a 35°C/24 h e posteriormente foram estocadas em caldo infusão cérebro coração (BHI; Merck, Alemanha) contendo 20 % de glicerol (Merck, Alemanha) a temperatura inferior a -70°C (Thermo, EUA). Para realização dos experimentos, uma alçada desta cultura foi semeada em 3,0 mL de caldo BHI e ágar nutriente (Merck, Alemanha) e incubados a 35°C/24 h.

As cepas de *Cronobacter sakazakii* INCQS 00578 (ATCC 29544) e de *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas.

Caracterização fenotípica

As colônias suspeitas obtidas nas análises microbiológicas e as cepas clínicas foram cultivadas em ágar nutriente e submetidas à confirmação do gênero através do sistema semi-automatizado Vitek 2.0 com uso de cartões GN TEST KIT VTK2 (bioMérieux, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em adição, as cepas confirmadas como *Cronobacter* spp. foram submetidas às provas bioquímicas convencionais descritas por Farmer et al.¹⁷ e complementadas por Iversen et al.¹⁸ para identificação dos biogrupos.

Caracterização molecular

As culturas foram cultivadas em BHI e submetidas à extração de DNA com uso do kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, sendo eluído em volume final de 100 µL. Em seguida, realizou-se a PCR com alvo no gene *gluA*, responsável pela atividade 1,6 α-glicosidase, para amplificação de um fragmento de 105 pares de base (pb) para confirmação do gênero¹⁹. Posteriormente, as cepas confirmadas como *Cronobacter* spp. foram submetidas à PCR com alvo no gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da polimerase ribossomal bacteriana, para identificação da espécie, seguindo o protocolo descrito por Stoop et al.²⁰.

O DNA extraído das cepas de *C. sakazakii* INCQS 00578 (ATCC 29544), *C. malonaticus* INCQS 619 (LMG 23826), *C. turicensis* INCQS 615 (LMG 23827), *C. muytjensii* INCQS 579 (ATCC 51329), *C. dublinensis* INCQS 618 (LMG 23823) e *C. universalis* INCQS 599 (NCTC 9529) foi utilizado como controle positivo para as reações da PCR. Água livre de DNA/RNA (BioBasic, Canadá) foi utilizada como controle negativo da reação.

Análise do polimorfismo do DNA genômico

Os isolados de *Cronobacter* spp. foram submetidos à avaliação do polimorfismo genético por PFGE de acordo com o protocolo *Pulsenet*²¹, com algumas modificações. O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose (1% *Seaken Gold Agarose*) com 1% dodecil sulfato de sódio). Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano em fase exponencial

foi suspensa em tampão para suspensão celular BSC (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8,0) para a obtenção da turvação correspondente a 3,0 da escala de McFarland. A 500 mL da suspensão de células, foi adicionado volume igual de agarose *low melting* a 1,1% (*Seaken Gold Agarose*) na temperatura de 50°C e 0,5 µL de proteinase K (Sigma, EUA). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos, contendo 2 mL de solução de lise (Tris-HCl 50 mM: 50 mM EDTA, pH 8,0 + sarcosil a 1%) e 0,5 µL de proteinase K e foram incubados a 50°C/2 h. Em seguida, o tampão foi retirado e os blocos lavados três vezes com 10 mL de água Milli-Q por 15 min a 50°C e uma vez com tampão TE nas mesmas condições. Os blocos foram incubados com 10 U da enzima de restrição *SpeI* (Sigma, EUA) durante 2 h a 37°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose à 1% preparado em tampão TE através da eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, EUA). A eletroforese foi realizada nas condições descritas por Bringi et al.²²: tempo de pulso crescente de 1,8 a 25 s, por 18 h a 6V/cm, a 14°C, com ângulo de 120°. Após a corrida os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL), observados e fotografados no Image Master VDS (Pharmacia Biotech). A análise dos genótipos foi realizada através de inspeção visual dos géis de agarose com base nos critérios estabelecidos por Tenover et al.²³. Os resultados obtidos foram analisados através de dendrogramas confeccionados a partir da análise da foto do gel no *software* Gel Compar II versão 4.0.

RESULTADOS

Cronobacter spp. não foi detectada em nenhuma amostra de alimento analisada (Tabela 1). Na análise pela metodologia ISO/TS 22964:2006¹⁶ todas as amostras apresentaram turvação no caldo mLST, contudo não houve crescimento de colônias características no ESIA. Na metodologia descrita no BAM-FDA¹⁵, as amostras 1, 2 e 3 apresentaram crescimento de colônias suspeitas no ESPM, contudo as cepas não foram confirmadas pela PCR. Uma colônia de cada amostra foi selecionada e submetida à identificação no sistema Vitek 2.0. As cepas foram identificadas como pertencente ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *A. baumannii* (amostra 1 e 3) e como *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (amostra 2).

Os três isolados clínicos foram confirmados como *Cronobacter* spp. pela PCR com alvo no gene *gluA*¹⁹ e pelo sistema semi-automatizado Vitek 2.0 (Tabela 2). As cepas 89 e 90 apresentaram o mesmo perfil bioquímico no sistema Vitek 2.0, enquanto que a cepa 91 divergiu em quatro provas, apresentando resultado positivo para alcalinização de L-lactato e produção de lipase, e resultado negativo para alcalinização de succinato e α-galactosidade. Esta diferença também foi observada na classificação dos biogrupos, uma vez que as cepas 89 e 90 foram classificadas no biogrupo 9, enquanto que a cepa C91 foi classificada como biogrupo 5, tendo como única diferença o resultado positivo para utilização do inositol.

As três cepas foram identificadas como *C. malonaticus* pela PCR com alvo no gene *rpoB*. A tipificação por PFGE classificou os três

Tabela 1. Resultado da análise das amostras de alimentos envolvidos no surto de toxinfecção alimentar causado por *Cronobacter malonaticus* em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina, Piauí, em 2013.

N.º da amostra	Aliquota (massa ou volume)	BAM-FDA (2012)		ISO/TS 22964:2006			Identificação		Resultado
		ESPM ¹	DFI ²	mLST ³	ESIA ⁴	PCR ⁵	Vitek 2.0 (% de probabilidade)		
1 - Lata aberta de fórmula infantil para recém-nascidos pré-termo e/ou de alto risco amostra	1 (100 g)	Pos ⁶	Aus ⁷	Tur ⁸	Aus	Neg ⁹	NR ¹⁰	Ausência em 343 g	
	2 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR		
	3 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i> (99)		
	4 (43 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR		
2 - Lata aberta contendo de fórmula infantil para lactantes de 0 a 6 meses	1 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (99)	Ausência em 229 g	
	2 (100 g)	Aus	Aus	Tur	Aus	NR	NR		
	3 (29 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR		
3 - Leite humano pasteurizado	50 mL	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i> (99)	Ausência em 50 mL	
4 - Leite humano pasteurizado	50 mL	Aus	Aus	Tur	Aus	NR	NR	Ausência em 50 mL	

¹ Enterobacter sakazakii chromogenic plating agar, ² Brilliance Enterobacter sakazakii agar, ³ Caldo lauril sulfato de sódio modificado, ⁴ Enterobacter sakazakii Isolation agar, ⁵ Reação em cadeia pela polimerase com alvo no gene *gluA* (Iversen et al., 2007), ⁶ Crescimento de colônias características, ⁷ Ausência de colônias características, ⁸ Presença de turvação, ⁹ Negativo, ¹⁰ Não realizado.

Tabela 2. Caracterização fenotípica e molecular dos isolados clínicos de *Cronobacter malonaticus* isolados de hemocultura de pacientes de um Hospital Maternidade na cidade de Teresina, Piauí, em 2013.

N.º da cepa	Caracterização fenotípica		Caracterização molecular		
	Vitek 2.0 (Bionúmero)	Biogrupo	PCR <i>gluA</i>	PCR <i>rpoB</i>	Perfil no PFGE ¹
C89	<i>Cronobacter</i> spp. (0625734053622010)	9	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. malonaticus</i>	1
C90	<i>Cronobacter</i> spp. (0625734053622010)	9	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. malonaticus</i>	1
C91	<i>Cronobacter</i> spp. (0625736053302010)	5	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. malonaticus</i>	1

¹ Eletroforese em gel de campo pulsado.

isolados com o mesmo pulsotipo com 89,3% de similaridade entre a cepa C91 e as cepas C89 e C90 e 100,0% de similaridade entre as cepas C89 e C90 (Figura).

DISCUSSÃO

Neste surto, não foi possível confirmar se o leite humano pasteurizado ou se as fórmulas infantis foram o veículo de contaminação do *Cronobacter* spp., uma vez que não foi detectado contaminação deste patógeno nestas amostras. Esse fato pode estar associado à ausência real do patógeno ou a concentração da bactéria nas amostras estar abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados. De acordo com o relatório emitido pela FAO/OMS¹, a concentração média de *Cronobacter* spp. em lotes de FID contaminados foi estimada em 0,01 UFC/100g; demonstrando a importância de analisar uma quantidade representativa de amostras e de possuir um método com limite

de detecção suficiente para identificar a contaminação quando presente. Outra hipótese é que os micro-organismos poderiam se encontrar presentes no estado viável, mas não cultivável (VNC), uma vez que já foi descrito esse mecanismo em espécies do gênero *Cronobacter*²⁴.

A FAO/OMS¹ recomenda a pesquisa de *Enterobacteriaceae* em FID. Estas enterobactérias não-*Cronobacter* foram classificadas como “categoria B - plausíveis de causarem infecções, mas sem o apoio de evidências epidemiológicas” pelas comissões de especialistas. Bactérias do gênero *Klebsiella* já foram associadas com infecções neonatais, mas nunca tendo FID identificadas como o veículo de contaminação. Neste estudo, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* foi detectada em uma das amostras de fórmulas infantis. Contudo, como a amostra analisada já estava aberta não é possível afirmar se esta bactéria é de origem do produto ou se a contaminação ocorreu no momento da manipulação da fórmula. Outros autores já relataram a identificação desta bactéria em amostras de FID comercializadas no Brasil^{25,26}. Outras bactérias também listadas como categoria B já foram isoladas de amostras de FID, incluindo *A. baumannii*. Este patógeno oportunista foi isolado de amostras de fórmulas infantis de seguimento comercializadas no Brasil em 2009²⁵. Logo, a contaminação pela cepa do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* da fórmula analisada neste surto pode ter sido oriunda do próprio produto ou no momento da manipulação do produto. Outras fontes de



Figura. Polimorfismo genético dos três isolados de *Cronobacter malonaticus* determinado por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA com enzima de restrição *SpeI*.



contaminação, como o ambiente hospitalar, equipamentos de limpeza, utensílios para preparo da alimentação dos pacientes (ex: bicos de mamadeira, liquidificadores, etc), entre outros, podem ter sido o veículo de contaminação da cepa de *C. malonaticus*, uma vez que cepas de *Cronobacter* spp. já foram isoladas deste tipo de amostra em outros estudos^{8,26}. Contudo, essa suposição não pôde ser investigada no surto descrito neste estudo, pois não foram coletadas amostras destes sítios para análise. Outros autores já relataram casos de infecções por *Cronobacter* spp. em neonatos em que não foi possível identificar nenhum alimento como veículo de contaminação, e o ambiente hospitalar foi sugerido como a possível fonte de contaminação^{27,28}.

Casos de infecções causados por *Cronobacter* spp. em neonatos já foram relatados no Brasil^{29,30,31}. Contudo, em alguns não houve uma investigação epidemiológica para determinar o veículo de contaminação destes pacientes^{29,31}. Já em um dos casos ocorridos, o veículo de contaminação identificado foi a solução de nutrição parenteral, uma vez que *Cronobacter* spp. foi identificado em bolsas fechadas desta solução³⁰.

Nem todas as espécies de *Cronobacter* spp. foram associadas a infecções, e a severidade da virulência varia entre as diferentes estirpes do gênero^{3,32}. Até o momento, apenas três espécies foram isoladas em infecções neonatais: *C. sakazakii*, *C. malonaticus* e *C. turicensis*³². Neste estudo, uma cepa de *C. malonaticus* foi a responsável pelas infecções nas três pacientes. Mesmo sendo a espécie *C. sakazakii* a mais prevalente em casos de infecções, outros estudos já identificaram *C. malonaticus* causando infecções em neonatos. Na Argentina, foram relatados dois casos de infecção por *C. malonaticus* em pacientes distintos sendo um caso em 2009 e outro em 2010³³. Análises posteriores revelaram que as duas cepas apresentavam o mesmo perfil de PFGE, demonstrando que o mesmo clone estava presente no segundo caso após um ano.

A PFGE é considerada uma técnica padrão ouro na tipificação de bactérias, sendo uma importante ferramenta para investigações epidemiológicas²². Até a presente data, ainda não se encontra disponível no site do *PulseNet* do CDC³⁴ um protocolo de PFGE para *Cronobacter* spp. Contudo, este já se encontra em fase de desenvolvimento e validação, para posterior incorporação²². Neste estudo, mesmo a cepa C91 tendo apresentando um perfil fenotípico distinto das demais, os perfis obtidos na PFGE revelaram polimorfismo genético semelhante entre as três cepas o que sugere que as infecções foram provocadas pela mesma cepa ou por cepas fortemente relacionadas.

CONCLUSÕES

Não foi possível identificar o veículo de contaminação do surto, uma vez que o patógeno não foi isolado nas amostras de alimentos suspeitas que foram ingeridas pelas pacientes do Hospital Maternidade. É importante a condução de uma investigação epidemiológica adequada nos casos de surtos. Dessa forma, recomenda-se também realizar a coleta de amostras ambientais, visando elucidar se estas poderiam ser a fonte de infecção. Mesmo com diferenças no fenótipo de um dos três isolados clínicos, a tipificação revelou que o mesmo clone foi responsável pela infecção nas três pacientes, sendo este identificado como *C. malonaticus*.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz, pelo financiamento deste estudo, e ao CNPq, por concessão de bolsa PIBIC a Natália Umeda. Ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz no qual Marcelo Brandão é aluno de doutorado. À Vigilância Sanitária e ao Lacen/PI pela coleta e envio das amostras.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization - WHO. Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Meeting Report. Geneva: World Health Organization; 2006 [acessado 14 jun 2014]. (Microbiological risk assessment series, Vol. 10). Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/>
2. Jason J. Prevention of invasive Cronobacter infections in young infants fed powdered infant formulas. *Pediatrics*. 2012;130(5):e1076-84. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2011-3855>
3. Yan QQ, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S. Cronobacter species (formerly known as Enterobacter sakazakii) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *J Appl Microbiol*. 2012;113(1):1-15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05281.x>
4. Urmenyi AM, Franklin AW. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet*. 1961;1(7172):313-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(61\)91481-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(61)91481-7)
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cronobacter species isolated in two infants - New Mexico, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58(42):1179-83.
6. Strydom A, Cawthorn D, Cameron M, Witthuhn RC. Species of Cronobacter: a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *Int Dairy J*. 2012;27(1-2):3-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.06.005>
7. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Cronobacter. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2012 [citado 15 jun 2014]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cronobacter/>
8. Friedemann M. Epidemiology of invasive neonatal Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(11):1297-304. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-009-0779-4>
9. Turcocsy I, Kuniková K, Drahovská H, Kaclíková E. Biochemical and molecular characterization of Cronobacter spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011;99(2):257-69.



10. Ye Y, Wu Q, Zhang J, Jiang H, Hu W. Detection of viable *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) by one-step RT-PCR in dry aquatic product. *J Food Sci.* 2012;77(11):M616-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02951.x>
11. Hochel I, Růžičková H, Krásný L, Demnerová K. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. *J Appl Microbiol.* 2012;112(6):1257-65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05292.x>
12. Codex Alimentarius Commission - CAC. Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for powdered formulae for infants and young children. 2008 [acessado 8 maio 2015]. (CAC/RCP 66, 2008). Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP>
13. International Baby Food Action Network - IBFAN. Reports and briefings on contaminants in baby foods (and product recall list). 2013 [acessado 14 jul 2014]. Disponível em: <http://ibfan.org/fact-contaminants-reports-recall>
14. Bowen AB, Braden CR. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1185-9.
15. Chen Y, Lampel K, Hammack T. *Cronobacter*. In: U. S. Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*. Silver Spring: Food and Drug Administration; 2012 [acessado 14 jul 2014]. Chapter 29. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm>
16. International Organization for Standardization - ISO. ISO/TS 22964:2006. Milk and milk products: detection of *Enterobacter sakazakii*. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.
17. Farmer JJ 3rd, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1980;30(3):569-84. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-30-3-569>
18. Iversen C, Waddington M, Farmer JJ, Forsythe SJ. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiol.* 2006;6(94):1-7.
19. Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R et al. Identification of "*Cronobacter*" spp (*Enterobacter sakazakii*). *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3814-6. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-6-94>
20. Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol.* 2009;136(2):165-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.023>
21. National Center for Infectious Diseases, Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Subtipificación de patógenos bacterianos de transmisión alimentaria: manual de procedimientos laboratorio. Buenos Aires: National Center for Infectious Diseases; 2004.
22. Brengi SP, O'Brien SB, Pichel M, Iversen C, Arduino M, Binsztein N et al. Development and validation of a PulseNet standardized protocol for subtyping isolates of *Cronobacter* species. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(9):861-7. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1161>
23. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.
24. Nășcuțiu AM. [Viable non-culturable bacteria]. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.* 2010;55(1):11-8. Romeno.
25. Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol.* 2009;136(2):185-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.005>
26. Palcich G, Gillio CM, Aragon-Alegro LC, Pagotto FJ, Farber JM, Landgraf M et al. *Enterobacter sakazakii* in dried infant formulas and milk kitchens of maternity wards in São Paulo, Brazil. *J Food Prot.* 2009;72(1):37-42.
27. Broge T, Lee A. A case of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* bacteremia in a breastfed infant. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2013;2(4):1-2. <http://dx.doi.org/10.1093/jpids/pit021>
28. Ray P, Das A, Gautam V, Jain N, Narang A, Sharma M. *Enterobacter sakazakii* in infants: novel phenomenon in India. *Indian J Med Microbiol.* 2007;25(4):408-10. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.37351>
29. Oliveira AC, Martinho GH, Dias RR, Savassi LCM. Investigação de surto por *Enterobacter sakazakii* na Unidade de Neonatologia do HC/UFMG. In: Anais da 2a Bienal de Extensão da Universidade Federal de Minas Gerais; 1999; Belo Horizonte. p. 103.
30. Santos M, Pessoa da Silva CL, Sampaio J, Marangoni DV, Pinto M, Moreira BM. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21(2):140.
31. Barreira ER, Souza DC, Gois PF, Fernandes JC. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. *Pediatria (São Paulo).* 2003;25(1/2):65-70.
32. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00905-12>
33. Asato VC, Vilches VE, Pineda MG, Casanueva E, Cane A, Moroni MP, et al. First clinical isolates of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Argentina: characterization and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. *Rev Argent Microbiol.* 2013;45(3):160-4.
34. Centers for Disease Control and Prevention - CDC, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. PulseNet. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention - CDC; 2013 [acessado 15 jun 2014]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>



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