

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

LUIZA VASCONCELLOS

ÁGUAS MINERAIS NATURAIS EM EMBALAGENS PLÁSTICAS RETORNÁVEIS -  
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
MOLECULAR DE PATÓGENOS

Rio de Janeiro

2019

Luiza Vasconcellos

ÁGUAS MINERAIS NATURAIS EM EMBALAGENS PLÁSTICAS RETORNÁVEIS -  
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
MOLECULAR DE PATÓGENOS

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Célia Maria C. P. Araujo Romão

Co-orientador: Marcelo Luiz Lima Brandão

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Vasconcellos, Luiza

Águas minerais naturais em embalagens plásticas retornáveis-gualidade microbiológica e caracterização fenotópica e molecular de patógenos. / Luiza Vasconcellos. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.  
75 f. : il. ; fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão.  
Co-orientador: Marcelo Luiz Lima Brandão.

1. Águas minerais. 2. Pseudomonas aeruginosa. 3. Cronobacter. 4. Tipagem de Sequências Multilocus. 5. ERIC-PCR. I. Título.

Natural mineral waters in returnable plastic bottles - microbiological quality, phenotypic and molecular characterization of pathogens.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Luiza Vasconcellos

ÁGUAS MINERAIS NATURAIS EM EMBALAGENS PLÁSTICAS RETORNÁVEIS -  
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
MOLECULAR DE PATÓGENOS

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 11/12/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Sílvia Maria dos Reis Lopes (Doutora)  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

---

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

---

Cátia Aparecida Chaia de Miranda (Doutora)  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

ORIENTADORES

---

Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ

---

Marcelo Luiz Lima Brandão (Doutor) – Co-orientador  
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio Manguinhos - FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Deus e aos amigos espirituais por todas as conquistas que realizei até o momento, incluindo a força necessária para passar por esta fase que não foi nada fácil.

À minha mãe e irmãos por todo o apoio, conselhos e torcida em todas as etapas da minha vida.

Ao meu marido Filipe por me incentivar em todos os meus projetos, por me apoiar e me mostrar que apesar das coisas nem sempre acontecerem da forma em que eu gostaria, os melhores caminhos sempre aparecem.

Ao programa de Pós-Graduação do INCQS.

À toda equipe do setor de Alimentos por toda ajuda, suporte e bons momentos compartilhados durante o período em que desenvolvi os meus experimentos: Sílvia, Ingrid, Paula, Mariana, Jéssica, Nathália e Jandira. Em especial: Carla, Valéria e Cátia Chaia – vocês são incríveis!

À Célia, minha orientadora, por todo o suporte sempre que necessário. Grande profissional que eu admiro muito e que me acompanha desde a época em que eu ainda era uma simples estagiária graduanda.

Ao Marcelo Brandão, meu orientador e amigo, por todos os ensinamentos, conselhos, desabafos, longas conversas, parceria, e claro, por ter dado o seu máximo para conseguirmos os insumos e reagentes necessários para o desenvolvimento dos ensaios. Vou levar a nossa parceria por toda a minha vida. Tenho muita gratidão por ter te conhecido e aprendido tanto com você. Muito muito obrigada!

Aos amigos que estão comigo desde a residência e aos que se agregaram durante o mestrado: Jorginho, Gleyce, Thaiz, Nathália e Gladson.

A todo o departamento de Microbiologia do INCQS onde concluí meus experimentos com êxito, em especial ao pessoal do Meio de Cultura e central de Esterilização por todo o suporte.

À Plataforma-PDTIS de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) pelas reações de sequenciamento das minhas cepas.

À Marize Miagostovich, do Instituto Oswaldo Cruz, pela parceria no estudo, possibilitando a análise de norovírus nas mesmas amostras, além da viabilidade e auxílio financeiro com a compra dos galões de água e dos meios de cultura para análise bacteriológica, especificamente à Isabelle Luz, pós-doutoranda do laboratório.

Ao Professor Stephen Forsythe, por todas as correções e ajuda durante a redação do artigo final.

Quando o homem aprender a amar e respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-los a amar seus semelhantes.

Albert Schweitzer

## RESUMO

A produção e consumo de água mineral natural no Brasil aumentaram nos últimos anos, principalmente devido à insatisfação da população com a água proveniente dos sistemas públicos de abastecimento, e pelas propriedades nutricionais que são oferecidas por estes produtos. Entretanto, estudos já relataram a ocorrência de contaminação bacteriana, principalmente em águas envasadas em embalagens plástico-garrafão reutilizáveis de 20 L. Esta contaminação representa um risco para a população, principalmente para os indivíduos pertencentes ao grupo de risco, como idosos, imunocomprometidos, gestantes e portadores de doenças crônicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de águas minerais naturais e sua relação com o prazo de validade das embalagens plástico-garrafão reutilizáveis de 20 L, com ênfase no isolamento de *Cronobacter* spp. e *P. aeruginosa*, avaliando a produção de biofilme, a resistência do biofilme a ação de sanitizantes, o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a diversidade genética pela técnica do *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) e ERIC-PCR. Foram analisadas 33 amostras representativas (três amostras de cada lote, totalizando 99 amostras), levando em consideração a validade do galão de 0-1 ano, de 1-2 anos e de 2-3 anos de água minerais naturais acondicionadas em embalagens plástico-garrafão reutilizáveis de 20 L comercializadas nos municípios do Rio de Janeiro-RJ e Niterói-RJ, sendo avaliados os seguintes parâmetros: coliformes totais, *Escherichia coli*, enterococos, clostrídios sulfito redutores, *Pseudomonas aeruginosa* e *Cronobacter* spp. Das 99 amostras, 22 (22,2%) apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória de acordo com os critérios estabelecidos na RDC nº 275/2005, com contaminação por coliformes totais (16,2%), *P. aeruginosa* (10,1%), clostrídios sulfito redutores (5,0%) e *E. coli* (2,0%). Considerando as 33 amostras representativas analisadas, 16 (39,4%) lotes apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória. *Cronobacter* foi isolado de uma (1,1%) amostra, sendo a cepa identificada como *C. malonaticus* ST440, sensível a todos os antimicrobianos e não formadora de biofilme em poliestireno. Das 10 (10,1%) amostras contaminadas por *P. aeruginosa*, seis cepas foram isoladas e caracterizadas, e não apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, mas apresentaram produção de biofilme em matriz poliestireno. O biofilme produzido não foi eliminado após a exposição hipoclorito de sódio a 0,02%. Os isolados de *P. aeruginosa* foram identificados como ST 252, 1417, 2502, 2620 e 3078, e um novo ST 3312 foi descrito. Diferenças significativas foram observadas em relação ao prazo de validade das embalagens plástico-garrafão reutilizáveis, sinalizando que embalagens com tempo de fabricação superiores a dois anos apresentam



maior risco de contaminação microbiológica. Estes resultados poderão ser utilizados pelos órgãos de Vigilância Sanitária para proposicao de medidas de controle mais eficazes para reduzir a contaminação nestes produtos.

Palavras-chave: Água Mineral Natural. *P. Aeruginosa*. *Cronobacter* spp. MLST. ERIC-PCR. Biofilme. Antibiograma.

## ABSTRACT

The production and consumption of natural mineral water in Brazil has increased in recent years, mainly due to the dissatisfaction of the population with the water from public supply systems, and the nutritional properties that are offered by these products. However, studies have reported the occurrence of bacterial contamination, especially in 20 L mineral water returned plastic bottled. This contamination represents a risk, especially for individuals belonging to the risk group, such as the elderly, immunosuppressed, pregnant women and patients with chronic diseases. The aims of this study was to assess the microbiological quality of mineral natural waters and the time of manufacture of the returnable bottle, with emphasis on the isolation of *Cronobacter* spp. and *P. aeruginosa*, evaluating biofilm production, biofilm resistance to sanitizing action, antibiotic susceptibility profile and genetic diversity by the Multi-locus Sequence Typing (MLST) and ERIC-PCR. A total of 33 representative samples (three from each lot, totalizing 99 individual samples) were analyzed and the time of manufacture of 0-1, 1-2 and 2-3 years of the returnable bottle commercialized from retailers located in Rio de Janeiro-RJ and Niterói-RJ evaluating for bacterial contamination in total coliforms, *Escherichia coli*, enterococci, clostridium sulphite-reducing, *Pseudomonas aeruginosa* and *Cronobacter* spp. In the 99 samples, 22 (22.2%) were considered unsatisfactory for human consumption according to Brazilian legislation, with a total coliform contamination (16,2%), *P. aeruginosa* (10,1%), clostridium sulphite-reducing (5,0%) and *E. coli* (2,0%). Furthermore, considering each representative sample, from the 33 lots analyzed, 16 (39.4%) lots were considered unsatisfactory. One (3.0%) sample showed contamination by *C. malonaticus* ST440. The strain was susceptible to all antibiotics tested and not formed biofilm in polystyrene microplates. A total of 10 (10,1%) samples contaminated by *P. aeruginosa*, six strains was isolated and was susceptible to all antibiotics tested, but showed biofilm in polystyrene. The formed biofilm not was eliminated after 0,02% sanitizing action. The strains of *P. aeruginosa* was identified by ST 252, 1417, 2502, 2620 and 3078, and a new ST 3312 was described. Significant differences were observed regarding the shelf life of reusable plastic-bottle packaging, indicating that packaging with a manufacturing time longer than two years presents a higher risk of microbiological contamination. These results may be used by Health Surveillance agencies to propose more effective control measures to reduce contamination in these products.

Keywords: Natural Mineral Water. *P. Aeruginosa*. *Cronobacter* spp. MLST. ERIC-PCR.  
Biofilm. Antibiogram.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Caracterização microbiológica das amostras de água minerais naturais comercializadas em galões de 20 L analisadas neste estudo.....	49
Tabela 2 - Caracterização fenotípica, perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e produção de biofilme dos isolados.....	54

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critério da RDC n.º 275/2005 para avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais naturais e águas naturais.....	19
Quadro 2 - Critérios da consulta pública n.º 541/2018 para revisão da RDC n.º 275/2005.....	19
Quadro 3 - Ocorrência de micro-organismos indicadores de contaminação de origem fecal em águas minerais no Brasil.....	22
Quadro 4 - Cepas de referência utilizadas nas análises.....	34
Quadro 5 - Quantificação de acordo com a técnica do Número Mais Provável.....	35
Quadro 6 - Protocolo de reação de qPCR com alvo no gene <i>dnaG</i> .....	39
Quadro 7 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes do MLST de <i>Cronobacter</i> .....	39
Quadro 8 - Iniciadores para PCR com alvo no gene 16S rRNA para identificação de <i>P. aeruginosa</i> .....	41
Quadro 9 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes do MLST de <i>P.aeruginosa</i> .....	42
Quadro 10 - Critérios de aderência de Biofilme.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Minimum Spanning Tree</i> (Árvore de Abrangência mínima) dos isolados de <i>Cronobacter</i> spp. do Brasil.....	28
Figura 2 - <i>Minimum Spanning Tree</i> (Árvore de Abrangência mínima) dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> oriundos de amostras de água de diversos países.....	30
Figura 3 - Região de higienização das embalagens retornáveis de 20 L antes das análises microbiológicas (indicadas com setas).....	33
Figura 4 - Método de presença-ausência utilizando substrato enzimático.....	36
Figura 5 - Esquema representativo da Avaliação da formação de biofilme em matriz poliestireno.....	44
Figura 6 - Tubos de ensaio contendo superfície de aço inox em formato de círculo utilizados para avaliação de biofilme em matriz inox.....	46
Figura 7 - Avaliação da qualidade microbiológica e o tempo de fabricação das embalagens plástico-garração de 20L.....	52
Figura 8 - Cepas de <i>C. malonaticus</i> ST440 depositadas no banco de dados do MLST.....	55
Figura 9 - Perfil de bandas representativo dos perfis obtidos dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> por ERIC-PCR.....	57
Figura 10 - <i>Minimum Spanning Tree</i> (Árvore de Abrangência mínima) de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com o STs depositados no banco de dados do MLST proveniente de amostras do Brasil.....	59

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AMC – amoxicilina – clavulanato

AMI - amicacina

AMP – ampicilina

APHA - American Public Health Association

APT – Água peptonada tamponada

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATM – aztreonam

BHI – *brain heart infusion* - caldo infusão cérebro-coração

CAZ - ceftazidima

CCI - *Chromogenic Cronobacter Isolation Agar*

CIP – ciprofloxacina

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN – controle negativo

CP – controle positivo

CPM - cefepima

CSB/v – *Cronobacter screening broth* contendo vancomicina

CSR – Clostrídios sulfito redutores

CRO - ceftriaxona

D.O – densidade óptica

DRCM – *Differential reinforced clostridial medium*

EUA – Estados Unidos da América

FA – fracamente aderente

FAO/WHO - *Food and Agricultural Organization/World Health Organization*

FID – fórmula infantil desidratada

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FMA – fortemente aderente

g- gramas

GEN – gentamicina

h - horas

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

ISO – *International Organizations for Standardization*

L – litro  
LVX - levofloxacina  
MA – moderadamente aderente  
MER – meropenem  
MLST – *Multi Locus Sequence Typing*  
n° - número  
NA – não aderente  
NaCl – Cloreto de sódio  
NAL – ácido nalidíxico  
NIT – nitrofurantoína  
NMP – número mais provável  
min – minutos  
mL – mililitro  
ng – nanogramas  
nm - nanômetro  
PBS – *phosphate buffered saline*  
PPT - piperaciclina-tazobactam  
PCR – Reação em cadeia pela polimerase  
PDTIS - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde  
PET – Poliestileno tereftalato  
pmol – pico-mol  
PSE – *Pfizer selective Enterococos*  
qPCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
rpm – rotação por minuto  
SAM – ampicilina/ sulbactam  
spp. - espécies  
ST – *Sequence Typing*  
SXT – trimetoprim/sulfametoxazola  
TBE – Tampão *Tris/Borate/EDTA*  
TE – tetraciclina  
T<sub>f</sub> – Tempo de fabricação  
TSA - Ágar tripitona de soja  
°C – Graus Centrígrados



% - porcentagem

µg - micrograma

µL – microlitro

UV – Ultra violeta

V – volt

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Águas minerais naturais .....</b>	<b>18</b>
1.1.1 Parâmetros microbiológicos .....	19
1.1.2 Contaminação microbiológica em águas minerais .....	20
<b>1.2 <i>Cronobacter</i> spp. ....</b>	<b>23</b>
<b>1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Resistência aos antimicrobianos .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 Tipificação molecular .....</b>	<b>26</b>
1.5.1 ERIC-PCR .....	27
1.5.2 Multi Locus Sequence Typing (MLST) .....	27
<b>1.6 Justificativa .....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Amostras.....</b>	<b>33</b>
3.1.1 Armazenamento e prévia higienização das embalagens.....	33
<b>3.2 Isolamento de cepas de <i>P. aeruginosa</i> e <i>Cronobacter</i> spp.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Análises bacteriológicas .....</b>	<b>34</b>
3.3.1 Enumeração de coliformes totais.....	35
3.3.2 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> .....	36
3.3.3 Enumeração de CSR.....	36
3.3.4 Enumeração de enterococcus.....	37
3.3.5 Enumeração de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	37
3.3.6 Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. ....	38
<b>3.4 Caracterização molecular dos isolados.....</b>	<b>38</b>
3.4.1 <i>Cronobacter</i> spp. ....	38
3.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
<b>3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de interesse clínico .....</b>	<b>42</b>
<b>3.6 Pesquisa de formação de biofilme .....</b>	<b>43</b>
3.6.1 Avaliação da formação de biofilme em matriz poliestireno.....	44

3.6.2 Avaliação da formação de biofilme em matriz aço inox .....	45
3.6.3 Avaliação da atividade antibiofilme do hipoclorito de sódio frente à formação de biofilme dos isolados .....	46
<b>3.7 Avaliação da relação entre a qualidade microbiológica e do tempo de fabricação das embalagens .....</b>	<b>47</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Avaliação da qualidade microbiológica das amostras de águas minerais naturais....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Avaliação da qualidade microbiológica e o tempo de fabricação das embalagens.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Caracterização fenotípica e molecular dos isolados .....</b>	<b>53</b>
4.3.1 <i>Cronobacter spp.</i> .....	53
4.3.2 <i>P. aeruginosa</i> .....	56
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO A – PREMIAÇÃO NOVOS TALENTOS – MENÇÃO HONROSA – XXI ENCONTRO NACIONAL E VII CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTA DE ALIMENTOS – 2019. ....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NA LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY – 2019 .....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Águas minerais naturais

Água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais e oligoelementos (BRASIL, 2006). As águas minerais normalmente possuem maior conteúdo mineral que a água da rede de abastecimento, fornecendo assim alguns micronutrientes essenciais, tais como cálcio e magnésio (WHO, 2011).

Alguns consumidores acreditam que certas águas minerais naturais têm propriedades medicinais ou oferecerem outros benefícios de saúde. O aumento do consumo deste produto no Brasil se deu principalmente por diversos fatores, como: desconfiança do consumidor com a água dos sistemas públicos de abastecimento, praticidade, escolha familiar, questões organolépticas, falta de suprimentos de água potável segura durante viagens, devido à queda de preços provocada pelo aumento da oferta, recomendação médica, e por acreditar que a água envasada é mais pura (BRASIL, 2007; GOMES et al., 2015). Este cenário fez com que o Brasil se tornasse o 4º maior mercado consumidor de água engarrafada no mundo em 2012. A produção anual brasileira neste mesmo ano foi de 6,98 bilhões de litros, sendo que 75% deste volume foi envasado e comercializado em garrafas retornáveis (BRASIL, 2013).

De acordo com a RDC nº 173/2006 (BRASIL, 2006), a água mineral e a água natural envasada devem ser comercializadas em estabelecimentos de alimentos ou bebidas e devem ser protegida da incidência de luz solar direta, acondicionadas em locais apropriados exclusivamente para este fim e em local limpo e seco. O estoque destes produtos não pode estar próximo a produtos saneantes, gás liquefeito de petróleo ou outros produtos tóxicos, evitando a contaminação ou odores indesejáveis. De acordo com a RDC nº 54/2000 (BRASIL, 2000), as embalagens dos garrafas devem ser comercializadas em sua forma íntegra (livre de amasso, rachaduras ou deformações), pois qualquer violação da embalagem pode afetar a qualidade do produto final.

Durante a penetração no solo, a água perde parte do conteúdo de bactérias e matéria orgânica em suspensão. Ao emergirem ou após captação, apresentam composição físico-química distinta, além de uma microbiota autóctone, em níveis baixos. Os micro-organismos predominantes são bacilos Gram-negativos, como as bactérias dos gêneros: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, e *Moraxella/Acinetobacter* (KIM; FENG, 2001). Porém, ao ser engarrafado,

essa população microbiana pode crescer rapidamente, e assim, ocasionar alguns distúrbios gastrintestinais (ROSENBERG, 2003).

### 1.1.1 Parâmetros microbiológicos

No Brasil, a RDC n.º 275/2005 determina as características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Este regulamento prevê os seguintes critérios descritos no Quadro 1 (BRASIL, 2005). Quando um lote do produto apresenta os limites de micro-organismos superiores aos permitidos, os produtores estarão sujeitos a ações da Vigilância Sanitária. Essa resolução se encontra em revisão, tendo sido submetida à consulta pública n.º 541 de 17 de julho de 2018 (ANVISA, 2018). Nesta nova revisão, uma proposta de critérios mais rígidos e alinhados as diretrizes do Mercosul e do *Codex Alimentarius* foram propostas, estando estes descritos no Quadro 2.

Quadro 1 - Critérios da RDC n.º 275/2005 para avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais naturais e águas naturais.

Micro-organismo(s)	Limites
<i>E. coli</i> ou coliformes (fecais) termotolerantes, em 100 mL	Ausência
Coliformes totais, em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência
Enterococos, em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência
<i>P. aeruginosa</i> , em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência
Clostrídios sulfito redutores ou <i>C. perfringes</i> , em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou ausência

Fonte: BRASIL, 2005.

Quadro 2 - Critérios da consulta pública n.º 541/2018 para revisão da RDC n.º 275/2005.

Micro-organismo(s)	Limites
Coliformes totais em 250 mL	Ausência
<i>Escherichia coli</i> em 250 mL	Ausência
Enterococos em 250 mL	Ausência
<i>P. aeruginosa</i> , em 250 mL	Ausência
Esporos Clostrídios sulfito redutores ou Esporos de <i>C. perfringes</i> , em 50 mL	Ausência

Fonte: ANVISA, 2018.

### 1.1.2 Contaminação microbiológica em águas minerais

Dados da literatura demonstram que as águas minerais comercializadas em embalagens de 20 L apresentam índice de contaminação variado, com percentual de amostras impróprias em uma faixa de 10,0-70,9% (CUNHA et al., 2012; BRANDÃO et al., 2012; PEDROSA et al., 2014; REIS et al., 2014; GOMES et al., 2015).

A contaminação de águas minerais pode ocorrer durante o engarrafamento e armazenamento, visto que as embalagens são reutilizáveis, podendo assim, contribuir para o aumento da microbiota do produto final, principalmente quando ocorrem falhas nas etapas de lavagem e desinfecção das embalagens (FARACHE FILHO; DIAS, 2008; COELHO et al., 2010). Neste contexto, o Departamento Nacional de Produção Mineral publicou a Portaria nº 128/2011 (BRASIL, 2011), que disciplina o prazo de validade de embalagens reutilizáveis de 20 L, que passou a ser de três anos. Contudo, mesmo após a publicação da Portaria, estudos realizados mostraram que a contaminação nestes produtos persiste, com índices que variaram de 35% a 72% (REIS et al., 2014; PEDROSA et al., 2014; GOMES et al., 2015). Estes resultados podem indicar que o prazo de três anos talvez não seja suficiente para garantir a integridade das embalagens. Com isso, o prazo de validade de três anos estipulado necessita ser mais bem avaliado, uma vez que a sua qualidade e integridade estão relacionadas à contaminação destes produtos (PEDROSA et al., 2014). Nunes Filho e colaboradores (2008) observaram que amostras, de mesma marca e lote, comercializadas por vendedores de rua apresentaram índices de contaminação muito superiores quando comparadas às obtidas diretamente dos estabelecimentos comerciais. Estes resultados podem tanto estar relacionados com o mau acondicionamento das amostras por vendedores de rua quanto à questão da não homogeneidade na contaminação do lote, devido ao uso de diferentes embalagens, acondicionamento em ambientes com pouca ventilação e/ou em altas temperaturas.

Uma preocupação à cerca da contaminação bacteriana é a da capacidade que alguns patógenos têm de formar biofilme, podendo ocorrer nos casos em que a sanitização nestes tipos de embalagens não é eficaz. Os biofilmes são formados por micro-organismos que crescem de forma agregada, geralmente em superfícies, embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares produzidas por estes (YASUHIKO et al., 2012). No biofilme, os micro-organismos adquirem maior resistência à ação de agentes físicos e químicos, como por exemplo ao hipoclorito de sódio, que é um sanitizante amplamente

utilizado na indústria de alimentos devido ao seu baixo custo e amplo espectro de ação (WAGHMARE; ANNAPURE, 2015).

Os coliformes totais, *E. coli*, enterococos e CSR são utilizados como indicadores de contaminação de origem fecal (CODEX ALIMENTARIUS, 2011). A presença destes indicadores já foi relatada em águas minerais no Brasil conforme Quadro 3.

Quadro 3 - Ocorrência de micro-organismos indicadores de contaminação de origem fecal em águas minerais no Brasil.

Amostras analisadas (n)	Local do estudo (Estado)	Micro-organismos (%)				Referências
		Coliformes totais	Enterococos	Clostrídeos sulfito redutores	<i>E. coli</i>	
96	Paraná	22,7	4,5	NR*	NR	Silva et al., 2008.
84	São Paulo	15,5	NR	NR	2,4	Farache filho e Dias, 2008.
46	Pernambuco	38,33	NR	NR	50	Coelho et al., 2010.
155	Rio de Janeiro	16,3	12,90	6,46	NR	Brandão et al., 2012.
80	Rio de Janeiro	11,2	NR	5,0	NR	Pedrosa et al., 2014.
32	Minas Gerais	6,25	18,75	NR	NR	Reis et al. 2014.
18	Bahia	44,5	NR	NR	5,6	Gomes et al. 2015.
21	Goiania	4,76	NR	NR	NR	Carvalho, 2015.

NR: Não relatado.

Fonte: Da autora, 2018.



A ocorrência destes indicadores de contaminação fecal indica que outros enteropatógenos, como por exemplo bactérias do gênero *Cronobacter*, também poderiam estar presentes nestes produtos. Vale destacar que as metodologias utilizadas nos estudos supracitados não são específicas para o gênero *Cronobacter*, logo, o patógeno também poderia estar presente em amostras negativas para estes indicadores, o que constitui preocupação para a saúde da população.

## 1.2 *Cronobacter* spp.

*Cronobacter* é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae composto por sete espécies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter universalis* e *Cronobacter condimenti* (IVERSEN et al., 2008; JOSEPH et al., 2012). Apresentam-se como bacilos, gram-negativo, possuindo flagelo peritríquio. Estes micro-organismos crescem em uma temperatura que varia de 37 a 44 °C, tolerando uma faixa de pH de 4,5 a 10. Geralmente são móveis, reduzem o nitrato, utilizam citrato, hidrolisam a esculina e arginina e produzem a enzima ornitina descarboxilase. Produzem ácidos através da sacarose e possuem atividade  $\alpha$ -glicosidase, que é uma característica importante utilizada nos meios seletivos-indicadores (IVERSEN et al., 2008). Forsythe (2018) agrupou as espécies de *Cronobacter* de acordo com sua relevância clínica. O grupo 1, compreende as espécies que representam a maioria dos isolados clínicos, em todas as faixas etárias: *C. sakazakii* e *C. malonaticus*. Grupo 2, são as espécies que raramente estão relacionadas a casos de infecções: *C. turicensis* e *C. universalis*. O Grupo 3, representam as espécies que são principalmente comensais ambientais e possuem pouco ou nenhuma importância clínica: *C. dublinensis*, *C. muytjensii* e *C. condimenti*. A identificação correta das cepas de *Cronobacter* spp. é importante para um tratamento eficaz em casos de infecções e, além disso, a realização de estudos epidemiológicos permite um melhor monitoramento acerca da disseminação deste patógeno.

As infecções causadas por *Cronobacter* spp. foram, inicialmente, associadas a neonatos devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas (FID) contaminadas (FAO/WHO, 2004, 2006, 2008). Em neonatos, estes micro-organismos podem causar síndromes como enterocolite necrosante, bacteremia/septicemia e meningite, com uma taxa de mortalidade que varia de 10% a 41,9% e os sobreviventes podem apresentar sequelas graves (FRIEDMANN, 2009). Um estudo a cerca do uso das FID realizado em 2008 aprovado por *Food and Drug Administration* (FDA) (WOLF et al., 2008) relatou que 790 (83%) das mães

reconstituíam a FID com água engarrafada, e destas, apenas 17% ferviam a água antes do preparo, o que aumenta o risco de infecções causados por *Cronobacter* spp. e outros patógenos presentes nas águas engarrafadas. Um estudo realizado em hospital no Paquistão (AYAZ et al., 2017) relataram que a água mineral era utilizada para a preparação de leite infantil (mamadeira) em 5,6% dos lactentes, e que das 198 crianças que deram entrada no hospital, 76,8% apresentara alguma infecção após a iniciação do uso da formula infantil, com cerca de 8-10 meses de vida. Na maioria dos casos de infecção, o conteúdo da mamadeira foi analisado e 58% estavam contaminados com algum patógeno (*Klebsiella*, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli*). Atualmente, a maior incidência das infecções causadas por *Cronobacter* ocorre em adultos, sendo os indivíduos idosos, imunocomprometidos, e pacientes com doenças crônicas os mais acometidos (PATRICK et al., 2014; ALSONOSI et al., 2015; FORSYTHE, 2018). As principais síndromes neste grupo são as infecções urinárias e pulmonares (FRIEDMANN, 2009; TSAI et al., 2013; PATRICK et al., 2014; ALSONOSI et al., 2015). No Brasil, *Cronobacter* já foi isolado a partir de diversos produtos alimentícios, como saladas prontas para o consumo e alimentos provenientes da culinária japonesa (VASCONCELLOS et al., 2018), queijo (BRANDAO et al., 2016), alimentos destinados à alimentação infantil (MEIER et al., 2016; BRANDAO et al., 2017), temperos/condimentos e produtos farináceos (BRANDAO et al., 2017), aveia e linhaça (SILVA et al., 2018).

A literatura apresenta relatos de surtos e casos isolados de infecções por *Cronobacter* em diversos países, inclusive no Brasil (BRANDAO et al., 2018; CHAVES et al., 2018). Em muitos surtos e casos esporádicos causados por *Cronobacter*, o veículo de contaminação não pôde ser identificado (BARREIRA et al., 2003; BRANDAO et al., 2015; CHAVES et al., 2018).

Estudos anteriores já relataram a detecção de *Cronobacter* spp. em amostras de água. Uma investigação realizada na China relatou o isolamento de *Cronobacter* spp. de 32 (12,9%) de 248 amostras de águas para consumo humano oriunda de sistemas de abastecimento municipais (LIU et al., 2013; CUI et al., 2015). Outro estudo relatou o isolamento de nove (9%) isolados de *Cronobacter* spp. em 100 amostras de águas para consumo humano provenientes de diferentes províncias na China (FEI et al., 2018). Contudo, até a presente data, não existem dados disponíveis na literatura em relação à ocorrência deste patógeno em águas minerais naturais. Logo, é importante a avaliação da ocorrência de *Cronobacter* em águas minerais, de forma a avaliar o risco que estes produtos podem representar a indivíduos pertencentes ao grupo de risco.

### 1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que está frequentemente associado a casos de doenças transmitidas por águas (WINGENDER; FLEMMING, 2011). É considerado um micro-organismo saprófito que se encontra difundido na natureza, particularmente em ambientes úmidos, como a água e o solo. Apresenta-se como micro-organismo Gram negativo na forma de bastonete, aeróbios estritos, reduzem o nitrato, catalase e oxidase positivos e possui um crescimento ótimo em temperatura de 37 a 42 °C (MURRAY, 2016). Possui capacidade de sobreviver em materiais e superfícies inertes, e por conta da sua resistência antimicrobiana frequente, tem se tornado um importante patógeno nosocomial. (DUBOIS et al., 2001). A resistência aos antimicrobianos nesta espécie bacteriana tem sido um desafio para saúde pública no tratamento das infecções (WHO, 2017).

Estudos no Brasil relataram a ocorrência de infecções nosocomiais por *P. aeruginosa* com taxa de mortalidade de 49% (FURTADO et al., 2009; TUON et al., 2012). Concomitante a isso, dados da literatura demonstram que as águas minerais comercializadas em embalagens plástico-garrafão de 20 L apresentam alto índice de contaminação, com percentual de amostras impróprias para o consumo, sendo a *P. aeruginosa* o principal contaminante (SANT'ANA et al., 2003; BERNARDO, 2009; BRANDÃO et al., 2012; PEDROSA et al., 2014). Além disso, cepas resistentes a diferentes classes de antimicrobianos foram isoladas destas amostras (PEDROSA et al., 2014). Sua maior ocorrência em relação a outros patógenos bacterianos está associada à sua presença natural na microbiota da água que é retirada diretamente da fonte (KIM; FENG, 2001) e à característica desta bactéria de formar biofilmes em equipamentos e embalagens plásticas (BERNARDO, 2009; LINCOPAN; TRABULSI, 2011; PEDROSA et al., 2014).

A necessidade de uma maior ingestão de água aumenta em todas as condições patológicas onde ocorre uma maior perda hídrica, como nos quadros de diarreia, vômito, hiperpirexia e suor abundante (PETRACCIA et al., 2006). A água mineral é frequentemente recomendada para pacientes com deficiências no sistema imunológico. Logo, o consumo de águas minerais contaminadas com cepas resistentes de *P. aeruginosa* pode representar risco para este grupo mais susceptível (MARKLT, 2009). Ainda, vale ressaltar, a importância da avaliação da disseminação de clones bacterianos em especial os resistentes a drogas antimicrobianas, no sentido de determinar possíveis fontes de contaminação e evitar a propagação destes patógenos.

## 1.4 Resistência aos antimicrobianos

A resistência bacteriana, antes do século XXI, ocorria predominantemente em ambientes hospitalares. Atualmente, está associada a diversos ambientes e pode atingir os indivíduos saudáveis. O uso de terapias associadas é uma alternativa que pode ser adotada na tentativa de contornar esse problema. Porém, o uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antibióticos, más condições de higiene, fluxo contínuo de viajantes, o aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas têm favorecido o aumento da resistência (GUIMARÃES et al., 2010).

Devido ao uso massivo dos antibióticos, tem sido constatado, em nível mundial, um aumento muito importante da prevalência da resistência (ALÓS, 2014). O uso (e o mau uso) de antibióticos pode selecionar cepas resistentes. Os principais mecanismos de resistência microbiana aos antibióticos conhecidos até o momento são: inativação enzimática ou modificação do antibiótico, substituição ou modificação do alvo e acumulação reduzida devido à diminuição da permeabilidade e/ou aumento do efluxo (POOLE, 2002; WALSH, 2003). A resistência pode ser intrínseca ou adquirida através de mutação ou transferência de ácido desoribonucleico (DNA) (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que a resistência antimicrobiana é uma ameaça crescente à saúde global e vem insistindo com os países para tomarem medidas para conter a propagação da resistência (WHO, 2012, 2017). Em 2017, a OMS publicou uma lista de prioridades em relação aos “agentes patogênicos resistentes aos antibióticos”, contemplando 12 grupos bacterianos que representam ameaça para a saúde humana. *P. aeruginosa* resistentes aos antibióticos carbapenêmicos foram indicadas como patógenos de “Prioridade crítica”, dentro de uma escala de três categorias (WHO, 2017). *P. aeruginosa* é o agente etiológico da maioria das infecções adquiridas em Unidades de Terapia Intensiva, e atualmente considerados locais onde podem ser encontradas cepas resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis (MIRANDA et al., 2015; ANVISA, 2017).

## 1.5 Tipificação molecular

Os métodos de tipificação se dividem em duas categorias: métodos genotípicos e métodos fenotípicos. A tipificação molecular é baseada nas características genéticas dos micro-organismos, podendo fornecer informações mais precisas, incluindo inserções ou deleções no cromossomo, ou até mesmo mutações randômicas que podem criar ou eliminar

sítios de restrição de endonucleases. Estes métodos nos permitem a comparação direta dos isolados nos casos de surtos, auxiliando no rastreamento das cepas até a origem da contaminação e tornaram-se ferramentas importantes tanto na epidemiologia quanto na tipificação de espécies bacterianas. Entre eles incluem-se o *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR), e *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) (NOWAKONSKI *et al.*, 2015).

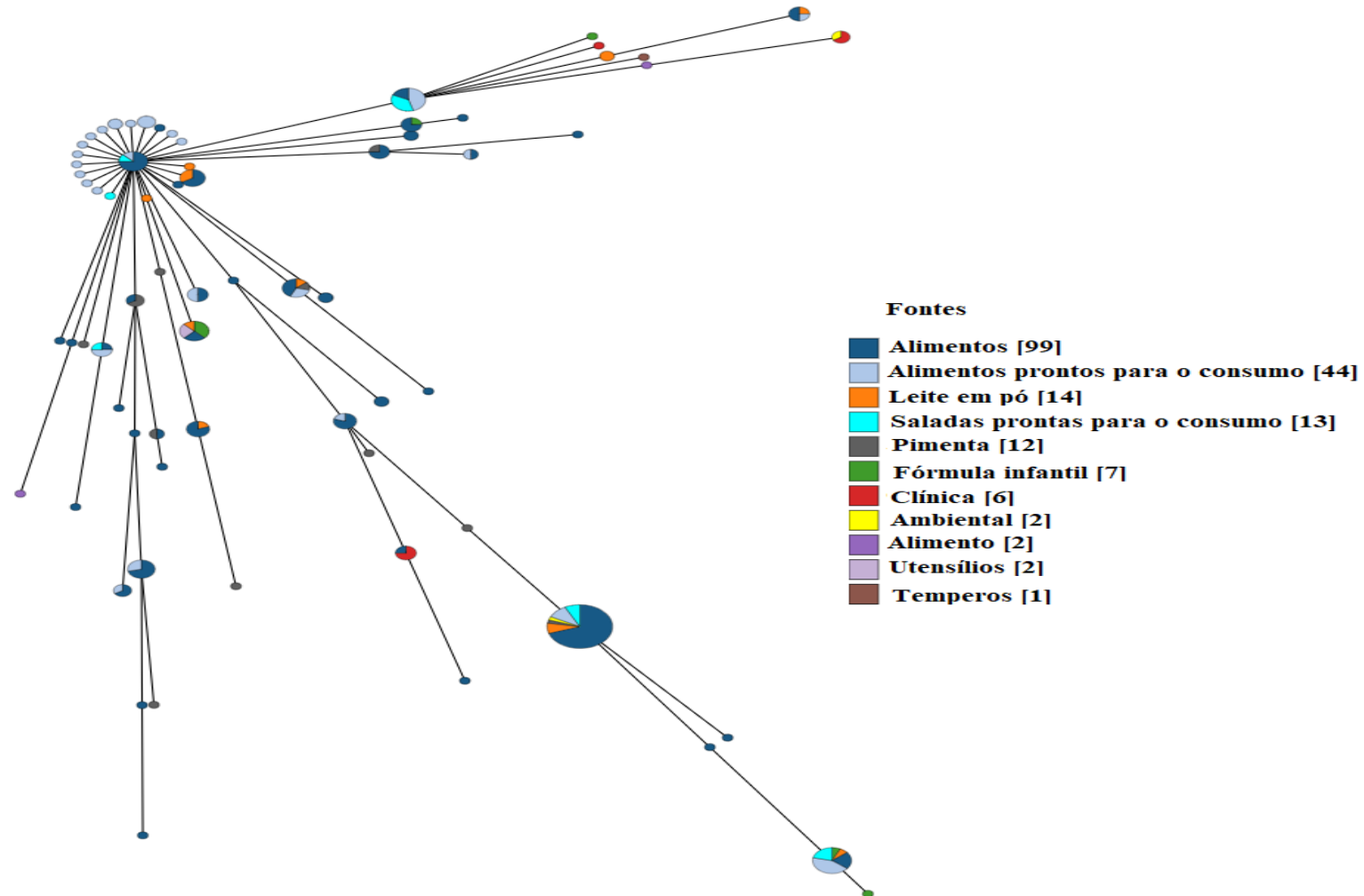
### 1.5.1 ERIC-PCR

A ERIC-PCR amplifica sequências pequenas e repetitivas de DNA conservadas, dispersas ao longo do genoma bacteriano (VERSALOVIC *et al.*, 1991). A utilização desta técnica para tipificação de *P. aeruginosa* já é estabelecida e estudos têm demonstrado que essa metodologia é rápida e eficiente, além da alta reprodutibilidade na discriminação das linhagens desta espécie, sendo considerada de simples reprodução, além do baixo custo (INACIO *et al.*, 2014). Porém, só permite a comparação de clones em análise intralaboratorial, não permitindo a comparação com outros dados epidemiológicos mundiais, tal como o MLST.

### 1.5.2 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

A técnica do MLST foi desenvolvida por Maiden e colaboradores (1998) e é um método de tipificação baseado no sequenciamento do DNA genômico, permitindo a detecção de variações em sete genes constitutivos chamados de “*housekeeping genes*”. O uso desta técnica para sequenciar os isolados de *Cronobacter* spp. foi desenvolvido por Baldwin e colaboradores (2009) e permite uma identificação e tipificação fidedigna das espécies. 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 2.828 estirpes depositadas e 697 “Tipos Sequenciais” (ST). Quarenta e seis cepas depositadas foram isoladas a partir de amostras de águas no período de 1956 a 2013, em seis países distintos (Reino Unido, EUA, China, Suíça, República Checa, e Malásia). Uma única cepa proveniente de água mineral natural foi depositada a partir deste estudo em questão. O Brasil conta com 204 cepas depositadas, sendo isoladas de amostras de alimentos ou de espécimes clínicas, como ilustrado na Figura 1 (último acesso em: 06/10/2019).

Figura 1 - *Minimum Spanning Tree* (Árvore de Abrangência mínima) dos isolados de *Cronobacter* spp. do Brasil.

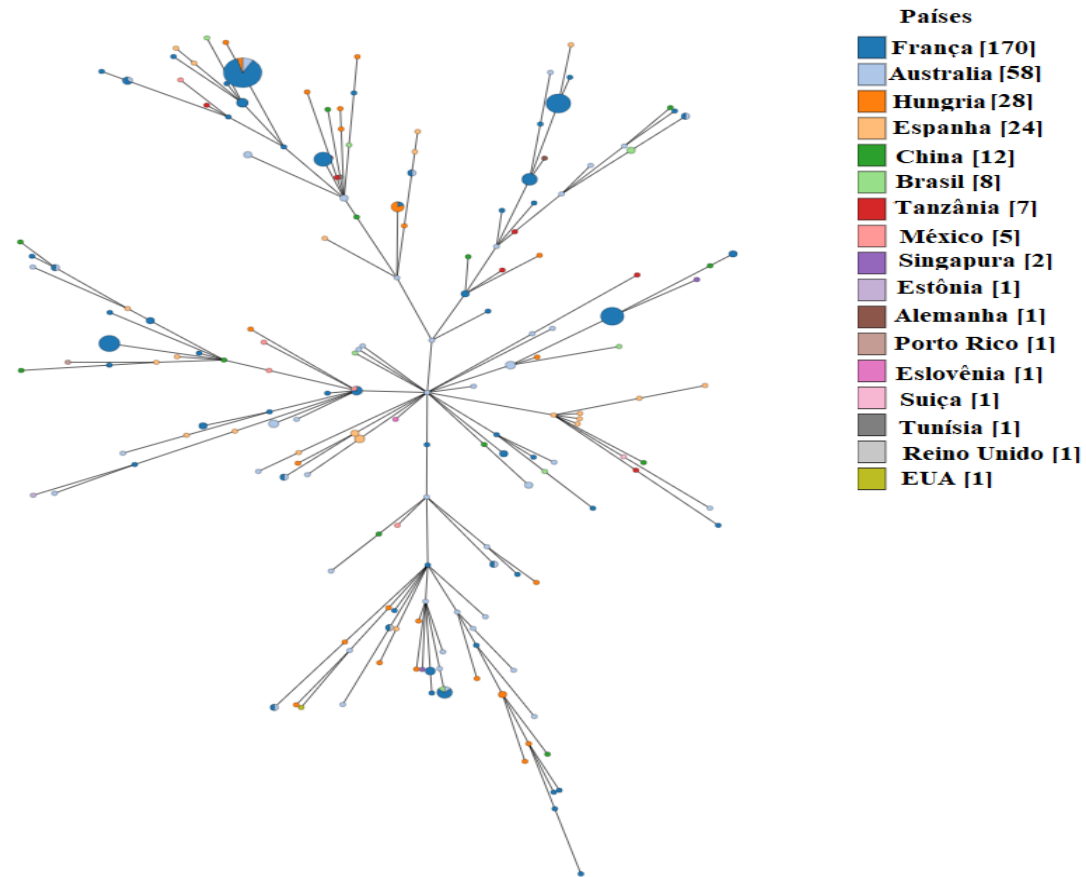


Legenda: A relação entre os STs foi determinada pela análise utilizando a ferramenta “GrapeTree” do banco de dados do <https://pubmlst.org/cronobacter/> de acordo com as diferentes fontes de isolamento de *Cronobacter* spp.

Fonte: Da autora (2019), baseada na análise do perfil alélico dos genes *fusA*, *atpD*, *glnB*, *gltB*, *gyrB*, *infB* e *pps*.

Em relação à tipificação das cepas de *P. aeruginosa*, o MLST também tem sido muito utilizado no rastreamento de casos de infecção, e outras avaliações epidemiológicas. O banco de dados onde os perfis de MLST são depositados, foi desenvolvido por Curran e colaboradores da Universidade de Oxford (CURRAN et al., 2004) e pode ser acessado pelo link <http://pubmlst.org/paeruginosa/>. Ele já conta com 6.879 estirpes depositadas e 3.341 “Tipos Sequenciais” (ST). 322 cepas depositadas foram isoladas a partir de amostras de águas no período de 1938 a 2018, em dezessete países distintos (Austrália, Brasil, China, Eslovênia, Espanha, Estônia, França, Hungria, México, Alemanha, Porto Rico, Singapura, Suíça, Tanzânia, Tunísia, Reino Unido e Estados Unidos da América) como ilustrado na Figura 2. O Brasil conta com 209 cepas depositadas, sendo isoladas de espécimes clínicas, efluentes hospitalares e outras fontes não divulgadas, porém, nenhum depósito de água mineral havia sido realizada até o presente estudo (último acesso em: 06/10/2019).

Figura 2 - *Minimum Spanning Tree* (Árvore de Abrangência mínima) dos isolados de *P. aeruginosa* oriundos de amostras de água de diversos países.



Legenda: A relação entre os STs foi determinada pela análise utilizando a ferramenta “GrapeTree” do banco de dados do <https://pubmlst.org/paeruginosa/>.  
 Fonte: Da autora (2019), baseada na análise do perfil alélico dos genes *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *ppsA* e *trpE*.



## 1.6 Justificativa

A água mineral é um produto cada vez mais consumido pela população, tanto nos domicílios, quanto em instituições e locais públicos. Pesquisas para elucidar a atuação de produtos como veículos para colonização ou infecção em indivíduos susceptíveis são fundamentais para a saúde pública e constituem um dos papéis dos órgãos que atuam em vigilância sanitária. Neste contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) se destaca como instituição que compõe o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, sendo referência para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços. Considerando que até o presente estudo não existiam dados disponíveis na literatura em relação à ocorrência de *Cronobacter* spp. em águas minerais naturais comercializadas em embalagens reutilizáveis de 20 L e a escassez de dados epidemiológicos do perfil clonal das cepas de *P. aeruginosa* isoladas nestes produtos, a realização de estudo visou contribuir no estado da arte acerca da disseminação destes patógenos. Além disso, a avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais naturais comercializadas em embalagens retornáveis em diferentes tempos de fabricação poderá contribuir de forma significativa para o aprimoramento de legislações e das ações sanitárias dos órgãos competentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica de águas minerais naturais comercializadas em embalagens plástico-garrafão de 20 L, e realizar a caracterização fenotípica e molecular dos isolados de *Cronobacter* spp. e *P. aeruginosa*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica de amostras de águas minerais de acordo os critérios descritos na RDC nº275/2005;
- Pesquisar *Cronobacter* spp. em amostras de águas minerais pela técnica de enriquecimento-seletivo;
- Caracterizar fenotipicamente os isolados de *Cronobacter* spp. e de *P. aeruginosa* com uso do sistema semi-automatizado Vitek 2.0;
- Caracterizar genotipicamente os isolados como gênero *Cronobacter* por reação da cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) com alvo no gene *dnaG*;
- Caracterizar genotipicamente os isolados de *P. aeruginosa* pela PCR com alvo no gene 16S rRNA espécie-específico;
- Tipificar as cepas de *Cronobacter* spp. e *P. aeruginosa* por técnicas moleculares e avaliar as relações genéticas entre os isolados;
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Cronobacter* spp. e *P. aeruginosa* frente aos antimicrobianos;
- Pesquisar a formação de biofilme nos isolados de *Cronobacter* spp e *P. aeruginosa*.
- Avaliar a atividade antibiofilme do hipoclorito de sódio frente a biofilmes de *P. aeruginosa*
- Associar a relação entre o tempo de validade das embalagens plástico-garrafão de 20L e qualidade microbiológica das amostras de águas minerais.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Amostras

No período de março a agosto de 2018 foram analisadas 99 amostras indicativas de águas minerais naturais (identificadas de A1 a A99), comercializadas em embalagens plástico-garrafão retornáveis de 20 L obtidas em postos de gasolinas e estabelecimentos comerciais dos municípios do Rio de Janeiro-RJ e Niterói-RJ. Quinze marcas distintas foram coletadas. Foi observada a data de fabricação da embalagem, de forma a se coletar 33 amostras com tempo de fabricação ( $T_f$ ) nas seguintes faixas:  $T_f \leq 1$  ano,  $1 \text{ ano} < T_f \leq 2$  anos, e  $2 \text{ anos} < T_f \leq 3$  anos. Após a coleta, as amostras foram transportadas ao INCQS/Fiocruz.

#### 3.1.1 Armazenamento e prévia higienização das embalagens

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente ao abrigo de luz até o momento das análises. Antes de dar início às análises bacteriológicas, todos os galões foram higienizados utilizando gaze estéril embebida em álcool etílico a 70% em toda região do gargalo conforme ilustrado na Figura 3. A abertura do lacre foi realizada utilizando tesoura ou bisturi estéril, de forma a evitar uma possível contaminação durante o manuseio das amostras.

Figura 3 - Região de higienização das embalagens retornáveis de 20 L antes das análises microbiológicas (indicadas com setas).



Fonte: <https://www.setegotas.com.br/produto/galao-vazio-de-agua-mineral-20-litros/>. Acesso em: 11 jan. 2019.

### 3.2 Isolamento de cepas de *P. aeruginosa* e *Cronobacter* spp.

Criotubos de cada cepa foram preparados e mantidos a -70 °C em caldo infusão cérebro-coração (BHI; Merck, Alemanha) contendo 20% de glicerol (Merck, Alemanha). Para realização dos experimentos, uma alçada desta cultura foi semeada em caldo BHI e em ágar nutriente (Merck, Alemanha) e incubados a  $35 \pm 2$  °C/24 h.

Foram utilizadas cepas de referência como controles positivos e negativos em todas as análises bacteriológicas. As cepas foram obtidas da Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) do INCQS/Fiocruz e estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4 - Cepas de referência utilizadas nas análises

Micro-organismo	Identificação na CBRVS	Identificação original
<i>Clostrídium perfringens</i>	INCQS 00130	ATCC <sup>1</sup> 13124
<i>Escherichia coli</i>	INCQS 00033	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00015	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	INCQS 00099	ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	INCQS 00154	ATCC 19433
<i>Enterococcus faecalis</i>	INCQS 00017	ATCC 4083
<i>Streptococcus pyogenes</i>	INCQS 00155	ATCC 19615
<i>Cronobacter sakazakii</i>	INCQS 00578	ATCC 29544

Legenda: 1 - American Type Culture Collection.

Fonte: Da autora, 2018.

### 3.3 Análises bacteriológicas

A quantificação de coliformes totais, enterococos e *P. aeruginosa* foi realizada pela técnica dos tubos múltiplos para a determinação do Número Mais Provável (NMP), onde 100 mL de cada amostra foram retirados e distribuídos em 10 tubos de ensaio contendo 10 mL dos meios de cultura específicos para cada micro-organismo, de acordo com a metodologia do *Standard methods for the examination of water and wastewater*, sendo a interpretação dos resultados realizada de acordo com o Quadro 5 (APHA, 2012).

Quadro 5 - Quantificação de acordo com a técnica do Número Mais Provável

Número de tubos positivos	NMP <sup>1</sup> /100 mL	Limites de confiabilidade	
		Inferior	Superior
0	<1,1	---	3,4
1	1,1	0,051	5,9
2	2,2	0,37	8,2
3	3,6	0,91	9,7
4	5,1	1,6	13
5	6,9	2,5	15
6	9,2	3,3	19
7	12	4,8	24
8	16	5,8	34
9	23	8,1	53
10	>23	13	---

Legenda: 1-Número Mais Provável.

Fonte: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2012.

A enumeração dos isolados de CSR foi realizada de acordo com os parâmetros da norma ISO 6461/1:1986 – *Water quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) – Method by enrichment in a liquid medium* (ISO, 1986).

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada por uma metodologia adaptada neste estudo, tendo como base as técnicas descritas na ISO 22964:2017-*Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection of Cronobacter spp.* (ISO, 2017) e por Chen e colaboradores (2012).

### 3.3.1 Enumeração de coliformes totais

Uma alíquota de 100 mL foi retirada de cada amostra e homogeneizada com o substrato enzimático em pó Colitag (Neogen, EUA). Imediatamente, a amostra foi distribuída em 10 tubos de ensaio esterilizados de tamanho 13x160 mm e os tubos foram incubados a  $36 \pm 1$  °C por 24 h. Os tubos que apresentaram mudança de coloração para amarelo foram considerados positivos e o resultado foi expresso em NMP/100 mL de acordo com o Quadro 5.

### 3.3.2 Pesquisa de *Escherichia coli*

A pesquisa de *E. coli* foi realizada pelo método de presença-ausência por adição de substrato enzimático Colitag (Neogen, EUA) adicionado a 100 mL da amostra em frasco estéril e incubado a  $36 \pm 1$  °C por  $24 \pm 1$  h. A amostra foi considerada positiva quando ocorre a viragem da coloração para amarela e produção de fluorescência quando visualizado em lâmpada ultravioleta (UV) de 365nm, em razão da detecção da enzima  $\beta$ -glucoronidase que é produzida por *E.coli*, conforme ilustrado na Figura 4. O resultado foi expresso como presença ou ausência de *E. coli*/ 100 mL conforme parâmetros dispostos no Quadro 1.

Figura 4 - Método de presença-ausência utilizando substrato enzimático



Fonte: <http://foodsafety.neogen.com/pt/colitag>. Acesso em: 22 nov. 2018.

### 3.3.3 Enumeração de CSR

Dez tubos contendo o caldo *Differential reinforced clostridial medium* (DRCM, Merck, Alemanha) em dupla concentração foram aquecidos até a fervura a 100 °C por 15 min. Após o período de fervura, os tubos foram submetidos a um choque térmico por resfriamento em banho de gelo. Em paralelo, uma alíquota de 100 mL foi retirada da amostra e submersa em banho-maria a  $75 \pm 5$  °C por 15 min. Posteriormente, foram distribuídas alíquotas de 10 mL da amostra em cada tubo contendo caldo DRCM em dupla concentração. Após a distribuição, os tubos foram incubados em condições de anaerobiose em jarra adequada utilizando kit comercial de gerador e indicador de anaerobiose (GasPak™, BD, EUA). A jarra foi incubada a  $37 \pm 1$  °C por  $44 \pm 4$  h. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram precipitação negra, por conta da redução de sulfeto de ferro, e o resultado foi expresso em NMP/100 mL de acordo com o Quadro 5.

### 3.3.4 Enumeração de enterococcus

A enumeração de enterococos foi realizada a partir de 10 mL da amostra distribuídos em 10 tubos contendo o caldo azida-dextrose (NEOGEN, USA) em dupla concentração. Os tubos foram homogeneizados e incubados a  $35 \pm 2$  °C por  $48 \pm 4$  h. Após o período de incubação, foi observada a presença de turvação do caldo. Para a confirmação, uma alçada do tubo foi semeada, pela técnica de esgotamento, em ágar *Pfizer Selective Enterococos* (PSE, Himedia, França) e incubado a  $35 \pm 0,5$  °C por  $24 \pm 2$  h. As placas que apresentaram crescimento de colônias características (colônias negras com halo amarronzado) foram submetidas à confirmação em tubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI, BD, EUA) com 6,5% de cloreto de sódio (NaCl) e BHI sem NaCl. Foram considerados pertencentes ao gênero *Enterococos* os isolados que apresentaram turvação nos dois tubos de BHI (com NaCl a 6,5% e sem NaCl). O resultado foi expresso em NMP/100 mL de acordo com o Quadro 5.

### 3.3.5 Enumeração de *Pseudomonas aeruginosa*

O ensaio presuntivo de *P. aeruginosa* foi realizado a partir de 100 mL da amostra distribuídos em 10 tubos (10 mL/tubo) contendo caldo asparagina (Biolog, Brasil) em dupla concentração. Os tubos foram homogeneizados e incubados a  $35 \pm 2$  °C por  $48 \pm 2$  h. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram pigmento verde fluorescente quando visualizados em lâmpada UV. Para confirmação, uma alíquota de 100µL foi transferida para um tubo contendo caldo acetamida (INLAB, Brasil) e incubado por até 36h a  $35 \pm 2$  °C. Os tubos que apresentaram viragem para a coloração púrpura foram considerados positivos e o resultado foi expresso em NMP/100 mL de acordo com o Quadro 5.

Para o isolamento de *P. aeruginosa* e realização dos ensaios fenotípicos e moleculares, a partir dos tubos positivos de caldo acetamida, foi realizado a semeadura, pela técnica de esgotamento, em ágar cetrimide (NEOGEN, USA) e incubado a  $35 \pm 2$  °C por  $48 \pm 2$  h. As amostras que apresentaram colônias características (colônias com produção de pigmento esverdeado), foram submetidos à identificação pelo sistema semi-automatizado Vitek 2.0 (bioMérieux, França), utilizando cartões GN TEST KIT VITK 2, de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.3.6 Pesquisa de *Cronobacter* spp.

Cem mL da amostra foram enriquecidos em 900 mL de água peptonada tamponada (APT; Merck, Alemanha) e incubada a  $35 \pm 2$  °C por  $18\text{h} \pm 2$ . Após o período de incubação, uma alíquota de 40 mL foi retirada e transferida para um tubo cônico de polipropileno do tipo Falcon (EUA) com capacidade para 50 mL e submetido à centrifugação (Eppendorf 5418, FA-45-18-11, Alemanha) a 3.860 rotações por minuto (rpm) a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 200 µL de salina tamponada fosfatada seguido de homogeneização em aparelho homogeneizador de tubos por 15 s. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo *Cronobacter Screening Broth* acrescido de vancomicina (CSB/v; Oxoid, Inglaterra) e este incubado a  $41,5 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h. Posteriormente, os tubos de CSB foram semeados, por esgotamento, em meio *Chromogenic Cronobacter Isolation Agar* (CCI, Oxoid, Inglaterra) e incubado a  $41,5 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h. Três colônias características, esverdeadas com ou sem borda branca, obtidas no CCI foram re-isoladas em ágar triptona de soja (TSA,BD, EUA) e submetidas à confirmação bioquímica no sistema semi-automatizado Vitek 2.0 (bioMérieux, França), utilizando cartões GN TEST KIT VITK 2, de acordo com as instruções do fabricante.

As cepas de *C. sakazakii* INCQS 00578 (ATCC 29544) e *E. coli* INCQS0033 (ATCC 25922) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

## 3.4 Caracterização molecular dos isolados

### 3.4.1 *Cronobacter* spp.

Os isolados característicos foram submetidos à confirmação molecular do gênero com uso da técnica de 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 Chen e colaboradores (2012). A extração de DNA foi realizada a partir de cultivos das cepas em caldo BHI incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 h utilizando-se o kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi estocado a  $-20 \pm 5$  °C até o momento do uso. A PCR foi realizada de acordo com as especificações descritas no Quadro 6.



Quadro 6 - Protocolo de reação de qPCR com alvo no gene *dnaG*.

Reagentes[concentração]	Volume (µL)	Iniciadores e sonda	Condições de amplificação
Universal Master Mix [2X] <sup>a</sup>	12,5	Crono F: GGGATATTCTCCCCTGAAA CAG Crono R: CGAGAATAAGCCGCGCATT Crono P: <sup>FAM</sup> <sub>-</sub> GAGTAGTAGTTGTAGAGGC CGTGCTTCCGAAAG- <sup>TAMRA</sup>	50 °C – 2 min; 95 °C – 3min; 40x (95 °C – 15s, 52 °C – 40s, 72 °C – 15s)
CronoF [10 pmol/µL] <sup>b</sup>	1,0		
CronoR [10 pmol/µL] <sup>b</sup>	1,0		
CronoP [100 µM] <sup>a</sup>	0,075		
DNA molde	2,0		
Água DNase/RNase livre <sup>c</sup>	8,425		
<b>Volume total</b>	<b>25,0</b>		

Legenda: <sup>a</sup>- Applied Biosystems, EUA; <sup>b</sup>- Integrated DNA Technologies, EUA; <sup>c</sup>- BioBasic, Canadá.

Fonte: Da autora, 2018.

Para a identificação das espécies, foi realizada a amplificação do gene *fusA* (gene espécie-específico) e os demais seis genes do MLST (*atpD*, *glnB*, *gltB*, *gyrB*, *infB* e *pps*) também foram amplificados e sequenciados para determinação dos ST (BALDWIN et al. 2009). Os iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento estão descritos no Quadro 7.

Quadro 7 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes do MLST de *Cronobacter*

Gene	Iniciadores		Tamanho do produto(pb)
	Amplificação (5'-3')	Sequenciamento (5'-3')	
<i>atpD</i>	F- CGA CAT GAA AGG CGA CAT	F- CGA AAT GAC CGA CTC CAA	390
	R- TTA AAG CCA CGG ATG GTG	R- GGA TGG CGA TGA TGT CTT	
<i>fusA</i>	F- GAA ACC GTA TGG CGT CAG	F- GCT GGA TGC GGT AAT TGA	438
	R- AGA ACC GAA GTG CAG ACG	R- CCC ATA CCA GCG ATG ATG	
<i>glnS</i>	F- GCA TCT ACC CGA TGT ACG	F- GGG TGC TGG ATA ACA TCA	363
	R- TTG GCA CGC TGA ACA GAC	R- CTT GTT GGC TTC TTC ACG	
<i>gltB</i>	F- CAT CTC GAC CAT CGC TTC	F- GCG AAT ACC ACG CCT ACA	507
	R- CAG CAC TTC CAC CAG CTC	R- GCG TAT TTC ACG GAG GAG	
<i>gyrB</i>	F- TGC ACC ACA TGG TAT TCG	F- CTC GCG GGT CAC TGT AAA	402
	R- CAC CGG TCA CAA ACT CGT	R- ACG CCG ATA CCG TCT TTT	
<i>infB</i>	F- GAA GAA GCG GTA ATG AGC	F- TGA CCA CGG TAA AAC CTC	441
	R- CGA TAC CAC ATT CCA TGC	R- GGA CCA CGA CCT TTA TCC	
<i>ppsA</i>	F- GTC CAA CAA TGG CTC GTC	F- ACC CTG ACG AAT TCT ACG	495
	R- CAG ACT CAG CCA GGT TTG	R- CAG ATC CGG CAT GGT ATC	

Fonte: <http://pubmlst.org/cronobacter/>. Acesso em: 02/04/2018.

A extração de DNA foi realizada a partir de cultivos das cepas em caldo BHI incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 h utilizando-se o kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi estocado a  $-20 \pm 5$  °C até o momento do uso. As PCRs foram realizadas em aparelho *SimpliAmp ThermalCycler* (Applied Biosystems, Singapore). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 60 V/80 min com a aplicação de corante fluorescente de ácidos nucléicos ultrasensível (GelRed®, Thermo Fischer, EUA). Para visualização da amplificação utilizou-se sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS, Brasil). Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se kit comercial (Quick PCR Purification Kit, Invitrogen, USA). A concentração e a qualidade do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA).

O sequenciamento foi realizado na plataforma PDTIS de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) utilizando Sequenciador Automático *ABI Prism 3730XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA). Os produtos foram enviados em microtubos com capacidade de 1,5 mL (Eppendorf, Alemanha) contendo: 2,0 µL do iniciador (primer - Forward) a 1,6 pmol e 5,5 µL do produto de DNA purificado, ajustados para concentrações entre 10-40 ng de acordo com as recomendações da Plataforma (Procedimento Operacional Padrão RPT01A-001, 2012). As análises dos cromatogramas foram realizadas utilizando software *BioEdit 709* (Informer Technologies Inc., Shingle Springs, CA, EUA) e as sequências dos genes do MLST foram analisadas através das ferramentas disponíveis no banco de dados ([www.pubMLST.org/cronobacter](http://www.pubMLST.org/cronobacter)).

#### 3.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Os isolados de *P. aeruginosa* confirmados pelo sistema semi-automatizado Vitek 2.0 foram submetidos à caracterização molecular. A extração do DNA foi realizada com kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) conforme descrito previamente (item 3.4.1). Foi realizada a PCR do gene 16S rRNA com iniciadores específicos para a espécie descritos por Spilker e colaboradores (2004) (Quadro 8). A eletroforese em gel foi realizada conforme descrito anteriormente (item 3.4.1).

Quadro 8 - Iniciadores para PCR com alvo no gene 16S rRNA para identificação de *P. aeruginosa*.

Iniciadores	Posição da sequência 16S rRNA	Tamanho do produto (pb)
PA-SS-F 5'-GGGATCTTCGACCTCA-3'	189-206	956
PA-SS-R 5'-TCCTTAGAGTGCCACCCG-3'	1124-1144	

Fonte: Spilker e colaboradores, 2004.

As cepas de *P. aeruginosa* foram submetidas à técnica do ERIC-PCR descrito por Versalovic e colaboradores (1991), utilizado-se o iniciador ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de 1,5% de agarose, utilizando o corante GelRed, em tampão TBE 0,5X por 90 min a 60 V. Como marcador de peso molecular foi utilizado o peso *1 kb plus DNA ladder* (Invitrogen, EUA) O gel foi fotografado e analisado utilizando-se sistema de fotodocumentação L-PIX Touch. Os padrões de bandas foram analisados com uso do Programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). O dendograma foi construído com índice de Dice e o método “*unweighted Pair Group Method with Arithmetic average*” (UPGMA) (VAN BELKUM et al., 2007).

Para a determinação dos STs, os seis genes *housekeeping* para *P. aeruginosa* (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *ppsA* e *trpE*) foram amplificados conforme os protocolos descritos no banco de dados (<https://pubmlst.org/paeruginosa>). Para o gene *nuoD*, foi desenhado a partir deste trabalho, uma sequência de alelos utilizando o programa primer 3. O alinhamento para este gene foi realizado no NCBI. Os genes e as sequências dos seus respectivos iniciadores estão descritos no Quadro 9.

Quadro 9 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes do MLST de *P.aeruginosa*

Gene	Amplificação (5'-3')	Sequenciamento (5'-3')	Tamanho do produto (pb)
<i>acsA</i>	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	GCCACACCTACATCGTCTAT	390
	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC	
<i>aroE</i>	TGGGGCTATGACTGGAAACC	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	495
	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG	
<i>guaA</i>	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC	372
	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	GACGTTGTGGTGCGACTTGA	
<i>mutL</i>	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	AGAAGACCGAGTTCGACCAT	441
	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT	
<i>nuoD</i>	ACCGCCACCCGTA CTG	ACCCGCACCTGACCCGCAT	366
	TCTCGCCCATCTTGACCA	TCTCGCCCATCTTGACCA	
<i>ppsA</i>	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	GGTGACGACGGCAAGCTGTA	369
	GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG	GTATCGCCTTCGGCACAGGA	
<i>trpE</i>	GCGGCCAGGGTCGTGAG	TTCAACTTCGGCGACTTCCA	441
	CCCGGCGCTTGTGATGGTT	GGTGTCCATGTTGCCGTTC	

Fonte: CURRAN et al., 2004.

### 3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de interesse clínico

As cepas de *Cronobacter* spp. e *P.aeruginosa*, provenientes deste estudo, foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos através do método de difusão em ágar Muller Hinton (Oxoid, Inglaterra), seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Para cada cepa, foram preparadas suspensões bacterianas ajustando a turvação para 0,5 na escala de McFarland. *E. coli* (INCQS 00033) ATCC 25922 foi utilizada como controle dos discos de antibióticos. Foram testados os antimicrobianos (BIO-RAD Laboratories Inc, França) recomendados para avaliação de cepas da família *Enterobacteriaceae* para os isolados de *Cronobacter* spp. nas seguintes concentrações: ampicilina-sulbactam (SAM; 10/10 µg), amoxicilina-clavulanato (AMC; 20/10 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), trimetoprim-sulfametoxazola (SXT; 1,25/23,75 µg), piperaciclina-tazobactam (PPT; 100/10µg) ampicilina (AMP; 10 µg), meropenema (MER; 10 µg), gentamicina (GEN; 10 µg), ácido nalidíxico

(NAL; 30 µg), aztreonam (ATM; 30 µg) e nitrofurantoína (NIT; 300 µg). Para as cepas de *P. aeruginosa* foram utilizados os antimicrobianos recomendados para espécie *P. aeruginosa* nas seguintes concentrações: piperaciclina-tazobactam (PPT; 100/10 µg), ceftazidima (CAZ; 30 µg), cefepima (CPM; 30 µg), aztreonam (ATM; 30 µg), meropenem (MER; 10 µg), gentamicina (GEN; 10 µg), ampicacina (AMI; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg) e levofloxacina (LVX; 5 µg). As placas foram incubadas a  $(35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$  por 24 h. Após, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado e as cepas foram classificadas como: sensível, resistência intermediária ou resistente de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2018).

### 3.6 Pesquisa de formação de biofilme

A pesquisa de formação de biofilme dos isolados de *P. aeruginosa* e *Cronobacter* spp. foi realizada de acordo com protocolo descrito por Pedrosa e colaboradores (2014) e Umeda e colaboradores (2017), respectivamente. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata para cada cepa. Avaliou-se a formação de biofilme na matriz de poliestireno e matriz aço inox, tendo como substratos o caldo BHI e água mineral estéril. O caldo BHI é um caldo rico em nutrientes, favorecendo o crescimento dos micro-organismos. A água mineral foi utilizada como parâmetro de crescimento justamente onde as cepas foram previamente isoladas neste estudo. A interpretação dos resultados foi realizada pela média das nove leituras dos três experimentos independentes e foram classificados da seguinte forma: não aderente (NA), fracamente aderente (FA), moderadamente aderente (MA) e fortemente aderente (FMA), segundo critérios descritos por Stepanovic e colaboradores (2007) (Quadro 10).

Quadro 10 - Critérios de aderência de Biofilme

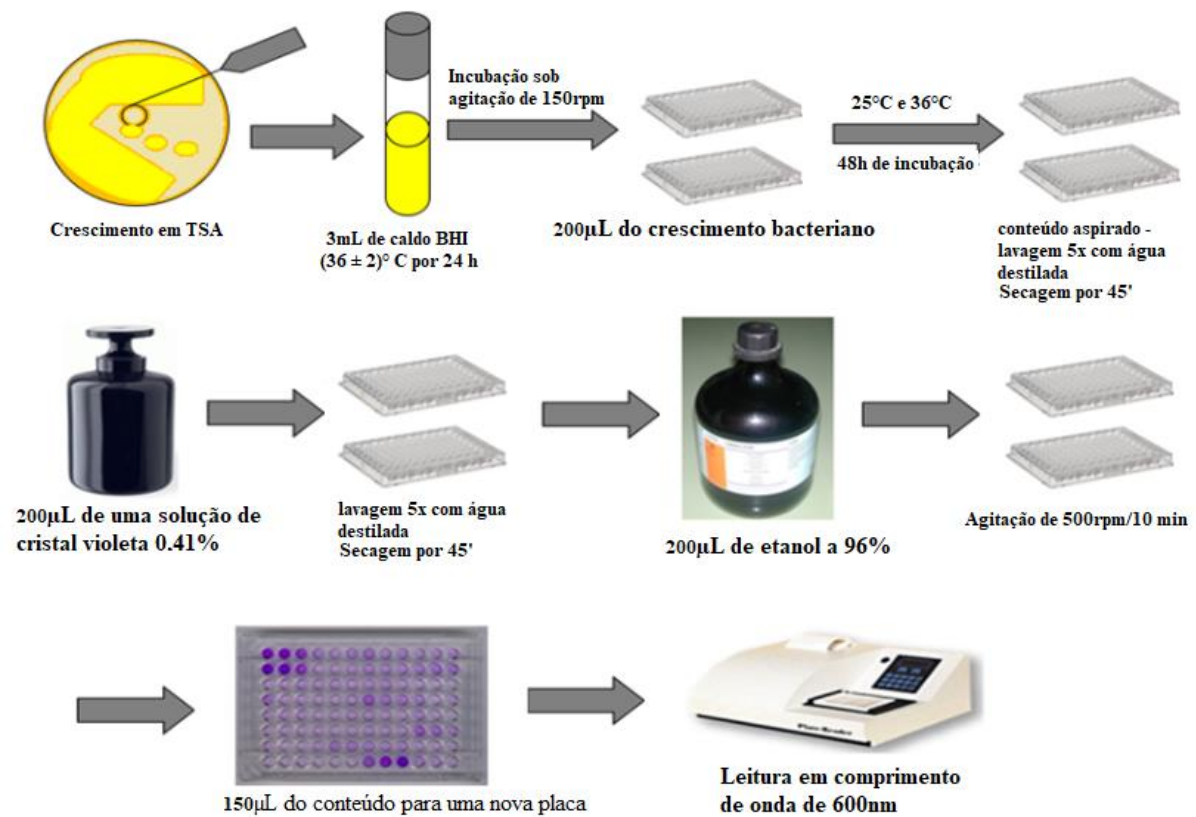
Classificação	Aderência
Não aderente (NA)	$D.O^1 \leq D.O. (CN^2)$
Fracamente aderente (FA) +	$D.O. (CN) < D.O. < 2 \times D.O. (CN)$
Moderadamente aderente (MA) ++	$2 \times D.O. (CN) < D.O. < 4 \times D.O. (CN)$
Fortemente aderente (FMA) +++	$4 \times D.O. (CN) < D.O.$

Legenda: 1-Densidade óptica; 2- Controle negativo.  
Fonte: STEPANOVIC *et al.*, 2007.

### 3.6.1 Avaliação da formação de biofilme em matriz poliestireno

A Figura 5 ilustra o esquema realizado para os ensaios de avaliação da formação de biofilme em matriz poliestireno, conforme protocolo descrito por Pedrosa e colaboradores (2014) e Umeda e colaboradores (2017). As cepas previamente criopreservadas foram semeadas em TSA e incubadas a  $35 \pm 2$  °C por  $24 \pm 2$  h para confirmação da pureza. Uma colônia isolada de cada cepa foi semeada em dois tubos 13x100 mm contendo 3,0 mL de caldo BHI e incubados sob agitação de 150 rpm a  $36 \pm 2$  °C por 24 h. Após o período de incubação, um tubo de BHI foi utilizado para a inoculação de 200 µL do crescimento bacteriano, em triplicata, em duas microplacas de poliestireno contendo 96 orifícios com fundo chato (Microtest<sup>TM</sup> Falcon, EUA). O outro tubo de BHI contendo a mesma cepa foi centrifugado (Eppendorf 5804-R, A-4-44, Alemanha) a 7.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com 1,5 mL de água mineral estéril (previamente autoclavada a temperatura de 121 °C por 15 min). Duzentos microlitros dessa suspensão foram inoculados, em triplicata, nas duas microplacas. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo (CP) e o caldo BHI e a água mineral estéril foram utilizados como controles negativos (-). Todos os controles também foram inoculados em triplicata, nas duas microplacas. Uma placa foi incubada na temperatura de  $25 \pm 2$  °C e a outra a  $36 \pm 2$  °C. A temperatura de  $25 \pm 2$  °C simulou a temperatura ambiente onde, geralmente, estão dispostos os galões de 20 L comercializados nos estabelecimentos comerciais. A temperatura de  $36 \pm 2$  °C simulou a temperatura ótima de crescimento das bactérias avaliadas e uma condição comum no Estado do Rio de Janeiro. Após o período de 48 h de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado. As placas foram lavadas cinco vezes em água destilada e foram mantidas à temperatura ambiente até a completa secagem (aproximadamente 45 min). A seguir foram adicionados 200 µL de solução cristal violeta (Merck, Alemanha) 0,41% em cada poço nas microplacas e estas foram mantidas a temperatura ambiente por 45 min. Os poços foram aspirados e as placas foram lavadas por cinco vezes em água destilada e deixadas em temperatura ambiente até a completa secagem. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto (Merck, Alemanha) em cada poço e as placas foram mantidas sob agitação a 500 rpm em aparelho agitador de placas. Após 10 min, 150 µL do conteúdo de cada poço foram transferidos para novas placas e foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) em aparelho espectrofotômetro (Biomérieux, Reader 270, França) em comprimento de onda de 600 nm.

Figura 5 - Esquema representativo da avaliação da formação de biofilme em matriz poliestireno.



Fonte: Da autora, 2019.

### 3.6.2 Avaliação da formação de biofilme em matriz aço inox

As cepas foram semeadas em ágar tripticaseína de soja (TSA) (Merck, Alemanha) e incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 h. Uma colônia isolada foi semeada em dois tubos contendo 5,0 mL de caldo infusão cérebro-coração (BHI) (Merck, Alemanha) incubados sob agitação de 150 rpm (Orbit-Shaker, Lab-Line, EUA) a  $36 \pm 2$  °C por 24 h. Após a incubação, um tubo de caldo BHI foi utilizado para inoculação de 2,0 mL do crescimento celular em dois tubos 38x250 mm contendo um cilindro de aço inox (Figura 6). O segundo tubo da mesma cepa foi centrifugado a 7.500 rpm/10 min (Eppendorf 5804-R, A-4-44, Alemanha), o sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspensão em 5,0 mL de água mineral natural estéril. Dois microlitros dessa suspensão foram inoculados em dois tubos contendo um cilindro de aço inox de dimensões. A cepa de *P. aeruginosa* (INCQS 00099) ATCC 27853 foi utilizada como CP. Caldo BHI sem crescimento e uma água mineral natural estéril foram utilizados como controles negativos (CN). Um tubo foi incubado a  $25 \pm 2$  °C e o outro a  $36 \pm 2$  °C por 48 h.

Para leitura, cada cilindro de aço inox foi lavado por cinco vezes com água destilada e mantida a temperatura ambiente durante 45 min. A seguir, foram adicionados 2,0 mL de solução de cristal violeta 0,41% (Merck, Alemanha) e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 45 min. A lavagem foi realizada novamente por cinco vezes em água destilada, e o cilindro transferido para um tubo novo da mesma dimensão e mantido a temperatura ambiente por 45 min. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de etanol a 96% (Merck, Alemanha). Após 10 min, 150 µL do conteúdo de cada tubo foram transferidos para microplacas de 96 poços e foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) em aparelho espectrofotômetro (Biomérieux, Reader 270, França) em comprimento de onda de 600 nm.

Figura 6 - Tubos de ensaio contendo superfície de aço inox em formato de círculo utilizados para avaliação de biofilme em matriz inox.



Fonte: Da autora, 2019.

### 3.6.3 Avaliação da atividade antibiofilme do hipoclorito de sódio frente à formação de biofilme dos isolados

A atividade antibiofilme do hipoclorito de sódio foi analisada frente às cepas que apresentaram a formação de biofilme na matriz de poliestireno (item 3.6.1). O produto à base de hipoclorito de sódio foi obtido do comércio e testado quanto ao teor de cloro ativo, de



acordo com o declarado no rótulo pelo fabricante, no Setor de Cosméticos e Saneantes do INCQS/Fiocruz por análise de volumetria de oxirredução, tendo como referência a RDC nº 110/2016 (BRASIL, 2016), sendo considerado satisfatório. Previamente às análises, o produto foi diluído utilizando-se água mineral estéril para adequação às seguintes concentrações:

- Simulação de desinfecção geral (superfícies fixas, pisos, paredes, etc...) (2%)
- Simulação de desinfecção de alimentos (1%)
- Simulação de desinfecção de bebedouros (0,02%)

Os biofilmes formados pelas cepas foram expostos a soluções de hipoclorito de sódio nas seguintes concentrações e tempos de exposição: 0,02% por 10, 30 e 60 min; 1% por 10 min; e 2% por 10 min, e após o tempo de contato, as leituras foram realizadas de acordo com o procedimento descrito em 3.6.1.

### **3.7 Avaliação da relação entre a qualidade microbiológica e do tempo de fabricação das embalagens**

Para a avaliação entre o  $T_f$  das embalagens plástico-garração nas faixas estudadas ( $T_f \leq 1$  ano,  $1 \text{ ano} < T_f \leq 2$  anos, e  $2 \text{ anos} < T_f \leq 3$  anos) e as condições sanitárias, foi aplicado o teste  $t$  de Student para amostras independentes, considerando como significativa uma probabilidade inferior a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Avaliação da qualidade microbiológica das amostras de águas minerais naturais**

A caracterização microbiológica das amostras analisadas neste estudo está apresentada na Tabela 1. Das 99 amostras analisadas, 22 amostras (22,2%) apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória considerando os critérios preconizados pela RDC n° 275/2005, sendo a maioria devido à contaminação por coliformes totais (16,2%) e *P. aeruginosa* (10,1%). Estudos anteriores realizados no Brasil já haviam relatado que 50-72% das amostras de águas minerais naturais vendidas em garrafas de 20 L apresentaram-se insatisfatórias para o consumo humano devido à contaminação microbiológica (NUNES FILHO et al., 2008; BRANDAO et al., 2012; PEDROSA et al., 2014; GOMES et al., 2015). Além disso, considerando as amostras representativas, dos 33 lotes analisados, 13 (39,4%) foram consideradas insatisfatórias, o que aumenta a reprovação destes produtos de acordo com os critérios legislativos.

Tabela 1 - Caracterização microbiológica das amostras de águas minerais naturais comercializadas em galões de 20 L analisadas neste estudo.

Amostras	Micro-organismos (Total / %)					
	Coliformes totais <sup>1</sup>	Clostrídios sulfito redutores <sup>1</sup>	<i>E. coli</i> <sup>1</sup>	Enterococos <sup>1</sup>	<i>Cronobacter</i> <sup>2</sup>	<i>P. aeruginosa</i> <sup>1</sup>
A1-5, 7-24, 28, 29, 31-33, 35-40, 43, 46-60, 64-67, 69-71, 73, 74, 76, 77, 79, 81-86, 89, 91-95	<1,1	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	<1,1
A6, 30, 90	>23	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	<1,1
A25	>23	>23	<b>Presença</b>	<1,1	Ausência	<b>2,2</b>
A26	<1,1	>23	Ausência	<1,1	Ausência	<1,1
A27	<b>16</b>	<b>6,9</b>	<b>Presença</b>	<1,1	Ausência	<b>3,6</b>
A34, 61, 68, 72, 96	<b>1,1</b>	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	<1,1
A41	<b>2,2</b>	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	<1,1
A42, 75, 87	<1,1	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	>23
A44	<b>1,1</b>	<b>3,6</b>	Ausência	<1,1	Ausência	<1,1
A45	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	Ausência	<1,1	Ausência	<b>16</b>
A62	>23	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	<b>1,1</b>
A63	>23	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	<b>2,2</b>
A78	<1,1	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	<b>5,1</b>
A80	>23	<1,1	Ausência	<1,1	<b>Presença</b>	<1,1
A88	<1,1	<1,1	Ausência	<1,1	Ausência	<b>1,1</b>
<b>Total (n=99)</b>	<b>16 (16,2%)</b>	<b>5 (5,0%)</b>	<b>2 (2,0%)</b>	<b>0 (0,0%)</b>	<b>1 (1,0%)</b>	<b>10 (10,1%)</b>

Legenda: 1- Resultados expressos em Número Mais Provável/100 mL; 2- Resultados expressos em Presença ou ausência/100 mL.

Fonte: Da autora, 2019.

Esses resultados enfatizam a importância de coletar várias amostras do mesmo lote para análise, uma vez que a contaminação não é homogênea. Essa contaminação pode ser atribuída ao uso de diferentes garrafas retornáveis de 20 L no mesmo lote de água mineral natural, inclusive de diferentes fabricantes, ou contaminação intermitente, como durante o envase, vedação ou ocasionado por outra etapa na linha de produção. Os coliformes que podem ocorrer naturalmente no solo, na água e na vegetação indicam possível contaminação por fontes aéreas ou por superfícies de contato do produto que não foram efetivamente desinfetados. Como os coliformes normalmente não estão presentes nas fontes naturais de água mineral, sua presença é considerada um indicador de contaminação da água na fonte ou durante o processo de embalagem (COMISSÃO DO CODEX ALIMENTARIUS, 2011). Os coliformes podem se originar de práticas não higiênicas ou do meio ambiente, sendo a *E. coli* considerada um dos indicadores mais adequados de contaminação fecal. No presente estudo, das 99 amostras analisadas, duas (2,0%) apresentaram contaminação por *E. coli*.

Das 15 marcas analisadas, nove (60,0%) apresentaram resultado insatisfatório para pelo menos um dos lotes analisados. Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Pedrosa e colaboradores (2014) que analisaram 33 marcas e observaram que 57,6% apresentaram resultados insatisfatórios. Esses resultados indicam que esses produtos continuam a representar risco para o consumo humano e concordam com dados anteriores do Ministério da Saúde, que relataram que de 2000 a 2017 a água foi implicada como veículo de contaminação em 770 (6,16%) surtos de um total de 12.503, e *E. coli* foi o agente etiológico mais frequente (BRASIL, 2018).

No presente estudo, *P. aeruginosa* foi isolada em 10 amostras (10,1%). Considerando que a *P. aeruginosa* não é um micro-organismo normal da microbiota das águas minerais naturais, porém pode sobreviver e crescer nessas águas, sua presença é considerada um indicador de contaminação da água na fonte ou durante o processo de embalagem (COMISSÃO DO CODEX ALIMENTARIUS, 2011). *P. aeruginosa* foi detectada em 8/33 lotes (24,2%) neste estudo, sendo essa ocorrência menor do que a relatada por outros estudos que observaram a ocorrência de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral natural engarrafada de 20 L comercializadas no Brasil, que variaram de 47,5 a 67,7% (BRANDÃO et al., 2012; PEDROSA et al., 2014; GOMES et al., 2015). Na Irlanda, Caskey e colaboradores (2018) analisaram 67 amostras de águas minerais engarrafadas e detectaram *P. aeruginosa* apenas em duas (3%) amostras. Essa menor ocorrência pode ser atribuída provavelmente ao fato dessas amostras não serem comercializadas em frascos retornáveis, que provavelmente são a maior fonte de contaminação.

Apenas a amostra A80 apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. (Tabela 1). Essa amostra apresentou alta concentração de coliformes totais, mas os demais indicadores de contaminação fecal pesquisados (*E. coli*, CSR e enterococos) não foram detectados. Devido à baixa ocorrência de *Cronobacter* spp. nas amostras analisadas (1,0%), nenhuma análise estatística de correlação entre a presença de indicadores de contaminação fecal e a presença de *Cronobacter* spp. pôde ser realizada. Liu e colaboradores (2013) reportaram que coliformes totais podem ser utilizados como indicadores da contaminação por *Cronobacter* spp. em águas para o consumo humano, obtendo uma taxa de verdadeiro positivo de 96%. Esses resultados foram similares ao presente estudo, uma vez que a amostra A80, contaminada com *C. malonaticus*, apresentou alta carga de coliformes totais (Tabela 1). Outro ponto interessante foi que nem *Cronobacter* spp. ou algum indicador de contaminação fecal foi detectado nas amostras A78 e A79, que são do mesmo lote que a amostra A80. Conforme discutido anteriormente, estes resultados indicam que a contaminação em amostras do mesmo lote não é homogênea. A discrepância dos resultados obtidos na presente investigação relativos à ocorrência de *Cronobacter* spp. com os demais previamente reportados na literatura pode estar atribuída ao tipo de água analisada, e as diferenças nas metodologias utilizadas, uma vez que ainda não existe um método de referência para pesquisa de *Cronobacter* spp. em amostras de águas para o consumo humano.

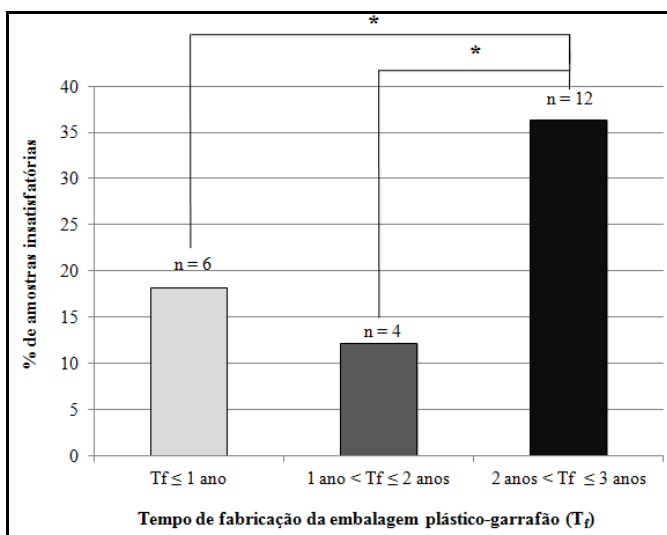
A contaminação de água mineral por *Cronobacter* spp pode ocasionar alguns agravos à saúde quando essa água é utilizada, por exemplo, para o preparo de alimentação infantil. O uso de água fervida e posteriormente resfriada a temperatura de 70 °C para reconstituição de fórmula infantil desidratada (FID) é recomendada para prevenir a contaminação e crescimento de *Cronobacter* spp. (SILANO et al., 2016). Contudo, alguns pais e cuidadores por acreditarem que as águas minerais naturais são produtos seguros acabam não seguindo esta recomendação. (WOLF et al., 2008; AYAZ et al., 2017). Logo, mesmo que a ocorrência de *Cronobacter* spp. encontrada neste estudo tenha sido baixa (1,0%), o uso destas águas minerais naturais sem o correto tratamento térmico para reconstituição de FID pode acarretar riscos à saúde dos lactentes. Além disso, a recente publicação de um surto de gastroenterite aguda causada por *C. sakazakii* em adultos saudáveis na China, onde o consumo de alimentos contaminados com o patógeno foram identificados como o possível veículo de contaminação (YONG et al., 2018), pode indicar que o consumo de águas minerais contaminadas com *Cronobacter* spp. pode representar um risco para estes indivíduos.

## 4.2 Avaliação da qualidade microbiológica e o tempo de fabricação das embalagens

As garrafas retornáveis geralmente são feitas de material de polietileno tereftalato (PET), o que tem a desvantagem de liberar resíduos que podem alterar as características organolépticas da água mineral natural. Assim, os recipientes de vidro são mais recomendados microbiologicamente do que os plásticos, uma vez que foi demonstrado que as garrafas plásticas podem favorecer a reprodução microbiana quando as condições de armazenamento não são ótimas (DE GIGLIO et al., 2015).

Em relação ao  $T_f$  das embalagens plástico-garrafão de 20 L, o maior percentual de amostras insatisfatórias foi identificado nas amostras com embalagens na faixa de 2 anos  $< T_f \leq 3$  anos (Figura 7). Após análise estatística, não houve diferença entre as amostras com  $T_f \leq 1$  ano e 1 ano  $< T_f \leq 2$  anos ( $P = 0,160$ ). Contudo, diferenças significativas foram detectadas quando comparado o tempo de  $T_f \leq 1$  ano e 2 anos  $< T_f \leq 3$  anos ( $P = 0,012$ ) e 1 ano  $< T_f \leq 2$  anos e 2 anos  $< T_f \leq 3$  anos ( $P = 0,003$ ). Estes resultados indicam que talvez o prazo de até três anos não seja suficiente para garantir a integridade das embalagens para sua reutilização, mostrando que estes podem apresentar maior risco para contaminação destes produtos. Em um estudo realizado após a publicação da Portaria nº 358/2009 (BRASIL, 2009), que estipulou um prazo de validade de três anos para as embalagens plástico-garrafão de 20 L, Pedrosa e colaboradores (2014) relataram um percentual de 50% de amostras insatisfatórias na análise de 80 amostras. Contudo os autores não avaliaram o  $T_f$  das embalagens das amostras, podendo este ter sido um fator para este alto percentual identificado.

Figura 7 - Avaliação da qualidade microbiológica e o tempo de fabricação das embalagens plástico-garrafão de 20L.



Fonte: Da autora, 2018.

### 4.3 Caracterização fenotípica e molecular dos isolados

#### 4.3.1 *Cronobacter* spp.

O isolado presuntivo de *Cronobacter* spp. da amostra A80 foi confirmado pelo qPCR e identificado como “*C.sak* group” Bionúmero 0625734153622210 com uso do sistema semi-automatizado Vitek 2.0 (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização fenotípica, perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e produção de biofilme dos isolados.


Cepas (n.º da amostra)	Perfil do Vitek 2.0 - Bionúmero	Antibiograma	Produção de Biofilme em matriz poliestireno				Produção de Biofilme em matrix inox			
			Caldo infusão cérebro-coração		Água mineral natural estéril		Caldo infusão cérebro-coração		Água mineral natural estéril	
			(25 ± 2) °C	(36 ± 1) °C	(25 ± 2) °C	(36 ± 1) °C	(25 ± 2) °C	(36 ± 1) °C	(25 ± 2) °C	(36 ± 1) °C
P163 (A27)	<i>P. aeruginosa</i> 0003053043500040	S	MA	MA	FA	FA	FA	FA	FA	NA
P164 (A42)	<i>P. aeruginosa</i> 0043053003500200	S	FMA	MA	MA	NA	FA	FA	FA	NA
P165 (A45)	<i>P. aeruginosa</i> 0003051043500252	S	FMA	MA	FA	NA	FA	FA	FA	NA
P166 (A87)	<i>P. aeruginosa</i> 0043053043500040	S	FMA	MA	FA	FA	FA	FA	NA	NA
P167 (A75)	<i>P. aeruginosa</i> 0003453043500200	S	FMA	MA	FA	FA	FA	NA	NA	NA
P168 (A78)	<i>P. aeruginosa</i> 0043453103500210	S	FMA	MA	FA	FA	FA	FA	NA	NA
C294 (A80)	<i>Cronobacter sak.</i> group 0625734153622210	S	FA	NA	FA	FA	FA	FA	FA	NA
<i>P.aeruginosa</i> (INCQS 00099) ATCC 27853	NR	NR	FMA	MA	FMA	MA	NA	MA	FA	NA

Legenda: S= sensível a todos os antimicrobianos testados; NA= não aderente, FA= fracamente aderente, MA= moderadamente aderente (MA), FMA= fortemente aderente, NR= não realizado.  
Fonte: Da autora, 2019.



A tipificação da cepa C294 pelo MLST identificou o isolado como pertencente a espécie *C. malonaticus* ST 440 e foi depositado no banco sob “id” de número 2646. Este ST já foi identificado em cepas isoladas no Brasil em um surto ocorrido na cidade de Teresina no Piauí, ocasionando a morte de três neonatos (BRANDAO et al., 2015; UMEDA et al., 2017). De acordo com o banco de dados do MLST (<https://pubmlst.org/cronobacter/>), este ST também já foi isolado a partir de amostra de leite na China (Figura 8). Uma investigação realizada na China isolou *Cronobacter* spp. em 32 (12,9%) de 248 amostras de águas para consumo humano e de sistemas de abastecimento municipais (LIU et al., 2013; CUI et al., 2015). Outro estudo detectou nove (9%) cepas de *Cronobacter* spp. em 100 amostras de águas para consumo humano provenientes de diferentes províncias na China (FEI et al., 2018). Cui e colaboradores (2019), no período de abril a novembro de 2016, trabalharam com 23 amostras provenientes de água de fazendas, parques e reservatórios, e destas, três (13,0%) apresentaram contaminação por *Cronobacter* spp. Vale ressaltar, que até o presente estudo, não havia depósitos de STs provenientes de amostras de água mineral natural no banco de dados online, e que o mesmo, foi depositado como proveniente de fonte ambiental.

Figura 8 - Cepas de *C. malonaticus* ST 440 depositadas no banco de dados do MLST.

Isolate fields 								Ext-MLST				MLST									
id	isolate	aliases	species	biotype	serotype	country	source	year	cgcA	cpa	zpx	EST	atpD	fusA	glnS	gltB	gyrB	infB	pps	ST	clonal complex
1470	C89		<i>C. malonaticus</i>	9		Brazil	Clinical	2013					124	13	172	204	77	183	244	440	
1471	C90		<i>C. malonaticus</i>	9		Brazil	Clinical	2013					124	13	172	204	77	183	244	440	
2181	Cro06		<i>C. malonaticus</i>		Cmal O1	China	Milk	2009					124	13	172	204	77	183	244	440	
2646	C294		<i>C. malonaticus</i>			Brazil	Environmental	2018					124	13	172	204	77	183	244	440	

Fonte: [https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst\\_cronobacter\\_isolates&page=profiles](https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_cronobacter_isolates&page=profiles). Acesso em: 24 out. 2019.

A cepa de *C. malonaticus* foi sensível a todos os antimicrobianos testados e não apresentou formação de biofilme nas matrizes estudadas (Tabela 2). Estes resultados foram similares a outros estudos que isolaram *Cronobacter* de amostras de alimentos sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados (MOLLOY et al., 2009; CHEN et al., 2012; HUANG et al., 2015; BRANDAO et al., 2016; BRANDAO et al., 2017; VASCONCELLOS et al., 2018). Em relação ao biofilme, Umeda e colaboradores (2017) avaliaram 10 cepas de *C. malonaticus* de seis ST distintos, incluindo os dois isolados clínicos ST 440 do surto ocorrido no Brasil

(BRANDÃO et al., 2015), e também observaram que as cepas não produziram biofilme moderado ou forte em matriz poliestireno.

#### 4.3.2 *P. aeruginosa*

Os isolados de *P. aeruginosa* (n= 6) foram confirmados pelo sistema Vitek 2.0 com nível de confiança Excelente (97-99%). O perfil fenotípico entre os isolados foi distinto para cada isolado, conforme apresentado na Tabela 2. Não foi possível isolar cepas de *P. aeruginosa* das amostras A25, A62, A63 e A88, pois não houve crescimento de colônias no ágar cetrimide ou crescimento de outras espécies do gênero *Pseudomonas*. Isto pode ter ocorrido devido ao tempo de incubação do caldo acetamida antes da semeadura no ágar cetrimide, o que poderia levar à perda de viabilidade da *P. aeruginosa* no caldo acetamida (PEDROSA et al., 2014).

Os resultados da produção de biofilme pelas cepas de *P. aeruginosa* estão apresentados na Tabela 2. No caldo BHI, todas as cepas de *P. aeruginosa* (n=6) foram capazes de produzir biofilme e foram consideradas moderadamente ou fortemente aderentes em ambas às temperaturas estudadas (25 e 36 °C). Já na água mineral natural, somente a cepa P164 foi capaz de produzir biofilme moderado na temperatura de (25 ± 2) °C. Esses resultados também foram observados por Pedrosa e colaboradores (2014) que relataram que as cepas de *P. aeruginosa* produzem mais biofilme em matriz BHI do que em água mineral natural. No entanto, Silva e colaboradores, (2008) avaliaram 10 isolados de *P. aeruginosa* em água mineral e observaram que nenhuma cepa foi capaz de aderir ao material PET. A composição do meio é provavelmente o fator mais importante que influencia a capacidade das bactérias de produzir biofilme sob condições *in vitro* (STEPANOVIC et al., 2007).

A exposição ao hipoclorito de sódio a 0,02% não eliminou o biofilme nem mesmo após 60 min de contato. Nas concentrações de 1 e 2% o hipoclorito de sódio eliminou o biofilme formado pelas cepas. De acordo com Manual do Ministério de Saúde - Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde (BRASIL, 1994), o uso de hipoclorito de sódio na concentração de 0,02% durante 60 min é indicado para desinfecção de bebedouros. Desta forma, os resultados do presente estudo indicam que caso o biofilme tenha sido formado nestes equipamentos, esse tratamento parece não ser suficiente para eliminar a contaminação por estes patógenos.

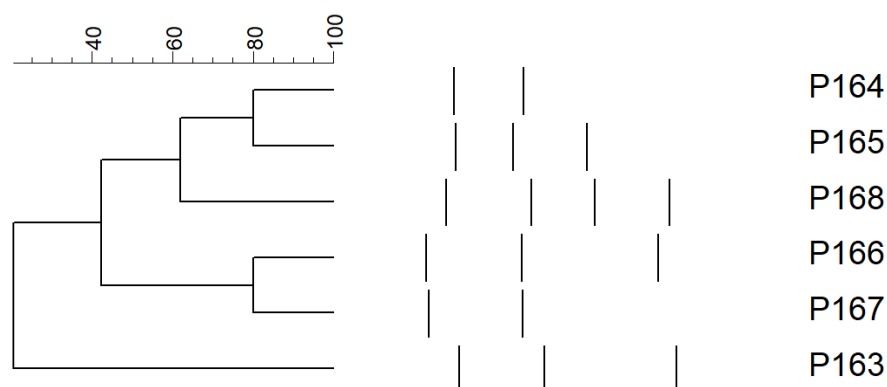
Em relação à suscetibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade frente aos antimicrobianos testados. Esses resultados foram

semelhantes aos relatados por Silva e colaboradores (2008), que avaliaram 30 cepas de *P. aeruginosa* provenientes de água potável, incluindo 10 isolados de água mineral engarrafada, e estas foram suscetíveis a aztreonam (ATM), cefepima (CPM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP) e piperacilina-tazobactam. Isso pode ser explicado pelo fato de que essas cepas talvez não sofressem forte pressão seletiva como cepas ambientais encontradas em locais de serviços de assistência à saúde. Entretanto, resultados diferentes foram relatados por Pedrosa e colaboradores (2014), que isolaram cepas de *P. aeruginosa* de água mineral que apresentaram resistência ou resistência intermediária a antibióticos de classes dos aminoglicosídeos e / ou  $\beta$ -lactâmicos.

A certificação molecular das cepas de *P. aeruginosa* foi realizada através de PCR com alvo no gene 16S rRNA, que apresentou o mesmo resultado obtido pelo Vitek 2.0. Outros autores também utilizaram essa metodologia em outros estudos para confirmação de *P. aeruginosa* e obtiveram um resultado confiável.

A análise por MLST dos seis isolados de *P. aeruginosa* demonstrou seis STs distintos, cinco previamente descritos (ST 252, ST 1417, ST 2502, ST 2620 e ST 3078) e um novo (ST 3312) que foram depositados na base de dados do MLST para *P. aeruginosa*. O isolado P168 apresentou uma nova sequência de alelos, e foi identificado e depositado como ST novo de número 3312. Conforme visualizado em dendograma (Figura 9), o perfil molecular a partir de ERIC-PCR também apresentou diferenças entre as cepas isoladas.

Figura 9 - Perfil de bandas representativo dos perfis obtidos dos isolados de *P. aeruginosa* por ERIC-PCR.

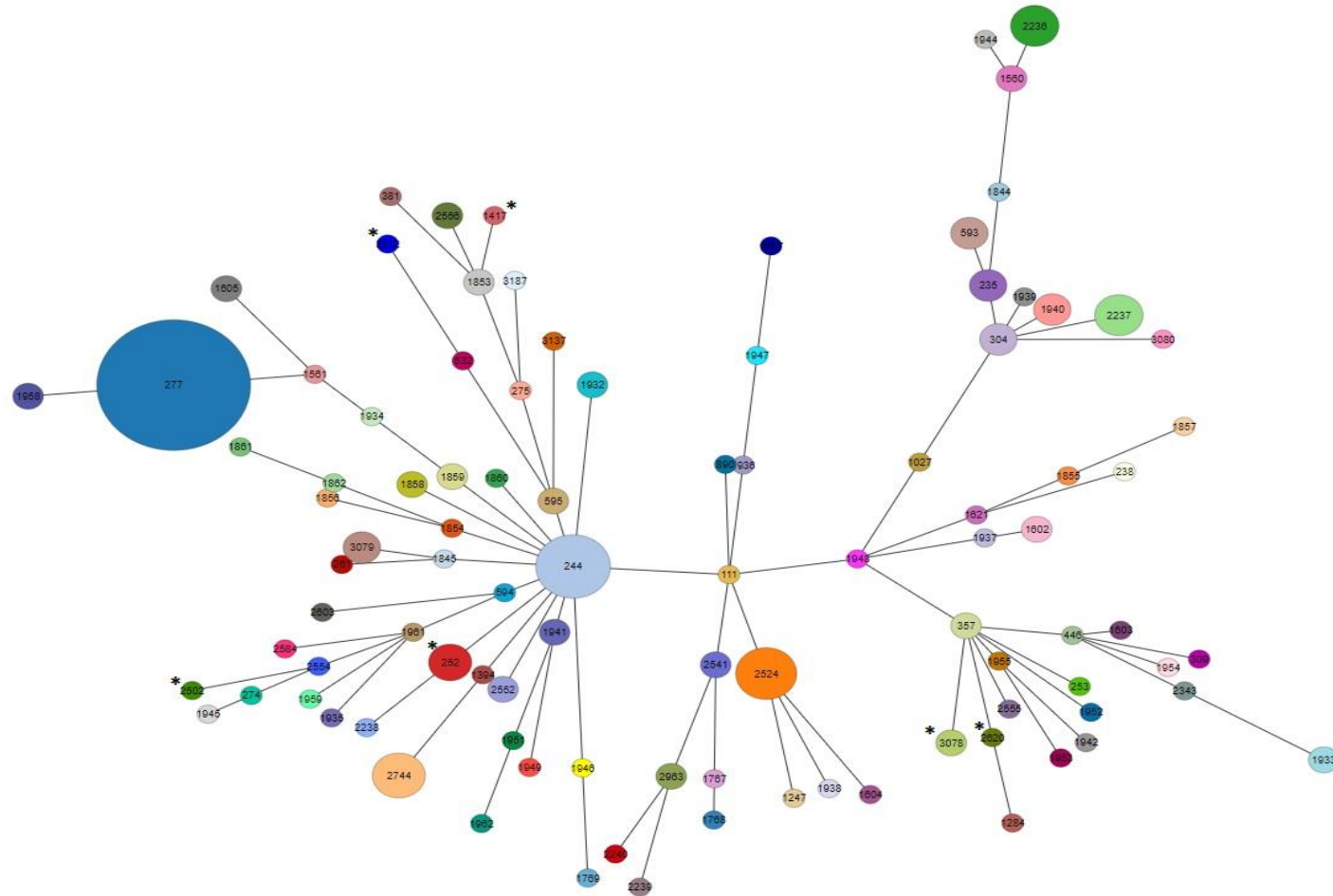


Fonte: Da autora (2019), obtida com base no agrupamento UPGMA e análise de similaridade com cálculo do coeficiente de Dice. Análise realizada utilizando-se o programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths, SintMartens-Latem, Belgium).

O ST 252 já havia sido depositado de amostras ambientais, água e amostra clínica dos seguintes países: Austrália e França. O ST 1417 foi previamente identificado do Japão e Malásia de amostras de escarro. O ST 2502 havia sido identificado na França, porém não foi possível identificar a origem. Não há informações a cerca da origem e amostra proveniente do ST 2620 previamente identificados. O ST 3078 foi isolado em amostra de paciente internado em um hospital no Pernambuco em 2016.

A Figura 10 apresenta os 209 STs do Brasil depositadas no banco de dados de *P. aeruginosa* (último acesso em 28 de outubro de 2019), destacando os seis STs identificados no presente estudo. Três STs (ST 252, ST 1417 e ST 3078) já estavam associados a casos clínicos em outros países, e o ST 252 também foi isolado de amostra de lavagem brônquica no Brasil (Figura 10). Os outros ST encontrados também estão intimamente relacionados a outros ST já associados a infecções humanas no Brasil (Figura 10). Esses resultados indicam que amostras de água mineral podem estar atuando como veículo para colonização e / ou infecção para esses indivíduos.

Figura 10 - *Minimum Spanning Tree* (Árvore de Abrangência mínima) de *P. aeruginosa* de acordo com o STs depositados no banco de dados do MLST proveniente de amostras do Brasil.



Fonte: Da autora (2019), baseada na análise do perfil alélico dos genes *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *ppsA* e *trpE*. A relação entre os STs foi determinada pela análise realizada com Bionumerics 6.6. Os asteriscos (\*) correspondem aos STs identificados neste trabalho.

## 5 CONCLUSÕES

- Das 99 amostras de água mineral natural envasadas em garrações de 20 L analisadas, 22 (22,2%) apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória de acordo com os critérios estabelecidos na RDC nº 275/2005;
- Das 15 marcas analisadas, nove (60%) apresentaram resultado insatisfatório para pelo menos um dos lotes analisados;
- *Cronobacter* foi isolado de uma amostra, sendo a cepa identificada como *C. malonaticus* ST440, já anteriormente associada a um caso clínico no Brasil. Este isolado apresentou-se sensível a todos os antimicrobianos e não formou biofilme em ambas matrizes estudadas;
- Os isolados de *P. aeruginosa* (n=6) não apresentaram resistência a nenhum antimicrobiano testado, mas apresentaram produção de biofilme em matriz poliestireno. A exposição ao hipoclorito de sódio a 0,02% não eliminou o biofilme nem mesmo após 60 min de contato. Nas concentrações de 1 e 2% o hipoclorito de sódio eliminou o biofilme formado pelas cepas;
- Os isolados de *P. aeruginosa* foram identificados como ST 252, 1417, 2502, 2620 e 3078, sendo associados também a cepas de origem clínica. O isolado P168 apresentou uma nova sequência de alelos, sendo depositado um novo ST de número 3312;
- Diferenças significativas foram observadas em relação ao prazo de validade das embalagens plástico-garração reutilizáveis, sinalizando que embalagens com tempo de fabricação superior a dois anos apresentam maior risco de contaminação microbiológica;
- Os resultados deste estudo poderão ser utilizados pelos órgãos de Vigilância Sanitária para análise de risco destes produtos, visto que as cepas isoladas neste estudo também já foram associadas a casos clínicos, o que demonstra uma preocupação em casos de ingestão por indivíduos pertencentes ao grupo de risco, como idosos, imunocomprometidos, gestantes e portadores de doenças crônicas.

## REFERÊNCIAS

- ALÓS, Juan Ignacio. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, 2014.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington: APHA, 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Investigação e controle de bactérias multirresistentes**. Brasília: Anvisa, 2017. 21 p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta pública nº 542, de 17 de julho de 2018. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 18 de julho de 2018.
- ALSONOSI *et al.* The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalized patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, V. 34, p.1979-1988, 2015.
- AYAZ, *et al.* Cleaning practices and contamination status of infant feeding bottle contents and teats in rawalpindi, pakistan. **Pakistan Journal of Pathology**, v. 28, n. 1, p. 13-20, 2017.
- 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. **Pediatrics (São Paulo)**, v.25, 65-70, 2003.
- BERNARDO, S. P. C. **Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes em pseudomonas aeruginosa isoladas de água mineral**. 2009. 46 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.
- BRANDÃO, M. L. L. *et al.* Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 32-9, 2012.
- BRANDÃO, M. L. L. *et al.* 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. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.3, n.3, p. 91-96, 2015.
- BRANDÃO, M.L.L. *et al.* Identification of *Cronobacter* spp. in cheeses and the antimicrobial susceptibility profile - **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.75, p.1697, 2016.
- BRANDÃO, M.L.L. *et al.* Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retails foods. **Food Microbiology**, v.63, p. 129-138, 2017.
- BRANDÃO, M.L.L.; UMEDA, N.S.; FILIPPIS, I. *Cronobacter* spp.: infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 21, e2017074, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. **Processamento de artigos e superfícies em estabelecimentos de saúde**. 2. ed. Brasília: MS, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54 de 15 de junho de 2000. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade da água mineral natural e água natural. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada nº 275, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Características Microbiológicas Para Água Mineral Natural e Água Natural. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 23 set. Seção 1. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 173, de 13 de setembro de 2006. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Águas Minerais Naturais e Águas Minerais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 set. Seção 1. 2006.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão; IPEA. **Gasto e consumo das famílias brasileiras contemporâneas**. Brasília: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão; IPEA, 2007. v. 2, 552 p.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Portaria nº 358, de 21 de setembro de 2009. Altera a Portaria nº 387, de 19 de setembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 22 set. 2009.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Portaria nº 128, de 25 de março de 2011. Altera a Portaria nº 387, de 19 de setembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 mar. 2011.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Sumário Mineral Brasileiro 2013**. Disponível em: [https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra\\_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=8963](https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=8963). Acesso em: 10 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 110, de 6 de setembro de 2016. Dispõe sobre regulamento técnico para produtos saneantes categorizados como água sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 08 de setembro de 2016.

CARVALHO, M. F. **Avaliação da qualidade da água mineral comercializada em postos de combustíveis no município de Goiânia**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2015.

CASKEY S. *et al.* Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in waters: implications for patients with cystic fibrosis (CF). **Lett Appl Microbiol**. v. 66, n. 6, p. 537-541, 2018.



CHAVES, C. E.V. *et al.* Fatal *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 494 Meningitis in a Newborn, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.24, n. 10, p. 1948-50, 2018.

CHEN, Y. *et al.* Cronobacter. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual.8. ed. Revision A. United States: *Food and Drug Administration*, 2012. Chapter 29. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm>. Acesso em: 20 jul. 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28. ed., PA, USA: CLSI, 2018. (CLSI supplement M100).

CODEX ALIMENTARIUS. CAC/RCP 33-1985, Rev.1 (2011). *Code of Hygienic Practice for Collecting, Processing and Marketing of Natural Mineral Waters*, 2011.

COELHO, M. I. S. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Maringá**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2010.

CUI, J.H. *et al.* Multilocus sequence typing analysis of *Cronobacter* spp. isolated from China. **Arch Microbiol**, v.197, p. 665-672, 2015.

CUNHA, H. F. A. *et al.* Qualidade físico-química e microbiológica de água mineral e padrões da legislação Ambi-Água. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, Taubaté, v. 7, n. 3, p. 155-165, 2012.

CURRAN, B. *et al.* Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 5644- 5649, 2004.

DE GIGLIO, O. *et al.* Mineral water or tap water? An endless debate. **Ann Ig**. p. 58-65, 2015.

DUBOIS, V. *et al.* Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of Cefepime – Amikacin therapy and analysis of  $\beta$ -lactam resistance. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 2072-2078, 2001.

FARACHE FILHO, A.; DIAS, M. F. F. Qualidade microbiológica de águas minerais em galões de 20 litros. **Alim Nutr Araraquara**, v. 19, n. 3, p. 243-248, 2008.

FEI, P. *et al.* Occurrence, Genotyping, and Antibiotic Susceptibility of *Cronobacter* spp. in Drinking Water and Food Samples from Northeast China. **Journal of Food Protection**. v. 81, n. 3, p. 456-460, 2018.

JOINT FAO/WHO WORKSHOP ON ENTEROBACTER SAKAZAKII AND OTHER MICROORGANISMS IN POWDERED INFANT FORMULA. **Proceedings**. Geneva: FAO; WHO, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. **Microbiological Risk Assessment**, Genova: WHO, 115 p. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. **Microbiological Risk Assessment**, Rome, n. 15, 2008.

FORSYTHE S. J.; DICKINS, B.; JOLLEY, K. A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. **BMC Genomics**, v.15, n. 1, p. 1121, 2014.

FORSYTHE, S. Microbial Source Tracking of *Cronobacter* spp. **Adv Appl Microbiol.**, v. 103, p. 49-101, 2018.

FURTADO, G. H. *et al.* Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: risk factors and mortality. **J Crit Care**, v. 24, n.4, p.625.e9–14, 2009.

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

GOMES, M. J. P. **Gênero pseudomonas spp. microbiologia clínica.** Porto Alegre: LABACVET, 2008.

GOMES, T.P.; SANTANA, J.S.; CARVALHO, L.R. Avaliação microbiológica de água mineral comercializada no município de Itabuna-Bahia. **Electronic Journal of Pharmacy**, v. 12, n. 4, p. 65-72, 2015.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

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.

INACIO, H. S. *et al.* Phenotypic and genotypic diversity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections recovered in the Hospitals of Belo Horizonte, Brazil. **Chemotherapy**, v. 60, p. 54-62, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6461**: water Quality. Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia), Part 1 – Method by enrichment in a liquid medium. Geneva: ISO, 1986.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. **ISO/TS 22964**: microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. Geneva: ISO, 2017.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Procedimento operacional padrão: reação de sequenciamento de DNA e precipitação: RPT01A-001, rev. 06. Rio de Janeiro: IOC, 2012.

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 muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 6, p.1442-7, 2008.

JOLLEY, K, A.; CHAN, M.; MAIDEN, C. J. pumlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. **BMC Bioinformatics**, v. 5, n. 86, 2004.

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. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1277-83, 2012.

KIM, H.; FENG, P. Bottled water. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods of examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, p. 573-576, 2001.

LIU, H. *et al.* Evaluation and implementation of membrane filter method for *Cronobacter* detection in drinking water. **FEMS Microbiol Lett**, p. 1-9, 2013.

LINCOPAM; TRABULSI. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**. v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

MAIDEN, M. C. J. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 95, p. 3140–3145, 1998.

MARKLT, W. Health-related effects of natural mineral waters. **Wien Klin Wochenschr**, v. 121, n. 17-18, p. 544-50, 2009.

MEIER, G.O.S. *et al.* Pesquisa, identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil. **Rev Inst Adolfo Lutz**; v. 75:1690, 2016.

MIRANDA, C. C. *et al.* Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 118, n. 6, p. 1276-1286, 2015.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M. A. **Medical Microbiology**. 8. ed. [S.l.]: JMI Laboratories, 2016.

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. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 2, p. 198-203, 2009.

NOWAKONSKI, V.A. *et al.* **Boas práticas em microbiologia clínica**, 2015. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/Microbiologia.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2018.

- NUNES FILHO, S. A. P. *et al.* Commercialization Conditions and Practices Influence the Microbiological Quality of Mineral Waters. **J Food Protect**, v. 71, n. 6, p. 1253-1257, 2008.
- PATRICK, M. E. *et al.* Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1520-1523, 2014.
- PEDROSA, A. P. *et al.* Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **RevAmbient Água**, v. 9, n. 2, p. 313-324, 2014.
- PETRACCIA, L. *et al.* Water, mineral waters and health. **Clin Nutr**. v. 25, n. 3, p.377-385, 2006.
- POOLE, K. Mechanism of bacterial biocide and antibiotic resistance. **J Appl Microbiol** v. 92 suppl, p. 55-64, 2002.
- REIS, R.L.; BEVILACQUA, P.D.; CARMO, R.F. Água envasada: qualidade microbiológica e percepção dos consumidores no município de Viçosa (MG). **Cad. Saúde Colet.**, 2014, v. 22 n. 3, p. 224-232.
- ROSENBERG, F. A. The microbiology of bottled water. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 25, n. 6, p. 41-44, 2003.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. **Resistência bacteriana**: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005. 118 p.
- SANT'ANA, A. *et al.* Qualidade microbiológica de águas minerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 190-194, 2003.
- SILANO, M. *et al.* Time for the 70 °C water precautionary option in the home dilution of powdered infant formula. **Italian Journal Pediatrics**. v. 19, n. 42, 2016.
- SILVA *et al.* Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. **Int J Hyg Environ Health**. v. 211, p.504-509, 2008.
- SILVA, J.N. *et al.* Molecular and phenotypical characterization of *Cronobacter* species isolated with high occurrence from oats and linseeds. **FEMS Microbiology Letters**, p. 1-6, 2018.
- SPILKER, T. *et al.* PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 2074-2079, 2004.
- STEPANOVIC, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMS**, v. 115, n. 8, p 891-899, 2007.
- TSAI, H. Y. *et al.* *Cronobacter* Infections Not from Infant Formula. **Emerg Infect Dis.**, v.1, n.19, p.167-169, 2013.

TUON, F. F. *et al.* Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy. **The Brazilian journal of infectious disease**, v. 16, n.4, p.351-356, 2012.

UMEDA, N.S. *et al.* Phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. strains isolated from foods and clinical specimens in Brazil. **Food Research International**, v. 102C, p. 61-67, 2017.

VAN BELKUM, A. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin Microbiol Infect Dis**, v. 13, p. 1–46, 2007.

VASCONCELLOS, L. *et al.* Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. **Food Research International**, v. 107, p. 353-359, 2018.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and environmental Health**, Alemanha, v. 214, n. 6, p. 417-423, 2011.

WAGHMARE, R. B.; ANNAPURE, U. S. Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. **Food Packaging and Shelf-life**, v. 3, p.62-69, 2015.

WALSH, C. **Antibiotics: action, origins, resistance**. Washington: ASM Press, p. 335, 2003.

WOLF *et al.* Infant Formula–Handling Education and Safety. **PEDIATRICS**. v. 122, Supplement 2, p. 585-590, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. 4. ed. Geneva: WHO, 518 p. 2011. ISBN 9789241548151.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana** **Opções de ação**: sumário executivo. Geneva: WHO, 2012 Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS\\_IER\\_PSP\\_2012.2\\_por.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf). Acesso em: 10 maio 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis**. Geneva: WHO; Switzerland: WHO/EMP/IAU, 2017. (Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO)

YASUHIKO, I. *et al.* Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 109, n. 50, p. 20632-20636, 2012.

YONG, W. *et al.* An Investigation of an Acute Gastroenteritis Outbreak: *Cronobacter* 426 *sakazakii*, a Potential Cause of Food-Borne Illness. **Front Microbiol**, v. 9, n. 2549, 2018.



## ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NA LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY – 2019

### ORIGINAL ARTICLE

## Occurrence of total coliforms, *Escherichia coli* and *Cronobacter* species in commercially available 20 l bottled drinking water sold in Rio de Janeiro State, Brazil

L. Vasconcellos<sup>1</sup>, V.M. Medeiros<sup>1</sup>, C.O. Rosas<sup>1</sup>, S.J. Forsythe<sup>2</sup>, C.M.C.P.A. Romão<sup>1</sup> and M.L.L. Brandão<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Laboratory of Microbiology of Food and Sanitizes, INCQS/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Foodmicrobe.com, Adams Hill, Keyworth, Nottinghamshire, UK

<sup>3</sup> Laboratory of Microbiology Control, Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

**Significance and Impact of the Study:** *Cronobacter malonaticus* ST440 was isolated from 20 l bottled drinking natural mineral waters sold in markets in Rio de Janeiro State, Brazil, and can be a potential threat to human health, particularly for neonates. Thirteen lots (39.4%) were unsatisfactory for human consumption due to the presence of total coliforms and/or *Escherichia coli*.

#### Keywords

antimicrobials, biofilms, *Cronobacter*, natural mineral water, water quality.

#### Correspondence

Marcelo Luiz Lima Brandão, Laboratory of Microbiology Control, Bio-Manguinhos/Fiocruz, CEP:21040-900, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.  
E-mail: marcelolb@gmail.com

2019/0829: received 9 August 2019, revised 14 October 2019 and accepted 15 October 2019

doi:10.1111/lam.13235

#### Abstract

*Cronobacter* infections of infants are commonly regarded as due to the ingestion of contaminated feed. The aim of this study was to determine the occurrence of *Cronobacter*, total coliforms and *Escherichia coli* in different brands of natural mineral waters as sold in 20 l returnable bottles in Rio de Janeiro, Brazil. The quantification of total coliforms and *E. coli* was performed by Most Probable Number. The detection of *Cronobacter* was as according to the ISO 22964:2017 and *Bacteriological Analytical Manual/FDA*. Molecular characterization of *Cronobacter* isolates was performed by real-time PCR and by multi-locus sequence typing. The antibiotic susceptibility profile was determined and biofilm production was evaluated in polystyrene microplates. Total coliforms and *E. coli* were detected in 13 (39.4%) and 2 (6.1%) of the 33 lots analysed respectively, and were considered unsatisfactory for human consumption according to Brazilian law. One (3.0%) lot showed contamination by *C. malonaticus* ST440 (*Cronobacter* MLST Databases accession no. ID 2646). The strain was susceptible to all ( $n = 13$ ) antibiotics tested and only formed a weak biofilm. Since there is a high consumption of natural mineral waters by elderly and immunosuppressed persons, epidemiological surveillance agencies should be aware of the risk that these waters may represent for these groups.

#### Introduction

The *Cronobacter* genus belongs to the family Enterobacteriaceae and is composed of seven species. These species can be grouped according to their clinical relevance: Group 1 comprises *C. sakazakii* and *C. malonaticus*, which form the majority of clinical isolates in all age groups, and Group 2 comprises *C. turicensis* and *C. universalis*, which have been rarely reported clinically. The remaining three species (*C. dublinensis*, *C. muytjensii* and

*C. condimenti*) are primarily environmental commensals and are probably of little or no clinical significance (Forsythe, 2018).

The main concern of *Cronobacter* has been life-threatening infection of neonates (FAO/WHO, 2006). Such infections may cause bacteraemia and necrotizing enterocolitis, and meningitis with life-threatening neurological sequelae (Forsythe, 2018). However *Cronobacter* infections occur in all age groups, with a greater incidence in adults (Patrick *et al.* 2014). In adults, *Cronobacter* have been associated

with bacteraemia, cholecystitis, pneumonia and urinary tract infections (Patrick *et al.* 2014). Recently, an outbreak of acute gastroenteritis due to *C. sakazakii* amongst students was reported in China (Yong *et al.* 2018).

In Brazil, *Cronobacter* infections are not subject to compulsory notification to the governmental epidemiological surveillance system. However, food-borne outbreaks are considered a "public health event" and their notification is compulsory (Brasil, 2016). No *Cronobacter* food-borne outbreaks had been reported in Brazil before 2017. However, some non-attributable clinical cases of infections were published between 1997 and 2017, with a higher occurrence in neonates (Umeda *et al.* 2017; Chaves *et al.* 2018).

The main source of *Cronobacter* infections of neonates has been identified as contaminated reconstituted powdered infant formula (PIF) (FAO/WHO, 2006). This may be intrinsically contaminated during manufacture, or extrinsically contaminated during reconstitution. *Cronobacter* isolated from water sold for the reconstitution of PIF was indistinguishable from the cerebrospinal fluid isolate from a case of neonatal *Cronobacter* meningitis (Hariri *et al.* 2013). In addition, cases of infections in neonates fed exclusively with breast milk have been reported. Together these demonstrate that sources of *Cronobacter* infection exist other than PIF which has received the most attention (Bowen *et al.* 2017).

The source(s) of *Cronobacter* infections in age groups other than infants is unknown, but may include food and water as the organism is both food- and water-borne (Forsythe, 2018). *Cronobacter* can be isolated from a wide range of food sources, especially vegetables and seasonings. However, few studies have considered its occurrence in drinking water (Lu *et al.* 2013; Hariri *et al.* 2013).

*Cronobacter* has been isolated from different categories of retail foods in Brazil (Brandao *et al.* 2017; Vasconcellos *et al.* 2018), but no research has been undertaken on drinking water. Ayaz *et al.* (2017) evaluated the cleaning practices and contamination status of contents and teats of feeding bottles used by children admitted in a hospitals in Pakistan and observed that 5-6% of the mothers/caretakers use natural mineral waters to prepare feeding bottle for children. It is notable therefore that previously studies in Brazil reported that 50-72% of samples of natural mineral waters sold in 20 l bottles were unsatisfactory for human consumption due to microbiological contamination, including the presence of indicators for faecal contamination (Brandao *et al.* 2012; Pedrosa *et al.* 2014).

According to Brazilian Ministry of Health data from 2000 to 2017, drinking water was implicated as contamination vehicle in 770 (6-16%) outbreaks from a total of 12 503; and *E. coli* was one of the most frequent aetiological agent identified (Brasil, 2018).

Given that *Cronobacter* can cause infections in adults, the microbiological evaluation of drinking water is important as it is a potential route for colonization and transmission (Liu *et al.* 2013). Due to the high consumption of natural mineral waters sold in 20 l returnable bottles by the adult population and previous studies have reported their contamination by bacterial indicators of faecal contamination (Brandao *et al.* 2012; Pedrosa *et al.* 2014), monitoring the quality of these products is very important.

Considering the absence of data for the occurrence of *Cronobacter* in natural mineral waters, the current study aimed to determine the occurrence of *Cronobacter* species, as well as total coliforms and *Escherichia coli* from these products, and to characterize any *Cronobacter* isolates using both phenotypic and molecular assays.

## Results and discussion

Total coliforms and *E. coli* were detected in 16 (16-2%) and 2 (2-0%) of the 99 individual samples analysed respectively (Table 1). These 16 (16-2%) individual samples are considered unsatisfactory for human consumption according to the Brazilian RDC no. 275/2005 which requires the absence of total coliforms and *E. coli* per 100 ml drinking natural mineral water (Brasil, 2005). Furthermore, considering each representative sample, from the 33 lots analysed, 13 (39-4%) lots were considered unsatisfactory according to Brazilian law (Table 2). The number of unsatisfactory lots (39-4%) was much higher when the samples were evaluated individually (16-2%). These results emphasize the importance of collecting multiple samples from the same lot for analysis, since the contamination is not homogeneous. This can be attributed to the use of different returnable 20 l bottles in the same lot of natural mineral water, or intermittent contamination, such as during packaging, sealing or other points in the production line (Brandao *et al.* 2012; Pedrosa *et al.* 2014). Coliforms can originate from unhygienic practices or from the environment, and *E. coli* is considered one of the most suitable indicators of faecal contamination (Codex Alimentarius Commission 2011). Coliforms which can occur naturally in soil, water and vegetation, indicate possible contamination from airborne sources or from product contact surfaces that have not been effectively disinfected (Codex Alimentarius Commission 2011). As coliforms are normally not present in natural mineral water sources, their presence are considered as an indicator of contamination of the water at source or during the packaging process (Codex Alimentarius Commission 2011).

Of the 15 brands analysed, nine (60-0%) gave an unsatisfactory result for at least one of the lots analysed.



**Table 1** Detection of coliforms, *Escherichia coli* and *Cronobacter* in samples of commercially available drinking waters

Sample identifier	No. samples (%)	Microorganism		
		Total coliforms (MPN per 100 ml)	<i>Escherichia coli</i> (MPN per 100 ml)	<i>Cronobacter</i> (per 100 ml)
A-1-1, A-1-2, A-1-3, A-2-1, A-2-2, A-2-3, A-3-1, A-3-2, A-3-3, B-1-1, B-1-2, B-1-3, B-2-1, B-2-2, B-2-3, B-3-1, B-3-2, B-3-3, C-1-1, C-1-2, C-2-1, C-2-2, C-2-3, D-1-2, D-2-2, D-3-3, E-1-1, E-1-2, E-1-3, E-2-1, E-2-2, E-2-3, E-3-1, E-3-2, E-3-3, F-1-1, F-1-2, F-1-3, G-1-1, G-1-2, G-1-3, H-1-2, H-1-3, I-1-1, I-1-2, I-1-3, I-2-1, I-2-2, J-1-1, J-1-2, J-1-3, J-2-1, J-2-2, J-3-1, J-3-2, K-1-1, K-1-2, L-1-1, L-1-2, L-1-3, M-1-1, M-1-3, M-2-1, M-2-2, M-3-1, M-3-2, M-3-3, N-1-1, N-1-2, N-2-1, N-2-2, N-2-3, N-3-1, N-3-2, N-3-3, O-1-1, O-1-2, O-2-1, O-2-2, O-2-3, O-3-1, O-3-2, O-3-3	83 (83.8)	<1.1	<1.1	Absent
C-1-3	1 (1.0)	2.2	<1.1	Absent
D-1-1	1 (1.0)	>23	>23	Absent
D-1-3	1 (1.0)	16	12	Absent
D-2-1, D-2-3, H-1-1, I-2-3, J-3-3, K-1-3, M-1-2	7 (7.1)	1.1	<1.1	Absent
D-3-1, D-3-2, J-2-3, N-1-3, O-1-3	5 (5.1)	>23	<1.1	Absent
M-2-3	1 (1.0)	>23	<1.1	Present
Total (n = 99)		16 (16.2%)	2 (2.0%)	1 (1.0%)

These results were similar of those reported by Pedrosa *et al.* (2014) who analysed 33 brands and observed that 57.6% gave unsatisfactory results. These results indicate that these products continue to represent risk for human consumption and agrees with earlier Brazilian Ministry of Health data (Brasil 2018). According to Pedrosa *et al.* (2014), the water marketed in returnable bottles should be more closely controlled, especially in terms of its microbiological characteristics. Studies performed in water marketed in not returnable bottles in others countries revealed low occurrence or absence of bacterial contamination (Caskey *et al.* 2018; Totaro *et al.* 2018).

Only the sample M-2-3 showed contamination by *C. malonicus*. This sample had a high presence of total coliforms but *E. coli* was not detected (Table 1). As *Cronobacter* belongs to total coliforms group, positive detection by the total coliforms procedure was expected. However, this group is environmentally very heterogeneous and not necessarily faecal, and therefore gives no indication of the source of contamination (Forsythe, 2018). Liu *et al.* (2013) reported that total coliforms can be used as indicator of *Cronobacter* contamination in drinking water, with a correct positive rate of 96%. However due to the single occurrence of *Cronobacter* in the 99 samples analysed, no statistical correlation between the presence of fecal indicators and *Cronobacter* can be made. In addition, neither *Cronobacter*, total coliforms nor *E. coli* were recovered from samples M-2-1 and M-2-2 which were from the same lot as sample M-2-3, indicating that the contamination was not

homogeneous. Other authors have reported a higher occurrence of *Cronobacter* in water samples for human consumption (Liu *et al.* 2013; Fei *et al.* 2018) but no research specifically on mineral waters could be found in the literature. Liu *et al.* (2013) analysed 248 samples of drinking water from municipal water supply on premises and small community water supply for premises in China and detected *Cronobacter* in 32 (12.9%) of them. Fei *et al.* (2018) isolated *Cronobacter* from nine (9.0%) of 100 samples of drinking water. In the present study, *Cronobacter* was isolated in one (3.0%) of the 33 lots analysed. The lower occurrence obtained in the present study can be attributed to the type of water analysed, and the differences in the methodologies used, since there is no reference method for screening *Cronobacter* species in drink water samples. Liu *et al.* (2013) used a membrane filter method combining a pre-incubation of the filter membranes on TSA before incubation on Drug-gan-Forsythe-Iversen (DFI) agar. Fei *et al.* (2018) performed a pre-enrichment in BPW followed by a selective enrichment into modified lauryl sulphate tryptose broth with vancomycin, a medium which is no longer recommended by the ISO standard methodology (Anonymous, 2017). In the present study, the BPW pre-enrichment was concentrated by centrifugation as described by Chen *et al.* (2012) before the selective enrichment into CSB/v and isolation on CCI agar.

The results of the real time PCR assay (Ct = 25.3) agreed with the results of the Vitek 2.0 (Identification as "C.sak group Bionumber 0625734153622210) and MLST identified the isolate as *C. malonicus* ST 440

**Table 2** Occurrence of total coliforms, *Escherichia coli* and *Cronobacter* species in different brands of drinking waters and their evaluation according to Brazilian law (RDC no. 275/2005)

Sample identifier	Samples that did not meet the RDC no. 275/2005 (Micro-organisms found)
A-1-1, A-1-2, A-1-3	0
A-2-1, A-2-2, A-2-3	0
A-3-1, A-3-2, A-3-3	0
B-1-1, B-1-2, B-1-3	0
B-2-1, B-2-2, B-2-3	0
B-3-1, B-3-2, B-3-3	0
C-1-1, C-1-2, C-1-3	C-1-3 (total coliforms)
C-2-1, C-2-2, C-2-3	0
D-1-1, D-1-2, D-1-3	D-1-1 and D-1-3 (total coliforms and <i>E. coli</i> )
D-2-1, D-2-2, D-2-3	D-2-1 and D-2-3 (total coliforms)
D-3-1, D-3-2, D-3-3	D-3-1 and D-3-2 (total coliforms)
E-1-1, E-1-2, E-1-3	0
E-2-1, E-2-2, E-2-3	0
E-3-1, E-3-2, E-3-3	0
F-1-1, F-1-2, F-1-3	0
G-1-1, G-1-2, G-1-3	0
H-1-1, H-1-2, H-1-3	H-1-1 (total coliforms)
I-1-1, I-1-2, I-1-3	0
I-2-1, I-2-2, I-2-3	I-2-3 (total coliforms)
J-1-1, J-1-2, J-1-3	0
J-2-1, J-2-2, J-2-3	J-2-3 (total coliforms)
J-3-1, J-3-2, J-3-3	J-3-3 (total coliforms)
K-1-1, K-1-2, K-1-3	K-1-3 (total coliforms)
L-1-1, L-1-2, L-1-3	0
M-1-1, M-1-2, M-1-3	M-1-2 (total coliforms)
M-2-1, M-2-2, M-2-3	M-2-3 (total coliforms)*
M-3-1, M-3-2, M-3-3	0
N-1-1, N-1-2, N-1-3	N-1-3 (total coliforms)
N-2-1, N-2-2, N-2-3	0
N-3-1, N-3-2, N-3-3	0
O-1-1, O-1-2, O-1-3	O-1-3 (total coliforms)
O-2-1, O-2-2, O-2-3	0
O-3-1, O-3-2, O-3-3	0
Total of brands (n = 15)/Total of lots (n = 33)	Total of unsatisfactory lots (%) n = 13 (39.4%)

\*Sample was contaminated by *Cronobacter malonaticus* ST440.

(*Cronobacter* MLST Databases accession no. ID 2646). The species *C. malonaticus* is more prevalent in adult infections (Forsythe, 2018) although it has also been associated with serious neonatal infections (Hariri et al. 2013; Umeda et al. 2017). In Brazil, *C. malonaticus* ST440 strains have already been isolated from two cases of infections in neonates (Umeda et al. 2017). The isolation of *C. malonaticus* strains in sequence types ST7, 159, 160, 169,

172 and 408 from drinking water have already been reported in China (Liu et al. 2013; Fei et al. 2018). Fei et al. (2018) also reported the isolation of *C. sakazakii* ST 4 strains, a clonal lineage associated with neonatal meningitis (Joseph and Forsythe 2011). Additionally, Hariri et al. (2013) reported the isolation of *C. sakazakii* ST111 from water sold for PIF reconstitution which had been used to feed a neonate who had *C. sakazakii* meningitis. These findings highlight the potential health hazard from *Cronobacter* strains in water.

The use of hot water at a temperature of 70°C in the dilution of PIF is recommend in order to prevent the *Cronobacter* contamination and growth (FAO/WHO, 2006). However, some parents believe that mineral waters are safe products and did not follow this recommendation (Ayaz et al. 2017). Hence, despite the low occurrence of *Cronobacter*, as found in the present study, the use of these natural mineral waters without the correct thermal treatment to reconstitute PIF can represent a risk which should be minimized.

The *C. malonaticus* ST440 strain was susceptible to the 13 antibiotics tested. This result was similar to those obtained by other authors who reported that *Cronobacter* strains isolated from food and water samples were susceptible to almost all the antibiotics tested (Brandao et al. 2017; Fei et al. 2018; Vasconcellos et al. 2018).

Biofilms enable the survival and persistence of bacteria in different environments (Iversen and Forsythe 2004). As biofilm formation is associated with the contamination of natural mineral waters as sold in returnable 20 l bottles (Pedrosa et al. 2014), the capacity of biofilm formation by the *Cronobacter* isolate was evaluated. In this study, according to the parameters used, the *C. malonaticus* ST440 strain produced a weak biofilm on polystyrene plates. These results were similar to the reported by Umeda et al. (2017) that evaluated 10 *C. malonaticus* strains from six different ST, including two ST440 clinical isolates, and also observed that these strains only formed weak biofilms on polystyrene plates.

In conclusion, 13 lots (39.4%) of 20 l volumes of natural mineral water sold in markets in Rio de Janeiro State, Brazil, were unsatisfactory for human consumption due to the presence of total coliforms and/or *E. coli*. Since these natural mineral waters are commonly consumed by elderly and immunosuppressed persons, epidemiological surveillance agencies should be aware of the risk that these waters may represent for these groups. Of particular interest was the recovery of *C. malonaticus* ST 440. This pathovar is already associated with neonatal infections. Hence, the use of these waters to reconstitute PIF without an efficient thermic treatment can represent a risk to neonates and may also be a direct source of adult infections.

## Materials and methods

### Water samples

A total of 33 representative samples (three from each lot, totalizing 99 individual samples and 15 brands) of natural mineral waters, non-carbonated, sold in returnable 20 l bottles, were collected at gas stations and commercial establishments located in Rio de Janeiro State, Brazil, from October 2017 to August 2018. The samples were codified adding the letter of the brand, number of the lot and then the replicate of the lot (i.e.: A-1-1). The samples were transported individually to the laboratory and stored at ambient temperature until analysis.

The overall aim was to analyse three samples from three different lots of each brand of water, giving a total of nine samples per brand over an 11 months time period. However, over the collection period such sampling was not always possible due to limited sample availability. Consequently, the number of samples and lots for each brand varied. Nine samples were obtained for brands A, B, D, E, J, M, N and O, six samples from brands C and I, and three samples for brands F, G, H, K and L.

### Quantification of total coliforms and *E. coli*

The Most Probable Number (MPN) of total coliforms and *E. coli* analysis was performed on 100 ml water samples using COLITAG™ enzyme substrate (CPI International, California City, CA) according to manufacturer's instructions.

### Isolation of *Cronobacter* species

The isolation of *Cronobacter* was based in the procedures described by the ISO 22964:2017 (Anonymous 2017) and the *Bacteriological Analytical Manual* (Chen *et al.* 2012). *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS0033) were used as positive and negative controls respectively.

One hundred millilitres of water were added to 900 ml of buffered peptone water (BPW; Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C for 18 h. The enrichment was mixed and one aliquot of 40 ml was centrifuged at 3000g/10 min (Eppendorf 5810R, A-4-81, Germany). The supernatant was dispensed and the pellet was suspended in 0.2 ml of phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. A 0.1 ml aliquot was inoculated into 10 ml of *Cronobacter* Screening Broth supplemented with vancomycin 10 µg ml<sup>-1</sup> (CSB/v; Oxoid, CM1121, Basingstoke, Hampshire, England). The sample was incubated at 41.5°C for 24 h. The CSB/v enrichments were streaked (10 µl) onto the surface of the Chromogenic *Cronobacter* Isolation

Agar (CCI; Oxoid, CM1122, Basingstoke, Hampshire, UK) and the plates were incubated at 41.5°C for 24 h. Typical colonies isolated from CCI were then transferred to Trypticase Soy Agar (TSA; Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 36°C for 24 h. After incubation, the colonies were submitted for presumptive phenotypic identification by semi-automatized Vitek 2.0 system using GN TEST KIT VTK2 (GRAM NEG) (bioMérieux, Durham, NC) and real time PCR targeting the *dnaG* gene (Chen *et al.* 2012). The real time PCR reactions were carried out in a total volume of 25 µl containing 12.5 µl of TaqMan™ Universal Master Mix (Applied Biosystems®, California City, CA), 2.0 µl of DNA template (20–60 ng µl<sup>-1</sup>), 10.0 pmol of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 0.3 µmol l<sup>-1</sup> of the probe (Applied Biosystems®). Reactions were carried out on ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

### Multi-locus sequence typing (MLST) and sequence analysis

DNA samples of presumptive *Cronobacter* isolates were extracted from overnight cultures in BHI broth using Dneasy Blood & Tissue kit (Qiagen®, Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. The DNA concentration was measured using NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, California City, CA).

The MLST gene set was amplified using primers and PCR conditions according to protocol available at MLST *Cronobacter* database (<http://pubmlst.org/cronobacter/info/protocol.shtml>; Baldwin *et al.* 2009, last accessed date: 10/14/2019). The PCR reactions, amplification product purification and sequencing reactions were as described by Vasconcellos *et al.* (2018). The nucleotide sequences of each gene were trimmed to the appropriate length and then searched for in the MLST database. Finally, allele numbers were assigned and the sequence type (ST) were determined by tools available at MLST *Cronobacter* database (Cronobacter MLST Databases accession no. ID 2646).

### Phenotypic characterization of *Cronobacter* isolates

#### Antimicrobial susceptibility

The antimicrobial susceptibility profile of isolates was determined using the standardized Bauer-Kirby agar disc diffusion method using Mueller-Hinton agar (Oxoid, CM0337, Basingstoke, Hampshire, England) following the instructions of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). The following antimicrobials (BIO-RAD Laboratories Inc, Boulevard Raymond, France) were tested ( $n = 13$ ): ampicillin (10 µg), ampicillin-sulbactam

(10 : 10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (20:10 µg), ceftriaxone (30 µg), tetracycline (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), trimethoprim-sulfamethoxazol (1-25:23-75 µg), piperacillin-tazobactam(100/10 µg), meropenem (10 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), aztreonam (30 µg) and nitrofurantoin (300 µg). *E. coli* ATCC 25922 (INCQS0033) was used as the quality control organism.

#### Biofilm formation assay

The biofilm formation assay was performed in 96-well polystyrene plates on brain heart infusion broth (BHI; Merck, Darmstadt, Germany) and sterile natural mineral water (Nestlé, Brazil, autoclaved at 121°C/15 min) for 48 h in the temperatures of 25 and 36°C, according to the procedure described by Umeda *et al.* (2017).

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the PPVS in the Sanitary Surveillance of INCQS/Fiocruz. The authors are grateful to the sequencing core "Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ". This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. This publication made use of the Cronobacter multilocus sequence typing database site (<http://pubmlst.org/cronobacter/>), host by the University of Oxford.

#### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Anonymous. (2017) *EN ISO 22964:2017 Microbiology of the Food Chain - Horizontal Method for the Detection of Cronobacter spp.* Geneva: International Organization for Standardization.
- Ayaz, F., Ayaz, S.B., Furrakh, M. and Matee, S. (2017) Cleaning practices and contamination status of infant feeding bottle contents and teats in Rawalpindi, Pakistan. *Pak J Pathol* **28**, 13–20.
- Baldwin, A., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Kucerova, E., Manning, G., Dowson, C. and Forsythe, S. (2009) Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malomaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BMC Microbiol* **9**, 223.
- Bowen, A., Wiesenfeld, H.C., Kloesz, J.L., Pascalle, A.W., Nowalk, A.J., Brink, L., Elliot, E., Martin, H. *et al.* (2017) Notes from the field: *Cronobacter sakazakii* infection associated with feeding extrinsically contaminated expressed human milk to a premature infant - Pennsylvania, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly* **66**, 761–762.
- Brandao, M.L.L., Rosas, C.O., Medeiros, V.M., Warnken, M.B., Bricio, S.M.L., Silva, A.M.L. and Azeredo, D.R.P. (2012) Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural. *Rev Inst Adolfo Lutz* **71**, 32–39. English abstract included.
- Brandao, M.L.L., Umeda, N.S., Jackson, E., Forsythe, S.J. and de Filippis, I. (2017) Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. *Food Microbiol* **63**, 129–138.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada n.º 275, de 22 de setembro de 2005 (2005). Regulamento Técnico de Características Microbiológicas Para Água Mineral Natural e Água Natural. Diário Oficial da União. 23 de setembro de 2005.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n.º 204, de 17 de fevereiro de 2016 (2016) Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 18 de fevereiro de 2016.
- Brasil. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil (2018). Available at: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf> (last accessed date: 09.25.19).
- Caskey, S., Stirling, J., Moore, J.E. and Rendall, J.C. (2018) Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in waters: implications for patients with cystic fibrosis (CF). *Lett Appl Microbiol* **66**(6), 537–541.
- Chaves, C.E.V., Brandão, M.L.L., Lacerda, M.L.G.G., Rocha, C.A.B.C., Leone de Oliveira, S.M.D.V., Parpinelli, T.C., Vasconcelos, L., Forsythe, S.J. *et al.* (2018) Fatal *Cronobacter sakazakii* sequence type 494 meningitis in a Newborn, Brazil. *Emerg Infect Dis* **24**, 1948–1950.
- Chen, Y., Lampel, K. and Hammack, T. (2012) *Cronobacter*. In *Bacteriological analytical manual*. 8th ed. Revision A, 1998. United States: Food and Drug Administration. Chapter 29 Available at: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-cronobacter.htm> (last accessed date: 10 14 19).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018) Disk Diffusion. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th ed. PA, USA: CLSI Supplement M100.
- Codex Alimentarius Comission. (2011) *Code of Hygienic Practice for Collecting, Processing and Marketing of Natural Mineral Waters (CAC/RCP 33-1985, Rev. 1)*.
- Fei, P., Jiang, Y., Gong, S., Li, R., Jiang, Y., Yuan, X., Wang, Z., Kang, H. *et al.* (2018) Occurrence, genotyping, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in drinking water and food samples from Northeast China. *J Food Prot* **23**, 456–460.

- Food and Agricultural Organization-World Health Organization. (2006) *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. In *Microbiological risk assessment series 10*. Rome. Available at: <http://www.who.int/foodsafety/publications/mra10/en/> (last accessed date: 10.14.19).
- Forsythe, S.J. (2018) Updates on the *Cronobacter* Genus. *Annals Rev Food Sci and Technol* **9**, 23–44.
- Hariri, S., Joseph, S. and Forsythe, S.J. (2013) *Cronobacter sakazakii* ST4 strains and neonatal meningitis, United States. *Emerg Infect Dis* **19**(1), 175–177.
- Iversen, C. and Forsythe, S.J. (2004) Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol* **21**(6), 771–776.
- Joseph, S. and Forsythe, S.J. (2011) Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections. *Emerg Infect Dis* **17**(9), 1713–1715.
- Liu, H., Yang, Y., Cui, J., Liu, L., Liu, H., Hu, G., Shi, Y. and Li, J. (2013) Evaluation and implementation of a membrane filter method for *Cronobacter* detection in drinking water. *FEMS Microbiol Lett* **344**, 60–68.
- Patrick, M.E., Mahon, B.E., Greene, S.A., Rounds, J., Cronquist, A., Wymore, K., Boothe, E., Lathrop, S. *et al.* (2014) Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003–2009. *Emerg Infect Dis* **20**, 1520–1523.
- Pedrosa, A.P., Brandao, M.L.L., Medeiros, V.M., Rosas, C.O., Bricio, S.M.L. and Almeida, A.E.C.C. (2014) Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. *Rev Ambient Água* **9**, 313–324. English abstract included.
- Totaro, M., Casini, B., Valentini, P., Miccoli, M., Lopalco, P.L. and Baggiani, A. (2018) Assessing natural mineral water microbiology quality in the absence of cultivable pathogen bacteria. *J Water Health* **16**, 425–434.
- Umeda, N.S., de Filippis, L., Forsythe, S.J. and Brandao, M.L.L. (2017) Phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. strains isolated from foods and clinical specimens in Brazil. *Food Res Int* **102**, 61–67.
- Vasconcellos, L., Carvalho, C.T., Tavares, R.O., Medeiros, V.M., Rosas, C.O., Silva, J.N., Dos Reis Lopes, S.M., Forsythe, S.J. *et al.* (2018) Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. *Food Res Int* **107**, 353–359.
- Yong, W., Guo, B., Shi, X., Cheng, T., Chen, M., Jiang, X., Ye, Y., Wang, J. *et al.* (2018) An investigation of an acute gastroenteritis outbreak: *Cronobacter sakazakii*, a Potential cause of food-borne illness. *Front Microbiol* **9**, 2549.