

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

Gisele Olivieri Soares Meier

**PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Cronobacter* spp. EM
PRODUTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO INFANTIL E PERFIL
DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Rio de Janeiro

2016

Gisele Olivieri Soares Meier

**PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Cronobacter* spp.
EM PRODUTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO INFANTIL E
PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Tutora: Silvia Maria dos Reis Lopes

Preceptor: Marcelo Luiz Lima Brandão

Rio de Janeiro

2016

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

Meier, Gisele Olivieri Soares

Pesquisa e identificação de espécies de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil e perfil suscetibilidade a antimicrobianos / Gisele Olivieri Soares Meier – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

32 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Preceptor: Marcelo Luiz Lima Brandão. Tutor: Silvia Maria dos Reis Lopes

1. Cronobacter. 2. Contaminação de Alimentos. 3. Alimentos Infantis. 4. Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. 5. Vigilância Sanitária. I. Título

Gisele Olivieri Soares Meier

**PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Cronobacter* spp.
EM PRODUTOS DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO INFANTIL E
PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de conclusão do curso apresentado
ao programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo
Cruz como requisito para a obtenção do título
de Especialista em Vigilância Sanitária

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Luiz Lima Brandão (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Carmela Kasnowski (Doutora)
Universidade Federal Fluminense

Maria Helena Simões Vilas Bôas (Coordenadora da COREMU)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Silvia Maria dos Reis Lopes (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus que permitiu mais esta oportunidade de encarnar neste mundo.

Aos meus pais, pela dedicação e por acreditarem em mim.

Ao meu marido, que tanto me ajudou nestes dois anos de residência, e que sempre me apoia nos momentos mais difíceis das nossas vidas.

Aos meus irmãos, que são os melhores amigos, e suporte em todos os momentos.

Aos meus amigos de todos os lugares, desculpe pela minha ausência e obrigada imensamente por todas as risadas.

Ao Octavio Presgrave, Cristiane Caldeiras, Izabela Lopes, Ronald, Adgerson, Profeta, Edmilson por me receberem com tanto carinho no primeiro ano de residência no Laboratório de Pirogênio e irritação.

A Carla Rosas, nossa Chefe do Laboratório, por me aceitar neste último ano de residência.

A Silvia Maria Lopes, por ser minha Tutora de último ano de residência.

Ao Marcelo por toda sua paciência com minhas dificuldades, por ter compartilhado seus conhecimentos.

Em especial agradeço à central de esterilização, setor de produção de meio de cultura, e ao laboratório de Bactérias de referências, pela disponibilização do material.

A Cátia, Valéria, Débora, Carlinha, Malú e Máx por proporcionarem um ano incrível de muita amizade e conhecimento no laboratório de microbiologia de alimentos.

RESUMO

Cronobacter spp. emergiu como perigo microbiológico em fórmulas infantis desidratadas (FID) causando infecções severas em neonatos. Contudo, em muitos casos, os pacientes não ingeriram FID indicando que outros alimentos poderiam atuar como veículo do patógeno. Os objetivos deste estudo foram pesquisar *Cronobacter* spp. em alimentos infantis, identificar as espécies e avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das cepas isoladas. Foram analisadas 47 amostras de cereais pré-cozidos à base de grãos, amidos de milho e farinhas lácteas. A pesquisa foi realizada com pré-enriquecimento em água peptonada tamponada, enriquecimento seletivo no *Cronobacter Screening Broth*, isolamento no *Enterobacter sakazakii Isolation Agar* e identificação no Vitek 2.0. A identificação das espécies foi realizada por reação em cadeia da polimerase com alvo nos genes *rpoB* e *cgcA*. O antibiograma foi realizado pelo método de difusão em ágar (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. foi identificada em 11 amostras (23,4%); sendo oito cepas identificadas como *C. sakazakii* (72,7%), duas como *C. malonaticus* (18,2%) e uma como *C. dublinensis* (9,1%). Apenas uma cepa de *C. malonaticus* apresentou resistência intermediária à ciprofloxacina. Os resultados mostram que os produtos avaliados, destinados à alimentação infantil, podem apresentar risco caso ingeridos por pacientes pertencentes ao grupo de risco, como neonatos e idosos.

Palavras-chave. *Cronobacter* spp. alimentos infantis. Antibiograma. PCR.

ABSTRACT

Cronobacter spp. emerged as a microbiological hazard in powdered infant formulas (PIF) that cause severe infections in newborns. However, in many cases, the patients did not have ingested PIF indicating that other categories of foods can act as vehicle for the pathogen. The aims of this study were investigate *Cronobacter* spp. in infant foods, identify the species and evaluate the antimicrobial susceptibility profile of the isolates. Forty-seven samples of precooked cereals prepared with different grains, corn starch and milk flours were analyzed. The microbiological assay was performed with pre-enrichment in buffered peptone water, followed by selective-enrichment in Cronobacter Screening Broth, isolation in *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar and identification in Vitek 2.0. The identification of species was performed by polymerase chain reaction targeting *rpoB* and *cgaA* genes. The antibiogram was realized using the agar diffusion method (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. was identified in 11 samples (23.4%); eight strains were identified as *C. sakazakii* (72.7%), two as *C. malonaticus* (18.2%) and one as *C. dublinensis* (9.1%). Only one *C. malonaticus* strain presented intermediate resistance to ciprofloxacin. The results show that evaluated products, intended for infant feeding, may present risk if ingested by patients belonging to the risk group such as newborns and elderly.

Keywords: *Cronobacter* spp. infant foods. Antibiogram. PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores e condições de amplificação para pesquisa dos genes <i>rpoB</i> e <i>cgcA</i> de <i>Cronobacter</i> spp.....	18
Tabela 2. Ocorrência de <i>Cronobacter</i> spp. Em amostras destinadas à alimentação infantil.....	21
Tabela 3. Caracterização fenotípica e molecular dos isolados de <i>Cronobacter</i> spp.....	22

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AM	Amido de milho
AMC	Amoxicilina-Clavulanato
AR	Arroz
AV	Aveia
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIP	Ciprofloxacina
CRO	ceftriaxona
CSB/v	<i>Cronobacter screening broth</i> contendo vancomicina
EUA	Estados Unidos da América
ESIA	Enterobacter Sakazakii Isolation Agar
INCS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde
ISO	International Organization for Standardization
FAO/WHO	Food and Agricultural Organization/World Health Organization
FID	Fórmula infantil desidratada
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Farinha láctea
h	horas
MI	Milho
Min	Minutos
mL	Mililitro
ng	Nanogramas
M-PCR	Múltipla Reação em cadeia pela polimerase
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pmol	Pico-mol
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SAM	Ampicilina-Sulbactam
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazola
TE	Tetraciclina

TU	Cereais variados
UFC	Unidade formadora de colônia
V	Volts
°C	Graus centígrados
%	Porcentagem
μL	Microlitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pmol	Pico-mol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA	13
1.2 JUSTIFICATIVA	14
2 OBJETIVO GERAL	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 AMOSTRAS	16
3.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	16
3.2.1 Identificação das Espécies	17
3.2.2 Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	20
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Cronobacter spp. emergiu como perigo microbiológico em fórmulas infantis desidratadas (FID), causando infecções em crianças, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunodeficientes (FAO/WHO, 2008). As síndromes clínicas incluem enterocolite necrosante, bacteremia e meningite, com uma taxa de mortalidade variando de 10-41,9% e os sobreviventes podem apresentar sequelas graves (FRIEDMANN, 2009). O gênero *Cronobacter* pertence à família Enterobacteriaceae, apresentam-se como bastonetes gram-negativos, anaeróbios facultativos, possuem flagelo peritríquio, crescem em temperaturas de 6 a 45°C, porém apresentam temperatura ótima de crescimento de 37 a 44°C, toleram faixa de pH de 4,5 a 10 e têm crescimento em concentração de 7% NaCl. Geralmente são móveis, reduzem o nitrato, utilizam citrato, hidrolisam a esculina e arginina e são positivos no teste da descarboxilação da L-ornitina. Produzem ácidos através da sacarose e possuem atividade α -glicosidade, que é uma característica importante utilizada nos meios seletivos-indicadores (IVERSEN et al, 2008a). São compostos por sete espécies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter universalis* e *Cronobacter condimenti*, uma vez que foi aprovada a proposta de reclassificação taxonômica das espécies *Cronobacter helveticus*, *Cronobacter pulveris*, *Cronobacter zurichensis* em três espécies de dois novos gêneros: *Franconibacter helveticus*, *Franconibacter pulveris* e *Siccibacter turicensis*, respectivamente (STEPHAN et al, 2014; LPSN, 2015). Com exceção da espécie *C. condimenti*, todas as espécies já foram associadas a casos de infecções (JOSEPH et al, 2012).

A meningite bacteriana em neonatos necessita de tratamento rápido e eficiente, levando a uma preocupação quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos nas infecções por *Cronobacter* spp. A antibioticoterapia, utilizando as combinações ampicilina/gentamicina ou meropenem/amicacina, são exemplos de procedimentos empíricos adotados no tratamento inicial de suspeita de infecção por *Cronobacter* spp. Entretanto, alguns autores já relataram o isolamento de cepas de *Cronobacter* spp. resistentes a essas drogas (BROGE e LEE, 2013; LAI, K.K. et al, 2001; KIM et al, 2008). Cepas resistentes a outros antimicrobianos como cefalotina (ASATO et al, 2013), cefoxitina (KIM et al 2008), ceftazidima (BARREIRA et al, 2003), eritromicina (HOCHERL et al, 2012) e tetraciclina (HOCHERL et al, 2012; KILONZON-NTHENGE et al, 2012) também já foram identificadas. Estes dados demonstram que existe

variabilidade no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos entre as cepas de *Cronobacter* spp., demonstrando a importância de se conhecer este perfil de resistência, de forma a identificar as classes de antimicrobianos que apresentem ação rápida e eficiente no tratamento das infecções.

O leite humano é a melhor forma de nutrição para neonatos, porém existem casos em que ele pode ser insuficiente ou não estar disponível, e uma das opções para dieta é o uso de FID. Devido ao perigo da contaminação de FID por *Cronobacter* spp., a comissão do *Codex Alimentarius* revisou o código de práticas para produção de FID definindo critérios específicos para o controle de *Cronobacter* spp, em um plano de dupla classe, com um número de 30 amostras do mesmo lote (n=30), deverá ter ausência de *Cronobacter* spp em 10 gramas de amostras (CODEX ALIMENTARIUS, 2008). No Brasil, a Resolução de Diretoria Colegiada a RCD n.º 12 de 02/01/2001 que é a legislação que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos atualmente em vigor, não contempla o padrão de pesquisa de *Cronobacter* spp. em FID (BRASIL, 2001).

A Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) classificou *Cronobacter* spp. como: “micro-organismo de risco severo para populações restritas, que representam ameaça à vida ou desenvolvimento de sequelas crônicas ou de longa duração” (ICMSF, 2002). No entanto, hoje já existem relatos de infecções em crianças de maior idade e adultos (GOSNEY et al, 2006; PATRICK et al, 2014). Em um estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA), a incidência de casos de infecções por *Cronobacter* spp. foi estimada em 0,66 casos/100.000 habitantes, sendo crianças menores de cinco anos e idosos os mais afetados (PATRICK et al, 2014). O relato de casos de infecções nestes grupos sugere que existem potenciais fontes de contaminação por *Cronobacter* spp. nos alimentos ingeridos por estes indivíduos. Pacientes idosos, principalmente os que apresentam disfagia, ingerem alimentos semissólidos na sua dieta, como papas e mingaus de cereais (GOSNEY et al, 2006). Logo, a presença de *Cronobacter* spp. nestes tipos de alimentos pode representar um risco a estes indivíduos (FREITAS et al, 2011; HOCHERL et al, 2012; MOLLOY et al, 2009). Outro problema é o uso incorreto de cereais pré-cozidos, alimentos semissólidos e/ou mingaus na alimentação de crianças com idade inferior a recomendada pelo fabricante, uma vez que muitas famílias desconhecem os riscos do uso destes alimentos na idade inadequada, ou não adquirem FID devido ao alto custo do produto (BRASIL, 2014).

Surtos causados por *Cronobacter* spp. já foram reportados em diversos países, incluindo o Brasil (BARREIRA et al, 2003; BRANDAO et al, 2015). Contudo, em muitos

surtos o veículo de contaminação não pôde ser identificado e muitos pacientes não ingeriram FID, indicando que outras fontes poderiam ser o veículo de contaminação deste patógeno (TSAI et al, 2013). Diversos estudos detectaram *Cronobacter* spp. nos mais diversos tipos de alimentos, como temperos e condimentos, produtos desidratados, produtos lácteos, produtos cárneos e produtos destinados a alimentação infantil como cereais e amido de milho (HOCHTEL et al, 2012; LEE et al, 2012; MOLLOY et al, 2009; SINGH et al, 2015; XU et al, 2015). Os ingredientes derivados de vegetais que são adicionados às FID sem tratamento térmico prévio como flocos de banana, de laranja, lecitina e principalmente o amido de trigo e de arroz, têm sido apontados como uma rota potencial de contaminação (FAO/WHO, 2004, 2006; O'BRIEN et al, 2009).

O primeiro estudo relacionado à presença de *Cronobacter* spp. em fórmulas infantis associada com infecção seguida de desenvolvimento de enterocolite necrosante foi relatado por Van Acker e colaboradores (2001). Os autores descreveram um caso de surto de infecção por *Cronobacter* spp., classificada na época por *Enterobacter sakazakii*, em 12 crianças recém-nascidas de uma maternidade da Bélgica, sendo que duas foram a óbito. Este caso ficou conhecido como “Surto da Bélgica”.

Gillio (2006) citou haver um percentual considerável de subnotificações em função de muitos laboratórios não possuírem métodos adequados para identificação de *Cronobacter* spp. em sua rotina. O autor avaliou diversos trabalhos que relataram casos de infecção causados por *Cronobacter* spp. ao longo do mundo, sendo muitos relacionados à ingestão de FID. Foi observada uma taxa de mortalidade muito elevada, variando de 20 a 80%, em especial em crianças recém-nascidas, e com consequências bastante severas para os sobreviventes, incluindo sequelas neurológicas, como hidrocefalia, tetraplegia e retardo no desenvolvimento neurológico.

A *Food and Agricultural Organization* (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) elaboraram recomendações para que os países intensifiquem suas pesquisas sobre as fontes e veículos de infecção desse micro-organismo, sobretudo nas FID. A metodologia de pesquisa recomendada e publicada na *International Organization for Standardization* (ISO) é a ISO/TS 22964 (ISO, 2006), que regulamenta os ensaios para a detecção da *E. sakazakii* em amostras de fórmulas infantis, leite em pó e ambientes relacionados à fabricação destes produtos. Baseado nesta metodologia, alguns métodos para o isolamento vêm sendo desenvolvidos e aprimorados, devido à grande dificuldade de isolamento e identificação deste patógeno.

Em vista do reconhecimento da importância deste agente etiológico na saúde pública, e à carência de ações de prevenção deste patógeno no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), promoveu um workshop nacional sobre “*E. sakazakii* em fórmulas infantis” com o objetivo de discutir os avanços científicos sobre o controle da contaminação por esse patógeno em fórmulas lácteas e identificar estratégias para o controle da qualidade sanitária deste tipo de produto comercializado no país. Foi realizada uma Capacitação dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública na metodologia analítica para isolamento e contagem de *Cronobacter* spp.

1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A lei 8080/90, em seu artigo 6º, parágrafo 1º, define Vigilância Sanitária como sendo “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Este conjunto de ações é desenvolvido pelo Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), onde diversas etapas devem ser realizadas, indo desde a coleta das amostras até a ação de vigilância propriamente dita, passando pelas análises laboratoriais (BRASIL, 1990).

Competem aos laboratórios, em especial aos laboratórios oficiais da vigilância sanitária, três tipos de análises: análise prévia, é realizada antes do produto ganhar mercado determinando se o registro será ou não concedido; análise de controle, após a colocação do produto no mercado, para a verificação da conformidade do mesmo em relação aos dados apresentados por ocasião da solicitação do registro; e análise fiscal, em amostras de produto em caráter de rotina para apuração de infração ou verificação de ocorrência de desvio quanto à qualidade, segurança e eficácia dos produtos ou matéria-prima. Existe, também, a perícia de contraprova que é realizada em amostras de produtos sob regime de Vigilância Sanitária, quando ocorrer discordância do resultado condenatório de análise fiscal (RESOLUÇÃO ESTADUAL N 30 26 DE FEVEREIRO DE 1997, CURITIBA).

O INCQS trabalha analisando Produtos cosméticos, saneantes, alimentos, medicamentos, imunobiológicos, artigos e insumos de saúde. Devido ao uso de novas tecnologias de produção de alimentos, à introdução de novos hábitos alimentares na

população, ao surgimento de micro-organismos multirresistentes a drogas e à emergência de novos patógenos o INCQS exerce análises prévias, de controle, ou ação fiscal, com o intuito, de exercer a vigilância sanitária de alimentos e promover alimentos seguros à sociedade.

Essas questões constituem importante desafio no que se refere à saúde pública e têm recebido atenção especial dos profissionais que atuam nessa área. Neste sentido, o relatório da I Conferência Nacional de Vigilância Sanitária-CONAVISA (2001) recomenda o incentivo a pesquisas com o desenvolvimento e publicação de projetos e investigações que produzam conhecimento científico necessário ao desenvolvimento de ações efetivas de vigilância sanitária.

1.2 JUSTIFICATIVA

A Vigilância Sanitária visa à promoção, a proteção, a recuperação e a reabilitação da saúde. Para isso, ela atua sobre diversos fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, ambiente, transportes, cargas e pessoas.

Devido à indicação de que alimentos infantis diferentes de FID podem atuar como veículos de contaminação em casos de infecções por *Cronobacter* spp. e tendo em vista o risco que representa esse patógeno para crianças, particularmente neonatos ou imunodeficientes e o risco da presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos, a pesquisa de identificação das espécies de *Cronobacter* spp. em produtos destinados a alimentação infantil e a avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados, poderá gerar dados nacionais sobre a ocorrência desse patógeno nesse tipo de alimento que muitas vezes é oferecido a crianças com idade inferior a recomendada pelo fabricante. Os dados gerados poderão subsidiar a inclusão dessa bactéria em futura revisão da legislação de alimentos.

2 OBJETIVO GERAL

Pesquisar *Cronobacter* spp. em alimentos destinados a alimentação infantil, identificar as espécies e determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar *Cronobacter* spp. pela técnica de enriquecimento-seletivo em amostras de alimentos destinados a alimentação infantil;
- Identificar as espécies de *Cronobacter* spp. e comparar o uso de duas técnicas de Reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Cronobacter* spp. frente aos principais antimicrobianos de escolha no tratamento de enfermidades causadas por enterobactérias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

No período de março a maio de 2015 foram analisadas 47 amostras de alimentos industrializados destinados à alimentação infantil de 12 marcas distintas. As amostras foram adquiridas de forma aleatória e em diferentes estabelecimentos comerciais (supermercados, drogarias, entre outros) localizados nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói do Estado do Rio de Janeiro. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio durante o período das análises. Deste total, 16 amostras eram à base de cereais variados (TU1-16), 11 de cereais à base de arroz (AR1-11), nove de cereais à base de milho (MI1-9), duas de cereais à base de aveia (AV1-2), quatro de farinhas lácteas (FL1-4) e cinco misturas para preparo de mingaus à base de amido de milho (AM1-5). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e enviadas para o laboratório para análise. As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

3.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A pesquisa de *Cronobacter* spp foi realizada de acordo com Iversen et al. (2008b). Vinte e cinco gramas da amostra foram pesados em um saco plástico *Whirl-Pak* (Nasco, EUA) seguido da adição de 225 mL de água peptonada tamponada (Merck, Alemanha) e homogeneizado em aparelho *Stomacher* durante 60 segundos. O homogenato, pré-enriquecimento, foi incubado a 35°C/24h. Após, uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada à 10 mL de *Cronobacter Screening Broth* contendo vancomicina (CSB/v; Oxoid, Inglaterra) e este foi incubado a 42°C/24-48 h, finalizando o enriquecimento seletivo. Posteriormente, as amostras em que a sacarose foi consumida pelo micro-organismo, gerando a modificação pelo indicador de pH que alterou a coloração das amostras do CSB/v de roxo para amarelo, foram submetidas a etapa de isolamento. Uma alçada da do crescimento no CSB/v com coloração alterada para amarelo foi semeada, pela técnica de esgotamento, na superfície do meio

Enterobacter sakazakii Isolation agar (ESIA; AES-Chemunex, França), e incubada a 44°C/24h. Após o período de incubação, das placas que apresentaram colônias características de *Cronobacter* spp. (colônias esverdeadas com bordas brancas devido ao uso da enzima α -glicosidase no meio ESIA) foi selecionada uma colônia característica de cada placa e estas foram semeadas em ágar nutriente (BD, EUA), incubadas a 35°C/24 h e, posteriormente, submetidas à confirmação no sistema Vitek 2.0 (bioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.1 Identificação das Espécies

Para a identificação das espécies de *Cronobacter* foram utilizados dois protocolos da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo um com alvo no gene *rpoB*, que codifica a subunidade B da polimerase ribossomal, e outro *Multiplex* (M-PCR) com alvo no gene *cgcA*, que codifica a diguanilato ciclase, conforme descrito na Tabela 1.

A extração do DNA foi realizada com o kit *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi dosada em espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA). As reações foram preparadas em um volume total de 25 μ L contendo: 5,0 μ L de DNA molde (20-60 ng/ μ l), 5,0 pmol de cada iniciador e *PCR Master Mix* 1X (ThermoScientific, EUA). A amplificação foi realizada no *SimpliAmp Thermal Cycler* (AppliedBiosystems, Singapore).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 100 V/50min. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/mL (Sigma, EUA) por 15 min e visualizado em analisador de imagens (GE-Healthcare, Inglaterra).

Tabela 1. Iniciadores e condições de amplificação para pesquisa dos genes *rpoB* e *cgA* nas cepas de *Cronobacter* spp

Gene alvo	Micro-organismo alvo	Iniciadores	Condições de amplificação	Tamanho (pb)	Referência
<i>rpoB</i>	<i>C. sakazakii</i> e <i>C. malonaticus</i>	Csakf: ACGCCAAGCCTATCTCCGCG	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 67°C-	514	STOOP et al. (2008)
		Csakr: ACGGTTGGCGTCATCGTG	30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min		
	<i>C. malonaticus</i>	Cmalf: CGTCGTATCTCTGCTCTC	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 60°C-	251	
		Cmalr: AGGTTGGTGTTCGCCTGA	30 s, 72°C-30 s); 72°C-5 min		
	<i>C. turicensis</i>	Cturf: CGGTAAGAGTTCTTCGGC	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 61°C-	628	
		Cturr: GTACCGCCACGTTTCGCC	30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min		
	<i>C. dublinensis</i>	Cdublf: GCACAAGCGTCGTATCTCC	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 62°C-	418	
		Cdublr: TTGGCGTCATCGTGTTCC	30 s, 72°C-30 s); 72°C-5 min		
	<i>C. muytjensii</i>	Cmuyf: TGTCCGTGTATGCGCAGACC	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min, 61°C-	289	
		Cmuyr: TGTTCGCACCCATCAATGCG	30 s, 72°C-30 s); 72°C-5 min		
<i>C. universalis</i>	Cgenomf: ACAAACGTCGTATCTCTGCG	94°C-5 min; 30x(94°C-1 min,	506		
	Cgenomr: AGCACGTTCCATAACCGGTC	61°C-30 s, 72°C-30 s); 72°C-5 min			
<i>C. condiment</i>	Ccon-f: AACGCCAAGCCAATCTCG	95°C-2 min; 30x(95°C-1 min,	689	LEHNER et al (2012)	
	Ccon-r: GTACCGCCACGTTTTGCT	58°C-30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min			
<i>cgA</i>	<i>C. dublinensis</i>	Cdub-40F: GATACCTCTCTGGGCCGAGC Cdm-469R ^a : CCACATGGCCGATATGCACGCC	94°C-3 min; 25x(94°C-30 s, 58°C- 30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min	430	CARTER et al (2013)

<i>C. muytjensii</i>	Cmuy-209F: TTCTTCAGGCGGAGCTGACCT	260
<i>C. turicensis</i>	Cmstu-825F ^b : GGTGGCSGGGTATGACAAAGAC Ctur-1036R: TCGCCATCGAGTGCAGCGTAT	211
<i>C. universalis</i>	Cuni-1133R: GAAACAGGCTGTCCGGTCACG	308
<i>C. sakazakii</i>	Csak-1317R: GGCGGACGAAGCCTCAGAGAGT	492
<i>C. malonaticus</i>	Cmal- 1410R:GGTGACCACACCTTCAGGCAGA	585

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

3.2.2 Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

As cepas identificadas como *Cronobacter* spp. neste estudo foram avaliadas quanto ao seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão (Kirby-Bauer) em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, CM0337, Inglaterra), utilizando a escala de 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ /mL) para o preparo do inóculo inicial, e seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Foram testados os antimicrobianos (produzidos por BIO-RAD Laboratories Inc, França) recomendados para avaliação de cepas da família *Enterobacteriaceae* listados a seguir nas seguintes concentrações: ampicilina-sulbactam (SAM; 10/10 µg), amoxicilina-clavulanato (AMC; 20/10 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg) e trimetoprim-sulfametoxazola (SXT; 1,25/23,75 µg). Após a incubação das placas a 35°C/24 h, foi mensurado o valor do diâmetro da zona de inibição de cada antimicrobiano e as cepas classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes de acordo com as recomendações do CLSI (2015).

4 RESULTADOS

Das 47 amostras analisadas foi detectada a presença de *Cronobacter* spp. em 11 (23,4%). A maior ocorrência foi observada em amostras à base de aveia (100,0%) e arroz (54,5%), seguido das amostras de farinha láctea (25,0%) e de cereal à base de milho (11,1%). A amostra TU1 foi a única à base de cereais variados contaminada, sendo esta à base de aveia e arroz. Nenhuma amostra de mistura à base de amido de milho apresentou contaminação (Tabela 2).

Tabela 2. Ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras de produtos destinados à alimentação infantil

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

a-n.º de amostras em que houve viragem da coloração do meio para amarelo/n.º total de amostras analisadas; b-n.º de amostras que apresentaram colônias características/n.º amostras semeadas; c-n.º de amostras confirmadas como *Cronobacter* spp./n.º amostras testadas; d-não realizado.

Dos 11 isolados de *Cronobacter* spp. oito (72,7%) foram identificados como *C. sakazakii*, dois (18,2%) como *C. malonaticus* e um (9,1%) como *C. dublinensis*. Os isolados apresentaram nove fenótipos distintos baseados no perfil do Vitek 2.0 (Tabela 3). Ambos os protocolos da PCR apresentaram o mesmo resultado para identificação das espécies de *Cronobacter*.

Na avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, das onze cepas isoladas 10 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Somente a cepa de *C. malonaticus* C173, isolada de amostra à base de farinha láctea (FL02) apresentou resistência intermediária a CIP.

Tabela 3. Caracterização fenotípica e molecular dos isolados de *Cronobacter* spp.

Amostra	Identificação do isolado	Perfil Vitek 2.0		Caracterização molecular	
		Bionúmero	Fenótipo	PCR <i>rpoB</i>	M-PCR <i>cgcA</i>
TU1	C163	0625734151622010	A	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR3	C167	0625734151722010	B	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR4	C168	0607737151720010	C	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR7	C171	0625734151622010	A	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR8	C174	0607736151720011	D	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR9	C175	0625734353722010	E	<i>C. dublinensis</i>	<i>C. dublinensis</i>
AR11	C176	0621736051222010	F	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AV1	C165	0621736053222010	G	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AV2	C177	0627734053622010	H	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. malonaticus</i>
MI5	C169	0625736153222011	I	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
FL2	C173	0607737151720010	C	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. malonaticus</i>

5 DISCUSSÃO

No isolamento de *Cronobacter* spp, o enriquecimento seletivo com caldo CSB/v permite a decisão de liberar amostras não contaminadas após 48 h (IVERSEN et al, 2008b). Neste estudo, 17 amostras não apresentaram viragem da coloração do meio, não sendo necessária a realização da etapa de isolamento. Após a semeadura das amostras positivas no ESIA, foram observadas colônias verdes com borda branca, características em 12 amostras e 11 foram confirmadas como *Cronobacter* spp. pelo Vitek 2.0. A cepa não confirmada foi isolada da amostra AR6 e identificada como *Enterobacter aerogenes* Bionúmero 0607736151720011. O isolamento de outras enterobactérias que também apresentam atividade α -glicosidase já foi relatado, o que demonstra a importância do uso de técnicas confiáveis para identificação de *Cronobacter* spp. após o isolamento nos meios cromogênicos (WARNKEN et al, 2012).

Cronobacter spp. foi isolada de outras amostras de cereais à base de aveia, arroz, milho e em farinha láctea. O isolamento desta bactéria nestes tipos de alimentos já foi reportado anteriormente, com uma ocorrência variando de 11,2 a 45,0% (FREITAS et al, 2011; HOCHERL et al, 2012; SINGH; GOEL; RAGHAV, 2015). Estes resultados foram similares ao observado no presente estudo, uma vez que *Cronobacter* spp. foi detectada em 23,4% das amostras. No Brasil, Freitas et al. (2011) isolaram *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos infantis a base de farinha de milho, mas, em contraste, não detectaram em amostras à base de arroz e aveia.

As instruções nos rótulos das amostras AR3, AR4, AR8, AR9, AR11, MI5, TU1, AV1 e AV2, que apresentaram contaminação por *Cronobacter* spp., informam que estes alimentos são pré-cozidos e não necessitam de aquecimento antes do consumo, indicando o uso de leite ou água para sua reconstituição. De acordo com Richard et al. (2005), populações muito baixas de *Cronobacter* spp. podem se multiplicar rapidamente em cereais infantis à base de arroz reconstituídos com água ou leite. Desta forma, o risco aumenta se a mistura for preparada e mantida em temperatura ambiente por longos períodos. De acordo com a revisão na literatura realizada por Osaili e Forsythe (2009), bactérias do gênero *Cronobacter* quando presentes em produtos desidratados por longos períodos apresentam maior resistência a tratamentos com altas temperaturas. Contudo, os trabalhos levantados pelos autores mostram que *Cronobacter* spp. não sobrevive a tratamentos térmicos como 58°C por 32 segundos em

FID reconstituídas e artificialmente contaminadas. Estas características do micro-organismo sugerem que a contaminação nos produtos destinados a alimentação infantil analisados neste estudo possa ter ocorrido porque o binômio tempo/temperatura ou algum outro processo utilizado pelos produtores no pré-cozimento, não foi suficiente para eliminação do patógeno. Outra possibilidade é que a contaminação ocorra em etapas após este tratamento térmico, uma vez que *Cronobacter* spp. já foi isolada de amostras de superfícies de ambientes de fábrica e que pode formar biofilmes no maquinário de indústrias (JACOBS; BRAUN; HAMMER, 2011), indicando que o micro-organismo pode estar presente nestes ambientes.

A ingestão destes alimentos por indivíduos pertencentes ao grupo de risco (ex.: neonatos, filhos de mães portadoras de AIDS que recebem FID obrigatoriamente, lactantes com menos de seis meses e idosos) representa um perigo em potencial. Logo, os consumidores devem estar atentos aos rótulos dos produtos para ofertá-los às crianças apenas na idade recomendada. A aplicação de um tratamento térmico antes do consumo poderia ser uma alternativa para tentar eliminar a contaminação pelo patógeno nestes produtos. Além disso, em ambientes onde se preparam diferentes categorias de alimentos infantis, como aqueles que são ofertados para neonatos e lactantes com menos de seis meses, cuidados devem ser tomados para evitar contaminação cruzada.

Quanto à ocorrência das espécies de *Cronobacter*, os resultados obtidos foram similares aos de outros estudos, que também relataram a maior ocorrência da espécie *C. sakazakii* em produtos alimentícios e em outras fontes (SINGH; GOEL; RAGHAV, 2015; HOCHERL et al, 2012). Os isolados de *C. sakazakii* foram agrupados em sete fenótipos distintos (A, B, C, D, F, G e I), sendo as cepas C163 e C171 agrupadas no mesmo fenótipo. A cepa de *C. sakazakii* C168 apresentou o mesmo fenótipo da cepa C173 identificada como *C. malonaticus*. Este resultado não é incomum, pois estas duas espécies são muito próximas geneticamente e inicialmente foram descritas como pertencentes à mesma espécie (JOSEPH et al, 2012). O outro isolado de *C. malonaticus* C177 e o único isolado de *C. dublinensis* C175 apresentaram fenótipos únicos.

Em relação ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, os resultados foram similares aos relatados por outros autores, que também isolaram cepas de *Cronobacter* spp. de alimentos, sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados (LEE; PARK; CHANG H, 2012; MOLLOY et al, 2009; TERRAGNO et al, 2009; XU et al, 2015). O isolamento de cepas de *Cronobacter* spp. que apresentaram resistência ou resistência intermediária a determinados antimicrobianos como: tetraciclina (CHANG, 2012; HOCHERL et al, 2012; LEE; PARK,2012;), gentamicina (XU et al, 2015) e ampicilina (LEE; PARK; CHANG ,2012;), já

foi reportado em outros estudos. Os resultados do presente estudo sugerem que cepas de *Cronobacter* spp. isoladas de alimentos apresentam baixo potencial de resistência aos antimicrobianos.

6 CONCLUSÃO

Cronobacter spp. foi detectada em 11 (23,4%) dos 47 produtos destinados a alimentação infantil analisados, com maior ocorrência em produtos à base de aveia e arroz. Foram identificadas três espécies de *Cronobacter* spp., sendo a maioria das cepas pertencentes a espécie *C. sakazakii*. Não houve diferença entre as duas técnicas da PCR utilizadas neste estudo. Estes alimentos representam um risco caso sejam ingeridos por indivíduos pertencentes ao grupo de risco, como neonatos e lactantes com menos de seis meses e idosos. Uma única cepa de *C. malonaticus* apresentou resistência intermediária a CIP, sendo as demais cepas suscetíveis a todos antimicrobianos testados. No decorrer de uma investigação epidemiológica durante um surto causado por *Cronobacter* spp., estes tipos de alimentos devem ser considerados como uma fonte potencial de contaminação caso tenham sido ingeridos pelos indivíduos acometidos. Estudos futuros de análise de risco quanto à ingestão destes alimentos por indivíduos pertencentes ao grupo de risco devem ser considerados pelos os órgãos de Vigilância em Saúde.

REFERÊNCIAS

- ASATO, V.C. et al. First clinical isolates of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Argentina: Characterization and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. **Rev Argent Microbiol**, v.3, n.45, p.160-4, 2013.
- BARREIRA, E. R. et al. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatria** (São Paulo), v.1/2, n.25, p.65-70, 2003.
- 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**, RJ, v.3, n.3, p.91-6, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção1, p. 45.
- _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Edital de Chamamento n.º 2, de 29 de julho de 2014. Edital de Chamamento para coletar dados e informações a respeito do risco de infecções de lactantes maiores de seis meses por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), **Diário Oficial da União. Poder Executivo**, Brasília, DF, n.144, 30 jul. 2014. Seção 3:92-3.
- _____. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado, 1988. Disponível em: Acesso em 07 jan 2016.
- BROGE, T.; LEE, A. A Case of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) Bacteremia in a Breastfed Infant. **J Ped Infect Dis**, v.4, n.2, p.1-2, 2013.
- CARTER, L. et al. Multiplex PCR Assay Targeting a Diguanylate Cyclase-Encoding Gene, *cgcA*, To Differentiate Species within the Genus *Cronobacter*. **Appl Environ Microbiol.**, v.2, n.79, p.734-7, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty-Fifth Informational Supplement, Wayne, PA, USA, v.3, p.100-S15, 2015.
- CODEXALIMENTARIUSCOMMISSION. CODEX ALIMENTARIUS: **Code of hygienic Practice for Foods for Infants and Children**. CAC/RCP66, 2008.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA,1, Brasília, 2001. **Relatório Final**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002. 159p.

CURITIBA. RESOLUÇÃO ESTADUAL N.º 30, DE 26 DE FEVEREIRO DE 1997: Estabelece requisitos gerais para a operação do sistema de habilitação de Laboratórios de Controle da Qualidade em Saúde, com vistas a sua integração na Rede Estadual de Laboratórios de Saúde Pública. Curitiba: **Secretaria de Estado de Saúde**, 1997. 8 p. Disponível:<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao/estadual_resolucao/97rpr30.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2016.

FARBER, J. M. **Enterobacter sakazakii – new foods for thought?** The Lancet, v.363, p.5-6, 2004.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO **workshop on Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula**, Geneva, 2-5 February, 2004.Proceedings.Disponível em:. Acesso em: 22 ago. 2015.

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

FRIEDEMANN, M. Epidemiological of invasive *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.11, n.28, p.1297-304, 2009.

FREITAS, L. G. et al. Ocorrência de *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) em alimentos infantis adquiridos em um hospital público. **Rev Inst Adolfo Lutz**, RJ, v.4, n. 70, p.548-53, 2011.

GILLIO, C. de M. *Enterobacter sakazakii* em fórmulas lácteas infantis desidratadas,para bebês de 0-6meses. 2006. **Dissertação de Mestrado em Bromatologia**-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GOSNEY, M. A. et al. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. **Eur J Int Med.**, v.3, n.17, p.185-8, 2006.

GURTLER, J. B.; KORNACKI, J. L.; BEUCHAT, L. R. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.1-34, 2005.

HOCHÉL, I. et al. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. **J Appl Microbiol.**, n. 112, v, p.1257-65, 2012.

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

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

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**, Grã Bretanha, v. 1, n. 58, p.1442-1447, 2008a.

IVERSEN, C. et al. Development of a novel screening method for the isolation of "Cronobacter" spp. (*Enterobacter sakazakii*). **Appl Environ Microbiol.**, v.8, n.74, p.2550-3, 2008b.

JACOBS, C.; BRAUN, P.; HAMMER, P. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*spp.) in a milkpowder-producing plant. **J Dairy Sci.**, v.8, n.94, p.3801-9, 2011.

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

KILONZO-NTHENGE, A. et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Cronobacter sakazakii* Isolated from Domestic Kitchens in Middle Tennessee, United States. **J Food Prot.**, v. 8, n.75, p.1512-7, 2012.

KIM, J.B. et al. Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. **Yonsei Med J**, v.6, n.49, p.1017-22, 2008.

LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults: case reports and a review of the literature. **Medicine**, v.2, n.80, p.113-22, 2001.

LEE, Y.; PARK, J.; CHANG, H. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. **Food Control**, v.24, n.1-2, p.225-230, 2012.

LEHNER, A.; FRICKER-FEER, C.; STEPHAN, R. Identification of the recently described *Cronobacter condimenti* by an *rpoB*-gene-based PCR system. **J Med Microbiol.**, v.7, n.61, p.1034-5, 2012.

LPSN: **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature**. 1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em: 21 jan. 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. **Int J Food Microbiol**, v.136, n. 2, p.198-3, 2009.

OSAILI, T., FORSYTHE, S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. **Int J Food Microbiol.**, v.2, n.136, p.214-20, 2009.

O'BRIEN, S. et al. Prevalence of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in followon infant formulae and infant drinks. **Letters in Applied Microbiol**, v.48, p.536-541, 2009.

PATRICK, M.E. et al. Incidence of *Cronobacter* spp. Infections, United States, 2003-2009. **Emerg Infect Dis.**, v.9, n.20, p.1520-3, 2014.

RICHARDS, G.M.; GURTLER J.B; BEUCHAT L.R; Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. **J Food Prot**, v.99, n.4, p.844-50, 2005.

SINGH, N.;GOEL, G.; RAGHA,V. M. Prevalence and Characterization of *Cronobacter* spp. from Various Foods, Medicinal Plants, and Environmental Samples. **Curr Microbiol**, v. 1, n.71, p.31-8, 2015.

STEPHAN, R., et al. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v.10, n.64, p.3402-10, 2014.

STOOP, B. et al. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. **Int J Food Microbiol**, p.165-8, 2008.

TSAI, H. Y. et al. *Cronobacter* Infections Not from Infant Formula. **Emerg Infect Dis.**, Taiwan, v.1, n.19, p.167-9, 2013.

TERRAGNO, R. et al. Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in Argentina. **Int J Food Microbiol**, v.2, n.136, p.193-7, 2009.

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

VAN ACKER, J. et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter Sakazakii* in powdered milk formula. **J Clin Microbiol**, v.39, p.293-297, 2001.

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