

MÁRCIA BARBOSA WARNKEN

Cronobacter spp.: do isolamento à pesquisa de
marcadores de virulência

PPGVS/INCQS
FIOCRUZ
2010

Cronobacter spp.: do isolamento à pesquisa de
marcadores de virulência

MÁRCIA BARBOSA WARNKEN

Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras: Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira
Dra. Maria Teresa Destro

Rio de Janeiro

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: *Cronobacter* spp.: do isolamento à pesquisa de marcadores de virulência

Márcia Barbosa Warnken

Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovada:

_____ (UERJ)
Dra Ângela Corrêa de Freitas Almeida

_____ (INCQS/FIOCRUZ)
Dra Célia M. C. P. Araujo Romão

_____ (INCQS/FIOCRUZ)
Dra Paola Cardarelli Leite

_____ (INCQS/FIOCRUZ)
Orientadora: Dra Ana Cristina Martins Nogueira

_____ (FCF/USP)
Orientadora: Dra Maria Teresa Destro

Rio de Janeiro

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Warnken, Márcia Barbosa

Cronobacter spp.: do isolamento à pesquisa de marcadores de virulência. / Márcia Barbosa Warnken. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2010. xvii, 140p., il., tab., fig.

Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadoras: Ana Cristina Martins A. Nogueira e Maria Teresa Destro.

1. *Cronobacter* spp. 2. isolamento. 3. identificação. 4. caracterização fenotípica. 5. PCR. 6. marcadores de virulência. I. Título

Cronobacter spp.: from isolation towards the search for virulence markers.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e apoiaram as minhas decisões;

Ao Sergio, pelo companheirismo, carinho e compreensão;

Às minhas filhas Julia e Olivia pela confiança, apoio, afeto e compreensão durante a elaboração desse trabalho;

À Maria Teresa Destro, pela orientação, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis;

À Tininha, pela orientação desse trabalho e apoio junto ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária;

Aos amigos do Setor de Alimentos, Carla, Silvia, Marcelo e Valéria e pela paciência e compreensão em todos os momentos;

Ao Marcelo, pelo grande auxílio e incentivo durante a execução desse trabalho;

Às bolsistas do Setor de Alimentos, Clara, Samara, Mariana, Juliana e especialmente à Aline pela colaboração na realização desse trabalho;

À amiga Regina, pelo constante apoio, colaboração e paciência;

À amiga Paola, pela compreensão e apoio;

À amiga Célia, pela colaboração em diversos momentos;

Às amigas Angela, Ana Luiza e Mara Lúcia, da UERJ, pelo carinho e grande auxílio durante a realização desse trabalho;

Às colegas do Instituto Oswaldo Cruz, Marise, Dália e Eliane pelo incentivo e colaboração;

À Dra Carol Iversen, da *University College Dublin*, e Dr Franco Pagotto, do *Health Canada*, pela colaboração, crítica e revisão de parte desse trabalho;

Aos colegas do Setor de Bactérias de Referência, em especial ao Ivano pela colaboração nas questões de biologia molecular e coleção de bactérias e também à Kátia pelo pronto auxílio com relação às cepas de referência;

Ao Victor Marin pelo auxílio durante a elaboração dos protocolos de PCR;

Aos colegas do Departamento de Imunologia, Kátia, Cida e Humberto e em especial Anna Christina e a equipe do Setor de Cultura de Células, pela colaboração;

Aos colegas do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, em especial Otávio, Rosaura e Heloísa pela confiança e colaboração;

À equipe do SAL/INCQS pela colaboração na coordenação junto à CECAL/FIOCRUZ para o fornecimento de sangue das diferentes espécies de animais;

À Maria Luiza Werneck, pela amizade e correção das referências bibliográficas;

À equipe da Biblioteca do INCQS pelo pronto atendimento às solicitações de artigos científicos e à disponibilização de recursos durante a etapa de redação dessa tese.

Ao Sergio Alves da Silva no auxílio relativo às análises estatísticas;

Às colegas de turma de Doutorado 2006, Regina, Cláudia e Hilda pelos momentos de alegria e companheirismo;

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e do INCQS, em particular aos amigos Regina, Cláudia, Paola, Suely, Silvana, Lúcia, Célia, Esther, Eliana, Carmen, Sinéia, Cláudia, Filipe, Lúcia Helena, Bernardete, Cláudia, Solange e Sonia Dória pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis;

À atual e à ex-chefe do Departamento de Microbiologia, Dras. Suely Fracalanza e Célia Romão, pelo apoio constante;

Ao INCQS, representado pelo atual e ex-diretor, Drs. Eduardo Leal e André Gemal, pelo apoio na realização desse trabalho.

Aos meus pais, Frederico e Lydia
Ao Sergio
Às minhas filhas, Julia e Olivia

RESUMO

Cronobacter spp. (*Enterobacter sakazakii*) são patógenos emergentes associados a surtos de meningite, enterocolite necrosante e septicemia em neonatos em diversos países. A taxa de mortalidade relatada varia de 40 a 80% e os sobreviventes apresentam seqüelas neurológicas severas. O desenvolvimento da infecção está associado ao consumo de fórmulas infantis desidratadas. As metodologias atualmente disponíveis para o isolamento de *Cronobacter* spp. apresentam discrepâncias e a identificação bioquímica não é esclarecedora. Assim, torna-se necessário que metodologias confiáveis para o isolamento e identificação desses micro-organismos estejam disponíveis. Outro ponto ainda não esclarecido são os mecanismos de virulência utilizados por esses patógenos para o desenvolvimento de infecções em humanos. Os objetivos desse estudo foram o desenvolvimento de um método rápido e eficiente para a identificação de *Cronobacter* spp., a avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e a avaliação da presença de alguns fatores de virulência. Foram utilizadas inicialmente cepas de referência de *Cronobacter* spp e 37 isolados previamente identificados como pertencentes ao gênero. O novo protocolo foi considerado 100% sensível e específico quando comparado aos demais métodos utilizados, indicando sua utilidade. O estudo de fatores de virulência revelou que *Cronobacter* spp. tem desenvolvido resistência aos β -lactâmicos e cefalosporinas, é capaz de formar cápsula, biofilme, e apresentar atividade de protease e atividade hemolítica. Nesse estudo relata-se pela primeira vez a presença de hemaglutininas associadas a pili tipo 3, enquanto algumas cepas apresentaram hemaglutininas associadas a pili tipo 1. Também foi demonstrada a atividade citotóxica em células Vero e a capacidade de invasão dessas células por *Cronobacter* spp. Os resultados desse estudo sugerem que todas as espécies do gênero *Cronobacter* apresentam potencial patogênico e que autoridades de saúde pública, produtores de alimentos e pessoas responsáveis pelo cuidado de indivíduos que fazem parte dos grupos de risco devem dedicar especial atenção ao controle de ambientes e à qualidade microbiológica de produtos destinados a esses grupos de modo a minimizar o risco de infecção por esses micro-organismos.

ABSTRACT

Cronobacter spp. (*Enterobacter sakazakii*) is an emerging foodborne pathogen associated with outbreaks of meningitis, necrotizing enterocolitis and sepsis in neonates in different countries. The reported mortality rate ranges from 40 to 80% and the survivors present severe neurological sequela. Development of the infection is associated with the consumption of powdered infant formula. The available methodologies employed for the isolation of *Cronobacter* spp. lack the necessary specificity and the biochemical identification remains non-conclusive. For these reasons, it is necessary to develop reliable methodologies for the isolation and identification of these microorganisms. Another issue still to be clarified refers to the virulence mechanisms associated with human infections. The objectives of this study were to develop a rapid and efficient method to identify *Cronobacter*, to evaluate the antimicrobial resistance of the strains, and to evaluate the presence of some virulence factors. Initially, reference strains of *Cronobacter*, and 37 isolates that had been previously identified as members of the genus were used. The proposed protocol showed 100% sensitivity and specificity when compared to the other methods used, indicating its usefulness. Studies on virulence factors revealed that *Cronobacter* spp. has developed resistance to β -lactams and cephalosporins, is able to form capsule, biofilm, and presents protease and hemolytic activities. This study reports, for the first time in literature, the presence of hemagglutinins associated with type 3 pili and it was also shown that some strains presented previously described hemagglutinins associated with type 1 pili. Cytotoxic activity in Vero cells and the invasiveness of these cells by *Cronobacter* spp were also demonstrated. The results of this study suggest that all species of the genus *Cronobacter* have pathogenic potential and public health authorities, food producers and caregivers should pay careful attention to issues associated with environment control and with the microbial quality of the products associated with the risk groups in order to minimize the risk of infection with these microorganisms.

LISTA DE SIGLAS

AMI - Amicacina

AMP - Ampicilina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - *Association of Official Methods of Analysis*

APC - Ágar padrão para contagem

APT - Água peptonada tamponada

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATM - Aztreonam

AVC - Acidente vascular cerebral

BAM - Manual de Análise Bacteriológica

BHI - Infuso de cérebro e coração

CBBR - Corante azul brilhante de Comassie

CCFH - *Codex Committee on Food Hygiene*

CAZ - Ceftazidima

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CEN - *European Committee for Standardization*

CFL - Cefalotina

CFO - Cefoxitina

CIP - Ciprofloxacina

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN - Controle negativo

CONAVISA - Conferência Nacional de Vigilância Sanitária

CPM - Cefepima

CSB - *Cronobacter* spp. *Screening Broth*

CTX - Cefotaxima

DAFF - *Irish Department of Agriculture Fisheries and Food*

DFI - Ágar *Brilliance E. sakazakii* formulação Druggan, Forsythe e Iversen

DI - Dados incompletos

DIS - *Draft International Standard*

DMEM - *Dulbecco's minimal essential medium*

DNA - Ácido desoxi-ribonucleico

DO - Densidade ótica

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EEB - Caldo de enriquecimento para enterobactérias
EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
ESIA - Ágar para o isolamento de *Enterobacter sakazakii*
ESPM - *Enterobacter sakazakii* Plating Medium
ESSM - *Enterobacter sakazakii* Screening Medium
ETA - Enfermidade transmitida por alimentos
FA - Fracamente aderente
f-AFLP - Polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados fluorescentes
FAO - *Food and Agricultural Organization*
FDA - *Food and Drug Administration*
FID – Fórmula infantil desidratada
FMA - Fortemente aderente
FSAI - *Food Safety Authority of Ireland*
GEN - Gentamicina
IBFAN - *International Baby Food Action Network*
ICMSF - *International Commission for Microbiological Specifications for Foods*
IDF - *International Dairy Federation*
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPM - Imipenem
ISO - *International Organization for Standardization*
ISO/TS - *International Organization for Standardization /Technical Specification*
LB - Caldo Luria Bertani
LIA - Ágar lisina ferro
LST - Caldo lauril sulfato de sódio
LT - Termo-lábil
MA - Moderadamente aderente
MER - Meropenem
MIC - Concentração inibitória mínima
mLST - Caldo lauril sulfato de sódio modificado
mLST/v - Caldo lauril sulfato de sódio modificado com vancomicina
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NA - Não aderente
NEC - Enterocolite neonatal necrosante
PBS - Solução salina tampão fosfato
PBS-D - Solução salina tampão fosfato modificada por Dulbecco

PCR - Reação em cadeia da polimerase
PPT - Piperacilina / Tazobactam
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
rRNA - Ácido ribonucléico ribossomal
SAM - Ampicilina/Sulbactam
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SIMBRAVISA - Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária
SFB - Soro fetal bovino
SFI - *Teagasc and Science Foundation Ireland*
ST - Termo-estável
SXT - Trimethoprim-sulfa
TSA - Ágar tripticaseína de soja
TSB - Caldo tripticaseína de soja
TSI - Ágar três açúcares ferro
UCD - *University College Dublin*
UERJ - Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC - Unidade formadora de colônia
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
USA - *United States of America*
USFDA - *United States Food and Drug Administration*
USP - Universidade de São Paulo
UTIN - Unidade de tratamento intensivo de neonatos
VM-VP - Vermelho de Metila-Voges Proskauer
VRBGA - Ágar glicose vermelho violeta
XαGlc - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α ,D-glicopiranosídeo
WHO - *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da metodologia USFDA (2002).....	28
Figura 2 -	Representação esquemática da metodologia ISO / TS 22964 (2006).....	30
Figura 3 -	Protocolo da metodologia ISO/ TS 22964:2006 original e modificado	45
Figura 4 -	Desenho esquemático da distribuição das suspensões bacterianas para o ensaio de hemaglutinação	53
Figura 5 -	Desenho esquemático do inóculo e do tratamento dos tapetes celulares no ensaio de invasão.....	58
Figura 6 -	Curva de crescimento da cepa de <i>Cronobacter</i> ATCC 29004.....	59
Figura 7 -	Perfil de bandas obtido com protocolo para amplificação do fragmento com 78 bp do gene <i>dnaG</i>	60
Figura 8 -	Perfil de bandas obtido com protocolo para amplificação do fragmento com 952 bp das regiões hipervariáveis V1 e V3 do gene de 16S rRNA.....	61
Figura 9 -	Perfil de bandas obtido com protocolo para amplificação do fragmento com 1680 bp do gene <i>gluA</i>	62
Figura 10 -	Perfil de bandas obtido com protocolo para amplificação do fragmento com 105 bp do gene <i>gluA</i>	62
Figura 11 -	Porcentagem geral de resistência das cepas estudadas aos antimicrobianos testados.....	85
Figura 12 -	Avaliação de formação de biofilme em caldo BHI.....	91
Figura 13 -	Atividade de protease da cepa <i>C. sakazakii</i> HBP 2876.....	95
Figura 14 -	Porcentagem de cepas de <i>Cronobacter</i> com capacidade hemaglutinante frente a eritrócitos de diferentes espécies animais.....	102
Figura 15 -	Porcentagem de invasão de células Vero por <i>Cronobacter</i> spp.....	110

Lista de Quadros

Quadro 1 -	<i>Cronobacter</i> spp. em alimentos de origem vegetal	9
Quadro 2 -	<i>Cronobacter</i> spp. em alimentos de origem animal.....	12
Quadro 3 -	<i>Cronobacter</i> spp. em água de consumo	14
Quadro 4 -	Casos relatados de infecção ou colonização por <i>Cronobacter</i> spp. em bebês e crianças até 36 meses.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Origem das culturas bacterianas estudadas	38
Tabela 2 -	Cepas de referência utilizadas como controle negativo dos ensaios moleculares	40
Tabela 3 -	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse estudo	43
Tabela 4 -	Identificação fenotípica e molecular das cepas de <i>Cronobacter</i> spp	63
Tabela 5 -	Identificação fenotípica e molecular das cepas não- <i>Cronobacter</i> .	65
Tabela 6 -	Comportamento das cepas de <i>Cronobacter</i> spp. nas diferentes etapas da metodologia ISO/TS 22964:2006 original e modificada.....	68
Tabela 7 -	Características das cepas não classificadas como <i>Cronobacter</i> spp. nas diferentes etapas da metodologia ISO/TS 22964:2006 original e modificada	70
Tabela 8 -	Sensibilidade e especificidade dos diferentes meios de cultura e ensaios utilizados para a identificação de <i>Cronobacter</i> spp.....	77
Tabela 9 -	Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados e cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp.	84
Tabela 10 -	Resistência das cepas estudadas ao total de drogas testadas ...	85
Tabela 11 -	Capacidade de produção de cápsula pelos isolados e cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp.	88
Tabela 12 -	Classificação das culturas quanto à formação de biofilme	92
Tabela 13 -	Atividade proteolítica dos isolados e cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp.	96
Tabela 14 -	Atividade hemolítica dos isolados e cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp.	98
Tabela 15 -	Classificação das culturas de <i>Cronobacter</i> spp. quanto à capacidade aglutinante frente a eritrócitos de diferentes espécies animais	103
Tabela 16 -	Avaliação da atividade citotóxica dos sobrenadantes de culturas de <i>Cronobacter</i> spp. em células Vero	106
Tabela 17 -	Capacidade invasora de células Vero por cepas de <i>Cronobacter</i> spp. em relação à <i>E. coli</i> C600 (controle negativo).....	109

Tabela 18	Resumo dos resultados dos ensaios para determinação de marcadores de virulência.....	116
Tabela 19 -	Distribuição dos marcadores de virulência entre as cepas de <i>Cronobacter</i> spp. estudadas	118

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais	1
1.2. Panorama atual das doenças transmitidas pelos alimentos	2
1.3. Histórico de ações e eventos sobre <i>Cronobacter</i> spp.	3
1.4. Taxonomia e características do gênero	6
1.5. Reservatórios	7
1.6. Casos de infecção por <i>Cronobacter</i> spp.	14
1.7. Manifestações clínicas	19
1.8. Fatores de virulência de <i>Cronobacter</i> spp.	20
1.8.1. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos	20
1.8.2. Produção de biofilme	21
1.8.3. Atividade proteolítica	22
1.8.4. Capacidade de hemaglutinação	23
1.8.5. Atividade citotóxica	23
1.8.6. Capacidade de invasão de células eucarióticas	24
1.9. Fórmulas infantis	24
1.10. Bloqueio de lotes (“recall”) de fórmulas infantis desidratadas	25
1.11. Aspectos regulatórios	26
1.12. Isolamento e identificação de <i>Cronobacter</i> spp.	27
1.12.1. Métodos de detecção e enumeração através de cultivo	27
1.12.2. Métodos fenotípicos para a identificação de <i>Cronobacter</i> spp.	32
1.12.3. Métodos moleculares de detecção e identificação	32
1.12.4. Perspectivas de novas metodologias	33
1.13. Considerações finais	33
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Material	36
3.1.1. Micro-organismos	36
3.1.2. Linhagens celulares	37
3.2. Métodos	40
3.2.1. Determinação da curva de crescimento de <i>Cronobacter</i> (ATCC 29004)	40
3.2.2. Identificação de <i>Cronobacter</i> spp. através de métodos moleculares	41
3.2.2.1. Desenvolvimento de uma PCR qualitativa para detecção de <i>Cronobacter</i> spp.	41
3.2.2.2. Protocolo de PCR para detecção das regiões hipervariáveis V1/V3 do gene de 16S rRNA	43
3.2.2.3. Protocolo para PCR para detecção do gene <i>gluA</i>	44
3.2.3. Avaliação do comportamento dos isolados e das cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp. frente à metodologia ISO / TS 22964:2006 original e modificada	44
3.2.3.1. Pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e isolamento em meios cromogênicos	44
3.2.3.2. Avaliação da eficiência da etapa de enriquecimento seletivo	45
3.2.3.3. Produção e detecção de pigmento amarelo	46
3.2.4. Caracterização fenotípica	46

3.2.4.1. Identificação bioquímica convencional segundo Farmer et al. (1980) e Iversen et al. (2006).....	46
3.2.4.2. Identificação através de sistemas miniaturizados comerciais.....	47
3.2.5. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos sistemas de caracterização fenotípica e identificação molecular	48
3.2.6. Pesquisa de fatores de virulência	48
3.2.6.1. Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	48
3.2.6.2. Produção de cápsula	48
3.2.6.3. Produção e detecção de biofilme.....	49
3.2.6.4. Atividade proteolítica	50
3.2.6.5. Atividade hemolítica.....	50
3.2.6.6. Hemaglutinação.....	50
3.2.6.7. Citotoxicidade para células Vero	53
3.2.6.8. Invasão de células Vero	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Determinação da curva de crescimento de <i>Cronobacter</i> spp. (ATCC 29004)	59
4.2. Identificação de <i>Cronobacter</i> spp. através de métodos moleculares.....	59
4.2.1. Desenvolvimento de uma PCR qualitativa para detecção de <i>Cronobacter</i> spp.	60
4.2.2. Detecção da região hipervariável V1/V3 do gene de 16S rRNA.....	61
4.2.3. Detecção do gene <i>gluA</i>	61
4.3. Avaliação do comportamento dos isolados e das cepas de referência de <i>Cronobacter</i> spp. frente à metodologia ISO/TS 22964:2006 original e modificada.....	66
4.3.1. Produção de pigmento amarelo	72
4.4. Caracterização fenotípica	72
4.4.1. Identificação bioquímica	72
4.4.1.1. Identificação através de kits miniaturizados	74
4.4.2. Determinação da atividade enzimática	75
4.5. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos sistemas de caracterização fenotípica e molecular.....	76
4.6. Pesquisa de fatores de virulência	80
4.6.1. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	80
4.6.2. Produção de cápsula	85
4.6.3. Produção e detecção de biofilme.....	89
4.6.4. Atividade proteolítica.....	94
4.6.5. Atividade hemolítica.....	96
4.6.6. Capacidade de hemaglutinação.....	100
4.6.7. Atividade citotóxica em células Vero.....	104
4.6.8. Capacidade invasora de células Vero.....	107
4.7. Avaliação final dos resultados dos ensaios de virulência	111
4.8. Propostas de ações de Vigilância Sanitária.....	118
5. CONCLUSÕES	120
6. REFERÊNCIAS	122

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

No Brasil, a área de vigilância sanitária tem apresentado um intenso dinamismo, nos últimos anos. A Constituição Brasileira de 1988 (BRASIL, 1988) consagrou a saúde como direito de todos e a partir de então a Vigilância Sanitária vivencia expressiva transformação na organização de suas práticas, no âmbito do Sistema de Saúde. Dentre suas atribuições estão incluídas a normatização de procedimentos, a promoção de ações educativas, bem como, o controle e fiscalização, com o objetivo de assegurar a efetiva garantia do direito à saúde para todos, sem privilégios ou discriminações.

A vigilância sanitária de alimentos, por sua vez, ganhou ainda maior expressão nos últimos anos, principalmente, devido ao uso de novas tecnologias de produção, à introdução de novos hábitos alimentares na população, ao surgimento de micro-organismos multirresistentes a drogas e à emergência de novos patógenos. 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 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.

É justamente neste contexto que se insere o presente trabalho. *Cronobacter* spp. são patógenos emergentes, agentes etiológicos de meningite severa em recém-nascidos, com taxa de mortalidade relatada entre 40 e 80% e desenvolvimento de seqüelas neurológicas graves nos sobreviventes (PAGOTTO et al., 2003). Na literatura científica são relatados casos isolados e surtos em diversos países, inclusive no Brasil (OLIVEIRA & MARTINS, 1999; PESSOA-SILVA et al., 2000; BARREIRA et al., 2003; GURTLER et al., 2005; FAO/WHO, 2008). *Cronobacter* spp. também podem causar infecção em adultos imunocomprometidos, particularmente em idosos (GOSNEY et al., 2006; SEE et al., 2007).

O desenvolvimento da infecção em bebês está associado ao consumo de fórmulas infantis desidratadas (FID), devido à contaminação intrínseca do produto ou de utensílios usados na reconstituição do alimento (MUTYJENS et al., 1983, BIERING et al., 1989, VAN ACKER, 2001). A comprovação da contaminação de produtos para alimentação infantil como responsáveis por casos de infecção por *Cronobacter* spp. acarretou o bloqueio (“recall”) de vários lotes de diferentes

produtores, em diversos países, incluindo o Brasil (ANVISA, 2004; FDA, 2005). Entretanto, o nível de contaminação com *Cronobacter* spp. das fórmulas envolvidas nos casos de infecção, era muito baixo e as mesmas se apresentavam dentro dos padrões estabelecidos pelo Codex Alimentarius e/ou pela legislação brasileira (FAO, 1994; BRASIL, 2001) que não contemplavam, naquela época, a enumeração específica desses patógenos, que eram incluídos no grupo de coliformes.

Assim, os organismos nacionais e internacionais envolvidos com a saúde pública e com a vigilância sanitária de alimentos tem incentivado pesquisas com *Cronobacter* spp., devido à carência de conhecimento científico sobre esses micro-organismos. O desenvolvimento de ações de vigilância sanitária depende de informações sobre a ecologia, patogenia, filogenia e principalmente, fatores de virulência do micro-organismo em questão.

1.2. Panorama atual das doenças transmitidas pelos alimentos

Durante as duas últimas décadas as doenças de origem alimentar emergiram como importante e crescente problema econômico e de saúde pública em diversos países, garantindo espaço em agendas políticas e gerando, em alguns casos, atenção substancial da mídia (NEWELL et al., 2010). Surtos freqüentes de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) causados por novos patógenos, aliados ao uso de antimicrobianos na criação intensiva de animais e à possível transferência de resistência aos antimicrobianos para os humanos representam aspectos de grande preocupação mundial (ROCCOURT et al., 2003; CDC, 2009). Esses surtos atingem quase todos os continentes e demonstram o grande significado, tanto na área social como em saúde pública, das doenças transmitidas pelos alimentos (WHO, 2010).

A maioria das ETA é causada por patógenos ainda desconhecidos (NEWELL et al., 2010). Os novos patógenos podem surgir devido a alterações ecológicas ou tecnológicas que permitem a inserção de um micro-organismo com potencial patogênico na cadeia alimentar. Novos patógenos também podem emergir pela transferência de fatores móveis de virulência, por exemplo, através de bacteriófagos (TAUXE, 2002). Esses fatores constituem fragmentos de DNA que codificam uma variedade de determinantes de virulência ou resistência, assim como enzimas que regulam sua própria transferência e integração ao DNA do novo hospedeiro. Os fatores móveis de virulência podem consistir em sequências de inserção,

transposons, fagos, plasmídeos, ilhas de patogenicidade ou cassetes cromossômicos (MALACHOWA & DELEO, 2010).

Dentre os patógenos emergentes reconhecidos atualmente, destaca-se o gênero *Cronobacter*. Esses micro-organismos estão associados a vários surtos de meningite, enterocolite necrosante e sepse (FAO/WHO, 2008). Apesar do relato de casos de doença em diferentes faixas etárias, a maioria dos surtos envolve neonatos debilitados e foi relacionada ao consumo de FID (FAO/WHO, 2008). A população de maior risco compreende desde crianças prematuras nascidas com tempo gestacional inferior a 36 semanas até recém-nascidos com 4 a 6 semanas, crianças imunocomprometidas de qualquer idade e recém-nascidos hospitalizados nos níveis 2 e 3 de unidades de tratamento intensivo (FARBER, 2004). A taxa de mortalidade relatada varia de 40 a 80% e em muitos casos os recém-nascidos morrem em poucos dias. Os sobreviventes apresentam seqüelas neurológicas severas (FARBER et. al, 2004).

1.3. Histórico de ações e eventos sobre *Cronobacter* spp.

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

Em 2004, consciente da necessidade de disponibilizar alimentação segura para todas as crianças, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) organizaram um encontro sobre *Cronobacter* spp. e outros micro-organismos em FID. O evento foi realizado em resposta à solicitação do Comitê de Higiene Alimentar do Codex Alimentarius (CCFH) devido à emergência de uma questão de saúde pública: ocorrência de infecções severas em neonatos e crianças associadas ao consumo de fórmulas infantis contendo *Cronobacter* spp., fato este de relevância para a saúde pública. O relatório emitido pela FAO/OMS recomendou a realização de estudos sobre a detecção e tipagem molecular de *Cronobacter* spp., além do desenvolvimento de pesquisas sobre a ecologia, taxonomia, virulência e outras características destes micro-organismos que possibilitassem a redução de sua concentração em fórmulas infantis reconstituídas (FAO / WHO, 2004).

A 36ª Sessão do CCFH, em 2004, concluiu o perfil de risco de *Cronobacter* spp. e nela foi destacado que “*E. sakazakii* emergiu como perigo microbiológico em

fórmulas infantis desidratadas, causando infecções, apesar de não freqüentes, em crianças, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunocomprometidos, internados em hospitais”. Nessa sessão, foi decidido que o Código de Práticas de Higiene para Fórmulas Infantis Desidratadas para Crianças (CAC RCP 21 – 1979) deveria ser revisado. As recomendações dessa reunião reforçaram aquelas previamente sugeridas pela FAO/WHO (2004), além de destacar a importância do estabelecimento de especificações microbiológicas apropriadas para *Cronobacter spp.* em FID e desenvolvimento de métodos de detecção e de tipagem molecular internacionalmente validados (FAO / WHO, 2006).

Em 2005 foi realizada a 37ª Sessão do CCFH que teve como objetivo principal avaliar e aplicar um modelo quantitativo de avaliação de risco para *Cronobacter spp.* em FID, de forma a garantir a análise de todos os diferentes procedimentos utilizados para a reconstituição das fórmulas infantis desidratadas (FAO/WHO, 2006).

Em janeiro de 2006 o Codex Alimentarius, a FAO e a OMS, promoveram uma reunião técnica intitulada “*Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula”. Esta reunião foi realizada com o objetivo de considerar dados científicos novos, avaliar e aplicar um modelo de análise de risco quantitativo para *Cronobacter spp.* em fórmulas infantis desidratadas, além de implementar o processo de revisão do Código de Práticas de Higiene para Fórmulas Infantis Desidratadas para Crianças, com ênfase especial no modelo de avaliação de risco (FAO/WHO, 2006). Com base no relatório dessa reunião, FAO e OMS elaboraram um manual sobre preparo, uso, manipulação e armazenamento de FID (FAO /WHO, 2007).

O documento intitulado “Código de Práticas de Higiene para Fórmulas Infantis para Bebês (0 a 12 meses) e Crianças (até 36 meses) (com Anexo I e II)” foi adotado na 31ª Sessão da Comissão do Codex Alimentarius em julho de 2008. Na 39ª sessão do CCFH foi estabelecido um acordo garantindo a continuação do trabalho de desenvolvimento do Anexo II que trata, especificamente, dos critérios microbiológicos para as fórmulas infantis de seguimento, consumidas por crianças de até doze meses. Essa questão deixou clara a divisão de opiniões entre os participantes da reunião. Algumas delegações declararam não haver justificativa científica para o estabelecimento de critério para *Cronobacter spp.* nesse tipo de produto, enquanto outras consideraram esse critério necessário devido ao relato de casos de infecção em crianças com até doze meses de idade. Foi decidido que FAO e OMS seriam responsáveis por elaborar uma consulta científica aos países sobre a

questão. Um grupo de discussão eletrônica foi formado e os países membros deveriam enviar seus comentários até 7 de novembro de 2008. A decisão final aconteceu durante a 40ª sessão do CCFH, em novembro de 2008, na Guatemala. O limite para *Cronobacter* spp. foi adotado apenas para fórmulas infantis, fórmulas com propósitos médicos especiais e fortificantes de leite humano utilizados para bebês de 0 a 6 meses. Entretanto, a Comissão decidiu que, em países com substancial população de bebês até doze meses com comprometimento imunológico, devem ser adotados para as fórmulas de seguimento os mesmos critérios das fórmulas infantis para 0 a 6 meses (FAO /WHO, 2009).

Em janeiro de 2009 foi realizada a I Conferência Internacional sobre *Cronobacter*, na Universidade de Dublin, na Irlanda. A conferência foi organizada pelo “University College Dublin (UCD) Centre for Food Safety” em colaboração com a FAO/WHO, “Irish Department of Agriculture Fisheries and Food” (DAFF), “Food Safety Authority of Ireland” (FSAI) e “Teagasc and Science Foundation Ireland” (SFI). Foi a primeira conferência dedicada a *Cronobacter* spp. e reuniu pesquisadores, especialistas da indústria de alimentos e profissionais de órgãos reguladores propiciando troca de experiência e idéias em nível global. O programa científico incluiu apresentações sobre taxonomia e identificação, métodos de isolamento, saúde pública e análise de risco, com várias sessões sobre ocorrência e vigilância do patógeno (IVERSEN & FANNING, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em julho de 2004, promoveu um workshop nacional sobre “*E. sakazakii* em fórmulas infantis” com o objetivo de discutir os avanços científicos sobre o controle da contaminação por esses patógenos em fórmulas lácteas e identificar estratégias para o controle da qualidade sanitária deste tipo de produto comercializado no país.

Em março de 2007, a ANVISA promoveu o curso teórico-prático “Capacitação dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública na metodologia analítica para isolamento e contagem de *Cronobacter* spp.”. Este curso foi realizado como parte do Termo de Cooperação (TC 37) entre a Organização Pan-Americana da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e teve como objetivo principal, capacitar profissionais da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária, de forma a atender a possíveis demandas. Em novembro de 2008, durante o IV SIMBRAVISA, foi realizada a Oficina de encerramento referente ao TC 37 e a ANVISA relatou o cumprimento dos objetivos: capacitação de laboratórios de saúde pública com participação em ensaio interlaboratorial; pesquisa de *Cronobacter* spp. em fórmulas

infantis, manipuladores e utensílios em 4 maternidades públicas de Belo Horizonte e divulgação dos resultados em oficina de encerramento.

A escolha do tema do presente trabalho foi baseada no histórico descrito acima, que demonstra a importância do estudo de *Cronobacter* spp., nas questões referentes à saúde pública e à vigilância sanitária de produtos e serviços relacionadas à saúde.

1.4. Taxonomia e características do gênero

Até 1980, *Cronobacter* spp. eram referidos na literatura como *Enterobacter cloacae* produtor de pigmento amarelo. Em 1980, Farmer e colaboradores definiram uma nova espécie, *Enterobacter sakazakii*, com base em experimentos de hibridização de DNA, produção de pigmento, reações bioquímicas e suscetibilidade aos antimicrobianos. Esses pesquisadores descreveram quinze biogrupos, mas, no mesmo estudo, eles relataram que, na verdade, a espécie *E. sakazakii* poderia abrigar diferentes espécies. Lehner e colaboradores (2004), através da análise de seqüências completas de 16S rRNA obtidas de isolados de diferentes origens, relataram a existência de duas linhagens filogeneticamente distintas dentro da espécie *E. sakazakii*. Estudos posteriores apontaram a existência de um décimo sexto biogrupo (IVERSEN et al., 2006 b). Iversen et al. (2006a) analisaram seqüências parciais de 16S rRNA de isolados clínicos, ambientais e de alimentos e obtiveram quatro grupos filogenéticos distintos. Esses autores demonstraram ainda a correlação entre a análise de seqüências de 16S rRNA e a classificação em biogrupos.

Em 2007, Iversen e colaboradores (2007a) publicaram um extenso estudo utilizando cepas padrão, isolados de *E. sakazakii* de diferentes origens e representantes de espécies relacionadas. As cepas de *E. sakazakii* foram separadas em grupos a partir de perfis obtidos por amplificação de fragmentos polimórficos fluorescentes de DNA (f-AFLP), ribotipos e análise de seqüências gênicas completas de 16S rRNA. A hibridização DNA-DNA revelou cinco genomoespécies cujos perfis fenotípicos foram determinados. A partir dos resultados obtidos, os autores propuseram a reclassificação de *E. sakazakii* como um novo gênero, *Cronobacter*, dentro da família *Enterobacteriaceae*. *Cronobacter* spp. seria composto por quatro espécies (*C. sakazakii*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* e *C. dublinensis*), duas subespécies (*C. sakazakii* subsp. *sakazakii* e *C. sakazakii* subsp. *malonaticus*) e uma genomoespécie (*C. genomospecies* I). A alteração final da nomenclatura foi

validada através da publicação de um artigo, descrevendo o novo gênero (IVERSEN et al., 2008). Assim, atualmente o gênero *Cronobacter* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto por seis espécies e três subespécies, a saber: *C. sakazakii*, *C. turicensis*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. genomospecies I*, *C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis* e *C. dublinensis* subsp. *lactardi* (IVERSEN et al., 2008).

Esses micro-organismos são bactérias oxidase-negativas, catalase-positivas, Gram negativas, geralmente móveis, com flagelos peritríquios, não formadores de esporo e anaeróbios facultativos (IVERSEN et al., 2008).

Em 1997, Nazarowec-White e Farber relataram que, dentre as enterobactérias, *Cronobacter* spp. pareciam ser os micro-organismos com maior capacidade de termorresistência. Breeuwer et al. (2003) relataram que *Cronobacter* spp. são capazes de se multiplicar na faixa de temperatura de 45-47°C. Entretanto, segundo Edelson-Mammel e Buchanan (2004) a termotolerância parece variar de acordo com a cepa. Esses autores estudaram a capacidade de 12 cepas de *Cronobacter* spp. sobreviverem em fórmulas infantis reidratadas, mantidas a 58°C e encontraram dois fenótipos de resistência.

Iversen e colaboradores (2004) realizaram estudos sobre termotolerância e capacidade de formação de biofilmes com cepas de *Cronobacter* spp. e concluíram que a termotolerância desses micro-organismos é similar a de outras enterobactérias. Entretanto, relataram que os micro-organismos do gênero *Cronobacter* são capazes de se multiplicar em fórmulas infantis durante estocagem sob refrigeração e de aderir aos equipamentos usados para preparo de alimentação infantil, possibilitando que esses se tornem reservatórios dos patógenos.

As células de *Cronobacter* spp. são mais resistentes ao stress osmótico e à dessecação do que outros membros da família *Enterobacteriaceae* (BREEUWER et al., 2003; CAUBILLA-BARRON et al., 2007) Essas características conferem uma vantagem competitiva aos micro-organismos, quando em ambientes secos como no ambiente de processamento de alimentos em pó e cereais, onde podem sobreviver durante longos períodos, além do próprio alimento.

1.5. Reservatórios

O gênero *Cronobacter* parece ter natureza ubíqua e seu reservatório primário de ainda não foi determinado. Iversen e Forsythe (2004) sugerem que esses micro-organismos não façam parte da microbiota normal dos humanos ou dos animais e

apontam a água, o solo e os vegetais como as principais fontes ambientais. Os Quadros 1, 2 e 3 apresentam os alimentos a partir dos quais *Cronobacter* spp. já foi isolado.

Alguns casos de infecção por *Cronobacter* spp. foram associados ao consumo de FID contaminadas (BIERING et al., 1989; HIMELRIGHT et al., 2002; LEHNER e STEPHAN, 2004; TORRES-CHAVOLLA et al., 2007; VAN ACKER, 2001). 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, tem sido apontados como uma rota potencial de contaminação (FAO/WHO, 2004, 2006; O'BRIEN et al., 2009).

Dessa forma, o caráter ubíquo desses micro-organismos deve ser considerado durante o estabelecimento de medidas de controle preventivas referentes à segurança dos alimentos.

Quadro 1 - *Cronobacter* spp. em alimentos de origem vegetal.

Alimento (produto)	Natureza do produto	Origem	Referência
1. Cereais			
Malte verde	Produto intermediário na produção de cerveja	Alemanha	Scheepe-Leberkühne and Wagner, 1986
Khamir (sorgo)	Pão fermentado	Arábia Saudita	Gassem, 1999
Semente de arroz	Produto desidratado	Filipinas	Cottyn et al., 2001
Sobia (trigo, farinhas de malte)	Bebida fermentada	Arábia Saudita	Gassem, 1999
Grãos, milho moído e arroz moído	Produtos desidratados	Grã-Bretanha	Iversen et al., 2004b,c
Arroz, amido de arroz, farinha de arroz	Produtos desidratados	USA	Gurtler et al., 2005 e Richards et al., 2005
Farinha ou refeição de milho, soja, trigo e arroz	Produtos desidratados	USA	Restaino et al., 2006
Cereais para adultos e crianças	Produtos desidratados	USA	Restaino et al., 2006
Grãos	Produtos desidratados	Coréia do Sul	Jung e Park, 2006
2. Legumes			
Pasta de feijão-fradinho	Refeição de rua	Nigeria	Bulgarelli et al., 1988
Brotos de soja e tofu	Produto cru e queijo de soja	USA	Fouad e Hegeman, 1993
Tempe (soja)	Produto fermentado	Indonésia	Denter e Bisping, 1994
Tofu	Queijo de soja	Coréia do Sul	No et al., 2002
Brotos de feijão-da-china, brotos de alfafa	Produto cru	Noruega	Robertson et al., 2002
Brotos de alfafa	Produto cru	Mexico	Cruz et al., 2004
Pó para preparo de sopa de ervilha	Produto desidratado	República Tcheca	Leuschner et al., 2004
Proteína de soja, lentilhas	Produto desidratado	Grã-Bretanha	Iversen et al., 2004b,c
Alçaçuz	Bebida a base de produto desidratado, refeição de rua	Jordânia	Nassreddin e Yamani, 2005

Continua

Continuação do **Quadro 1.**

Alimento (produto)	Natureza do produto	Origem	Referência
3. Chá, ervas e condimentos			
<i>Sour tea</i>	Bebida fermentada	China	Tamura et al., 1995
<i>Iced tea</i>	Produto desidratado	USA	Zhao et al., 1997
Chá de ervas (funcho, erva-doce)	Produto desidratado	Alemanha	Federal Microbiological Food Monitoring Programme 2003
Ervas e condimentos	Produtos desidratados	Grã-Bretanha	Iversen e Forsythe, 2004
Alimento infantil contendo ervas	Produto desidratado	Grã-Bretanha	Iversen e Forsythe, 2004
Condimentos	Produtos desidratados	USA	Restaino et al., 2006
4. Frutas e hortaliças			
Salada com misto de vegetais	Produto fatiado pronto para consumo	Itália	Galli et al., 1990
Salada com misto de vegetais	Produto fatiado pronto para consumo	Alemanha	Geiges et al., 1990
Salada com misto de vegetais	Produto fatiado pronto para consumo	Itália	Ottaviani et al., 1992
Alface	Produto fresco	Irlanda	Francis e O'Beirne, 1998
Vegetais	Crus e congelados	Finlândia, Holanda, Itália, Polônia, Hungria, Portugal e Alemanha	Österblad et al., 1999
Salada com misto de vegetais	Produto fatiado pronto para consumo	Alemanha	Lack et al., 1999
Alface	Produto fresco	Espanha	Soriano et al., 2001
Abobrinha	Produto fresco, casca	Espanha	Gray et al., 2001
Vegetais	Produto fresco	França	Leclercq et al., 2002

Continua

Continuação do **Quadro 1**.

Alimento (produto)	Natureza do produto	Origem	Referência
Salada	Pronta para consumo, refeição de rua	Gana	Mensah et al., 2002
Guisado de tomate	Pronta para consumo, refeição de rua	Gana	Mensah et al., 2002
Efluente de vinícola	Efluente de vinícola	África do Sul	Keyser et al., 2003
Alimento infantil à base de frutas	Produto desidratado	Grã-Bretanha	Iversen e Forsythe, 2004
Sementes, frutas amêndoas, pistache, coco em pó, sementes de girassol, sementes de gergelim	Produtos desidratados	Grã-Bretanha	Iversen e Forsythe, 2004
Salada com misto de vegetais	Produto fatiado pronto para consumo	Alemanha	Weiss et al., 2005
Vegetais	Produtos desidratados	USA	Restaino et al., 2006
Vegetais, algas vermelhas	Produto não processado, pronto para consumo	Coréia do Sul	Jung e Park, 2006

Quadro 2 - *Cronobacter* spp. em alimentos de origem animal.

Alimento (produto)	Natureza do produto	Origem	Referência
1. Carne e produtos cárneos			
Salsichas		França	Goulet e Picard, 1986
Salsichas	Cortadas e resfriadas	Alemanha	Scalch et al., 1994
Produtos de carne	Curadas	Japão	Watanabe e Esaki, 1994
Carne	Picada	Canadá	Nazarowec-White e Farber, 1997
Produtos cárneos	Crus	Japão	Kimura et al., 1999
Carne de porco (<i>lacon</i>)	Superfície crua curada desidratada	Espanha	Castano et al., 2001
Carne de camelo	Carcaças	Arábia Saudita	Al-Dugham e Yassien, 2001
Carne de boi, de salsicha	Picada	França	Leclercq et al., 2002
Frango	Carcaças	Argentina	Jimenez et al., 2003
Gelatina	Extrato semi-final	Bélgica	De Clerck et al., 2004
2. Leite e laticínios			
Soro de queijo		África do Sul	De Haast e Britz 1986
Leite		República da Coreia	Choi et al., 1999
Tanque de homogeneização de leite	Leite cru	USA	Jayarao e Wang, 1999
Queijo		França	Leclercq et al., 2002
Queijo		Espanha	Roig-Sagués et al., 2002
Produto de queijo		Grã-Bretanha	Iversen et al., 2004 b,c
Leite (vaca)	Leite cru	França	Ogier et al., 2004
Queijo (Morbier)	À base de leite cru, semi-duro	França	Ogier et al., 2004
Caseinato de sódio	Produto desidratado	USA	Restaino et al., 2006
Queijo (Pecorino)		Itália	Chaves-Lopez et al., 2006

Continua

Continuação do **Quadro 2.**

Alimento (produto)	Natureza do produto	Origem	Referência
3. Ovos e produtos de ovos			
Ovos (avestruz)	Clara e gema do ovo	Itália	Cabassi et al., 2004
Ovos	Casacas não lavadas	USA	Musgrove et al., 2004
Ovos		USA	Gurtler et al., 2005
4. Pescados e produtos de pesca			
Ostras	Frescas, cruas	Espanha	Balebona et al., 1990
Camarões	Congelados	Suíça	Teuber, 2001
Peixes	Fritos, prontos para consumo, alimento de rua	Gana	Mensah et al., 2002
Sardinhas	Defumadas, prontas para consumo	Gana	Nketsia-Tabiri et al., 2003
Peixes	Aquicultura	USA	Miranda et al., 2003
Peixes	Produto desidratado	China	Liu et al., 2005

Quadro 3 - *Cronobacter* spp. em água de consumo.

Alimento (produto)	Origem	Referência
Água	Grã-Bretanha	NCTC 9529 (1954)
Água potável	França	Leclerc et al., 1981; Oger et al., 1981
Água	USA	Farmer et al., 1985
Água potável	USA	Camper et al., 1986
Água	Bélgica	Goulet e Picard, 1986
Água	França	Goulet e Picard, 1986
Água potável	Alemanha	Schindler e Metz, 1991
Água mineral engarrafada	Alemanha	Schindler, 1994
Água potável (biofilme)	Itália	Bartolucci et al., 1996
Água	Grã-Bretanha	Oliver, 1997
Água	França	Leclerc et al., 2001
Água potável (biofilme)	República da Coréia	Lee e Kim, 2003
Água potável (biofilme)	Grã-Bretanha	Williams e Braun-Howland, 2003
Água	USA	Cruz et al., 2004

1.6. Casos de infecção por *Cronobacter* spp.

Em 1961, na Inglaterra, Urmenyi e Franklin, relataram os dois primeiros casos de meningite neonatal causada por *Cronobacter* spp., naquela época ainda identificado como *Enterobacter cloacae* produtor de pigmento amarelo. A partir de então, diversos casos e surtos de infecção neonatal por *Cronobacter* spp. tem sido relatados em todo o mundo (GURTLE et al., 2005; FAO/WHO, 2008; CDC, 2009; ENTEROBACTER SAKAZAKII BLOG, 2008, 2009). O Quadro 4 apresenta os casos relatados de infecção por *Cronobacter* spp. em bebês e crianças até 36 meses de idade. A maioria dos casos são nosocomiais, envolvendo neonatos e crianças de 3 dias a 4 anos (FAO/WHO, 2008).

Apesar da infecção por *Cronobacter* spp. estar, a princípio, associada a crianças, existem diversos relatos de casos em adultos (FAO/WHO, 2008). Jimenez e Gimenez (1982), na Espanha, foram os primeiros a relatar o isolamento de *Cronobacter* spp. de um paciente adulto com bacteremia. Pribyl et al. (1985) relataram a ocorrência de infecção por *Cronobacter* spp. associada a osteomielite em adulto diabético dentre casos estudados no período de 1982 a 1985 em um hospital em Nova Orleans, USA. Gosney et al. (2006), tendo em vista o relato de estudos anteriores (Preston et al., 1999) sobre a alta prevalência de bacilos Gram

negativos na cavidade oral de pacientes acometidos por acidente vascular cerebral (AVC), estudaram 203 indivíduos desse grupo e encontraram *Cronobacter* spp. na cavidade oral de sete pacientes. See et al. (2007) descreveram o primeiro caso de infecção por *Cronobacter* spp. em adulto sem comprometimento imunológico. Eles encontraram o patógeno em abscesso esplênico de uma paciente de 75 anos.

É importante destacar que, considerando os dados disponíveis no Reino Unido durante o período de 1999 a 2007, a mais alta taxa de incidência de infecção por *Cronobacter* spp. foi atribuída à faixa etária de ≥ 75 anos (3,75 por milhão de indivíduos) seguida pela faixa de 65 a 74 anos (2,65 por milhão de indivíduos). A taxa de incidência em bebês foi apresentada como 2,45 e para crianças de 1 a 4 anos como 0,65 por milhão de indivíduos. Esses relatos sugerem que os idosos podem representar a população mais suscetível às infecções por *Cronobacter* spp. (KYNE, 2009) indicando a necessidade de revisão das políticas de saúde pública.

No Brasil, ainda são poucos os relatos de infecção por *Cronobacter* spp. O primeiro está relacionado a um surto ocorrido na Unidade de Neonatologia e no Centro de Terapia Intensiva no Hospital das Clínicas da UFMG (OLIVEIRA e MARTINS, 1999). O segundo, a um surto envolvendo quatro hospitais no Rio de Janeiro (PESSOA-SILVA et al., 2000). O terceiro relato descreve um caso de meningite por *Cronobacter* spp. em recém-nascido no Hospital Universitário da USP (BARREIRA et al., 2003).

Entretanto, os números de casos relatados nos diversos países provavelmente não refletem a realidade. Isso porque muitos laboratórios clínicos, independentemente do país, não incluem a pesquisa rotineira de *Cronobacter* spp. e na maioria dos casos o relato das infecções por esses patógenos não é obrigatório. Além disso, muitos países não dispõem de um sistema oficial de informação (FARBER, 2004; FAO/WHO, 2008).

Quadro 4 – Casos relatados de infecção ou colonização por *Cronobacter* spp. em bebês e crianças até 36 meses.

Ano	Local	Doença / sintomas	Nº casos (óbitos)	Fonte	Referência
1958	Inglaterra	Meningite e sepse	2 (2)	Desconhecida	Urmenyi e Franklin, 1961
1958	Dinamarca	Meningite	1 (1)	Desconhecida	Joker et al., 1965
1958	Georgia (USA)	Bacteremia	1	Desconhecida	Monrone e Tift, 1979
1958	Oklahoma (USA)	Meningite e sepse	1 (1)	Desconhecida	Adamson e Rodgers, 1981
1958	Indiana (USA)	Meningite	1	Desconhecida	Kleiman et al., 1981
1977-81	Holanda	Meningite, enterocolite necrosante	8 (6)	Suspeita de FID ^a	Muytjens et al., 1983
1977-81	Grécia	Bacteremia	1 (1)	NE ^b	Arseni et al., 1984
1984	Grécia	Colonização	11 (4)	Desconhecida	Arseni et al., 1987
1984	Missouri (USA)	Meningite	1	Desconhecida	Naqvi et al., 1985
1984	Massachusetts e Los Angeles (USA)	Meningite	2 (1)	Desconhecida	Willis e Robinson, 1988
1986-87	Islândia	Meningite	3 (1)	FID	Biering et al., 1989; Clarke et al., 1990
1988	Tennessee (USA)	Sepse	4	FID e liquidificador	Simmons et al., 1989 Clarke et al., 1990
NE	Portugal	Meningite	1 (1)	Desconhecida	Lecour et al., 1989
1988	Maryland (USA)	Bacteremia	1	FID	Noriega et al., 1990

Continua

Continuação do **Quadro 4.**

Ano	Local	Doença / sintomas	Nº casos (óbitos)	Fonte	Referência
1988	Ohio (USA)	Meningite	1	NE	Gallagher e Ball, 1991
NE	Alemanha	Meningite	1	Desconhecida	Ries et al., 1994
NE	Canadá	Abscesso cerebral	1	Desconhecida	Tekkok et al., 1996
1997	Escócia	Meningite	1	Desconhecida	SCIEH Weekly Report, 11.03.97
1988	Bélgica	Enterocolite necrosante	12 (2)	FID	Van Acker et al., 2001
1998	Brasil	Bacteremia	5	Desconhecida	Santos et al., 2000
NE	North Carolina (USA)	Meningite	1	Desconhecida	Burdette e Santos, 2000
NE	Minnesota (USA)	Infecção urinária, secreção nasal, meningite	3	FID	CDC, 2001
1999-00	Jerusalém	Bacteremia, meningite	5	FID, liquidificador	Bar-Oz et al., 2001
1999-00	Jerusalém	Meningite	3	Liquidificador	Block et al., 2002
2001	Tennessee (USA)	Meningite	11 (1)	FID	Hilmeright et al., 2002
2002	Bélgica	Meningite	1 (1)	FID	www.cfsan.fds.gov/~dms/infr3.html
NE	Colorado(USA)	Isolado de traquéia	1	Desconhecida	CDC, 2002
NE	Wisconsin (USA)	Isolado de liquor	1	Desconhecida	CDC, 2002
NE	Michigan (USA)	Meningite	1	Desconhecida	CDC, 2002
NE	Minnesota (USA)	Meningite	1 (1)	Desconhecida	CDC, 2002

Continua

Continuação do **Quadro 4.**

Ano	Local	Doença / sintomas	Nº casos (óbitos)	Fonte	Referência
2004	Nova Zelândia	Meningite	5 (1)	FID	www.nzfsa.govt.nz
2004	França	Meningite, enterocolite necrosante, bacteremia	18 (4)	FID	Caubilla-Barron et al., 2007
2008	Novo México (USA)	Meningite e síndrome da morte súbita infantil	2 (1)	FID (?) ^c	MMWR, 2009
2008	Illinois (USA)	Meningite	1 (1)	FID (?)	Enterobactersakazakii Blog, 2008
2008	Japão	Bacteremia	1 (1)	FID (?)	Teramoto et al., 2010

^a – Fórmula Infantil Desidratada; ^b – Não especificado; ^c - Não confirmado. Fontes: FAO/WHO, 2008; MMWR, 2009.

1.7. Manifestações clínicas

Cronobacter spp. estão envolvidos como agentes etiológicos de surtos de meningite severa e enterocolite necrosante em neonatos e crianças. O quadro de meningite resulta em infartos e hemorragias cerebrais, ventriculite, abscesso cerebral ou formação de cisto e desenvolvimento de hidrocefalia que requer desvio peritoneal-ventricular (LAI, 2001). Em bebês, a meningite se estabelece entre o quarto e quinto dias após o nascimento e pode ser fatal dentro de horas ou alguns dias após o aparecimento dos sintomas (MUYTJENS et al., 1983). A taxa de mortalidade relatada varia entre 40 e 80%. Os sobreviventes apresentam severas seqüelas neurológicas como hidrocefalia, retardo mental, hemiplegia e quadriplegia espástica (FARBER, 2004).

Outras manifestações clínicas da infecção incluem bacteremia isolada, diarréia sanguinolenta, enterocolite necrosante, sepse e coagulopatia. Essas formas apresentam menor gravidade, mas podem evoluir para o quadro de meningite (FARBER, 2004).

A enterocolite neonatal necrosante (NEC) é caracterizada por necrose e pneumatose intestinal (LEHNER e STEPHAN, 2004). Na Holanda, Muytjens e colaboradores (1983) relataram oito casos de meningite neonatal e sepse, sendo que dois neonatos desenvolveram NEC e meningite, simultaneamente.

Além da doença aguda, estudos indicam que o paciente pode se tornar um portador entérico de *Cronobacter* spp., por um período de até 18 semanas (BLOCK et al., 2002). Assim, além da capacidade de aderência e sobrevivência por longo período no intestino humano é possível que esses micro-organismos apresentem grande potencial para o desenvolvimento de infecções cruzadas (BLOCK et al., 2002).

A meningite bacteriana em neonatos é uma doença fatal de evolução rápida, e como as defesas imunológicas nos fluidos cerebrais destes indivíduos são limitadas, os antibióticos devem ser rapidamente administrados para a erradicação do agente etiológico (LEHNER e STEPHAN, 2004).

As infecções por *Cronobacter* spp. em adultos estão associadas a choque séptico (JIMENEZ e GIMENEZ, 1982), osteomielite (PRIBYL et al., 1985), abscesso esplênico (SEE et al., 2007), pneumonia/bacteremia (GOSNEY et al., 2006), e infecção de feridas (KYNE, 2009).

A antibioticoterapia, utilizando ampicilina combinada à gentamicina ou cloranfenicol, é o procedimento adotado no tratamento inicial de suspeita de

infecção por *Cronobacter* spp. Entretanto, vários autores têm relatado o desenvolvimento de resistência do micro-organismo a essas drogas, incluindo a produção de β -lactamase. (LAI, 2001; KYNE, 2009).

1.8. Fatores de virulência de *Cronobacter* spp.

A severidade das infecções causadas por *Cronobacter* spp. vem chamando a atenção dos microbiologistas de alimentos, principalmente durante a última década. Contudo, os mecanismos que contribuem para a patogenicidade desses micro-organismos, particularmente no que se refere às meningites neonatais, ainda não foram definidos (HEALY et al., 2010).

1.8.1. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos

As meningites bacterianas necessitam de tratamento rápido e efetivo e por isso existe uma preocupação crescente com a suscetibilidade a antimicrobianos nos casos de infecção de neonatos por *Cronobacter* spp. (LAI, 2001, BLOCK, 2002, LEHNER E STEPHAN, 2004). Esse gênero era descrito como o mais sensível membro da família *Enterobacteriaceae*, suscetível a muitas classes de antimicrobianos incluindo os aminoglicosídeos e carboxi-penicilinas (STOCK E WIEDERMANN, 2002). Entretanto, esses micro-organismos adquiriram resistência a esses antimicrobianos através de elementos de transposição, e aos β -lactâmicos através da produção de β -lactamase (LAI, 2001). Assim, novos esquemas de terapia antimicrobiana necessitam ser estabelecidos. Nesse sentido, existem sugestões do uso de carbapenems ou cefalosporinas de terceira geração associadas a aminoglicosídeos ou trimetoprim-sulfametaxazol (LAI, 2001).

As diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI; 2010) não fazem referência direta a *Cronobacter* spp., mas sugerem que sejam testadas as seguintes drogas para as enterobactérias: ampicilina, cefazolin (somente MIC), gentamicina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulânico, cefuroxime, cefepime, cefotetan, cefoxitina, cefotaxime ou ceftriaxone (para isolados de liquor), ertapenem, imipenem, meropenem, piperacilina, trimetoprim-sulfametoxazol, aztreonam, ceftazidime, cloranfenicol e tetraciclina.

1.8.2. Produção de biofilme

A capacidade de formar biofilme pode ser crucial para a colonização de certas superfícies bióticas ou abióticas e pode influenciar na virulência de bactérias patogênicas. A adesão de bactérias patogênicas a células específicas do hospedeiro representa uma etapa fundamental para o estabelecimento de infecção, através da colonização do tecido hospedeiro (LANGSTRAAT et al., 2001). A formação de biofilme tem como pré-requisito a forte adesão mediada por interações específicas entre adesinas e receptores de superfície. Essas interações podem promover a agregação microbiana e ativar a formação de biofilme (GERLACH & HENSEL, 2007). Langstraat et al. (2001) relataram que a presença de fímbrias tipo 3 facilita a formação de biofilme em *Klebsiella pneumoniae*. Ong et al. (2008), estudando cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas, sugerem que as fímbrias tipo 3 podem contribuir na formação de biofilme por diferentes patógenos Gram negativos nosocomiais.

A adesão bacteriana a superfícies e a formação de biofilmes são características que também contribuem para a resistência das células ao estresse ambiental e proteção contra antimicrobianos, a saneantes, à dessecação, ao aquecimento e ao pH (KIM, 2006; HEALY et al., 2010).

A formação de biofilme em ambientes de processamento de alimentos representa uma fonte potencial de contaminação e pode acarretar a deterioração de partidas de alimentos ou contaminação de alimentos com patógenos (DEWANTI & WONG, 1995).

Existem vários relatos de formação de biofilme por micro-organismos do gênero *Cronobacter* (IVERSEN et al., 2004; LEHNER et al., 2005; KIM, 2006). Iversen et al. (2004) estudaram a produção de biofilme por *Cronobacter* spp. em superfícies associadas a equipamentos para alimentação por FID. Os isolados foram capazes de aderir a silicone, látex, policarbonato e aço inoxidável com maior aderência pelas cepas produtoras de cápsula polissacarídica. No gênero *Cronobacter*, a disponibilidade de nutrientes e a temperatura são fatores capazes de afetar a formação de biofilme (KIM et al., 2006, 2007, 2008). A colonização, por *Cronobacter* spp., de superfícies de utensílios como colher, escova e liquidificador utilizados na preparação de FID foram documentadas na avaliação de infecções de neonatos causadas por esses micro-organismos (MUYTJENS et al., 1983; NORIEGA, 1990; VAN ACKER, 2001). Segundo Hurrell et al. (2009), com o amadurecimento dos biofilmes bacterianos formados em tubos para alimentação enteral, grupos de células podem se destacar e sobreviver à passagem através do

estômago de neonatos, devido à proteção contra acidez. Uma vez que neonatos de baixo peso apresentam baixa imunidade e ainda não desenvolveram uma microbiota intestinal competitiva, esses micro-organismos, associados por biofilme, podem causar infecção neonatal (TOWNSEND & FORSYTHE, 2008).

Uma vez que as FID representam veículos potenciais de infecções por esses micro-organismos em neonatos é importante o controle da higienização de superfícies para evitar adesão e formação de biofilmes.

1.8.3. Atividade proteolítica

As metaloproteases bacterianas parecem desempenhar importante papel na disseminação de bactérias a partir do sítio de infecção para a circulação sistêmica (HARRINGTON, 1996; MIYOSHI & SHINODA, 2000). A degradação específica de componentes protéicos da matriz extracelular pelas metaloproteases contendo zinco pode causar a destruição das membranas das células endoteliais dos capilares, acarretando a dispersão dos componentes sanguíneos para os tecidos adjacentes e permitindo, dessa forma, a travessia de patógenos através da barreira hematoencefálica (MIYOSHI & SHINODA, 2000).

Kothary e colaboradores (2007) demonstraram que micro-organismos do gênero *Cronobacter* produzem metaloprotease contendo zinco. As proteínas caracterizadas por esses pesquisadores apresentaram propriedades comuns às de outros patógenos, mas também características únicas como ausência de atividade de elastase e incapacidade de hemaglutinar eritrócitos de galinha e de carneiro. Caubilla-Barron e colaboradores (2007) estudaram cepas relacionadas a um surto de infecção por *Cronobacter* spp. ocorrido em 1994, na França. Através de ensaio para detecção de atividade de protease verificaram que todas as cepas clínicas apresentaram essa característica, diferentemente das culturas obtidas a partir de embalagens fechadas de FID. Os autores relataram não ser possível definir a atividade de protease como determinante de virulência, mas indicaram a necessidade de novas investigações.

Carranza et al. (2009) realizaram um grande estudo, traçando o perfil proteômico da cepa *C. turicensis* 3032, associada à morte de dois neonatos. Nesse estudo identificaram uma metaloprotease que apresenta 70% de similaridade com a enzima protealisina de *Serratia* sp. envolvida na melanização de *Drosophila melanogaster* (mosca da banana). A cepa estudada não apresentou atividade

proteolítica em ágar contendo caseína. Esses autores concluíram que a metaloprotease de *C. turicensis* 3032 não tem atividade sobre a caseína e está associada a funções ambientais referentes a insetos e plantas.

1.8.4. Capacidade de hemaglutinação

A capacidade de aderir a uma variedade de superfícies bióticas ou abióticas é uma característica que pode promover a sobrevivência bacteriana e consiste em uma função essencial para muitos patógenos (GERLACH & HENSEL, 2007). A adesão é mediada por diferentes estruturas de superfície bacteriana que podem ser subdivididas, conforme o seu mecanismo de agrupamento e sua estrutura, em duas classes: adesinas fimbriais e adesinas não fimbriais (SOTO & HULTGREN, 1999).

Fímbricas (ou pili) são apêndices filamentosos retos e rígidos presentes na superfície bacteriana, mas distintos dos flagelos. Existem diferentes tipos de fímbria. As bactérias que apresentam fímbria tipo 1 são caracterizadas por sua capacidade de mediar aglutinação de eritrócitos na ausência de α -D-manose, mas não na presença desse carboidrato. As fímbricas associadas à aglutinação de eritrócitos somente após tratamento com ácido tânico são caracterizadas como tipo 3 e são comuns dentre os membros da família *Enterobacteriaceae* (ADEGBOLA & OLD, 1983). A atividade de hemaglutinação das enterobactérias é geralmente associada à sua capacidade de adesão a epitélio (DUGUID et al., 1979). As enterobactérias que apresentam fímbricas do tipo 3 são patógenos oportunistas frequentemente associados a indivíduos imunocomprometidos (HORNICK et al., 1991; SEBGHATI, 1998).

1.8.5. Atividade citotóxica

Segundo Finlay & Falkow (1989), a determinação do papel das toxinas na patogenicidade de micro-organismos representa um desafio. Algumas vezes, elas agem causando dano aos tecidos de forma a permitir a penetração da bactéria em tecidos mais profundos ou a passagem através do epitélio ou da barreira endotelial.

A presença de toxinas também pode inibir a resposta imune do hospedeiro ou, no caso das enterotoxinas, eliminar bactérias intestinais (CANTEY, 1985). Assim, as toxinas estão incluídas dentre os fatores de virulência produzidos pelos patógenos bacterianos (LAW, 1988) e podem representar o principal fator de

virulência e a causa de algumas doenças, mas não constituem o principal determinante de infectividade (FINLAY & FALKOW, 1989).

Pagotto et al. (2003) foram os primeiros a abordar esse aspecto para *Cronobacter* spp. e demonstraram efeito citopático em células CHO, Vero e Y-1 usando o filtrado de cultura de uma cepa clínica de *Cronobacter*. Kothary et al. (2007) isolaram e caracterizaram uma metaloprotease única em *Cronobacter* spp. que é ativa contra azocaseína, tem efeito citopático em células CHO e pode permitir que o micro-organismo atravesse a barreira hemato-encefálica ou cause extensiva destruição celular em neoatos com enterocolite necrosante.

1.8.6. Capacidade de invasão de células eucarióticas

Alguns estudos têm descrito aspectos relativos à interação de *Cronobacter* spp. com culturas de células. Segundo Mange e colaboradores (2006), a adesão de *Cronobacter* spp. a células eucarióticas não ocorre por intermédio de fímbrias e as adesinas envolvidas nesse processo ainda não foram determinadas.

Townsend et al. (2008) estudaram as propriedades de aderência e invasão de sete cepas de *Cronobacter* spp. associadas a um surto de enterocolite necrosante, bacteremia e meningite em uma unidade neonatal de tratamento intensivo, na França. Todas as cepas foram capazes de aderir e invadir células Caco-2 após um período de 3 horas. Os estudos de invasão com células endoteliais de cérebro de rato demonstraram que a cepa isolada de um caso fatal de meningite apresentou capacidade invasora significativamente maior do que as cepas não associadas a casos de meningite (TOWNSEND et al., 2008). Kim e Loessner (2008) estudaram três cepas de *Cronobacter* spp. que demonstraram capacidade invasora de células Caco-2 significativamente maior do que as cepas de *E. cloacae* e *E. agglomerans* também utilizadas no estudo. Além disso, concluíram que o mecanismo de invasão celular por *Cronobacter* spp. é diferente dos processos utilizados por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium.

1.9. Fórmulas infantis

O leite humano é reconhecido internacionalmente como a melhor fonte de nutrição de bebês. Entretanto, existem circunstâncias em que há necessidade de suplementação ou substituição do leite humano. Nesses casos a opção é a utilização de fórmulas infantis, que são substitutas do leite humano, especialmente

produzidas para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais de bebês durante os primeiros meses de vida até a introdução de alimentação complementar apropriada (FAO/WHO, 2007). As fórmulas infantis tem como composição básica o leite de vaca ou de outros animais e/ou outros ingredientes que tenham sido considerados adequados à alimentação infantil por comprovação científica. Os processos de produção desses alimentos utilizam apenas métodos físicos e a embalagem deve impedir a deterioração ou contaminação do produto durante as condições normais de manipulação, estocagem e distribuição no país de venda do produto (FAO/WHO, 2007). O produto final pode se apresentar na forma líquida ou desidratada.

As fórmulas infantis líquidas constituem um produto pronto para consumo e são submetidas ao processo de esterilização comercial. As fórmulas infantis desidratadas (FID), apesar de amplamente utilizadas (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997; FAO/WHO, 2008), não são estéreis. A tecnologia atualmente utilizada na produção de FID não permite que o produto seja submetido ao processo de esterilização. Dessa forma, as FID podem conter micro-organismos e a inocuidade desses produtos deve ser garantida através da utilização de boas práticas de higiene durante a produção e também durante o uso (reconstituição, estocagem e administração) (FAO/WHO, 2008).

1.10. Bloqueio de lotes (“recall”) de fórmulas infantis desidratadas

Em 2002, por ocasião de um caso fatal de meningite por *Cronobacter* spp. em um neonato, Himelright e colaboradores realizaram um estudo para determinar a magnitude e fonte de infecção, em uma Unidade de Tratamento Intensivo de Neonatos (UTIN) no Tennessee, nos Estados Unidos. Espécimes colhidos de 49 crianças hospitalizadas na mesma unidade foram submetidos a análise e 10 culturas foram identificadas como *Cronobacter* spp. Através da análise dos fatores de risco identificados foi determinado que o uso de uma FID específica (Portagen, Mead Johnson) estava associado, de forma significativa, com os casos de colonização e infecção por *Cronobacter* spp. A análise microbiológica de latas abertas e fechadas do produto pertencentes ao mesmo lote utilizado na UTIN revelou a presença do patógeno. O lote do produto Portagen implicado como fonte de infecção foi voluntariamente recolhido pelo produtor, em março de 2002. A Agência Americana para o Controle de Drogas e Alimentos, FDA, estabeleceu diretrizes para o preparo de fórmulas infantis desidratadas nas UTIN, além de fazer recomendações para a

seleção de produtos e sugestões de alternativas às FID, quando possível (Himmelright, 2002).

Ainda em 2002, cerca de 1,5 milhão de latas de fórmulas infantis da marca Wyeth Nutritionals, foram voluntariamente recolhidas, nos Estados Unidos, devido à presença de *Cronobacter* spp. (USFDA, 2003).

Em janeiro de 2003, a Mead Johnson iniciou, nos Estados Unidos, o recolhimento voluntário de 3030 latas do produto EnfaCare Lipil devido à contaminação por *Cronobacter* spp. (IBFAN, 2005). Novamente, em dezembro de 2004, a Mead Johnson deu início ao recolhimento voluntário global de seu produto Pregestimil devido à morte de duas crianças francesas com infecção por *Cronobacter* spp., associadas ao consumo do produto (IBFAN, 2005). Dessa vez, as consequências atingiram o Brasil. Em 31 de dezembro de 2004, a ANVISA (2004) proibiu em todo o território nacional o ingresso, a comercialização, a distribuição, a exposição ao consumo e o uso da fórmula infantil/produto “Leite Infantil com Ferro para Lactentes”, em pó, marcas Pregestimil e Enfamil Pregestimil. Este produto é fabricado na Holanda pela empresa Mead Johnson e importado para o Brasil pela empresa Bristol-Myers Squibb Farmacêutica. O não cumprimento a essas determinações implicaria em multas que poderiam variar de R\$ 2 mil a R\$ 1,5 milhão.

Em 2007 foram recolhidos produtos de vários fabricantes (Kayebe Dauce Packers, Humana, Milupa e Hipp) em diferentes países (Uganda, Croácia/Slovênia, Alemanha, Áustria e Luxemburgo) (IBFAN, 2008). Em 2008, foram recolhidas fórmulas infantis, produzidas na China e contaminadas com melamina e *Cronobacter* spp. (IBFAN, 2008). Em 2009, o Serviço Nacional de Pesquisa Veterinária e Quarentena da Coréia do Sul informou que *Cronobacter* spp. haviam sido encontrados em 695 kg de fórmula infantil produzida pela indústria Maeil Dairies Co. que ainda não estavam disponíveis para venda.

1.11. Aspectos regulatórios

Em 2005, foi estabelecida na Europa, a nova regulamentação para fórmulas infantis. Esta legislação especifica a ausência de *Cronobacter* spp. em 30 amostras de 10 gramas de FID para bebês até 6 meses (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2005). O Codex Alimentarius, através do documento “Code Of Hygienic Practice For Powdered Formulae For Infants And Children” CAC/RCP 66-2008 Revisão 1 (FAO, 2008), estabelece os limites microbiológicos

para FID, e incorpora os mesmos critérios da União Européia. Entretanto, no Anexo II desse documento, referente às fórmulas de seguimento, especifica que as autoridades competentes dos países que considerarem que exista evidência científica de risco no que se refere a *Cronobacter* spp. pelo consumo de fórmulas de seguimento podem estabelecer outro critério microbiológico para esse alimento

A legislação brasileira em vigor, RDC nº 12 de 02/01/01 – ANVISA (BRASIL, 2001), que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos ainda não contempla o gênero *Cronobacter*. Para as fórmulas infantis, o limite para coliformes, em amostra indicativa (apenas uma amostra) é de 10 por grama. Em amostra representativa a tolerância é de $n=5$, $c=2$, $m<3$ e $M=20$, o que significa que na análise de cinco amostras de produto de um mesmo lote, duas amostras podem apresentar contagem de coliformes entre 3 e 20 por grama e as demais devem apresentar resultado inferior a três por grama do produto. Esses limites são ainda mais tolerantes do que os padrões anteriormente utilizados pelo Codex Alimentarius (CAC/RCP 21-1979 - FAO, 1994) para *Cronobacter* spp., que também considerava os critérios de coliformes, antes do documento mais recente (CAC/RCP 66-2008 Revisão 1 - FAO, 2008).

Dessa forma, é notória a necessidade de revisão da RDC nº 12 de 02/01/01 – ANVISA, com a inclusão dos limites para *Cronobacter* spp.

1.12. Isolamento e identificação de *Cronobacter* spp.

1.12.1. Métodos de detecção e enumeração através de cultivo

O primeiro método quantitativo para enumeração de *Cronobacter* spp. foi descrito por Muytjens e colaboradores (1988). Em 1997, Nazarowec-White e Farber modificaram esse método para determinar a incidência de *Cronobacter* em FID. O protocolo recomendado pelo USFDA (2002) para a detecção de *Cronobacter* spp. tem como base esses dois métodos (Figura 1). Nesse protocolo, a amostra é submetida a meios de cultura para o isolamento de enterobactérias e a seguir, cinco colônias presuntivas de *Cronobacter* spp. são semeadas em ágar tripticaseína de soja para detecção de pigmento amarelo. As culturas suspeitas são submetidas à confirmação bioquímica no sistema miniaturizado API 20E da bioMèrieux. Entretanto, esse protocolo não é específico para *Cronobacter* spp. e requer uma semana para a identificação final dos micro-organismos.

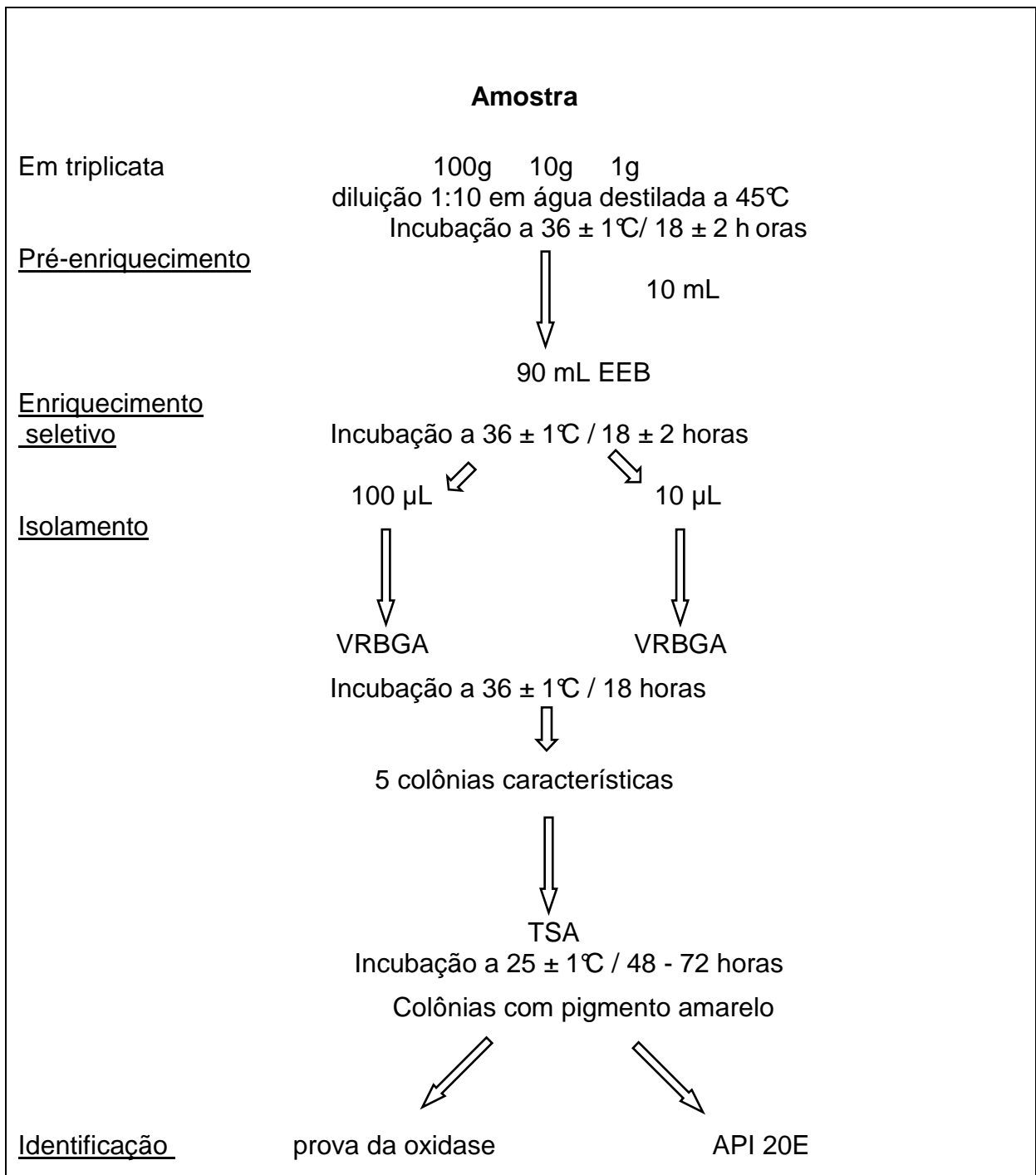


Figura 1 - Representação esquemática da metodologia USFDA (2002). EEB = caldo de enriquecimento para enterobactérias; VRBGA = ágar glicose vermelho violeta; TSA = ágar tripticaseína de soja.

A metodologia recomendada pela *International Organization for Standardization* (ISO) e pela *International Dairy Federation* (IDF) para o isolamento de *Cronobacter* spp. a partir de fórmulas desidratadas à base de leite é mais específica (ISO/TS, 2006) (Figura 2). Utiliza como enriquecimento seletivo o caldo lauril sulfato de sódio modificado com vancomicina (mLST/v), que foi desenvolvido com base na resistência osmótica de *Cronobacter* spp. Além disso, esse meio de cultura é incubado a 44°C, considerando a característica de termotolerância desses micro-organismos. A seguir, é empregado o ágar cromogênico para o isolamento de *E. sakazakii* (ESIA; AES Chemunex) com incubação a 45°C. A identificação é feita através de um conjunto de provas bioquímicas convencionais ou kits de identificação. Entretanto, existem vários relatos de cepas de *Cronobacter* spp. que não apresentam crescimento caldo mLST/v (GUILLAUME-GENTIL et al., 2005; LEHNER et al., 2006a; IVERSEN & FORSYTHE, 2007; FOX & JORDAN, 2008). De acordo com Iversen & Forsythe (2007) e Druggan & Iversen (2009), os métodos de cultivo até então usados para o isolamento e identificação presuntiva de *Cronobacter* spp. não são confiáveis e necessitam ser melhorados.

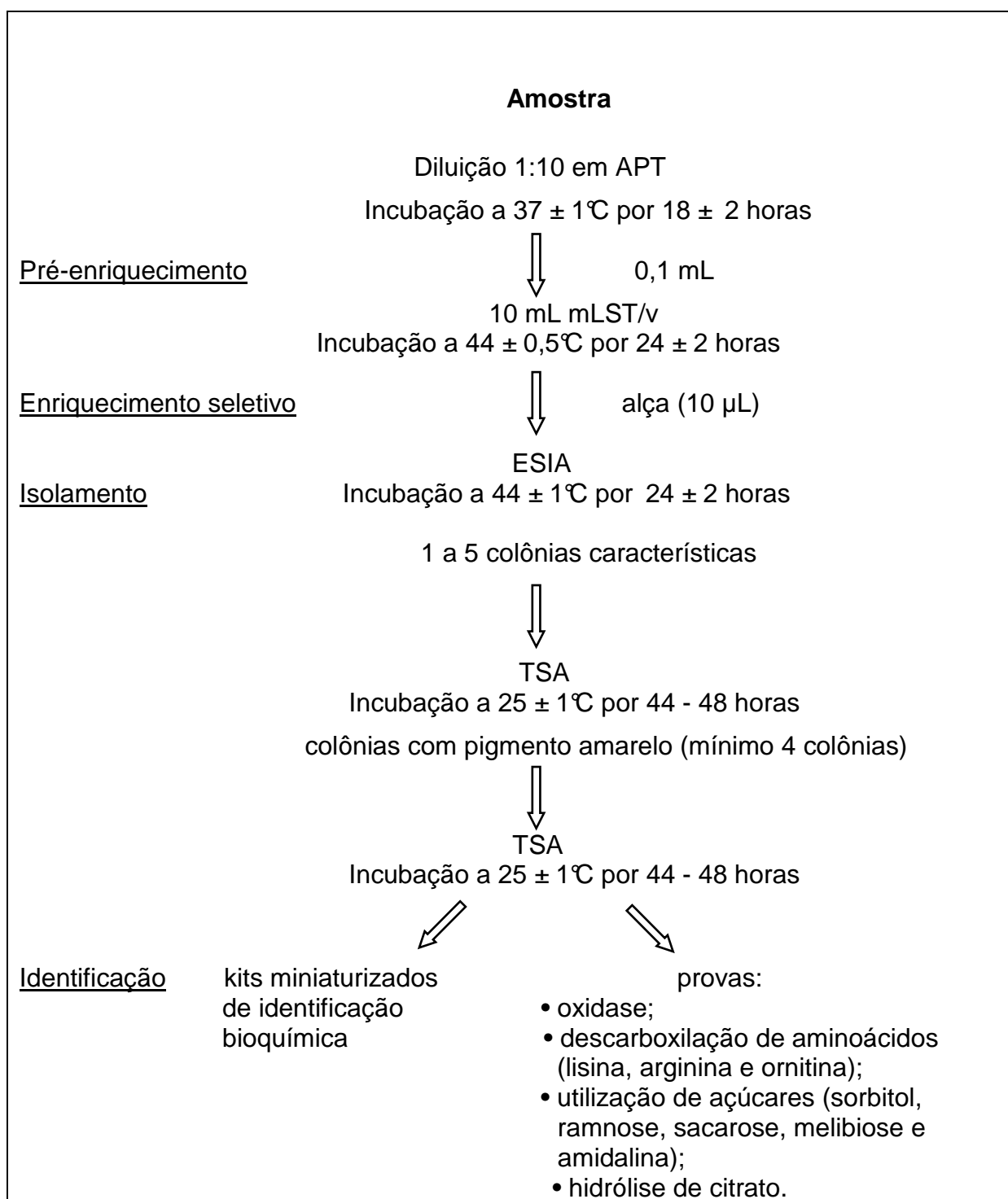


Figura 2 - Representação esquemática da metodologia ISO / TS 22964 (2006). APT = água peptonada tamponada; mLST/v = caldo LST modificado com vancomicina; ESIA = ágar cromogênico para o isolamento de *E. sakazakii*; TSA = ágar tripticaseína de soja.

Muytjens e colaboradores (1984) relataram que todas as cepas de *Cronobacter* spp. apresentam atividade de α -glicosidase. Com base nessa importante característica, vários meios de cultura cromogênicos e seletivos foram desenvolvidos com o objetivo de aperfeiçoar o isolamento de *Cronobacter* spp.

O primeiro meio cromogênico disponibilizado comercialmente para o isolamento desses patógenos foi o ágar cromogênico para o isolamento de *E. sakazakii* (ESIA) da marca AES Chemunex, cuja formulação foi publicada na ISO / TS 22964. Esse meio apresenta uma concentração relativamente baixa de peptona quando comparado a meios de cultura como o TSA (DRUGGAN & IVERSEN, 2009). Contém o cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α ,D-glicopiranosídeo (X α Glc) e desoxicolato de sódio e cristal violeta como agentes seletivos, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas (DRUGGAN & IVERSEN, 2009). Além disso, o meio é incubado a 45°C para inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas termotolerantes (DRUGGAN & IVERSEN, 2009).

O ágar *Brilliance E. sakazakii* (formulação Druggan, Forsythe e Iversen - DFI) foi desenvolvido pela Oxoid. Essa formulação utiliza o meio TSA como base de nutrientes, o cromógeno X α Glc e um sistema de detecção de sulfeto de hidrogênio para diferenciar *Cronobacter* spp. de cepas de *Proteus* spp. com fraca atividade de α -glicosidase (DRUGGAN & IVERSEN, 2009). Esse meio é incubado a 37°C para garantir o crescimento de cepas de *Cronobacter* spp. que não apresentam termotolerância (DRUGGAN & IVERSEN, 2009).

O ágar *Enterobacter sakazakii* *Plating Medium* (ESPM) é um meio cromogênico comercializado por R&F Products Inc. que também utiliza X α Glc como cromógeno. Os autores, Restaino e colaboradores (2006), incluíram ainda o trissacarídeo análogo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β ,D-glicopiranosídeo- β ,D-glicopiranosídeo. O segundo composto cromogênico foi incluído com o objetivo de aumentar a sensibilidade do meio, visando detectar as poucas cepas de *Cronobacter* spp. que apresentam baixa atividade de hidrólise de X α Glc (RESTAINO et al., 2006). Além disso, o ESPM contém vermelho de fenol como indicador de pH e os carboidratos adonitol, D-arabitol e sorbitol (Restaino et al., 2006).

Outros meios de cultura cromogênicos e meios fluorogênicos comercialmente disponíveis não foram abordados nesse trabalho porque não estão relacionados às metodologias oficiais para o isolamento de *Cronobacter* spp.

1.12.2. Métodos fenotípicos para a identificação de *Cronobacter* spp.

Os kits de identificação comercialmente disponíveis tem sido empregados, rotineiramente, na análise clínica e microbiológica para a identificação de bactérias das mais variadas origens. Entretanto, a precisão e a confiabilidade desses kits para a identificação de *Cronobacter* spp. tem sido questionadas através de relatos de resultados falso-positivos e falso-negativos (IVERSEN et al, 2007a; RESTAINO et al., 2006). Além disso, o único kit que atualmente inclui a taxonomia de *Cronobacter* spp. é o *Gen III Identification plates* (Biolog) (HEALY, 2010).

1.12.3. Métodos moleculares de detecção e identificação

A diversidade genética dentre as cepas de *Cronobacter* spp. sugere que os procedimentos que empregam métodos fenotípicos não sejam totalmente confiáveis. Assim, para garantir a identificação correta dos micro-organismos e minimizar o risco da contaminação por *Cronobacter* spp. em FID e tornar a detecção do patógeno mais rápida, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos. Dentre eles destacam-se os métodos moleculares que utilizam protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR) tendo como alvo diferentes genes: *dnaG* (SEO & BRACKETT, 2005), *gluA* (IVERSEN et al., 2007b), *ompA* (MOHAN NAIR & VENKITANARAYANAN, 2006) e regiões V1-V3 do gene de 16S rRNA (HASSAN et al., 2007), espaçadora interna de transcrição (ITS) de 16S-23S rRNA (LIU et al., 2006). Dentre esses métodos, dois foram testados com um grande número de cepas: o protocolo com alvo no gene *dnaG* e o protocolo com alvo em *gluA*. O ensaio quantitativo de PCR em tempo real desenvolvido por Seo e Brackett tem como alvo um segmento interno de 78 pares de base (pb) do gene *dnaG*, presente no *operon* de síntese macromolecular. O protocolo de PCR com alvo no gene *gluA* (IVERSEN et al., 2007b) amplifica dois fragmentos (105 pb e 1680 pb) do gene que codifica a enzima α -glicosidase.

Existem também sistemas comerciais para a detecção de *Cronobacter* spp. que empregam a tecnologia da PCR, como o BAX (Dupont) ou que utilizam métodos de imunoseparação como Pathatrix da Matrix MicroScience. Entretanto, esses sistemas ainda não incluem a taxonomia de *Cronobacter* spp.

1.12.4. Perspectivas de novas metodologias

As pesquisas com o objetivo de melhorar os métodos de isolamento e identificação de *Cronobacter* spp. continuam. Atualmente, o US-FDA está validando um novo procedimento que incorpora meios de cultura desenvolvidos especificamente para o isolamento de *Cronobacter* spp. Esse método utiliza os meios cromogênicos *Brilliance Enterobacter Sakazakii* Ágar (formulação DFI; Oxoid) e o *Enterobacter Sakazakii Plating Medium* (ESPM; R&F Products Inc.) além do ensaio de PCR em tempo real desenvolvido por Seo e Brackett e o kit RAPID ID 32E (bioMérieux). O protocolo de PCR tem aplicação bi-funcional: é usado na etapa de triagem e na confirmação de culturas suspeitas de *Cronobacter* spp. O tempo total de análise varia de um a dois dias, dependendo da população, do estado fisiológico das células além dos micro-organismos competidores presentes na FID. Esse protocolo já ultrapassou a etapa de estudo pré-colaborativo da *Association of Official Methods of Analysis* (AOAC) e se encontra em processo de validação para inclusão no Manual de Análise Bacteriológica (BAM) do FDA (LAMPEL & CHEN, 2009).

Em paralelo, a ISO em conjunto com o *European Committee for Standardization* (CEN) também estão preparando um padrão horizontal para a detecção de *Cronobacter* spp. Uma rede de dez laboratórios avaliou os meios de cultura disponíveis utilizando 670 amostras. Encontra-se em fase de elaboração um rascunho internacional padrão (*Draft International Standard*; DIS) baseado em um procedimento que reúne o caldo de triagem para *Cronobacter* spp. (*Cronobacter* spp. *Screening Broth*; CSB) e o isolamento em ágar cromogênico. Se aprovado, o protocolo deverá ser submetido a ensaios colaborativos para a avaliação do seu desempenho. A previsão de publicação do padrão horizontal final está prevista para 2012 (DRUGGAN & IVERSEN, 2009).

1.13. Considerações finais

Em resumo, é de extrema importância para a saúde pública e para a vigilância sanitária que se minimize a contaminação por *Cronobacter* spp. nas FID. Os esforços com foco em *Cronobacter* spp. tem reunido pesquisadores, especialistas de indústrias e diferentes esferas dos governos de países de todo o mundo. Entretanto, apesar da diminuição do número de casos de infecção de neonatos por *Cronobacter* spp. ainda existem relatos recentes como os casos do Novo México (USA; CDC, 2009), Illinois (USA; ENTEROBACTERSAKAZAKII BLOG, 2008) e Japão (TERAMOTO, 2010).

Por outro lado, algumas indústrias, de porte internacional, que produzem FID sofreram grande prejuízo econômico ao fazerem o recolhimento de vários lotes de produtos contaminados com esses patógenos. Essas indústrias vem efetuando rigoroso controle durante as etapas de produção, incluindo o monitoramento intensivo do ambiente das fábricas. Entretanto, esses esforços não tem sido suficientes para eliminar a contaminação por *Cronobacter* spp. A utilização de métodos confiáveis no isolamento e identificação desses micro-organismos é imprescindível nas atividades de monitoramento e controle.

A literatura científica tem relatado diferenças no comportamento dos isolados de *Cronobacter* spp. (TOWSEND et al., 2008), sinalizando que talvez nem todos apresentem o mesmo potencial patogênico o que justifica um estudo mais detalhado sobre esses micro-organismos, utilizando cepas de diferentes espécies e origens.

A proposta apresentada neste trabalho visa avaliar os meios de cultura e sistemas de identificação atualmente disponíveis para *Cronobacter* spp. assim como pesquisar, em cepas de *Cronobacter* spp., propriedades associadas à virulência, já reconhecidas dentre outros membros da família *Enterobacteriaceae* mas ainda pouco claras para *Cronobacter* spp.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Classificar isolados e cepas de referência nas espécies de *Cronobacter* spp., através de métodos fenotípicos e moleculares e avaliar o potencial de patogenicidade dessas cepas através da pesquisa de fatores de virulência presentes em outros membros da família *Enterobacteriaceae*.

2.2. Objetivos específicos

- a. Classificar isolados previamente identificados como *E. sakazakii* / *Cronobacter* spp. e confirmar a classificação das cepas de referência nas espécies do gênero *Cronobacter*;
- b. Avaliar diferentes métodos, fenotípicos e moleculares, para a identificação de *Cronobacter* spp.;
- c. Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Cronobacter* spp. frente a antimicrobianos;
- d. Avaliar o potencial de patogenicidade dos isolados e cepas de referência de *Cronobacter* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Todos os meios de cultura e reagentes empregados pertencem à marca Merck (Darmstadt, Alemanha) exceto quando especificado.

3.1.1. Micro-organismos

Foram utilizadas 37 culturas de diferentes origens (isolados de fonte clínica, FID, ambiente de fábrica de FID e manipuladores de FID) compreendendo cepas de referência de *Cronobacter* spp. e micro-organismos previamente identificados como *E. sakazakii* / *Cronobacter* spp. Pelo menos um representante de cada espécie foi incluído. A Tabela 1 apresenta a relação das cepas estudadas e suas respectivas origens. Dezenove cepas de referência, de espécies frequentemente identificadas, de forma equivocada, como *Cronobacter* spp. foram utilizadas como controle negativo nos ensaios de PCR (Tabela 2).

A cepa de *E. coli* enteroagregativa EAEC 042 (NATARO et al., 1985), gentilmente cedida pela Professora Ângela Corrêa F. Almeida e Professora Mara L. P. Queiroz da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), foi utilizada como controle positivo nos ensaios de biofilme.

A cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 17-2 sorotipo O:3H2 (NATARO et al., 1985), cedida pela Professora Ângela Corrêa F. Almeida e Professora Mara L. P. Queiroz da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ), foi empregada como controle positivo nos ensaios de hemaglutinação.

Os ensaios de citotoxicidade para células Vero empregaram a cepa de *E. coli* EHEC ATCC 43895 / INCQS 00171 como controle positivo e a cepa de *E. coli* C600 ATCC 23724 / INCQS 00048 como controle negativo.

No ensaio quantitativo de invasão *Salmonella* Enteritidis INCQS P3440 foi utilizada como controle positivo e a cepa *E. coli* C600 foi utilizada como controle negativo.

Os micro-organismos foram cultivados em placas contendo ágar nutriente e incubados a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. A seguir, o crescimento de cada placa foi recolhido com o auxílio de uma alça de Drigalwsky e transferido para tubos de criopreservação contendo caldo infuso de cérebro e coração (BHI) adicionados de 20% de glicerol (v/v) e estocados à temperatura de $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento do uso.

Para a realização dos ensaios, as culturas criopreservadas foram semeadas em ágar nutriente, incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas e posteriormente transferidas para caldo BHI, com exceção de casos de utilização de outro procedimento, descrito especificamente no item do ensaio. Para uso nos ensaios, as culturas foram mantidas entre 2 a 8°C em ágar nutriente.

3.1.2. Linhagens celulares

Os ensaios de citotoxicidade, associação e invasão celular empregaram a linhagem celular Vero ATCC CCL81 oriunda de rim de macaco verde africano.

Tabela 1 – Origem das culturas bacterianas estudadas

Laboratório de origem	Código original	Identificação original	Fonte	Identificação final
UCD ^a	CDC 1058-77	<i>C. malonaticus</i> (T) ^b	Clínica (abscesso de seio)	<i>Cronobacter malonaticus</i>
UCD	3032	<i>C. turicensis</i> (T)	Clínica (meningite neonatal)	<i>Cronobacter turicensis</i>
UCD	E922	<i>C. sakazakii</i>	Clínica (secreção bronquial)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UCD	E785	<i>C. sakazakii</i>	Clínica (neonato)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UCD	CDC 996-77	<i>C. sakazakii</i>	Clínica (liquor)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UCD	CDC 3128-77	<i>C. sakazakii</i>	Clínica (escarro)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UCD	SK90	<i>C. sakazakii</i>	Clínica (criança)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
INCQS ^c	597(ATCC ^d 29544)	<i>C. sakazakii</i> (T)	Clínica (orofaringe infantil)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UERJ ^e	A1	<i>E. sakazakii</i>	Clínica	<i>Enterobacter cloacae</i>
IOC ^f	D2	<i>E. sakazakii</i>	Clínica	<i>Enterobacter cloacae</i>
IOC	501M	<i>E. sakazakii</i>	Clínica	<i>Enterobacter cloacae</i>
IOC	8F	<i>E. sakazakii</i>	Clínica	NC ^g
IOC	57 L	<i>E. sakazakii</i>	Clínica	<i>Enterobacter gergoviae</i>
INCQS	583 (ATCC BAA 894)	<i>C. sakazakii</i>	Clínica	<i>Cronobacter sakazakii</i>
HCSC ^h	HPB 2871	<i>C. sakazakii</i>	FID ⁱ	<i>Cronobacter sakazakii</i>
USP ⁱ	2A	<i>E. sakazakii</i>	FID	<i>Cronobacter malonaticus</i>
USP	4A	<i>E. sakazakii</i>	FID	<i>Cronobacter sakazakii</i>
HCSC	HPB 2875	<i>E. sakazakii</i>	FID	<i>Cronobacter sakazakii</i>
HCSC	HPB 2876	<i>E. sakazakii</i>	FID	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UCD	E782	<i>C. sakazakii</i>	FID	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UCD	CFS 10	<i>C. sakazakii</i>	Matéria prima (caseína ácida)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
USP	3A	<i>E. sakazakii</i>	Ambiental (lactário)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UCD	CFS 237	<i>C. dublinensis</i> (T)	Ambiental (fábrica de FID)	<i>Cronobacter dublinensis</i>
UCD	CFS 101	<i>C. sakazakii</i>	Ambiental (fábrica de FID)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UCD	NCTC 9529	<i>C. genomoespecie 1</i> (T)	Ambiental (água)	<i>Cronobacter genomoespecie 1</i> (T)

Continua

Continuação da **Tabela 1.**

Laboratório de origem	Código original	Identificação original	Fonte	Identificação final
USP	5A	<i>E. sakazakii</i>	Ambiental (lactário)	<i>Enterobacter cloacae</i>
USP	N1	<i>E. sakazakii</i>	Ambiental (fábrica de FID)	<i>Enterobacter helveticus</i>
FUNED ^k	1390	<i>E. sakazakii</i>	Utensílio (bico de mamadeira)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
UERJ	M1	<i>E. sakazakii</i>	Mão de manipulador	<i>Enterobacter</i> spp.
UERJ	M3	<i>E. sakazakii</i>	Mão de manipulador	<i>Enterobacter</i> spp.
UERJ	M12	<i>E. sakazakii</i>	Mão de manipulador	<i>Enterobacter</i> spp.
HCSC	HPB 2887 - CDC A8	<i>E. sakazakii</i>	Desconhecida	<i>Enterobacter</i> spp.
HCSC	HPB 2891 - CDC B3	<i>E. sakazakii</i>	Desconhecida	<i>Enterobacter</i> spp.
IOC	IOC - PC	<i>E. sakazakii</i>	Desconhecida	<i>Cronobacter sakazakii</i>
INCQS	579 (ATCC 51329)	<i>C. muytjensii</i>	Desconhecida	<i>Cronobacter muytjensii</i>
INCQS	115 (ATCC 29004)	<i>C. sakazakii</i>	Desconhecida	<i>Cronobacter sakazakii</i>
INCQS	580 (ATCC 12868)	<i>C. sakazakii</i>	Desconhecida	<i>Cronobacter sakazakii</i>

^a -S. Fanning, Centre for Food Safety, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Irlanda; ^b – cepa tipo; ^c – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; ^d - American Type Culture Collection; ^e -A. C. F. Almeida & M. L. P. Queiroz, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil; ^f - M. D. Asensi, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil; ^g - Não classificada; ^h - F. Pagotto, Health Products and Food Branch, Health Canada, Ottawa, Canadá; ⁱ - Fórmula Infantil Desidratada; ^j - M. T. Destro, Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade de São Paulo, Brasil; ^k - M. C. C. Silva, Laboratório Central de Saúde Pública, Minas Gerais, Brasil.

Tabela 2 – Cepas de referência utilizadas como controle negativo dos ensaios moleculares.

Código do INCQS	Código Original	Micro-organismo
00073	ATCC ^a 8090	<i>Citrobacter freundii</i>
00145	ATCC 13048	<i>Enterobacter aerogenes</i>
00146	ATCC 23355	<i>Enterobacter cloacae</i>
00074	ATCC 23355	<i>Enterobacter cloacae</i>
00586	CDC ^b 6453	<i>Enterobacter gergoviae</i>
00310	ATCC 11775	<i>Escherichia coli</i>
00033	ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
00507	CCT ^c 0182/CIP ^d 79.32	<i>Klebsiella oxytoca</i>
00083	ATCC 4352	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
00147	ATCC 13883	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
00201	ATCC 14029	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
00332	ATCC 29906	<i>Proteus mirabilis</i>
00106	ATCC 13315	<i>Proteus vulgaris</i>
00323	ATCC 29944	<i>Providencia rettgeri</i>
00113	ATCC 15175	<i>Pseudomonas putida</i>
00028	ATCC 10708	<i>Salmonella Choleraesuis</i>
00258	ATCC 13076	<i>Salmonella</i> Enteritidis
00150	ATCC 14028	<i>Salmonella</i> Typhimurium
00100	ATCC 13880	<i>Serratia marcescens</i>

^a - American Type Culture Collection; ^b - Centers for Disease Control; ^c - Coleção de Culturas Tropical; ^d - Collection de l'Institut Pasteur

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da curva de crescimento de *Cronobacter* (ATCC 29004)

Foram realizados dois experimentos para o estudo da curva de crescimento da cepa ATCC 29004. Os procedimentos realizados foram semelhantes, com exceção do tempo de leitura.

A cepa foi cultivada em caldo BHI, incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas e a seguir, 1 mL do cultivo foi submetido à centrifugação (centrífuga 5415 D - Eppendorf; Hamburgo, Alemanha) a $9.300 \times g$ por 3 minutos. O sedimento foi ressuspenso em

2,5 mL de tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2. Após ajuste, com PBS, para turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foram realizadas diluições seriadas em PBS e uma alíquota de 1 mL foi transferida para erlenmeyer contendo 99 mL de caldo BHI (diluição 1:100.000). A partir desta suspensão foi retirada alíquota de 1 mL para centrifugação a $9.300 \times g$ por 3 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 2,5 mL de PBS e após determinação da turvação, foi realizada semeadura de 1 mL, em duplicata, em profundidade, em ágar padrão para contagem (APC) com o objetivo de determinar o inóculo inicial. A suspensão em caldo BHI foi mantida em estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sem agitação. No primeiro experimento, foram retiradas alíquotas da cultura para semeadura e enumeração em ágar APC a cada 20 minutos por até 4 horas e a seguir foram retiradas alíquotas com 8 e 24 horas de incubação. No segundo experimento, as alíquotas foram retiradas a cada hora por até 12 horas e ao completar 24 horas. As colônias foram contadas e a população expressa em UFC/mL.

3.2.2. Identificação de *Cronobacter* spp. através de métodos moleculares

3.2.2.1. Desenvolvimento de uma PCR qualitativa para detecção de *Cronobacter* spp.

Foram utilizados nesse estudo os micro-organismos relacionados nas tabelas 1 e 2.

Os iniciadores desenhados por Seo & Bracket (2005) (Tabela 3) para a detecção de *dnaG* por PCR em tempo real foram utilizados no desenvolvimento de um novo protocolo de PCR qualitativo convencional, conforme apresentado a seguir.

Os iniciadores, as polimerases e outros reagentes empregados nos ensaios de PCR foram adquiridos pela Invitrogen Corp. (USA) Após eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g/ml}$ - Sigma) por 45 minutos. As imagens foram digitalizadas através de sistema de vídeo documentação e analisadas com o auxílio do programa ImageMaster (Image Master® VDS – Fuji Film / Thermal Imaging System FTI-500 / Pharmacia Biotech). Todos os experimentos foram repetidos, pelo menos, em dois ensaios independentes.

3.2.2.1.1. Preparo dos moldes de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada através da técnica descrita por Kothary e colaboradores (2007) com algumas modificações. As culturas criopreservadas foram semeadas, pela técnica de esgotamento, em placas contendo ágar tripticaseína de soja (TSA; Difco) e incubadas a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Uma colônia de cada cultivo foi transferida para tubo contendo 5 mL de caldo BHI e os tubos foram mantidos a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação a 150 rpm (Orbit-Shaker, Lab-Line, Illinois, USA), até a obtenção de turvação equivalente a 2 da escala de MacFarland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL, conforme determinado em 3.2.1). A seguir, 2 mL de cada cultura foram submetidos à centrifugação (centrífuga 5415 D - Eppendorf) a $6.000 \times g$ durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 500 μL de água purificada estéril, aquecido a 100°C (Dri-bath type 17600, Barnstead, Thermolyne, IA, USA) durante 15 minutos, resfriado rapidamente a -20°C e mantido nesta temperatura até o momento do uso.

As cepas de referência de *Cronobacter* spp. relacionadas na tabela 1 foram utilizadas como controle positivo. As cepas relacionadas na tabela 2 e a mistura de reação contendo água em substituição ao DNA foram utilizadas como controle negativo.

3.2.2.1.2. Protocolo para PCR qualitativo convencional para detecção do gene *dnaG*

A mistura de reação foi composta por 5 pmol de cada iniciador (Tabela 3); 100 μM de cada dNTP; tampão *Taq* polimerase (1x) (10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl); 2,0 mM de MgCl_2 ; 2 U de *Taq* DNA polimerase e 3 μL de DNA molde preparado conforme 3.2.2.1 e água purificada estéril suficiente para 50 μL .

A mistura foi submetida à desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C durante 30 segundos e extensão final a 72°C por 4 minutos termociclador PTC – 200 (Peltier Thermal Cycler, MA, USA). Uma alíquota de 8 μL de cada reação de PCR foi aplicada a gel de agarose (Sigma) a 2% (p/v) em tampão Tris-EDTA (TAE) (Invitrogen), e submetida à eletroforese a 80 V (PowerPac Basic/Bio-Rad, CA, USA) em tampão TAE. Como marcador de peso molecular utilizou-se o TrackIt 50 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse estudo.

Gene alvo	Iniciador	Comprimento do fragmento	Sequencia (5'- 3')	Referências
<i>dnaG</i>	<i>dnaGf</i>	78 bp	GGG ATA TTG TCC CCT GAA ACA G	Seo e Brackett, 2005
	<i>dnaGr</i>		CGA GAA TAA GCC GCG CAT T	
V1/V3	Saka – 1a	952 pb	ACA GGG AGC AGC TTG CTG C	Hassan et al., 2007
	Saka - 2b		TCC CGC ATC TCT GCA GGA	
<i>gluA</i>	<i>EsAgf</i>	1.680 pb	TGA AAG CAA TCG ACA AGA AG	Lehner et al., 2006
	<i>EsAgr</i>		ACT CAT TAC CCC TCC TGA TG	
	<i>EsAg5f</i>	105 pb	TAT CAG ATC TAC CCG CGC	Iversen et al., 2007
	<i>EsAg5_5r</i>		TTG ATG CCA AGC TGT TGC	

3.2.2.2. Protocolo de PCR para detecção das regiões hipervariáveis V1/V3 do gene de 16S rRNA

Esse protocolo foi desenvolvido por Hassan et al. (2007) e visa a amplificação de um fragmento de 952 pb da região V1/V3 do gene de 16S rRNA empregando os iniciadores Saka-1a e Saka-2b (Tabela 3).

As reações de PCR foram realizadas em volume total de 30 µl. A mistura de reação foi composta de: 10 pmol de cada iniciador (Tabela 3); 100 µM de cada dNTP; tampão *Taq* polimerase (1x) (10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl₂; e 1 U de *Taq* DNA polimerase e 2,5 µl de DNA molde (3.2.2.1.1). As condições da reação foram: desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C/60 seg, 50°C/60 seg, 72°C/90 seg e extensão final a 72°C por 4 minutos em termociclador PTC – 200. Dez microlitros dos produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (PowerPac Basic/Bio-Rad) em gel de agarose (Sigma) a 2% (p/v) a 120 V em tampão TAE (Invitrogen). Como marcador de peso molecular empregou-se o TrackIt 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA).

3.2.2.3. Protocolo para PCR para detecção do gene *gluA*

A detecção do gene *gluA* foi realizada empregando dois protocolos para a amplificação de dois fragmentos, sendo um com 1.680 pb e o outro com 105 pb.

3.2.2.3.1. Detecção do fragmento de 1680 pb

Foi utilizado o protocolo desenvolvido por Lehner et al. (2006). As reações de PCR foram realizadas em volume total de reação de 50 µl e a mistura de reação foi composta de 5 pmol de cada iniciador; 100 µM de cada dNTP; 2,0 mM de MgCl₂; tampão *Taq* polimerase (1x) (10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl); 2 U de *Taq* polimerase e 3 µl de DNA molde (3.2.2.1.1). Os iniciadores utilizados foram EsAgf e EsAgr (Tabela 3).

As condições da reação foram 94°C durante 2 minutos, seguida de 29 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 58°C por 60 segundos, 72°C durante 90 segundos e alongamento final a 72°C por 5 minutos em termociclador PTC – 200). A eletroforese foi realizada conforme apresentado em 3.2.2.1.2 e um marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt 100 bp DNA Ladder, Invitrogen, USA).

3.2.2.3.2. Detecção do fragmento de 105 pb

Os ensaios foram realizados conforme descrito por Iversen et al. (2007), empregando o protocolo semelhante ao descrito para o fragmento de 1680 pb, com emprego dos iniciadores EsAg5f e EsAg5_5r (Tabela 3), e anelamento a 62°C/30 seg e extensão a 72°C/30 seg. A eletroforese foi realizada conforme apresentado em 3.2.2.1.2 com o marcador de 50 pb TrackIt 50 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA).

3.2.3. Avaliação do comportamento dos isolados e das cepas de referência de *Cronobacter* spp. frente à metodologia ISO / TS 22964:2006 original e modificada

3.2.3.1. Pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e isolamento em meios cromogênicos

As 37 culturas (Tabela 1) foram semeadas em solução peptonada tamponada (APT) e incubadas a 37 ± 1°C durante 18 ± 2 horas (pré-enriquecimento). Após esse período, volumes de 0,1 mL de cada cultivo foram transferidos para tubos com 10 mL de caldo lauril sulfato triptose modificado (contendo NaCl a 0,5 M) com vancomicina (Sigma) (concentração final de 10µg/ml de caldo mLST) (mLST/v).

Após incubação a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas (enriquecimento seletivo), as culturas foram semeadas, por esgotamento, na superfície dos seguintes meios cromogênicos: *Enterobacter Sakazakii Isolation Agar* (ESIA; AES Chemunex), *Brilliance Enterobacter Sakazakii Agar* (formulação Druggan-Forsythe-Iversen) (DFI; Oxoid) e *Enterobacter Sakazakii Plating Medium* (ESPM; R&F Products Inc.). As placas contendo ESIA foram incubadas a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 horas. As placas de DFI e ESPM foram mantidas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

3.2.3.2. Avaliação da eficiência da etapa de enriquecimento seletivo

Todas as culturas (Tabela 1) foram submetidas a cultivo em LST e mLST com e sem vancomicina incubados a 35°C e 44°C . Uma alíquota de cada tubo de enriquecimento seletivo foi semeada, por esgotamento, na superfície dos meios cromogênicos, conforme descrito no item 3.2.4.1 (Figura 3).

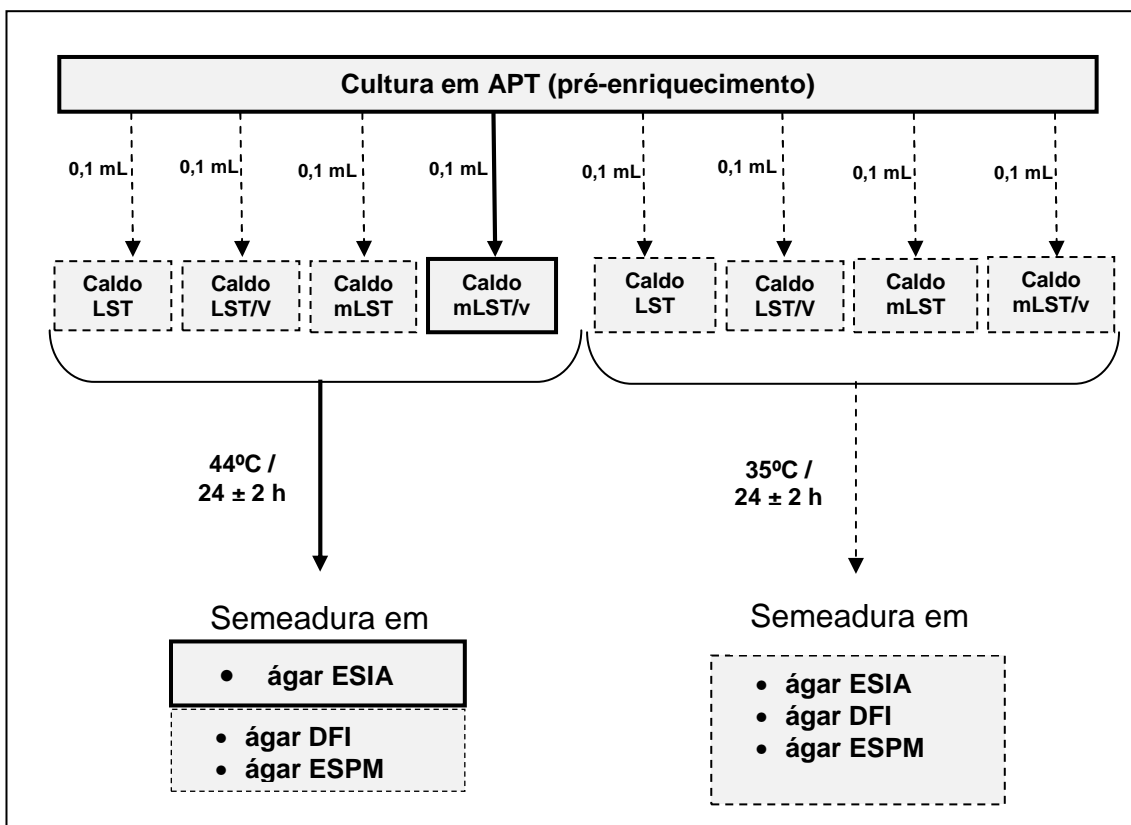


Figura 3 – Protocolo da metodologia ISO/ TS 22964:2006 original (linha contínua) e modificado (linha tracejada) para estudo de culturas que não apresentaram crescimento na etapa de enriquecimento seletivo da norma original. Etapas de enriquecimento seletivo e semeadura em meios cromogênicos. APT - solução peptonada tamponada; LST - caldo lauril sulfato triptose; mLST - caldo lauril sulfato triptose contendo NaCl a 0,5 M; mLST/v - caldo lauril sulfato triptose contendo NaCl a 0,5 M e vancomicina (concentração final de $10\mu\text{g}/\text{mL}$); ESIA - *Enterobacter Sakazakii Isolation Agar*, DFI - *Brilliance Enterobacter Sakazakii Agar*, ESPM - *Enterobacter Sakazakii Plating Medium*.

3.2.3.3. Produção e detecção de pigmento amarelo

Cerca de três colônias típicas e atípicas (na ausência de colônias típicas) obtidas em ágar ESIA (verde a verde-azuladas), em ágar DFI (turquesas) e ágar ESPM (azul-enegrecidas ou azul-acinzentadas com ou sem halo de clareamento do meio) foram semeadas, por esgotamento, na superfície de placas contendo TSA (Difco). Após incubação a 25°C durante 44 a 48 horas os crescimentos foram examinados quanto à presença de pigmento amarelo. As placas foram mantidas a 25°C por 72 horas adicionais, sob iluminação. Ao final desse período foram novamente examinadas para a detecção de pigmento amarelo.

3.2.4. Caracterização fenotípica

3.2.4.1. Identificação bioquímica convencional segundo Farmer et al. (1980) e Iversen et al. (2006)

Inicialmente, as culturas (tabela 1) foram semeadas em ágar nutriente, incubadas a 35°C / 24 ± 2 horas e submetidas à coloração de Gram e à prova da produção de oxidase, utilizando tiras de papel de filtro impregnado com solução a 1% (p/v) do reagente N-N dimetil,1-4 fenilamida dicloridrato com leitura após um minuto. Foi avaliado o comportamento das culturas em ágar três açúcares ferro (TSI), em ágar lisina ferro (LIA) e meio de SIM após 24 horas de incubação a 37°C. Todas as culturas bacterianas foram submetidas às provas relacionadas a seguir, com incubação a 30°C por até 7 dias, com exceção dos casos indicados. As provas de produção de ácido a partir de carboidratos (D-sacarose, D-melibiose, D-sorbitol, D-celobiose, L-ramnose, maltose, lactose, xilose, adonitol, mio-inositol, dulcitol, manitol e metil- α -D-glicopiranosídeo) foram realizadas em base de caldo vermelho de fenol com adição de solução de carboidrato esterilizada por filtração para concentração final de 0,5%. As provas de descarboxilação de aminoácidos (lisina, arginina e ornitina) foram realizadas em caldo base de Moeller (Difco) com adição de solução de cada aminoácido esterilizada por filtração. A produção de gás a partir da fermentação de glicose foi detectada em tubo de Durham em base de caldo vermelho de fenol. As culturas foram ainda submetidas às provas de oxidação/fermentação da glicose, hidrólise da uréia, utilização do citrato como única fonte de carbono, utilização do malonato, VM-VP e redução do nitrato.

3.2.4.2. Identificação através de sistemas miniaturizados comerciais

3.2.4.2.1. Kit API 20E (bioMérieux, França)

Foi adotado o procedimento recomendado pelo fabricante. Suspensões bacterianas em solução salina 0,85% (p/v), com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foram preparadas a partir de crescimento em ágar nutriente e as galerias foram inoculadas. Após incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 ± 2 horas e adição dos reagentes necessários a leitura dos resultados foi realizada e avaliada através do programa apiweb API 20E versão 4.1.

3.2.4.2.2. Kit ID 32E (bioMérieux)

As suspensões bacterianas foram preparadas conforme descrito no item 3.2.4.2.1 e inoculadas nas galerias conforme as instruções do fabricante. Após incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e adição de reagentes (bioMérieux), quando necessário, a leitura foi realizada através do programa apiweb ID 32E versão 3.0.

3.2.4.2.3. Sistema Vitek 32 (bioMérieux)

Os ensaios foram realizados empregando cartões “GNI plus”, segundo as instruções do fabricante, com suspensões bacterianas preparadas a partir de culturas de 24 horas em ágar sangue (base de ágar sangue adicionada de 5% de sangue desfibrinado de carneiro). As leituras foram realizadas através do software versão 5.1 em instalado em unidade de microcomputador acoplado ao sistema.

3.2.4.2.4. Determinação da atividade enzimática

O kit API ZYM (bioMérieux) foi utilizado para a comparação dos perfis enzimáticos das culturas. Foi adotado o procedimento recomendado pelo fabricante. Suspensões bacterianas em meio de suspensão API (bioMérieux), com turvação equivalente a 5 da escala de MacFarland ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), foram preparadas a partir de crescimento em ágar nutriente. As galerias foram inoculadas e incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 4 horas. Após a adição de reagentes (ZYM A e ZYM B), foi realizada a leitura, conforme as instruções do fabricante.

3.2.5. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos sistemas de caracterização fenotípica e identificação molecular

Sensibilidade e especificidade foram calculadas segundo Greenhalgh (1977) e considerando os resultados obtidos com a detecção do fragmento de 105 pb do gene *gluA* como padrão ouro.

Sensibilidade é definida como o número de verdadeiros positivos dividido pelo número de verdadeiros positivos somado ao número de falso negativos e é expressa em porcentagem. Especificidade é definida como a relação entre o número de verdadeiros negativos e a soma do número de falso-positivos com o número de verdadeiros negativos, e também é expressa em porcentagem (GREENHALGH, 1977).

3.2.6. Pesquisa de fatores de virulência

Esses estudos foram realizados empregando as 27 culturas que foram identificadas como *Cronobacter* spp. (tabela 1), com exceção dos ensaios de citotoxicidade em células Vero que utilizaram 12 cepas de *Cronobacter* spp. (3.2.6.7). A seleção das cepas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade teve como critério contemplar cada uma das espécies de *Cronobacter* de diferentes fontes de isolamento, com preferência a isolados de origem clínica.

3.2.6.1. Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

Foi utilizado o sistema Vitek 32 (bioMérieux) com cartões GNS 655, segundo as instruções do fabricante. Foram testadas as seguintes drogas: amicacina (AMI), ampicilina (AMP), ampicilina/sulbactam (SAM), aztreonam (ATM), cefepima (CPM), cefotaxima (CTX), cefoxitina (CFO), ceftazidima (CAZ), cefalotina (CFL), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), imipenem (IPM), meropenem (MER), piperacilina / tazobactam (PPT) e trimethoprim-sulfa (SXT).

3.2.6.2. Produção de cápsula

Foi empregada a metodologia descrita por Caubilla-Barron et al. (2007). Os isolados foram semeados em placas contendo ágar leite e as placas foram incubadas a 37°C por até 72 horas. As culturas foram avaliadas quanto à produção de cápsula por inspeção visual da morfologia colonial durante o período de incubação.

3.2.6.3. Produção e detecção de biofilme

Foi empregada a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2000) com algumas modificações. As culturas foram semeadas, por esgotamento, na superfície de placas contendo TSA. Após incubação a 37°C durante 24 horas, quatro colônias isoladas foram repicadas para tubos contendo 5 mL de caldo BHI. Os tubos foram incubados a 37°C durante 20 a 24 horas, sob agitação a 150 rpm (Orbit-Shaker, Lab-Line). A seguir, 200 µl de cada cultura foram transferidos, em triplicata, para 3 orifícios de uma placa estéril de poliestireno, de fundo chato, com 96 orifícios (Microtest™ 96 Falcon) sendo a placa foi incubada a 37°C durante 24 horas. Após incubação, o conteúdo de cada orifício foi aspirado e desprezado. Cada orifício foi lavado por três vezes com 200 µl de água purificada e a placa mantida durante 10 minutos, à temperatura de 37°C, para secagem. A seguir, foram adicionados a cada orifício 30 µl de solução de cristal violeta a 0,5% (p/v) e após 10 minutos, o conteúdo de cada orifício foi retirado com micropipeta (P-200 Gilson), desprezado e foi realizada nova série de lavagem com 200 µl de água purificada. A placa foi mantida durante 10 minutos à temperatura de 37°C, para secagem e a cada orifício foram adicionados 200 µl de etanol a 95%. Após período de 10 minutos, 150 µl de cada orifício foram transferidos para uma nova placa de poliestireno com 96 orifícios e a determinação da densidade ótica (D.O.) foi realizada (Bio-Tek Instruments, Inc., VT, USA) no comprimento de onda de 595 nm.

O experimento foi repetido por três vezes para cada cultura. A interpretação dos resultados foi realizada através da média das nove leituras de cada cultura.

Esse experimento também foi realizado empregando o caldo Luria Bertani (LB; Difco), em substituição ao caldo BHI.

Utilizou-se como controle positivo para o ensaio a cepa de *E. coli* 042 e como controles negativos os caldos BHI e LB, nos respectivos ensaios.

Foram considerados os seguintes parâmetros, descritos por Stepanovic et al. (2000) para a avaliação da produção de biofilme:

- Não aderente (NA): densidade ótica menor ou igual à densidade ótica do controle negativo $\Rightarrow D.O. \leq D.O.(CN)$
- Fracamente aderente (FA): densidade ótica maior do que uma vez o valor da densidade ótica do controle negativo mas, menor do que duas vezes a densidade ótica do controle negativo $\Rightarrow D.O.(CN) < D.O. < 2 \times D.O.(CN)$

- Moderadamente aderente (MA): densidade ótica maior do que duas vezes o valor da densidade ótica do controle negativo mas menor do que quatro vezes a densidade ótica do controle negativo $\Rightarrow 2 \times D.O.(CN) < D.O. < 4 \times D.O.(CN)$
- Fortemente aderente (FMA): densidade ótica maior do que quatro vezes a densidade ótica do controle negativo $\Rightarrow 4 \times D.O.(CN) < D.O.$

3.2.6.4. Atividade proteolítica

Esse ensaio foi realizado de acordo com Caubilla-Barron et al. (2007) utilizando o ágar leite modificado (Brown e Foster, 1970). Este meio sólido foi preparado através da mistura em igual volume, a 60°C, de solução a 20% de skim milk (Difco) autoclavada a 115°C por 5 minutos com uma solução estéril de ágar (Difco) a 4%. O meio foi distribuído em placas de Petri. As placas foram semeadas através de uma única estria a partir de cada cultura bacteriana e incubadas a 37°C por até 10 dias. Uma zona de clareamento ao redor do crescimento bacteriano indicou resultado positivo.

3.2.6.5. Atividade hemolítica

Os ensaios foram realizados em conjuntos de placas contendo base para ágar sangue adicionada de 5% de sangue desfibrinado de coelho, cavalo, carneiro ou cobaio. As placas foram semeadas através de uma única estria a partir de cada cultura bacteriana (24 horas em caldo BHI) e incubadas a 37°C durante 48 horas. Após o período de incubação, as culturas foram avaliadas quanto à formação de zona de hemólise (α , β ou γ hemólise).

3.2.6.6. Hemaglutinação

Foi empregada a metodologia descrita por OLD (1972), com algumas modificações. Foram utilizadas suspensões de eritrócitos (3%) de carneiro, cobaio, coelho e cavalo, com e sem adição de manose (1%) e com e sem tratamento com ácido tânico (Duguid, 1979). O sangue das diferentes espécies de animais foi fornecido pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (CECAL), através do Serviço de Animais de Laboratório (SAL) do INCQS.

Foram empregadas placas de poliestireno de 96 orifícios com fundo em V (BD Falcon), com tampa. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 17-2 sorotipo O:3H2 e salina tampão fosfato (PBS pH 7,2) foram utilizadas como controles positivo e

negativo, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em dias diferentes.

3.2.6.6.1. Preparo da suspensão bacteriana

As culturas, estocadas a -20°C foram semeadas em placas de ágar sangue (base de ágar sangue adicionada de 5% de sangue desfibrinado de carneiro) e incubadas a 37°C por 24 horas. A seguir, uma colônia de cada cultura foi semeada em tubo contendo 3 mL de caldo LB (Difco) que foi incubado a 37°C por 24 horas. A partir dessa etapa foram realizados repiques sucessivos em caldo LB, a cada 3 dias, até completar 10 repiques. Após esse período, as culturas foram submetidas à centrifugação a 4.500 x g (centrífuga 5415 D - Eppendorf) durante 5 minutos. As células foram lavadas com tampão salina fosfato (PBS; pH 7,2) e após nova centrifugação o sedimento foi ressuspenso em PBS (pH 7,2) de forma a obter turvação equivalente a 10 da escala de McFarland (aproximadamente 3×10^9 UFC/mL).

3.2.6.6.2. Preparo das suspensões de hemácias

3.2.6.6.2.1. Suspensão-mãe de hemácias

Foram preparadas suspensões-mãe dos diferentes tipos de hemácias. Alíquotas de 10 mL de cada espécie de eritrócito foram centrifugadas a 344 x g por 5 minutos (centrífuga 5415 D - Eppendorf) e lavadas três vezes com PBS (pH 7,2). Foram preparadas suspensões a 12% através da mistura de 4,8mL de hemácias a 35,2 mL de PBS (pH 7,2). As suspensões estoque de hemácias foram armazenadas sob refrigeração (2-8°C) por um período máximo de uma semana.

3.2.6.6.2.2. Suspensão de hemácias a 3%

Foram preparadas misturando-se 5 mL de suspensão-mãe (3.2.6.6.2.1) a 15 mL de PBS (pH 7,2).

3.2.6.6.2.3. Suspensão de hemácias a 3% com 1% de manose

Foram preparadas combinando 5 mL da suspensão-mãe de hemácias (3.2.6.6.2.1) com 5 mL de PBS (pH 7,2) e 10 mL de solução de manose a 2% (p/v).

3.2.6.6.2.4. Suspensão de hemácias a 3% tratadas com ácido tânico

Alíquotas de 20 mL de suspensão-mãe de cada espécie de eritrócito foram misturadas com 20 mL de solução de ácido tânico (Sigma) a 1: 33000 em salina a 0,85% (p/v). Após incubação a 37°C por 10 minutos as suspensões foram centrifugadas a 194 x g por 3 minutos (centrífuga 5415 D - Eppendorf). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado duas vezes com solução de NaCl a 0,85% (p/v) e ressuspenso em solução salina a uma concentração final de 3% de hemácia.

3.2.6.6.3. Ensaio de hemaglutinação

Alíquotas de 70 µL das suspensões bacterianas foram distribuídas nas fileiras A, C e E das microplacas incluindo os controles positivo e negativo (Figura 4). Nas fileiras B, D e F, foram distribuídas alíquotas de 35µL de PBS pH 7,2. As suspensões bacterianas foram diluídas (1:2) através da transferência de 35µL das fileiras A, C e E para as fileiras B, D e F, respectivamente. Nos orifícios das fileiras A a F foram adicionados 35µL da suspensão de eritrócitos de uma espécie. As outras espécies de eritrócitos foram testadas em placas preparadas da mesma maneira, assim como as suspensões de eritrócitos contendo 1% de manose e as suspensões de eritrócitos taninizados. As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas e submetidas à primeira leitura. As placas foram mantidas sob refrigeração (2-8°C) durante 24 horas e submetidas a nova leitura.

Foi adotado o seguinte padrão de leitura:

- Hemaglutinação negativa → Foi determinada pela formação de um botão depositado no fundo da microplaca indicando que não houve hemaglutinação;
- Hemaglutinação positiva → Foi determinada pela formação de um tapete difuso e frouxo de hemácias depositado no fundo dos orifícios da microplaca;

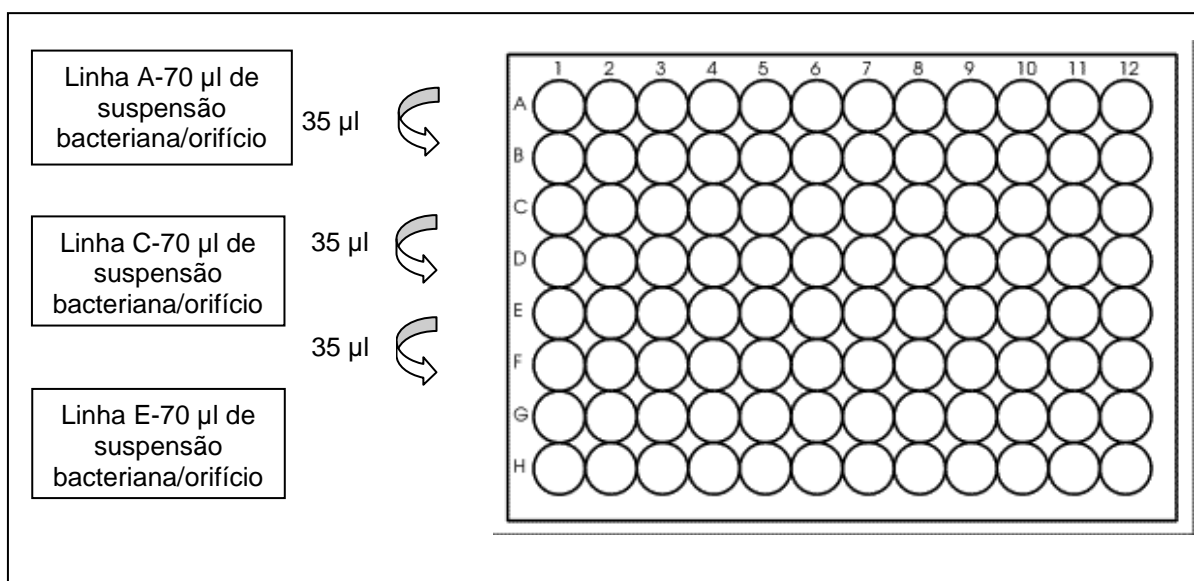


Figura 4 - Desenho esquemático da distribuição das suspensões bacterianas para o ensaio de hemaglutinação.

3.2.6.7. Citotoxicidade para células Vero

Foram testadas 12 culturas identificadas como *Cronobacter* spp. (*C. malonaticus* CDC 1058-77, *C. turicensis* 3032, *C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* E785, *C. sakazakii* CDC 996-77, *C. sakazakii* CDC 3128-77, *C. sakazakii* SK90, *C. sakazakii* E782, *C. sakazakii* CFS 10, *C. dublinensis* CFS 237, *C. sakazakii* CFS 101 e *C. genomoespecie* 1 NCTC 9529). Os controles positivos utilizados foram: solução de Triton-X 1% (p/v) em PBS (pH 7,2) e *Escherichia coli* EHEC (ATCC 43895). Os controles negativos foram: *E. coli* C600, células eucarióticas em caldo tripticaseína de soja (TSB; Difco) e células eucarióticas em *Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM; Gibco-BRL).

3.2.6.7.1. Cultivo e manutenção da linhagem celular Vero

As células Vero foram cultivadas em frascos plásticos com faces planas contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco-BRL) inativado, HEPES (20 mM - Sigma), L-glutamina (3 mM - Sigma), NaHCO₃ (26 mM - Sigma), penicilina (1.000 UI/mL - Sigma) e fungizona (2,5µg/ml - Sigma). As passagens celulares foram feitas pelo tratamento do tapete celular com 0,2% (p/v) de tripsina (1:250; Sigma) e 0,02% (p/v) de EDTA (Sigma) em solução salina balanceada (BSS; pH 7,2) sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺. Após remoção da solução de tripsina

- EDTA foram adicionados 10mL de meio DMEM e o volume foi dividido em dois novos frascos. As células foram incubadas a $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em atmosfera com 5% de CO_2 em estufa (Modelo RCO 3000T-5-ABC, Revco, Thermo Electron Corporation, NC, USA) por 2-3 dias.

Estes procedimentos foram realizados pelo Setor de Cultura de Células do Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células do Departamento de Imunologia do INCQS.

3.2.6.7.1.2. Preparo dos tapetes celulares para os ensaios de citotoxicidade

O tapete celular confluyente foi tratado com solução de tripsina-EDTA conforme descrito no item 3.2.7.1 e diluído em meio DMEM suplementado.

Para os ensaios com o corante azul brilhante de Comassie (CBBR R-250; BIO-RAD), 1000 μl de suspensão de células (2×10^5 células/mL) foram adicionados em cada orifício em placas de 24 orifícios (3847 – BD Falcon). Para os ensaios com o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT; Sigma), 100 μl de suspensão de células (2×10^5 células/mL) foram adicionados em cada orifício da microplaca de fundo plano de 96 orifícios (3072 – BD Falcon). As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 72 horas em atmosfera com CO_2 até os tapetes celulares atingirem confluência.

3.2.6.7.2. Preparo dos filtrados bacterianos

Foi utilizada a metodologia descrita por Pagotto (2003). As culturas, estocadas a 20°C foram semeadas em placas de TSA (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. A seguir, uma colônia de cada cultura foi semeada em tubo contendo 3 mL de TSB (Difco) e os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Alíquotas de 0,1mL foram transferidas para tubos de vidro (16x100 mm) com rosca contendo 10 mL de TSB (Difco) e os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas sob agitação constante a 200 rpm (Orbit-Shaker, Lab-Line). As culturas foram submetidas à centrifugação por 30 minutos a $2.300 \times g$ (centrífuga 5415 D - Eppendorf) e os sobrenadantes foram filtrados através de membranas MF- 0,22 μm (Millipore, Brasil) e divididos em duas partes. Uma porção foi aquecida a 100°C (Dri-bath type 17600 – Barnstead/Thermolyne, IA, USA) durante 20 minutos, resfriada rapidamente a -20°C e mantida nesta temperatura até o momento do uso. A outra porção foi imediatamente congelada a -20°C . Os filtrados foram utilizados no prazo de 10 dias.

3.2.6.7.3. Determinação da citotoxicidade dos filtrados bacterianos através de coloração com azul brilhante de Comassie

Foi empregada a técnica descrita por Margis e Borojevic,(1989) com modificações feitas por Araújo (2008).

Foram retirados 100 µl de DMEM de cada um dos 24 orifícios das placas (3.2.6.7.2), com exceção dos orifícios utilizados como controle do tapete de células (3.2.6.7). Em três orifícios foram adicionados 100 µl de TSB (controle negativo) e em outros três orifícios foram adicionados 100 µl de solução a 1% de Triton-X (Riedel) (controle positivo). Os demais orifícios foram inoculados, em triplicata, com 100 µl dos filtrados das culturas, tratados e não tratados termicamente (3.2.6.7.3). As placas foram preparadas em triplicata e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. As leituras foram realizadas após 24, 48 e 72 horas de incubação.

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, as placas foram vertidas para a retirada do inóculo e cada orifício foi lavado, duas vezes, com 500 µl de solução salina tampão fosfato modificada por Dulbecco (0,01M, pH 7,5; PBS-D). A seguir, a cada orifício foram adicionados 500µL de solução de PBS-D contendo 0,2% (v/v) de formol (Vetec) para fixação e as placas mantidas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Todo o PBS-D / 0,2% formol foi vertido e as placas foram mantidas em estufa a 40-50°C para secagem. Em seguida, foram adicionados 250 µL de corante azul brilhante de Comassie (CBBR R-250; BIO-RAD) a 0,5% (p/v) a cada orifício e as placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 hora, ao abrigo de luz. Após esse período, as placas foram delicadamente lavadas por imersão em água destilada. Para secagem, as placas foram mantidas à temperatura ambiente ou em estufa a 40-50°C até a completa secagem dos orifícios. O corante foi eluído com 1000 µL de solução de dodecil sulfato de sódio a 1% (p/v) (SDS; Sigma) por uma hora à temperatura ambiente e as placas submetidas à leitura da absorbância do eluato foi realizada com filtro de 595 nm em leitora de placas (Universal Microplate Reader – ELX 800 – Bio-Tek Instruments, Inc., VT, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata, em três ocasiões diferentes e as médias foram utilizadas para o cálculo dos resultados. Os resultados, expressos como porcentagem de morte celular, foram calculados de acordo com a seguinte fórmula (COOTE et al., 2007):

$$100 * \left\{ \frac{A_{595} (\text{amostra}) - A_{595} (\text{controle positivo})}{A_{595} (\text{controle negativo}) - A_{595} (\text{controle positivo})} \right\}$$

3.2.6.7.4. Determinação viabilidade celular através do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT)

Foi empregada a técnica descrita por Coote et al. (2007). Foram retirados 10 µl de DMEM de cada um dos 96 orifícios das placas, com exceção dos orifícios utilizados como controle do tapete de células. Em três orifícios foram adicionados 10 µl de TSB (controle negativo) e em outros três orifícios foram adicionados 10 µl de solução a 1% de Triton-X (Riedel; controle positivo). Os demais orifícios foram inoculados, em triplicata, com 10 µl dos filtrados das culturas, tratados e não tratados termicamente (3.2.6.7.3). As placas foram preparadas em triplicata e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. As leituras foram realizadas após 24, 48 e 72 horas de incubação.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado das placas e os orifícios lavados duas vezes com PBS-D. A cada orifício foram adicionados 100µL de solução de PBS pH 7,5 e 10 µL de solução a 0,5% (p/v) de MTT (Sigma). As placas foram novamente incubadas por 4 horas a 37°C com 5% de CO₂ e ao abrigo de luz. Após esse período, as placas foram vertidas e foram adicionados 100 µL de solução de HCl 0,04 N em isopropanol em todos os orifícios, para solubilizar a formazana produzida pelas células metabolicamente ativas. As placas foram mantidas sob agitação a 100 rpm (Titertek modelo DSG 304, Flow laboratories, Alemanha) durante 10 minutos. A leitura da absorbância do produto corado foi realizada com filtro duplo (570 nm e 630 nm) em leitora de ELISA (VersaMax tunable, Molecular Devices Corporation, CA, USA) acoplada a uma unidade de microcomputador e o resultado avaliado através do programa Soft Max Pro 5 (Molecular Devices Corporation, CA, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata, em três ocasiões diferentes e as médias foram utilizadas para o cálculo dos resultados. Os resultados, expressos como porcentagem de morte celular, foram calculados de acordo com a fórmula apresentada em 3.2.6.7.4.

3.2.6.8. Invasão de células Vero

No ensaio quantitativo de invasão *Salmonella* Enteritidis foi utilizada como controle positivo e *E. coli* C600 foi utilizada como controle negativo.

3.2.6.8.1. Preparo dos tapetes celulares para os ensaios de invasão celular

Foram utilizadas placas de 24 orifícios contendo células Vero, preparadas conforme descrito nos itens 3.2.6.7.1 e 3.2.6.7.2.

3.2.6.8.2. Preparo das culturas bacterianas

As culturas, congeladas (3.1.1), foram semeadas em placas de TSA (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. A seguir, a partir de uma colônia de cada cultura foram semeados tubos contendo 3 mL de caldo BHI e os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. Alíquotas de 1mL foram centrifugadas a 16.800 x g durante 3 minutos e os sedimentos foram ressuspensos em PBS-D de modo a atingir uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC (previamente determinado através de estudos relacionando o número de células com a D.O.; item 3.2.1).

3.2.6.8.3. Ensaio quantitativo de invasão

Os ensaios foram realizados conforme descrito por Rosa e colaboradores (1998) com algumas modificações.

Os cultivos celulares dos orifícios das placas foram lavados duas vezes com PBS-D e recobertos com 900 μ L de meio DMEM sem antibióticos e com 2% de SFB. A seguir, 100 μ L de cada uma das suspensões bacterianas contendo aproximadamente 10^7 UFC (3.2.6.8.2) foram inoculados em cada orifício, em quaduplicata. As placas foram incubadas em estufa (Luferco, Brasil) a 37°C por 3 horas. Após esse período, os tapetes celulares foram lavados duas vezes com PBS-D pH 7,2. Para determinar o número total de bactérias associadas ao tapete celular, foram adicionadas alíquotas de 1 mL de DMEM em metade dos orifícios contendo cada uma das culturas. A outra metade dos orifícios foi tratada com DMEM suplementado com 250 μ g/mL de gentamicina (Sigma) de forma a determinar o número de bactérias intracelulares (Figura 5). As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora, o meio de cultura foi removido e as células lavadas, duas vezes, com PBS-D. A cada orifício foi adicionado 1 mL de solução de lise (1% de Triton X-100; Riedel em PBS-D, pH 7,2) e as placas foram mantidas a 37°C durante 30 minutos. Após vigorosa homogeneização, foram preparadas diluições decimais em PBS-D e alíquotas dessas diluições foram semeadas, em profundidade, em TSA (Difco), em duplicata. As placas foram incubadas a 35 °C por 18-24 horas e a população de células bacterianas foi determinada.

A porcentagem de invasão foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ de invasão} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de bactérias intracelulares}}{\text{Total de bactérias associadas}} \times 100$$

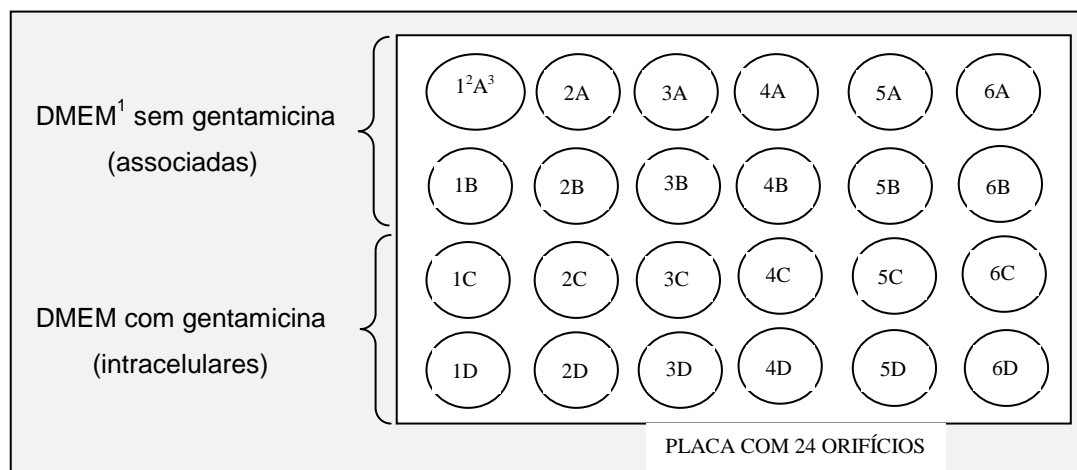


Figura 5 – Desenho esquemático do inóculo e do tratamento dos tapetes celulares no ensaio de invasão. ¹ - meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); ² - o número indica a cultura bacteriana; ³ - a letra indica repetição.

3.2.6.8.4. Análise Estatística

Os resultados de citotoxicidade e invasão foram avaliados através do teste de Mann Whitney unicaudal em nível de significância de 0,05 através do Programa GraphPad Prisma versão 5.01 (GraphPad Software, Inc.), através da comparação com os resultados de citotoxicidade e invasão obtidos com a cepa de *E. coli* C600, utilizada como controle negativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da curva de crescimento de *Cronobacter* spp. (ATCC 29004)

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de determinar o padrão de crescimento de *Cronobacter* spp. para aplicação nos ensaios de aderência e penetração em células eucarióticas. Os resultados foram semelhantes, apesar de terem sido adotados tempos de leitura diferentes. (Figura 6). A fase log teve início a partir de 3 horas de incubação e a fase estacionária após 11 horas de incubação.

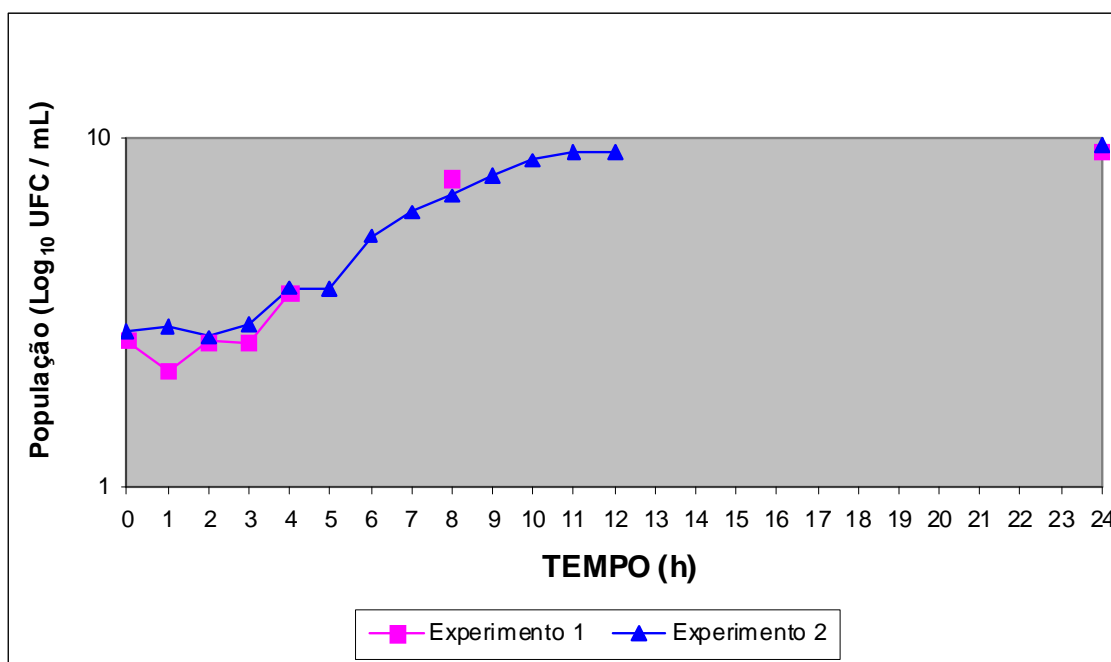


Figura 6 – Curva de crescimento da cepa de *Cronobacter* ATCC 29004, em caldo BHI com incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2. Identificação de *Cronobacter* spp. através de métodos moleculares

Foram estudados os micro-organismos relacionados na Tabela 1. Dezenove cepas de referência compreendendo membros da família *Enterobacteriaceae*, outros Gram negativos e espécies frequentemente identificadas, erroneamente, como *Cronobacter* spp. foram empregadas como controles negativos nos ensaios moleculares (Tabela 2).

4.2.1. Desenvolvimento de uma PCR qualitativa para detecção de *Cronobacter* spp.

Esse novo protocolo foi desenvolvido através da utilização dos iniciadores desenhados por Seo e Brackett (2005) para a detecção de um fragmento de 78 pb de *dnaG* do *operon* de síntese macromolecular através de PCR em tempo real.

Dentre as 37 culturas estudadas, 27 apresentaram o fragmento de 78 pb correspondente a *dnaG* (Tabela 4, Figura 7). O fragmento não foi detectado nas cepas A1, D2, 501M, 8F, 57L, M1, M3, M12, 5A e N1, isoladas no Brasil (Tabela 5), como também nas cepas utilizadas como controle negativo.

O protocolo proposto foi comparado aos protocolos de PCR elaborados por Lehner et al. (2006b) e Iversen et al. (2007b) com alvo no gene *gluA* (4.2.2) e ao protocolo desenvolvido por Hassan et al. (2007), com alvo na região hipervariável V1/V3 do gene que codifica 16S rRNA (item 4.2.3).

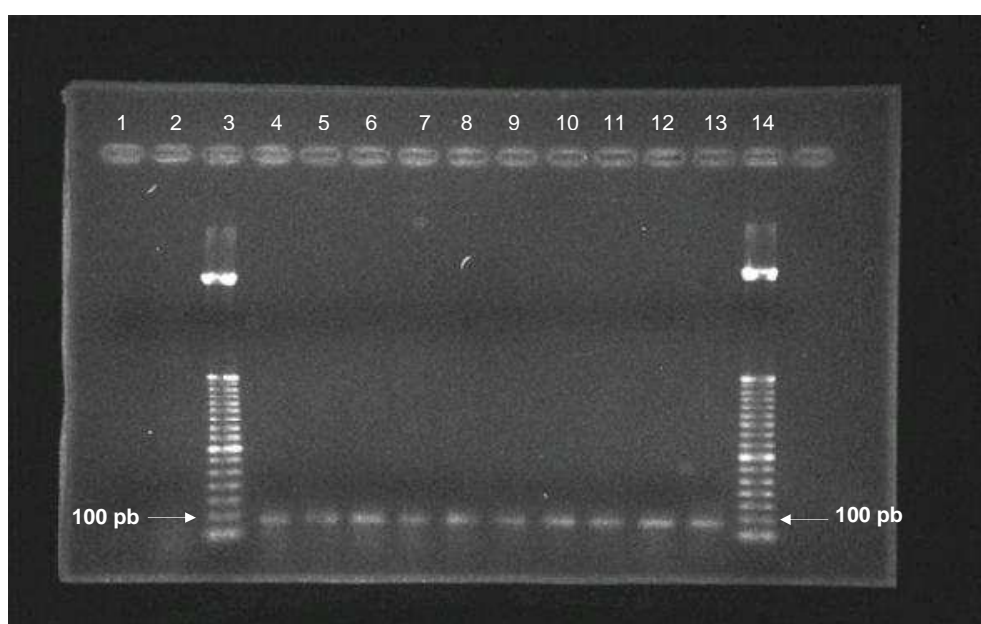


Figura 7 – Perfil de bandas obtido com protocolo para amplificação do fragmento com 78 pb do gene *dnaG*. Linha 1- mistura da reação sem DNA; linha 2 – controle negativo (*Pseudomonas putida* ATCC 15175); linha 3 - padrão de peso molecular de 0,5 Kb; linha 4 – *C. sakazakii* ATCC 29004; linha 5 – *C. sakazakii* HPB2871; linha 6 - cepa 12; linha 7 - *C. malonaticus* 2A; linha 8 - *C. sakazakii* 3A; linha 9 - *C. sakazakii* 4A; linha 10 - *C. sakazakii* HPB2875; linha 11 - *C. sakazakii* HPB2876; linha 12 - *C. sakazakii* HPB2887 CDC A8; linha 13 - *C. sakazakii* HPB2891 CDC B3; linha 14 - padrão de peso molecular de 0,5 Kb.

4.2.2. Detecção da região hipervariável V1/V3 do gene de 16S rRNA

Apenas as culturas positivas para os genes *dnaG* e *gluA* apresentaram o fragmento de 952 pb correspondente à região hipervariável V1/V3 do gene de 16S rRNA (Tabela 4, Figura 8). As cepas de referência utilizadas como controle negativo, nem as cepas relacionadas na Tabela 5 apresentaram esse fragmento. Entretanto, esse protocolo apresentou problemas de repetitividade, o que pode comprometer sua utilização.

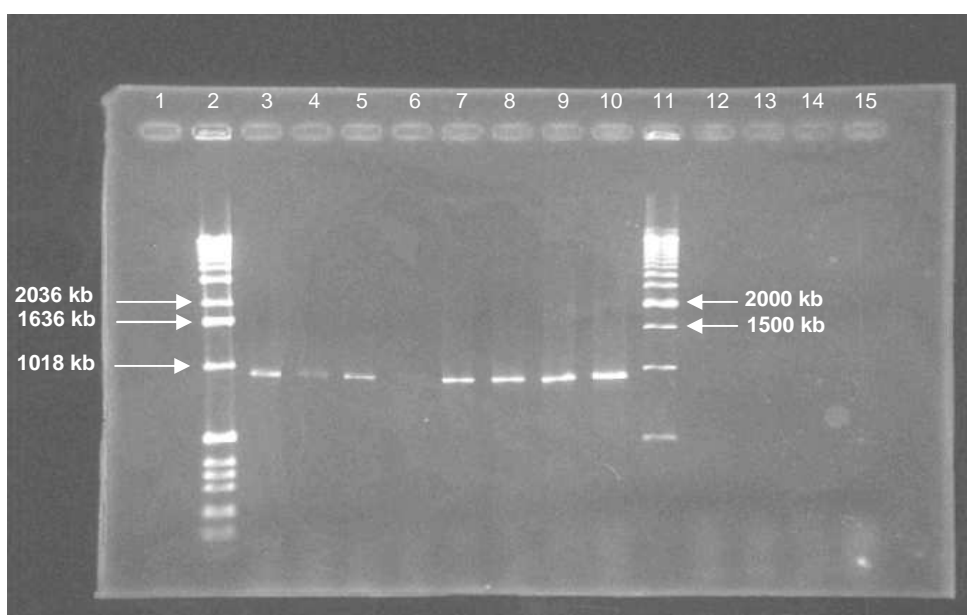


Figura 8 – Perfil de bandas obtido com protocolo para amplificação do fragmento com 952 pb das regiões hipervariáveis V1 e V3 do gene de 16S rRNA. Linha 1- mistura da reação sem DNA; linha 2 – padrão de peso molecular de 1Kb; linha 3 – *C. sakazakii* ATCC 29004; linha 4 - *C. sakazakii* ATCC 29544; linha 5 - *C. sakazakii* HPB 2871; linha 6 - *C. malonaticus* 2A; linha 7 - *C. sakazakii* 3A; linha 8 - *C. sakazakii* 4A; linha 9 - *C. sakazakii* HPB 2875; linha 10 - *C. sakazakii* HPB 2876; linha 11 – padrão de peso molecular de 0,5 Kb; linha 12 – controle negativo *S. marcescens* ATCC 13880; linha 13 – controle negativo *P. mirabilis* ATCC 29906; linha 14 - controle negativo *E. cloacae* ATCC 23355; linha 15 - controle negativo *E. aerogenes* ATCC 13048.

4.2.3. Detecção do gene *gluA*

Os fragmentos de 105 pb e 1680 pb referentes a *gluA* foram detectados nas mesmas cepas identificadas como *Cronobacter* spp. quando se empregou o protocolo de PCR tendo como alvo *dnaG* (Tabelas 4, Figuras 9 e 10). Esses

fragmentos não foram detectados nas cepas de relacionadas na Tabela 5 nem nas cepas de referência utilizadas como controle negativo.

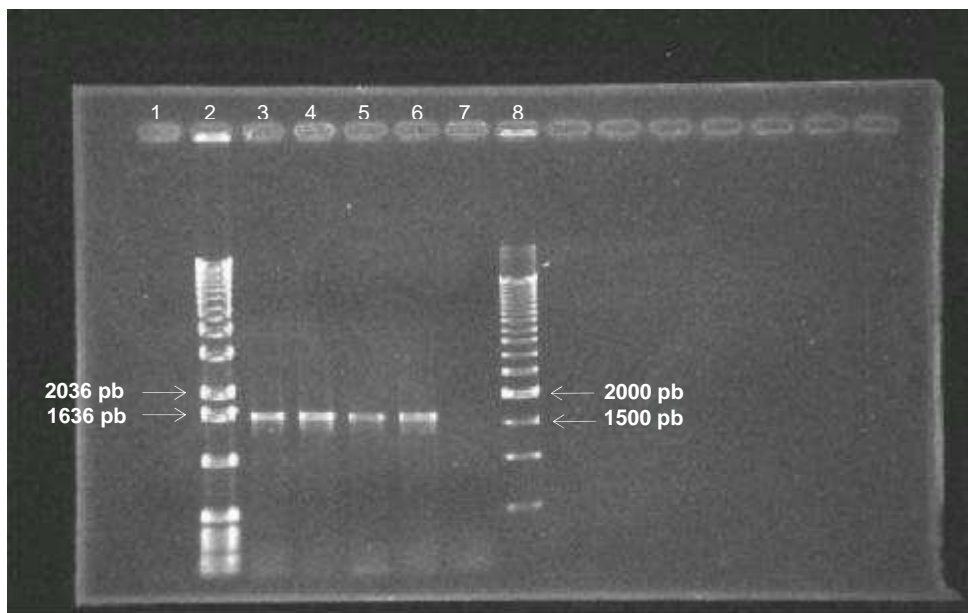


Figura 9 – Perfil de bandas obtido com protocolo para amplificação do fragmento com 1680 pb do gene *gluA*. Linha 1- mistura da reação sem DNA; linha 2 – padrão de peso molecular de 1Kb; linha 3 – *C. malonaticus* 2A; linha 4 - *C. sakazakii* HPB2876; linha 5 – *C. sakazakii* ATCC 29004; linha 6 – *C. sakazakii* ATCC 25944; linha 7- controle negativo (*E. gergoviae* CDC 6453); linha 8 - padrão de peso molecular de 0,5Kb.

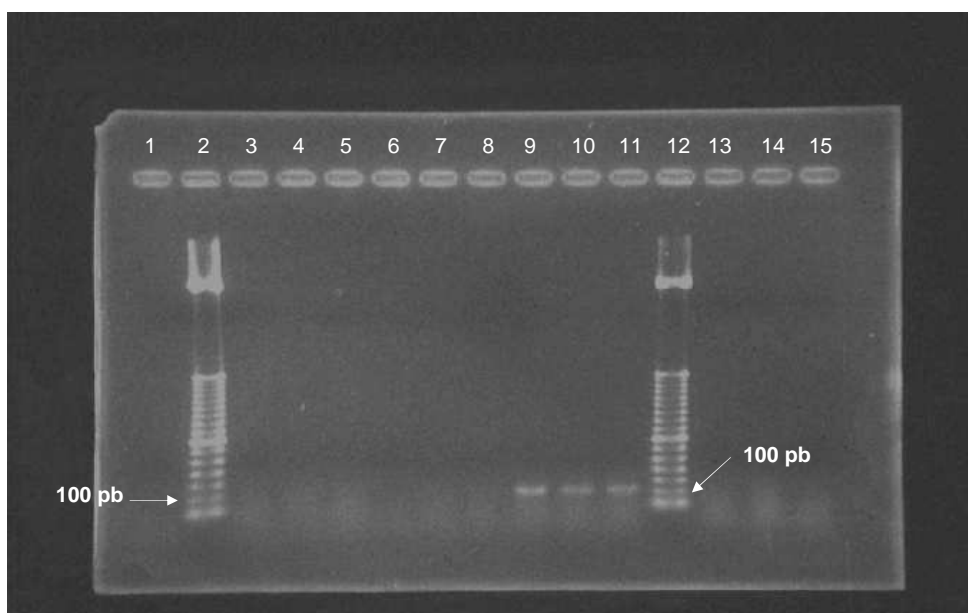


Figura 10 – Perfil de bandas obtido com protocolo para amplificação do fragmento com 105 pb do gene *gluA*. Linha 1- mistura da reação sem DNA; linha 2 – padrão de peso molecular de 0,5 Kb; linha 3 – isolado A1; linha 4 - isolado D2; linha 5 – isolado 501M; linha 6 – isolado 8F; linha 7- isolado 57L; linha 8 - isolado 5A; linha 9 – *C. sakazakii* ATCC 29004; linha 10 – *C. sakazakii* ATCC 29544; linha 11 – *C. sakazakii* ATCC 12868; linha 12 – padrão de peso molecular de 0,5 Kb; linha 13 – controle negativo *E. coli* ATCC 25922; ; linha 14 – controle negativo *K. oxytoca* CCT 0182; ; linha 15 – controle negativo *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Tabela 4 – Identificação fenotípica e molecular das cepas de *Cronobacter* spp.

Código original	Micro-organismo (Identificação original)	Identificação baseada no comportamento bioquímico						Detecção por PCR			
		Ensaio bioquímicos convencionais	API 20E (%) ^a	Vitek 32 (%)	ID 32 (%)	Biogrupo	Zym-tipo ^b	<i>gluA</i> 1680 pb	<i>dnaG</i> 105 pb	V1/V3 78 pb	952 pb
CDC 1058-77	<i>C. malonaticus</i> (T) ^c	<i>C. malonaticus</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (61)/ <i>Kluyvera</i> sp. (22)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	9	1	+	+	+	+
3032	<i>C. turicensis</i> (T)	<i>C. turicensis</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	16	2	+	+	+	+
E922	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1) / <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	3	+	+	+	+
E785	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	4	+	+	+	+
CDC 996-77	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	3	5	+	+	+	+
CDC 3128-77	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1) / <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (97)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	11	6	+	+	+	+
SK90	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	7	+	+	+	+
ATCC 29544	<i>C. sakazakii</i> (T)	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+
ATCC BAA 894	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1) / <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	9	+	+	+	+
HPB 2871	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	8	+	+	+	+
2A	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. malonaticus</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.9) / <i>E. amnigenus</i> 1 (30.8)/ <i>E. cloacae</i> (17)	<i>E. sakazakii</i> (96)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	9	9	+	+	+	+
4A	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+
HPB 2875	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.9) / <i>E. amnigenus</i> 1 (30.8)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	9	+	+	+	+

Continua

Continuação da Tabela 4

Código original	Micro-organismo (Identificação original)	Identificação baseada no comportamento bioquímico						Detecção por PCR			
		Ensaio bioquímico convencional	API 20E (%) ^a	Vitek 32 (%)	ID 32 (%)	Biogrupo	Zym-tipo ^b	gluA 1680 pb	dnaG 105 pb	V1/V3 78 pb	952 pb
HPB 2876	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.9) / <i>E. amnigenus</i> 1 (30.8)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	9	+	+	+	+
E782	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	5	+	+	+	+
CFS 10	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	8b	4	+	+	+	+
3A	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+
CFS 237	<i>C. dublinensis</i> (T)	<i>C. dublinensis</i>	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	<i>P. agglomerans</i> (95) / <i>E. sakazakii</i> (3)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	12	11	+	+	+	+
CFS 101	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1) / <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (74) / <i>E. cloacae</i> (24)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	6	+	+	+	+
NCTC 9529	<i>C. genomoespecie</i> 1 (T)	<i>C. genomoespecie</i> 1	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	16c	12	+	+	+	+
1390	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	3	10	+	+	+	+
HPB 2887 - CDC A8	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (96)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+
HPB 2891 - CDC B3	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. sakazakii</i>	Perfil inaceitável	<i>E. sakazakii</i> (95)	<i>E. sakazakii</i> (99.9) (perfil duvidoso)	1	9	+	+	+	+
IOC - PC	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4) / <i>E. cloacae</i> (1.5)	<i>E. sakazakii</i> (99) / <i>E. cloacae</i> (1)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	3	9	+	+	+	+
ATCC 51329	<i>C. muytjensii</i>	<i>C. muytjensii</i>	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	15	10	+	+	+	+
ATCC 29004	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (97.3)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	10	+	+	+	+
ATCC 12868	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+

^a - percentual de correspondência; ^b - código do perfil enzimático do API-ZYM; ^c - cepa tipo.

Tabela 5 – Identificação fenotípica e molecular das cepas não-*Cronobacter*

Código original	Micro-organismo (Identificação original)	Identificação baseada no comportamento bioquímico				Detecção por PCR			
		Ensaio bioquímicos convencionais	API 20E (%) ^a	Vitek 32 (%)	ID 32 (%)	<i>gluA</i>		<i>dnaG</i>	
						1680 pb	105 pb	78 pb	V1/V3 952 pb
A 1	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1) / <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. cloacae</i> (98)	<i>E. cloacae</i> (99.9)	-	-	-	-
D 2	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	<i>E. cloacae</i> (97)/ <i>sakazakii</i> (2)	<i>E. cloacae</i> (99.9)	-	-	-	-
501 M	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. cloacae</i> (97)/ <i>sakazakii</i> (2)	<i>E. cloacae</i> (99.9)	-	-	-	-
8 F	<i>E. sakazakii</i>	NC ^b	<i>Bordetella/ Alcaligenes/ Moraxella spp.</i>	<i>Acinetobacter lwoffii/junii</i> (99)	NC	-	-	-	-
57 L	<i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>E. sakazakii</i> (86.6) / <i>E. gergoviae</i> (11)	<i>E. cloacae</i> (70)/ <i>sakazakii</i> (15)	<i>E. gergoviae</i> (99.9)	-	-	-	-
M 1	<i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> (82.3)	<i>E. cloacae</i> (98)	<i>E. asburiae</i> (99.9)	-	-	-	-
M 3	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i> (90.9)	<i>E. cloacae</i> (99)	<i>E. cloacae</i> (54.4)/ <i>E. asburiae</i> (45.4)	-	-	-	-
M 12	<i>E. sakazakii</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> (82.3)	<i>E. cloacae</i> (98)	<i>E. asburiae</i> (99.9)	-	-	-	-
5 A	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i> (95)/ <i>E. sakazakii</i> (3)	<i>E. cloacae</i> (94)	<i>E. cloacae</i> (60.2)	-	-	-	-
N 1	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. helveticus</i>	<i>Escherichia vulneris</i> (66.2)/ <i>Buttiauxella agrestis</i> (44.2)/ <i>Pantoeae spp.</i> (6.3)	<i>E. cancerogenus</i> (88)/ <i>P. agglomerans</i> (4)	<i>Escherichia vulneris</i> (66.2)/ <i>Buttiauxella agrestis</i> (44.2)	-	-	-	-

^a - percentual de correspondência; ^b – Não classificada.

4.3. Avaliação do comportamento dos isolados e das cepas de referência de *Cronobacter* spp. frente à metodologia ISO/TS 22964:2006 original e modificada

A norma ISO / TS 22964:2006 é a especificação técnica mais atual e aceita internacionalmente, aplicável à detecção de *Cronobacter* spp. em leite em pó, em FID e em amostras ambientais coletadas em fábricas de leite em pó ou de FID. Apesar de ter sido publicada antes da reclassificação taxonômica de *E. sakazakii* em *Cronobacter* spp. ela ainda é utilizada por muitos pesquisadores, autoridades de vigilância sanitária e empresas no mundo todo. Além disso, tem sido amplamente empregada em muitos países para a detecção de *Cronobacter* spp. em FID durante o processo de inspeção na entrada-saída e quarentena desses produtos.

Nesse estudo, as 37 cepas recebidas como *E. sakazakii* / *Cronobacter* spp foram submetidas a essa metodologia para avaliação de seu comportamento.

Os isolados foram inoculados no caldo de pré-enriquecimento e a partir daí seguiram todas as etapas da metodologia até a identificação final, incluindo a avaliação de produção de pigmento amarelo, identificação através das provas bioquímicas convencionais relacionadas na norma, identificação através do kit API 20 E (bioMérieux), ID 32 (bioMérieux) e sistema Vitek 32 (bioMérieux). Na etapa de isolamento, além do ágar ESIA, recomendado pela metodologia ISO, foram também utilizados os ágares DFI e ESPM que também são meios cromogênicos e permitem avaliar a atividade da enzima α -glicosidase. A seguir, como etapa de triagem, foi utilizado o ágar ESSM para verificar a produção de ácido a partir de sacarose e melibiose (Figura 3).

A etapa de enriquecimento seletivo em mLST/v a $44 \pm 0,5$ °C se mostrou inibitória para algumas das culturas do gênero *Cronobacter*. Duas cepas (SK 90 e NCTC 9529) apresentaram crescimento muito tênue, quase imperceptível, na etapa de enriquecimento seletivo (Tabela 6). A cepa SK 90, pertence à espécie *C. sakazakii* e apesar de sua origem clínica, já havia sido referida como atípica anteriormente (CHEN et al., 2009). O outro cultivo é a cepa tipo de *C. genomoespecie 1* e tal comportamento não era esperado. Por essa razão, todas as cepas foram submetidas a estudo onde se variou, além da composição do caldo de enriquecimento seletivo - mLST/v, mLST sem vancomicina, LST com vancomicina e LST original (Figura 3), a temperatura de incubação (35°C e 44°C). Dessa forma buscou-se determinar o fator inibitório que se havia observado. Os resultados apontaram a temperatura de 44°C como fator restritivo à multiplicação desses

isolados. Isso indica que a presença desses micro-organismos, em amostras de FID, poderia passar despercebida durante análise microbiológica de rotina, acarretando riscos à inocuidade desses alimentos. Limitações do enriquecimento seletivo em mLST/v devido a temperaturas elevadas ou inibição do crescimento pelo lauril sulfato de sódio foram relatadas anteriormente (IVERSEN et al. 2004; IVERSEN e FORSYTHE, 2007). Assim, propostas de novas metodologias para o isolamento de *Cronobacter* devem considerar a possibilidade de efeito inibitório dessa temperatura.

Por outro lado, alguns isolados que não pertencem ao gênero *Cronobacter* spp., como por exemplo A1, M1, M3, M12, 5A e N1, foram capazes de multiplicar em mLST/v a 44°C (Tabela 7). Contudo, apenas a cepa N1, identificada como *E. helveticus* apresentou colônias típicas de *Cronobacter* spp. nos três meios cromogênicos utilizados. Entretanto, essa cepa não foi capaz de produzir ácido a partir de sacarose no meio ESSM (Tabela 7).

Apesar da metodologia ISO/TS 22964 recomendar apenas o ágar ESIA, os meios de isolamento DFI e ESPM foram inseridos nesse estudo para avaliação de seu desempenho tendo em vista a sua inclusão no novo protocolo proposto pelo USFDA para detecção de *Cronobacter* spp., que se encontra em processo de validação (LAMPEL & CHEN, 2009).

Tabela 6 – Comportamento das cepas de *Cronobacter* spp. nas diferentes etapas da metodologia ISO/TS 22964:2006 original e modificada.

Código original	Micro-organismo	Crescimento em mLST/v ^a	Crescimento / colônias típicas em DFI ^b	Crescimento / colônias típicas em ESIA ^c	Crescimento / colônias típicas em ESPM agar ^d	Produção de ácido a partir de melibiose / sacarose em ESSM ^e	Produção de pigmento amarelo em TSA ^f
CDC 1058-77	<i>C. malonaticus</i> (T) ^g	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
3032	<i>C. turicensis</i> (T)	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
E922	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
E785	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
CDC 996-77	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	c ^h
CDC 3128-77	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
SK90	<i>C. sakazakii</i>	F ⁱ	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
ATCC 29544	<i>C. sakazakii</i> (T)	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
ATCC BAA 894	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
HPB 2871	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
2A	<i>C. malonaticus</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
4A	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
HPB 2875	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
HPB 2876	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
E782	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
CFS 10	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
3A	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
CFS 237	<i>C. dublinensis</i> (T)	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
CFS 101	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
NCTC 9529	<i>C. genomoespecie 1</i> (T)	F	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
1390	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
HPB 2887 - CDC A8	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+

Cont.

Continuação da Tabela 6

Código original	Micro-organismo	Crescimento em mLST/v ^a	Crescimento / colônias típicas em DFI ^b	Crescimento / colônias típicas em ESIA ^c	Crescimento / colônias típicas em ESPM agar ^d	Produção de ácido a partir de melibiose / sacarose em ESSM ^e	Produção de pigmento amarelo em TSA ^f
HPB 2891 - CDC B3	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -	+
IOC - PC	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
ATCC 51329	<i>C. muytjensii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
ATCC 29004	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+
ATCC 12868	<i>C. sakazakii</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+

^a – Caldo lauril sulfato triptose modificado; ^b - Druggan Forsythe Iversen agar; ^c - Enterobacter sakazakii Isolation Agar; ^d - Enterobacter sakazakii Chromogenic Plating Medium (ESPM); ^e - Enterobacter sakazakii Screening Medium (ESSM); ^f– Ágar tripticaseína de soja; ^g- cepa tipo; ^h - pigmento com coloração creme ; ⁱ - crescimento muito fraco.

Tabela 7 – Características das cepas não classificadas como *Cronobacter* spp. nas diferentes etapas da metodologia ISO/TS 22964:2006 original e modificada

Código original	Micro-organismo	Crescimento em mLST/v ^a	Crescimento / colônias típicas em DFI ^b	Crescimento / colônias típicas em ESIA ^c	Crescimento / colônias típicas em ESPM agar ^d	Production de ácido a partir de melibiose / sucrose on ESSP ^e	Produção de pigmento amarelo em TSA ^f
A1	<i>E. cloacae</i>	+	+ / -	+ / -	+ / -	+ / +	+
D2	<i>E. cloacae</i>	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / +	+
501M	<i>E. cloacae</i>	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / +	+
8F	NC ^g	-	+ / -	+ / -	+ / -	NT ^h	+
57 L	<i>E. gergoviae</i>	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / +	-
M 1	<i>E. asburiae</i>	+	+ / -	+ / -	+ / -	- / +	+
M 3	<i>E. cloacae</i>	+	+ / -	+ / -	+ / -	+ / +	+
M 12	<i>E. asburiae</i>	+	+ / -	+ / -	+ / -	- / +	+
5A	<i>E. cloacae</i>	+	+ / -	+ / -	+ / -	+ / +	-
N1	<i>E. helveticus</i>	+	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -	+

^a – Caldo lauril sulfato triptose modificado; ^b - Druggan Forsythe Iversen agar; ^c - Enterobacter sakazakii Isolation Agar; ^d - Enterobacter sakazakii Chromogenic Plating Medium (ESPM); ^e - Enterobacter sakazakii Screening Medium (ESSM); ^f – Ágar tripticaseína de soja; ^g - Não Classificada; ^h – Não Testada.

Na etapa de isolamento, todas as culturas de *Cronobacter* spp. se apresentaram como colônias compatíveis com atividade de α -glicosidase nos meios cromogênicos utilizados (Tabela 6). Tanto no ESIA como no DFI, essas colônias apresentaram coloração verde-azulada e no ESPM azul-enegrecido ou azul-acinzentado com ou sem halo de clareamento do meio. A cepa tipo de *C. genomospecie* 1 (NCTC 9529) apresentou crescimento fraco de poucas colônias azul-acinzentadas com halo no ágar ESPM.

Nesse estudo, colônias típicas e atípicas do ESPM foram semeadas, através de estria única, na superfície de placas contendo *Enterobacter Sakazakii Screening Medium* (ESSM; R&F Products Inc.) para verificar a capacidade de produção de ácido a partir de sacarose e melibiose. As placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e observadas após 6 e 24 horas. Entretanto, o período de 6 horas de incubação do meio ESSM, conforme recomendado por Restaino et al. (2006), não foi suficiente para a obtenção de resultados conclusivos. Após 6 horas de incubação, 6 culturas (*C. sakazakii* ATCC 29544, ATCC 29004, CFS 10, SK 90, *C. turicensis* 3032 e *C. dublinensis* CFS 237) apresentaram resultado negativo para melibiose e outros cinco isolados (*C. sakazakii* 4A, 2887-CDC A8, ATCC 12868, IOC-PC e *C. malonaticus* CDC 1058-77) apresentaram fraca acidificação do meio com sacarose, gerando resultados duvidosos. Após incubação adicional de 18 horas, todas as culturas, com exceção de *C. sakazakii* HPB 2891 CDC B3, apresentaram resultados positivos para produção de ácido a partir de sacarose e melibiose (Tabela 6). Assim, o uso do ágar ESSM como uma ferramenta de triagem com período de 6 horas de incubação não se mostrou eficiente uma vez que onze (40,7%) cepas de *Cronobacter* spp. apresentaram resultados negativos ou duvidosos após esse período. Dessa forma, sugere-se utilizar 24 horas de incubação para a obtenção de resultados confiáveis. Iversen et al. (2007b) relataram o oposto do problema uma vez que os resultados positivos após 6 horas de incubação eram transitórios e se tornavam negativos a seguir.

Também é interessante destacar que as cepas SK 90 e NCTC 9529, que apresentaram inibição de crescimento durante o enriquecimento seletivo em mLST/v foram capazes de desenvolver colônias típicas no ágar ESIA a $44 \pm 1^\circ\text{C}$. Assim, parece existir um efeito sinérgico envolvendo a temperatura de incubação com o agente seletivo (lauril sulfato de sódio) no meio de enriquecimento seletivo.

4.3.1. Produção de pigmento amarelo

Os micro-organismos do gênero *Cronobacter* eram anteriormente designados como “*E. cloacae* produtores de pigmento amarelo”. De acordo com essa característica a metodologia do FDA (2002) e a norma ISO (2006) utilizam esse parâmetro como indicativo de isolamento de *Cronobacter* spp. Nesse estudo, a detecção de uma cepa de *Cronobacter* spp. não produtora de pigmento amarelo (*C. sakazakii* 996-77) e isolados com pigmento amarelo, mas pertencentes a outros gêneros (A1, D2, 501M, 8F, M1, M3, M12 e N1) demonstra que esse critério não é confiável (Tabelas 6 e 7). É possível que a capacidade de produção de pigmento amarelo exibida pelos isolados brasileiros possa ter contribuído para a errônea classificação como *E. sakazakii* na etapa de identificação presuntiva. A utilização do ensaio de produção de pigmento amarelo como critério para a identificação de *Cronobacter* spp. tem sido questionada por outros pesquisadores. Iversen & Forsythe (2007) foram os primeiros a relatar que 2% das cepas de *Cronobacter* spp. estudadas por eles não produziram pigmento amarelo e concluíram que os métodos de caracterização fenotípica precisavam ser aprimorados. Cawthorn et al. (2008) demonstraram que a utilização do ensaio de produção de pigmento amarelo para a identificação de *Cronobacter* spp. apresenta baixa sensibilidade, especificidade e acurácia (87%, 71% e 74%, respectivamente).

4.4. Caracterização fenotípica

4.4.1. Identificação bioquímica

A norma ISO / TS 22964:2006 recomenda que as culturas com identificação presuntiva como *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) sejam submetidas a um conjunto de provas bioquímicas convencionais (oxidase; fermentação do sorbitol, ramnose, sacarose, melibiose e amidalina; hidrólise do citrato; descarboxilação de lisina, arginina e ornitina) ou a kits miniaturizados de identificação bioquímica, comercialmente disponíveis.

Nesse estudo, os isolados e cepas de referência foram submetidos ao grupo de provas bioquímicas convencionais recomendado pela metodologia ISO e também aos kits comerciais API 20E, ID 32E e sistema Vitek 32. O kit API ZYM foi empregado para o estudo da atividade enzimática dos micro-organismos. Os esquemas de identificação propostos por Farmer et al. (1980) e Iversen et al (2006b) também foram aplicados aos isolados para a determinação dos biogrupos (Tabelas

4 e 5). A classificação das culturas nas espécies de *Cronobacter* foi realizada pela correspondência com os biogrupos, de acordo com Iversen et al. (2008).

Alguns isolados de origem brasileira (57L, M1 e M12), presuntivamente identificados como *E. sakazakii*, foram classificados pelos kits comerciais em espécies que comumente são confundidas com *Cronobacter* spp. Um dos isolados brasileiros (8F) (Tabela 5) apresentou atividade metabólica muito fraca e não pode ser classificado. Outro isolado (N1) (Tabela 5) foi identificado como membro da espécie *Enterobacter helveticus*, recentemente criada por Stephan et al. (2007). Essa nova espécie é encontrada nos mesmos nichos ecológicos de *Cronobacter* spp., como alimentos desidratados e ambiente fabril, além de desenvolver colônias típicas (α -glicosidase positivas) nos meios cromogênicos. Nesse estudo, o isolado N1 apresentou características típicas de *Cronobacter* spp. durante a etapa de enriquecimento seletivo da ISO (Tabela 7) e no isolamento em meios cromogênicos, apresentou colônias α -glicosidase positivas. Entretanto, não foi capaz de produzir ácido a partir de sacarose no ágar ESSM (Tabela 7), diferenciando seu comportamento do metabolismo característico de *Cronobacter* spp. O isolado N1, originalmente identificado como *E. sakazakii* (Tabela 1), não foi classificado como tal por nenhum dos kits comerciais empregados (Tabela 5), embora esses sistemas não apresentassem ainda a espécie *E. helveticus* em suas bases de dados.

A cepa tipo *C. muytjensii* ATCC 51329 foi a única cultura de *Cronobacter* spp. que, através do conjunto de provas bioquímicas convencionais utilizado (item 3.2.4.1) não apresentou produção de ácido a partir de metil- α -D-glicopiranosídeo (dado não apresentado), substrato empregado nos meios cromogênicos para detectar a atividade de α -glicosidase das culturas. Iversen et al. (2007) também relataram essa característica da cepa ATCC 51329. Entretanto, essa cepa desenvolveu colônias típicas nos meios cromogênicos (Tabela 6), apresentou atividade de α -glicosidase nos kits comerciais (ID 32E e API ZYM) e apresentou resultado positivo na detecção do gene *gluA* (Tabela 4). Esse comportamento pode ser atribuído a diferenças, entre as cepas de *Cronobacter* spp., no que se refere à especificidade ou capacidade de indução da enzima α -glicosidase e/ou mecanismo de transporte para diferentes glicopiranosídeos (IVERSEN et al., 2007b).

4.4.1.1. Identificação através de kits miniaturizados

Esses sistemas foram utilizados com o objetivo de avaliar seu desempenho, uma vez que são amplamente empregados nos laboratórios clínicos e nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos.

Os resultados obtidos com os kits estão apresentados conforme a nomenclatura antiga (*E. sakazakii*) porque a base de dados desses kits comerciais ainda não havia sido atualizada.

Todas as cepas identificadas como *Cronobacter* spp. pelos ensaios moleculares, foram classificadas pelo kit ID 32E como *E. sakazakii* com percentuais de correspondência de 99,9% (Tabela 4). Entretanto, a cepa HPB 2891 CDC B3 foi designada como “Perfil Duvidoso” por causa do resultado negativo na prova de utilização da sacarose (Tabela 4).

O sistema Vitek 32 confirmou a identidade de todas as culturas de *Cronobacter* spp. com exceção da cepa tipo de *C. dublinensis* CFS 237 que foi confundida com *P. agglomerans* com um percentual de correspondência de 95% e apenas 3% de chance de ser *E. sakazakii* (Tabela 4). Nossos resultados diferem dos de Fanjat et al. (2007) que obtiveram 100% de resultados corretos na identificação *E. sakazakii* por esse sistema. Nesse estudo, o sistema Vitek 32 permitiu a identificação da maioria das culturas de *Cronobacter* spp. com percentuais de correspondência superiores a 95%, com exceção da cepa tipo de *C. malonaticus* CDC 1058-77 e da cepa *C. sakazakii* CFS 101 cujos percentuais de correspondência foram de 61% e 74%, respectivamente (Tabela 4). O sistema Vitek é um equipamento que requer investimento de recursos, muitas vezes, não disponíveis nos laboratórios brasileiros. Além disso, consideramos que a utilização desse sistema para a identificação de *Cronobacter* spp. deva ser cautelosa, devido à possibilidade de resultados falso-negativos, conforme o relatado acima.

Os resultados obtidos com o kit API 20E estavam, em alguns casos, em desacordo com os ensaios bioquímicos convencionais e com os resultados dos outros kits utilizados (Tabelas 4 e 5). A cepa HPB 2891 CDC B3 foi designada como “Perfil Inaceitável” devido à sua incapacidade de produzir ácido a partir da sacarose. Duas cepas de *C. malonaticus* (a cepa tipo CDC 1058-77 e a cepa 2A) além de 6 cepas de *C. sakazakii* (E922, CDC 3128-77, HPB 2875, HPB 2876, CFS 101 e ATCC BAA 894) apresentaram baixos valores percentuais (51.1%) para a identificação como *E. sakazakii* (Tabela 4). Quatro isolados (A1, D2, 501 M e 57 L)

foram erroneamente identificados como *E. sakazakii* quando se empregou o API 20E, com elevados percentuais de correspondência (Tabelas 5).

É interessante destacar que até o momento não existe relato de incapacidade de utilização da sacarose por membros do gênero *Cronobacter*, como foi detectado com a cepa HPB 2891 CDC B3 que apresentou essa característica em todos os sistemas estudados. Esse resultado é bastante importante uma vez que a nova metodologia ISO, que está em processo de validação, emprega o *Cronobacter Screening Broth* (caldo CSB). Esse meio de cultura tem como característica a viragem do indicador de pH pela utilização de sacarose. A descoberta de cepas, como a HPB 2891 CDC B3, que não utilizam a sacarose sugere cautela no emprego de metodologias que se baseiam na fermentação desse carboidrato.

4.4.2. Determinação da atividade enzimática

O estudo da atividade enzimática das 27 culturas de *Cronobacter* spp. através do kit API ZYM revelou a existência de 12 perfis enzimáticos distintos. Esses perfis foram designados como “ZYM-tipos” enumerados de 1 a 12 (Tabela 4). Todas as culturas apresentaram atividade de α -glicosidase, característica do gênero, confirmando os resultados obtidos nos meios cromogênicos (Tabela 6). O “ZYM tipo” 9 foi o que apresentou maior prevalência, com 11 isolados: dez *C. sakazakii* (ATCC 29544, ATCC BAA 894, 4A, HPB 2875, HPB 2876, 3A, HPB 2887-CDC A8, HPB 2891-CDC B3, IOC-PC e ATCC 12868) e um *C. malonaticus* (2A) (Tabela 4). As cepas 3032 (*C. turicensis*), CFS 237 (*C. dublinensis*) e NCTC 9529 (*C. genomoespecie* 1) foram as únicas classificadas nos “ZYM-tipos” 2, 11 e 12, respectivamente. A cepa tipo de *C. malonaticus* (CDC 1058-77) foi a única cultura classificada como “ZYM tipo 1” (Tabela 4) sendo a outra cepa de *C. malonaticus* (2A) estudada designada como “ZYM-tipo” 9, como a maioria das culturas utilizadas nesse estudo. As cepas E 922, SK 90 e HPB 2871, de *C. sakazakii*, também foram as únicas classificadas nos “ZYM-tipos” 3, 7 e 8, respectivamente. A cepa ATCC 51329 (*C. muytjensii*) apresentou o mesmo perfil enzimático de duas cepas de *C. sakazakii* (ATCC 29004 e isolado 1390) (Tabela 4).

Nesse estudo não foi possível determinar correlação entre os perfis enzimáticos e as espécies, biogrupos ou origem das cepas de *Cronobacter* spp. A maioria das cepas estudadas eram representantes únicos de cada espécie, com exceção de *C. sakazakii* e *C. malonaticus*, o que pode induzir viés a essa

correlação. Estudos adicionais, utilizando um número maior de espécies e/ou biogrupos seriam interessantes para avaliar uma possível correlação.

4.5. Avaliação da sensibilidade e especificidade dos sistemas de caracterização fenotípica e molecular

Nesse estudo, foi avaliado o desempenho dos meios de cultura (DFI, ESIA, ESPM e ESSM), dos sistemas de identificação bioquímica (conjunto de provas bioquímicas convencionais, API 20E, Vitek 32 e ID 32) e dos protocolos de identificação molecular (com alvo na região hipervariável V1/V3 do gene de 16S rRNA e no gene *dnaG*). A sensibilidade e a especificidade dos sistemas de identificação foram determinadas por comparação com os resultados obtidos com o protocolo de PCR com alvo no fragmento de 105 pb de *gluA*, considerado como *padrão ouro* para identificação de *Cronobacter* spp. Segundo Iversen e colaboradores (2007b) esse protocolo é 100% sensível e específico, não tendo ainda sido relatados resultados falso-positivos ou falso-negativos (Tabelas 4, 5, e 8).

Tabela 8 – Sensibilidade e especificidade dos diferentes meios de cultura e ensaios utilizados para a identificação de *Cronobacter* spp.

Espécie	Crescimento em mLST/v ^a	Meios de isolamento				Produção de pigmento amarelo em TSA ^b	Ensaio fenotípicos				Ensaio moleculares			
		DFI	ESIA	ESPM	ESSM		Provas bioquímicas convencionais	API 20E	VITEK 32	ID 32E	glu A PCR	dna G PCR	V1/V3 PCR	
Todos <i>Cronobacter</i> spp. (resultados positivos/cepas testadas)	25/27	27/27	27/27	27/27	26/27	26/27	27/27	27/27	27/27	26/27	27/27	27/27	27/27	27/27
Outras enterobactérias (resultados positivos/cepas testadas)	6/10	1/10	1/10	1/10	NA ^c	8/10	0/10	4/10	0/10	0/10	0/28	0/28	0/28	0/28
Não- enterobactérias (resultados positivos/cepas testadas)	NT ^d	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0/1	0/1	0/1	0/1
Sensibilidade (%)	93,1	100	100	100	96,4	96,4	100	100	96,4	100	100	100	100	100
Especificidade (%)	62,5	90,9	90,9	90,9	NA	55,6	100	71,4	100	100	100	100	100	100

^a - Caldo lauril sulfato triptose modificado /vancomicina (mLST/v); ^b – ágar tripticaseína de soja; ^c - Não Aplicável; d - Não Testado.

Os resultados obtidos com o protocolo proposto para PCR tradicional, tendo como alvo *dnaG*, indicaram que ele foi 100% sensível e específico (Tabela 8).

Um novo método elaborado pelo US-FDA para a detecção de *Cronobacter* spp. em FID foi relatado por Lampel & Chen (2009). De acordo com esses autores, o protocolo está em fase de validação por estudo colaborativo para ser adotado pelo US-FDA no seu “Bacteriological Analytical Manual”.

O método de PCR convencional aqui desenvolvido baseia-se no novo método do FDA (Lampel e Chen, 2009) para a detecção de *Cronobacter* spp. em FID que incorpora um protocolo de PCR em tempo real bi-funcional. Esse protocolo é utilizado como ferramenta de triagem e também na confirmação de culturas suspeitas de *Cronobacter* spp. Apesar de empregar uma tecnologia mais avançada que a PCR tradicional, a utilização da PCR em tempo real pode dificultar a adoção dessa metodologia por muitos laboratórios que não dispõem de recursos financeiros, técnicos ou físicos necessários à aquisição / manutenção do equipamento. Como se sabe, as metodologias recomendadas pelo USFDA tem sido amplamente adotadas como métodos oficiais em vários países, incluindo os laboratórios brasileiros de Saúde Pública. Isso se deve ao fato dessas metodologias serem de livre acesso enquanto as metodologias ISO necessitam ser adquiridas dificultando o acesso de alguns laboratórios a essas normas.

Dessa forma, acredita-se que o protocolo de PCR aqui proposto possa representar uma boa alternativa para os laboratórios que não dispõem de um equipamento de PCR em tempo real. Dentre os protocolos de PCR utilizados nesse estudo, o protocolo desenvolvido por nós é o único que tem como alvo o mesmo gene (*dnaG*) usado na metodologia do USFDA, que se encontra em processo de validação. No nosso estudo, os métodos com alvo nas regiões hipervariáveis V1/V3 do gene de 16S rRNA e no gene *gluA* foram 100% sensíveis e específicos. Entretanto, Cawthorn et al. (2008) estudaram vários protocolos de PCR e relataram que os pares de primers Saka – 1a/Saka - 2b (alvo em V1/V3) e EsAgf/EsAgf (alvo em *gluA*), também incluídos no nosso estudo, foram 100% sensíveis mas apresentaram especificidade de 88% e 82%, respectivamente devido a vários resultados falso-positivos.

Assim, após validação com um número maior de cepas e matrizes alimentícias o protocolo desenvolvido nesse estudo poderá ser utilizado como uma

complementação na detecção ou na etapa de identificação de *Cronobacter* spp. após o isolamento através de métodos convencionais.

Os três meios de isolamento usados nesse estudo (DFI, ESIA e ESPM) apresentaram desempenho equivalente. O ágar DFI, ESIA e ESPM foram 100% sensíveis e a especificidade foi de 90,9% (Tabela 8). O ágar ESSM que é empregado para verificar a capacidade de produção de ácido a partir de sacarose e melibiose apresentou sensibilidade de 96,4%. O cálculo da especificidade não é aplicável nesse caso porque esse meio é empregado na sequência do ágar ESSM, para confirmação de colônias suspeitas de *Cronobacter* spp.

A avaliação dos resultados obtidos com os kits comerciais para a identificação de *Cronobacter* spp. demonstrou que o ID 32E foi 100% sensível e específico (Tabela 8). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por El-Sharoud et al. (2009) e Fanjat et al. (2007) que também empregaram a versão 3.0 do banco de dados do ID 32E, disponível desde o final de 2006. Por outro lado, Drudy et al. (2006) e Iversen et al. (2004) haviam relatado resultados falso-positivos e falso-negativos empregando esse mesmo kit. Entretanto, a versão do banco de dados era anterior, o que pode ter causado essa diferença.

Nesse estudo o sistema Vitek 32 apresentou 100% de especificidade, mas 96,4% de sensibilidade (Tabela 8). Esses dados estão em desacordo com Fanjat et al. (2007) que relataram sensibilidade de 100% desse sistema na identificação de *Cronobacter* spp. O valor de sensibilidade encontrado nesse estudo indica a ocorrência de resultados falso-negativos que podem causar problemas na avaliação da segurança microbiológica de produtos (produção/controle de qualidade) ou em diagnóstico nos laboratórios de saúde pública (identificação de patógenos).

O kit API 20E apresentou sensibilidade de 100% mas especificidade de apenas 71,4%, a menor dentre os kits testados (Tabela 8). Apesar de ser o kit miniaturizado mais frequentemente usado para a confirmação de colônias presuntivas de *Cronobacter* spp., existem vários relatos de resultados falso-positivos e falso-negativos. Seo e Brackett (2005) relataram que um isolado de fórmula infantil caracterizado como não-*Cronobacter* pelo kit API 20E foi posteriormente identificado como *Cronobacter* spp. por esse mesmo kit. Restaino et al. (2006) encontraram resultados falso-positivos e falso-negativos para *Cronobacter* spp. com o kit API 20E na identificação de isolados obtidos a partir de 240 amostras de alimentos. Concluíram que o API 20E e o sistema Biolog MicroLog3 4.20 deveriam ser usados

em conjunto para a confirmação de isolados presuntivos de *Cronobacter* spp. Iversen et al. (2007) também relataram que sete cepas previamente identificadas como *E. cloacae*, *E. hormaechei* ou *E. asburiae* através do seqüenciamento do gene de 16S rRNA e/ou pelo kit ID 32E foram identificadas como *Cronobacter* spp. pelas galerias de API 20E. Jaradat et al. (2009) analisaram 233 amostras de alimentos utilizando o kit API 20E como método de triagem inicial de identificação que classificou 42 isolados como *Cronobacter* spp. Esses autores prosseguiram com a identificação através do sequenciamento de 16S rRNA e apenas 29 isolados foram confirmados como *Cronobacter* spp.

Dessa forma, dentre os sistemas comerciais testados (Vitek 32, API 20E e ID 32), consideramos que é preferencial o uso do kit ID 32E, tendo em o bom desempenho desse kit (100% de sensibilidade e 100% de especificidade) além da questão da necessidade de recursos financeiros e a ocorrência de resultados falso-negativos (4.4.1.1) no que se refere ao sistema Vitek 32 e a baixa especificidade do API 20E.

4.6. Pesquisa de fatores de virulência

4.6.1. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

As 27 culturas identificadas após os estudos anteriores como *Cronobacter* spp. (Tabela 4) foram avaliadas quanto à sensibilidade a antimicrobianos através da utilização de cartões GNS 655 no equipamento Vitek 32 system (bioMérieux). Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Todas as culturas foram sensíveis a amicacina (aminoglicosídeo), cefepima (cefalosporina de quarta geração), cefotaxima (cefalosporina de terceira geração), ceftazidima (cefalosporina de terceira geração), ciprofloxacina (fluoroquinolona), gentamicina (aminoglicosídeo), imipenem (carbapenema), meropenem (carbapenema) e trimethoprim-sulfa (inibidores da síntese de folato).

Exceto pela cepa *C. genomospecies* 1 NCTC 9529, todas as culturas apresentaram alguma forma de resistência à cefalotina (cefalosporina de primeira geração). Dezesesseis cepas (*C. turicensis* 3032, *C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* ATCC 29544, *C. sakazakii* HPB 2871, *C. malonaticus* 2A, *C. sakazakii* HPB 2876, *C. sakazakii* CFS 10, *C. sakazakii* 3A, *C. sakazakii* CFS 101, *C. sakazakii* 1390, *C. sakazakii* HPB 2887 - CDC A8, *C. sakazakii* HPB 2891 - CDC B3, *C. sakazakii* IOC-PC, *C. muytjensii* ATCC 51329, *C. sakazakii* ATCC 29004, *C. sakazakii* ATCC BAA

894) foram resistentes à cefoxitina (cefalosporina de segunda geração) e uma (*C. dublinensis* CFS 237) apresentou resistência intermediária a essa droga (Tabela 9).

A resistência à cefalosporina também foi relatada por outros pesquisadores. See et al. (2007), em Cingapura, trataram inicialmente com ceftriaxona (cefalosporina de terceira geração) e metronidazol (nitroimidazol) um caso de bacteremia com abscessos esplênicos múltiplos por *Cronobacter* spp. em uma paciente de 75 anos. Entretanto, segundo esses autores o micro-organismo desenvolveu resistência à cefalosporina e o tratamento prosseguiu com imipenem (carbapenema) intravenoso durante 28 dias. A paciente foi liberada do hospital sob tratamento adicional com ciprofloxacina (fluoroquinolona) por três semanas, entretanto retornou após uma semana com febre intermitente e neutropenia. Foi tratada durante duas semanas com imipenem e a infecção foi eliminada.

Quinze cepas (*C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* E785, *C. sakazakii* CDC 996-77, *C. sakazakii* CDC 3128-77, *C. sakazakii* ATCC 29544, *C. sakazakii* HPB 2871, *C. malonaticus* 2A, *C. sakazakii* 3A, *C. sakazakii* 1390, *C. sakazakii* HPB 2887 - CDC A8, *C. sakazakii* HPB 2891 - CDC B3, *C. sakazakii* IOC-PC, *C. muytjensii* ATCC 51329, *C. sakazakii* ATCC 29004 e *C. sakazakii* ATCC 12868) foram resistentes à ampicilina (β -lactâmico) e 4 cepas (*C. malonaticus* CDC 1058-77, *C. sakazakii* HPB 2876, *C. sakazakii* E782 e *C. sakazakii* CFS 101) apresentaram resistência intermediária a essa droga (Tabela 9). Esses dados não estão de acordo com o relato de Stock e Wiedermann (2002) que estudaram a suscetibilidade de 35 cepas de *Cronobacter* spp. a antimicrobianos. Esses autores não encontraram nenhuma evidência da expressão de β -lactamases e concluíram que o gênero *Cronobacter* apresenta maior sensibilidade aos antimicrobianos β -lactâmicos do que outros membros da família *Enterobacteriaceae*.

Caubilla-Barron et al. (2007) estudaram cepas isoladas durante um surto associado a *Cronobacter* spp. em uma unidade neonatal de terapia intensiva na França. Duas cepas isoladas de dois casos fatais (meningite e enterocolite necrosante) apresentaram resistência à ampicilina. No nosso estudo, 3 cepas (*C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* HPB 2871 e *C. sakazakii* HPB 2891 - CDC B3) apresentaram resistência à associação ampicilina/sulbactam (β -lactâmico/inibidor de β -lactamase) e a cepa de referência *C. sakazakii* ATCC 29544 apresentou resistência intermediária a essa associação (Tabela 9). Nossos resultados diferem parcialmente dos resultados obtidos por El-Sharoud et al. (2009) que isolaram

dezesesseis cepas de *Cronobacter* spp. através da análise de 152 produtos à base de leite obtidos no Delta do Nilo, no Egito. Segundo esses autores, todos os isolados foram sensíveis à ampicilina e compostos de sulfonamida, além das outras drogas testadas - furazolidona, gentamicina, spectinomicina e estreptomicina. No presente estudo todas as cepas testadas foram sensíveis à associação trimethoprim-sulfa (inibidores da síntese de folato).

As cepas *C. sakazakii* SK90 e *C. sakazakii* CFS 101 apresentaram, respectivamente, resistência e resistência intermediária ao aztreonam (monobactama= β -lactâmico resistente a algumas β -lactamases) (Tabela 9). Pribyl et al. (1985), em Nova Orleans, EUA, relataram que obtiveram tratamento eficaz de um paciente de 56 anos, diabético, que apresentava ulcerações no pé por *Cronobacter* spp. com o uso de aztreonam.

Duas cepas (*C. sakazakii* E922 e *C. sakazakii* HPB 2871) ainda apresentaram resistência intermediária à associação piperacilina/tazobactam (β -lactâmico com espectro estendido/inibidor de β -lactamase) (Tabela 9).

A avaliação dos resultados revelou que 96,3% das cepas estudadas apresentaram resistência à cefalotina (cefalosporina de primeira geração) e 63% foram resistentes à cefoxitina (cefalosporina de segunda geração) (Figura 11). Com relação aos β -lactâmicos, 70,4% das cepas estudadas apresentaram resistência à ampicilina (β -lactâmicos) e 14,8% foram resistentes à associação ampicilina/sulbactam (β -lactâmico/inibidor de β -lactamase). Além disso, 7,4% das cepas foram resistentes ao aztreonam (monobactama) e também 7,4% apresentaram resistência à piperacilina/tazobactam (β -lactâmico com espectro estendido/inibidor de β -lactamase) (Figura 11).

É importante destacar que as cepa *C. sakazakii* E922 (origem clínica) e a cepa *C. sakazakii* HPB 2871 (isolada de FID) apresentaram o mesmo perfil de suscetibilidade a antimicrobianos com resistência a 5 das drogas testadas (ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, cefalotina e piperacilina /tazobactam) indicando resistência a 2 classes de antimicrobianos (β -lactâmicos e cefalosporinas) (Tabela 9). A cepa *C. sakazakii* CFS 101, isolada de ambiente de fábrica produtora de FID, apresentou resistência a quatro antimicrobianos (ampicilina, aztreonam, cefoxitina, e cefalotina), mostrando também resistência à classe dos β -lactâmicos e à das cefalosporinas (Tabela 9).

Dentre os isolados brasileiros, a cepa *C. sakazakii* 4A (isolado de FID) apresentou resistência intermediária somente à cefalotina (cefalosporina de primeira geração), mas as cepas *C. malonaticus* 2A (isolada de FID), *C. sakazakii* 3A (isolada de ambiente de lactário) e *C. sakazakii* 1390 (isolada de bico de mamadeira em lactário) apresentaram resistência à ampicilina (β -lactâmico), à cefalotina (cefalosporina de primeira geração) e à cefoxitina (cefalosporina de segunda geração) (Tabela 9). Esses isolados não são associados a casos clínicos/surtos, mas foram obtidos em lactários de maternidades brasileiras. Esses dados alertam para a necessidade de utilização de boas práticas nesses ambientes, tendo em vista a ameaça que representa a presença de cepas desse tipo em locais de manipulação de FID.

A Tabela 10 apresenta a correlação entre o número de cepas estudadas e o número de antimicrobianos aos quais elas apresentaram resistência. Verifica-se que 24 das 27 cepas testadas apresentam resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos.

A avaliação final dos resultados revela que os micro-organismos do gênero *Cronobacter* tem adquirido resistência a antimicrobianos por comparação com relatos anteriores encontrados na literatura. Contudo, esse comportamento não é surpreendente e provavelmente reflete o aumento de resistência dentre as enterobactérias em geral. Tradicionalmente, a antibioticoterapia para casos de infecção por *Cronobacter* spp. emprega a associação de ampicilina com gentamicina. Nesse estudo, a maioria das cepas apresentou resistência à ampicilina, independentemente da origem. De acordo com Lehner e Stephan (2004), a emergência de cepas resistentes à ampicilina tem induzido o uso de cefalosporinas mais recentes. Assim, a conclusão desse estudo está de acordo com Block et al. (2002) que sugere que não devem ser utilizadas pressupostas terapias antimicrobianas nos casos de infecção por *Cronobacter* spp. O tratamento deve ser baseado em julgamento clínico associado a ensaios de sensibilidade *in vitro*.

Tabela 9 – Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados e cepas de referência de *Cronobacter* spp.

Isolado/Cepa	Antimicrobianos ^a														
	AMI	AMP	SAM	ATM	CPM	CTX	CFO	CAZ	CFL	CIP	GEN	IPM	MER	PPT	SXT
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	S ^b	I ^c	S ^d	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. turicensis</i> 3032	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> E922	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	I	S
<i>C. sakazakii</i> E785	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> SK90	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	S	R	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA 894	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> HPB 2871	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	I	S
<i>C. malonaticus</i> 2A	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> 4A	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> HPB 2875	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> HPB 2876	S	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> E782	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> 3A	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	S	I	S	I	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> 1390	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> HPB 2887 - CDC A8	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> HPB 2891 - CDC B3	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> IOC-PC	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29004	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S

^a - AMI=amicacina; AMP=ampicilina; SAM=ampicilina/sulbactam; ATM=aztreonam; CPM=cefepima; CTX=cefotaxima; CFO=cefotaxina; CAZ=ceftazidima; CFL=cefalotina; CIP=ciprofloxacina; GEN=gentamicina; IPM=imipenem; MER=meropenem; PPT=piperacilina / tazobactam; SXT=trimethoprim-sulf;^b - S=Sensível; ^c - I=Resistência intermediária; ^d - R=Resistente.

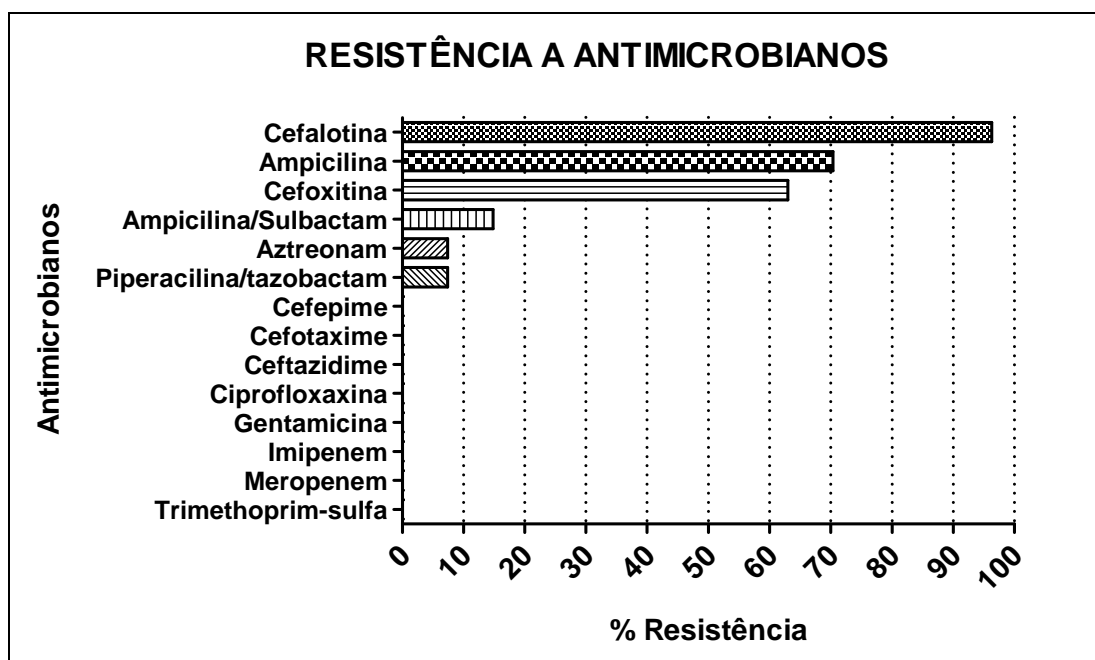


Figura 11- Porcentagem geral de resistência das cepas estudadas aos antimicrobianos testados.

Tabela 10 – Resistência das cepas estudadas ao total de drogas testadas.

Nº de drogas que apresenta resistência	Nº Cepas
0	1
1	2
2	11
3	8
4	3
5	2
Total	27

4.6.2. Produção de cápsula

Algumas estruturas bacterianas de superfície como cápsula e adesinas são consideradas como importantes fatores de virulência (SCHEMBRI et al., 2004). De acordo com Kim (2002) *E. coli* é o micro-organismo Gram negativo mais comumente associado a casos de meningite neonatal, e dentre esses agentes etiológicos, 80% apresentam polissacarídeo capsular. Esses autores sugerem que a cápsula esteja envolvida na inibição da atividade dos lisossomos das células eucarióticas,

possibilitando que o patógeno atravessasse a barreira hemato-encefálica, causando meningite. Segundo Dredge e Krishnamoorthy (2010), os neonatos apresentam maior risco de desenvolver sepse e meningite devido a deficiências na imunidade humoral e celular e na função de fagocitose celular. Esses autores sugerem que os neonatos apresentam deficiências na via alternativa de ativação do complemento, comprometendo sua capacidade de defesa contra bactérias encapsuladas. Dessa forma, consideramos importante avaliar a capacidade de produção de cápsula das cepas identificadas como *Cronobacter* spp. (Tabela 4).

Dentre as 27 cepas de *Cronobacter* spp. testadas, oito (*C. sakazakii* SK90, *C. sakazakii* ATCC 29544, *C. sakazakii* HPB 2875, *C. dublinensis* CFS 237, *C. genomoespecie* 1 NCTC 9529, *C. sakazakii* 1390, *C. sakazakii* HPB 2891 - CDC B3 e *C. sakazakii* IOC-PC) não foram capazes de formar cápsula nas condições testadas, após 24 horas de incubação (Tabela 11). Após 72 horas de incubação apenas 5 cepas (*C. sakazakii* ATCC 29544, *C. sakazakii* HPB 2875, *C. dublinensis* CFS 237, *C. sakazakii* HPB 2891 - CDC B3 e *C. sakazakii* IOC-PC) não apresentaram produção de cápsula. Cinco cepas (*C. malonaticus* CDC 1058-77, *C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* CDC 3128-77, *C. sakazakii* CFS 10, *C. sakazakii* ATCC 29004) foram capazes de aumentar a produção de cápsula após a leitura de 72 horas de incubação. Três cepas (*C. sakazakii* E785, *C. muytjensii* ATCC 51329 e *C. sakazakii* ATCC 12868) apresentaram intensa formação de cápsula já com 24 horas, mas três outras cepas (*C. malonaticus* CDC 1058-77, *C. sakazakii* E922 e *C. sakazakii* CDC 3128-77) só apresentaram intensa formação de cápsula na leitura de 72 horas. Esses dados indicam que nos ensaios para produção e detecção de cápsula em *Cronobacter* spp. as culturas devem ser incubadas por um período de pelo menos 72 horas.

De acordo com os resultados obtidos, o meio de cultura utilizado, contendo fórmula infantil como fonte de nutrientes parece constituir um bom meio para a produção de cápsula para micro-organismos do gênero *Cronobacter*.

Caubilla-Barron e colaboradores (2007) estudaram a produção de cápsula por cepas de *Cronobacter* spp. envolvidas em um surto em uma unidade neonatal de tratamento intensivo em 1994, na França. Esses autores relataram que apenas as cepas de origem clínica foram capazes de produzir cápsula. No presente estudo, a maioria das cepas (81,5%) apresentou cápsula após o período de 72 horas de incubação, independentemente da origem. Uma vez que as cepas de origem clínica

C. sakazakii ATCC 29544 e *C. sakazakii* SK90 apresentaram resultado negativo e fracamente positivo, respectivamente, para esse ensaio, é possível concluir que a produção de cápsula não seja um bom marcador de virulência para *Cronobacter* spp. ou que outros fatores possam estar envolvidos na regulação da expressão desse fenótipo, como a produção de biofilme, adesinas ou proteínas de autotransporte, conforme sugerido em alguns estudos (JOSEPH E WRIGHT, 2004; SCHEMBRI et al., 2004; KLEMM et al., 2006).

Tabela 11 – Capacidade de produção de cápsula pelos isolados e cepas de referência de *Cronobacter* spp.

Isolado/Cepa	Origem	Tempo de leitura ^a	
		24 horas	72 horas
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	clínica	+	+++
<i>C. turicensis</i> 3032	clínica	++	++
<i>C. sakazakii</i> E922	clínica	++	+++
<i>C. sakazakii</i> E785	clínica	+++	+++
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	clínica	+	+
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	clínica	++	+++
<i>C. sakazakii</i> SK90	clínica	-	+
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	clínica	-	-
<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA 894	clínica	++	++
<i>C. sakazakii</i> HPB 2871	FID ^b	+	+
<i>C. malonaticus</i> 2A	FID	++	++
<i>C. sakazakii</i> 4A	FID	++	++
<i>C. sakazakii</i> HPB 2875	FID	-	-
<i>C. sakazakii</i> HPB 2876	FID	++	++
<i>C. sakazakii</i> E782	FID	++	++
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	matéria prima	+	++
<i>C. sakazakii</i> 3A	ambiental	++	++
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	ambiental	-	-
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	ambiental	++	++
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	ambiental	-	++
<i>C. sakazakii</i> 1390	utensílio	-	+
<i>C. sakazakii</i> HPB 2887 - CDC A8	desconhecida	+	+
<i>C. sakazakii</i> HPB 2891 - CDC B3	desconhecida	-	-
<i>C. sakazakii</i> IOC-PC	desconhecida	-	-
<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	desconhecida	+++	+++
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29004	desconhecida	+	++
<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	desconhecida	+++	+++

^a – Resultados referentes à produção de cápsula: (-) negativa, (+) fraca, (++) moderada, (+++) intensa; ^b – Fórmula Infantil Desidratada.

4.6.3. Produção e detecção de biofilme

Existem vários relatos associando a colonização por *Cronobacter* spp. da superfície de utensílios empregados na manipulação de FID em lactários (colher, escova de mamadeira e liquidificador) com a infecção de neonatos por esses micro-organismos (MUYTJENS et al., 1983; NORIEGA, 1990; VAN ACKER, 2001). Além disso, o uso de tubos para alimentação enteral que pode se estender por períodos superiores a 48 horas, favorece a implantação de micro-organismos, como *Cronobacter* spp., devido às condições de temperatura (corpo humano) e disponibilidade de nutrientes (FID). Kim et al. (2006) relataram que as células de *Cronobacter* spp. presentes em biofilmes formados em tubos para alimentação enteral podem se destacar e formar grumos que são protegidos da acidez estomacal devido à sua capacidade de formar cápsula. Nesse trabalho foram estudadas cepas de *Cronobacter* spp. (Tabela 4) quanto à capacidade de formação de biofilme.

Os ensaios realizados em caldo BHI indicaram que a maioria das culturas foi fracamente aderente (FA; *C. sakazakii* E785, *C. sakazakii* CDC 996-77, *C. sakazakii* CDC 3128-77 *C. sakazakii* ATCC 29544, *C. malonaticus* 2A, *C. sakazakii* 4A, *C. sakazakii* HPB 2875, *C. sakazakii* HPB 2876, *C. sakazakii* CFS 10, *C. sakazakii* 3A, *C. dublinensis* CFS 237, *C. sakazakii* 1390, *C. sakazakii* IOC-PC, *C. sakazakii* HPB 2887 - CDC A8, *C. sakazakii* HPB 2891 - CDC B3, *C. sakazakii* IOC-PC, *C. muytjensii* ATCC 51329, *C. sakazakii* INCQS115/ATCC 29004, *C. sakazakii* ATCC 12868, *C. sakazakii* ATCC BAA 894), 6 culturas foram não aderentes (NA; *C. malonaticus* CDC 1058-77, *C. turicensis* 3032, *C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* SK90, *C. sakazakii* E782, *C. sakazakii* CFS 101, *C. genomoespecie* 1 NCTC 9529) e uma cultura foi fortemente aderente (*C. sakazakii* HPB 2871) (Tabela 12, Figura 12).

Os resultados em caldo LB foram diferentes e todas as culturas foram consideradas como não aderentes com exceção das cepas *C. sakazakii* 3A e *C. sakazakii* ATCC 12868 que foram classificadas como fracamente aderentes (Tabela 12 e Figura 12).

Três hipóteses podem ser levantadas para explicar a fraca produção de biofilme pelas cepas avaliadas. A primeira pode estar relacionada à composição dos meios de cultura utilizados. Dancer et al. (2009) estudaram 72 cepas de *Cronobacter* spp. e após avaliação geral dos resultados relataram que a fonte de nitrogênio é um importante determinante para formação de biofilme por *Cronobacter* spp. quando comparada a carboidratos. Eles verificaram que proteínas do soro e a caseína são

mais importantes do que a lactose para a formação de biofilme. Os meios de cultura empregados nesse estudo são ricos em nutrientes e aplicáveis inclusive para o crescimento de micro-organismos mais exigentes. O caldo LB não contém carboidratos, sendo a triptona (digesto pancreático de caseína) a fonte de nitrogênio e carbono e o extrato de levedura, a fonte de vitaminas. O caldo BHI é um meio de cultura tamponado que contém infusões de coração e cérebro e peptonas como fonte de nitrogênio. Além disso, contém glicose como carboidrato. Nesse estudo, as cepas testadas apresentaram maior produção de biofilme no caldo BHI que não contém caseína (presente no caldo LB) e contém carboidrato, resultados esses que discordam dos apresentados por Dancer et al. (2009).

Outra hipótese que explicaria a fraca formação de biofilme pelas cepas estudadas também está relacionada à composição dos meios de cultura. Kim et al. (2008) estudaram a produção de biofilme por *Cronobacter* spp., com variações na temperatura de incubação e na umidade relativa, em dois meios de cultura. Um deles, o caldo fórmula infantil (rico em nutrientes), foi preparado através da dissolução de uma fórmula infantil comercial em água destilada na proporção de 1:10 (p/v) com pH final de 6,6. O outro meio de cultura utilizado foi o meio M9 que contém a concentração mínima de nutrientes para o crescimento de micro-organismos e pH 7,2. Esses pesquisadores relataram que a produção de biofilme foi maior no meio M9, mas o biofilme formado no caldo fórmula infantil apresentou maior resistência à dessecação. Esses resultados confirmaram o relato de Dewanti e Wong (1995), que estudando cepas de *Escherichia coli* O157:H7, sugeriram que os meios de cultura com baixa concentração de nutrientes favorecem a formação de biofilme por micro-organismos, como uma forma de resistência às condições adversas do ambiente. Assim, como no presente estudo foram utilizados dois meios de cultura ricos em nutrientes (caldo BHI e caldo LB), essa hipótese explicaria a fraca formação de biofilme pelas cepas testadas.

A terceira hipótese está relacionada à expressão de cápsula. Segundo alguns pesquisadores (JOSEPH E WRIGHT, 2004; SCHEMBRI et al., 2004) a expressão de cápsula inibe a adesão bacteriana e/ou formação de biofilme em *Vibrio vulnificus*, *E. coli* K12 e *K. pneumoniae*. Assim, como nesse estudo apenas 5 das 27 cepas testadas não foram capazes de produzir cápsula, essa interferência pode ter ocorrido.

É importante ressaltar que a cepa *C. sakazakii* HPB 2871, classificada como fortemente aderente, foi isolada a partir de FID. Esse resultado reforça a necessidade de cuidados especiais na manipulação de fórmulas infantis no que se refere principalmente ao binômio tempo/temperatura durante a estocagem e administração desse tipo de alimento.

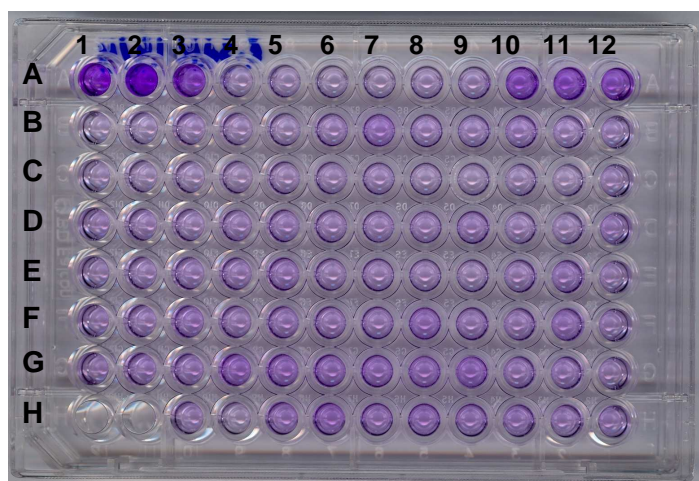


Figura 12 - Avaliação de formação de biofilme em caldo BHI. A1, 2 e 3- *E. coli* O42; A 4, 5 e 6- *C. malonaticus* CDC 1058-77; A 7, 8 e 9- *C. turicensis* 3032; A 10, 11 e 12- *C. sakazakii* HPB 2871; B 1, 2 e 3- *C. sakazakii* HPB2875; B 4, 5 e 6- *C. sakazakii* HPB 2876; B 7, 8 e 9- *C. malonaticus* 2A; B 10,11 e 12- *C. sakazakii* 4A; C 1, 2 e 3- *C. sakazakii* 3A; C 4, 5 e 6- *C. sakazakii* HPB 2887 CDC A8; C 7, 8 e 9- *C. sakazakii* HPB 2891 CDC B3; C 10, 11 e 12- *C. sakazakii* IOC-PC; D 1, 2 e 3- *C. muytjensii* ATCC 51329; D 4, 5 e 6- *C. sakazakii* ATCC 29004; D 7, 8 e 9- *C. sakazakii* ATCC 12868; D 10, 11 E 12- *C. sakazakii* E922; E 1, 2 e 3- *C. dublinensis* CFS 237; E 4, 5 e 6- *C. sakazakii* CFS 10; E 7, 8 e 9- *C. sakazakii* CFS 101; E 10, 11 e 12- *C. sakazakii* E782; F 1, 2 e 3- *C. sakazakii* E785; F 4, 5 e 6- *C. sakazakii* CDC 996-77; F 7, 8 e 9- *C. sakazakii* CDC 3128-77; F 10, 11 e 12- *C. sakazakii* SK90; G 1, 2 e 3- *C. genomoespecie* 1 NCTC 9529; G 4, 5 e 6- *C. sakazakii* ATCC BAA 894; G 7, 8 e 9- *C. sakazakii* 1390; G 10, 11 e 12- *C. sakazakii* ATCC29544; H 7, 8 e 9- *C. sakazakii* 1390; H 10, 11 e 12- caldo BHI.

Tabela 12 – Classificação das culturas quanto à formação de biofilme.

Isolado/Cepa	Origem	BHI		LB	
		A ₅₉₅ ± DP ^a	Classificação	A ₅₉₅ ± DP	Classificação
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	clínica	0,113 ± 0,013	NA ^b	0,115 ± 0,016	NA
<i>C. turicensis</i> 3032	clínica	0,112 ± 0,018	NA	0,117 ± 0,023	NA
<i>C. sakazakii</i> E922	clínica	0,130 ± 0,027	NA	0,147 ± 0,030	NA
<i>C. sakazakii</i> E785	clínica	0,132 ± 0,029	FA ^c	0,144 ± 0,029	NA
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	clínica	0,132 ± 0,016	FA	0,133 ± 0,013	NA
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	clínica	0,155 ± 0,068	FA	0,144 ± 0,020	NA
<i>C. sakazakii</i> SK90	clínica	0,112 ± 0,025	NA	0,130 ± 0,020	NA
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	clínica	0,204 ± 0,040	FA	0,142 ± 0,027	NA
<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA 894	clínica	0,247 ± 0,037	FA	0,121 ± 0,031	NA
<i>C. sakazakii</i> HPB 2871	FID ^d	0,574 ± 0,369	FMA ^e	0,142 ± 0,035	NA
<i>C. malonaticus</i> 2A	FID	0,214 ± 0,035	FA	0,114 ± 0,014	NA
<i>C. sakazakii</i> 4A	FID	0,206 ± 0,033	FA	0,139 ± 0,023	NA
<i>C. sakazakii</i> HPB 2875	FID	0,194 ± 0,034	FA	0,145 ± 0,032	NA
<i>C. sakazakii</i> HPB 2876	FID	0,180 ± 0,016	FA	0,137 ± 0,029	NA
<i>C. sakazakii</i> E782	FID	0,125 ± 0,017	NA	0,138 ± 0,018	NA
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	matéria prima	0,188 ± 0,067	FA	0,148 ± 0,043	NA
<i>C. sakazakii</i> 3A	ambiental	0,183 ± 0,013	FA	0,179 ± 0,082	FA
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	ambiental	0,135 ± 0,038	FA	0,133 ± 0,034	NA
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	ambiental	0,127 ± 0,015	NA	0,140 ± 0,019	NA
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	ambiental	0,121 ± 0,035	NA	0,138 ± 0,049	NA
<i>C. sakazakii</i> 1390	utensílio	0,249 ± 0,048	FA	0,138 ± 0,007	NA

Continua

Continuação da Tabela 12

Isolado/Cepa	Origem	BHI		LB	
		A ₅₉₅ ± DP ^a	Classificação	A ₅₉₅ ± DP	Classificação
<i>C. sakazakii</i> HPB 2887 - CDC A8	desconhecida	0,200 ± 0,045	FA	0,134 ± 0,027	NA
<i>C. sakazakii</i> HPB 2891 - CDC B3	desconhecida	0,174 ± 0,013	FA	0,139 ± 0,025	NA
<i>C. sakazakii</i> IOC-PC	desconhecida	0,178 ± 0,034	FA	NT ^f	-
<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	desconhecida	0,215 ± 0,035	FA	0,137 ± 0,028	NA
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29004	desconhecida	0,254 ± 0,049	FA	0,138 ± 0,020	NA
<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	desconhecida	0,234 ± 0,038	FA	0,213 ± 0,128	FA
<i>E. coli</i> 042	clínica	0,803 ± 0,659	FMA	0,660 ± 0,380	FMA
caldo BHI	-	0,131 ± 0,010	CN ^g	-	-
caldo LB	-	-	-	0,149 ± 0,038	CN

^a A₅₉₅ ± DP – Absorbância a 595 nanômetros ± Desvio Padrão; ^b - Não Aderente; ^c – Fracamente Aderente; ^d – Fórmula Infantil Desidratada; ^e – Fortemente Aderente; ^f – Não Testada; ^g – Controle negativo.

4.6.4. Atividade proteolítica

Os patógenos bacterianos apresentam diferentes fatores, arranjos ou sistemas que contribuem com a sua capacidade de virulência de forma direta ou indireta, tendo como objetivo a sobrevivência em ambientes com condições adversas, como por exemplo, sua replicação no hospedeiro (INGMER e BRONDSTED, 2009). Nas bactérias Gram negativas as proteases agem em vários processos biológicos da parede celular potencializando a capacidade patogênica desses micro-organismos (INGMER & BRONDSTED, 2009).

Estudos realizados com cepas de *Cronobacter* spp. isoladas de um surto em uma unidade neonatal de terapia intensiva na França, em 1994, (CAUBILLA-BARRON et al., 2007; TOWSEN et al., 2008) relataram que as cepas de origem clínica apresentaram atividade de protease diferentemente das cepas isoladas de FID. Nesse estudo, a produção de protease foi avaliada como possível marcador de virulência para *Cronobacter* spp. empregando cepas de diferentes origens (Tabela 4).

Dentre as 27 culturas de *Cronobacter* spp. estudadas, dez (*C. malonaticus* CDC 1058-77, *C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* E785, *C. sakazakii* CDC 996-77, *C. sakazakii* CDC 3128-77, *C. sakazakii* SK90, *C. sakazakii* HPB 2876, *C. sakazakii* E782, *C. dublinensis* CFS 237 e *C. genomoespecie* 1 NCTC 9529) apresentaram atividade proteolítica nas condições testadas (Tabela 13, Figura 13). Apenas quatro cepas (*C. malonaticus* CDC 1058-77, *C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* HPB 2876 e *C. genomoespecie* 1 NCTC 9529) apresentaram resultado positivo após 5 dias de incubação. As demais apresentaram resultado positivo após 10 dias. A cepa *C. sakazakii* E782 foi a que apresentou maior atividade proteolítica apesar do resultado negativo na leitura de 5 dias. De acordo com os resultados obtidos, o período de 5 dias de incubação não foi suficiente para avaliar a capacidade proteolítica das cepas estudadas nas condições testadas (Tabela 13).

São poucos os estudos que avaliaram a produção de protease por *Cronobacter* spp. Kothary et al. (2007) testaram 74 cepas de *Cronobacter* spp. de diferentes origens, nas quais a presença do gene para protease havia sido detectada por PCR. Essas cepas foram cultivadas durante 3-4 dias em ágar contendo leite e apenas 50% delas apresentou atividade proteolítica. Considerando os dados obtidos através do presente estudo, esse resultado pode ser atribuído à

ausência de expressão do gene de protease ou ao tempo de incubação que pode ter sido insuficiente para a detecção da atividade de protease.

Carranza et al. (2009), em estudo de proteômica com a cepa *C. turicensis* 3032, não detectaram atividade proteolítica sobre caseína apesar de terem detectado uma metaloprotease. No presente estudo, a cepa *C. turicensis* 3032 também não apresentou atividade proteolítica.

Não foi possível correlacionar a atividade de protease com a origem das cepas estudadas tendo em vista que foram obtidos resultados positivos tanto com cultivos de origem clínica, como de FID e ambiental. Estudos complementares empregando períodos de incubação mais longos (durante 10 dias, p. ex.) devem ser realizados para melhor avaliação do comportamento dessas cepas.



Figura 13 - Atividade de protease exibida pela cepa *C. sakazakii* HPB2876 em ágar leite modificado

Tabela 13 – Atividade proteolítica dos isolados e cepas de referência de *Cronobacter* spp.

Isolado/Cepa	Origem	Tempo de leitura ^a	
		5 dias	10 dias
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	clínica	+	++
<i>C. turicensis</i> 3032	clínica	-	-
<i>C. sakazakii</i> E922	clínica	+	++
<i>C. sakazakii</i> E785	clínica	-	++
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	clínica	-	++
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	clínica	-	++
<i>C. sakazakii</i> SK90	clínica	-	+
<i>C. sakazakii</i> INCQS 597 (ATCC 29544)	clínica	-	NT
<i>C. sakazakii</i> INCQS 583 (ATCC BAA 894)	clínica	-	NT
<i>C. sakazakii</i> HPB 2871	FID ^b	-	-
<i>C. malonaticus</i> 2A	FID	-	NT
<i>C. sakazakii</i> 4A	FID	-	NT
<i>C. sakazakii</i> HPB 2875	FID	-	NT
<i>C. sakazakii</i> HPB 2876	FID	++	NT
<i>C. sakazakii</i> E782	FID	-	+++
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	matéria prima	-	-
<i>C. sakazakii</i> 3A	ambiental	-	NT
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	ambiental	-	+
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	ambiental	-	-
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	ambiental	++	++
<i>C. sakazakii</i> 1390	utensílio	-	NT
<i>C. sakazakii</i> HPB 2887 - CDC A8	desconhecida	-	NT
<i>C. sakazakii</i> HPB 2891 - CDC B3	desconhecida	-	NT
<i>C. sakazakii</i> IOC-PC	desconhecida	-	NT
<i>C. muytjensii</i> INCQS 579 (ATCC 51329)	desconhecida	-	NT
<i>C. sakazakii</i> INCQS 115 (ATCC 29004)	desconhecida	-	NT
<i>C. sakazakii</i> INCQS 580 (ATCC 12868)	desconhecida	-	NT

^a – Resultados referentes à atividade proteolítica: (-) negativa, (+) fraca, (++) moderada, (+++) intensa, (NT) Não testada; ^b – Fórmula Infantil Desidratada.

4.6.5. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica é um conhecido mecanismo bacteriano para aquisição de ferro. Assim, as hemolisinas são importantes fatores de virulência (FINLAY & FALKOW, 1989) devido à capacidade de prover ferro *in vivo* (LINGGOOD & INGRAM, 1982; WAALWIJK et al., 1983). Muitos gêneros da família *Enterobacteriaceae* apresentam capacidade de produzir hemolisinas dentre outras toxinas.

Simi et al. (2003) isolaram uma hemolisina termo-resistente em 7 das 50 cepas clínicas de *E. cloacae* estudadas. Hemolisinas similares foram encontradas

em *P. mirabilis* e *S. marcescens*, sugerindo um gene ancestral comum (BRAUN & FOCARETA, 1991). Assim, é possível que hemolisinas similares sejam encontradas em espécies ou gêneros bacterianos relacionados, incluindo *Cronobacter* (DANCER & KANG, 2009). Nesse estudo foram testadas cepas de *Cronobacter* spp. (Tabela 4) frente a diferentes espécies de eritrócitos (coelho, cavalo, carneiro e cobaio) para avaliar a produção de hemolisinas.

Todas as cepas testadas apresentaram atividade β -hemolítica em sangue de coelho, cavalo, carneiro e α -hemolítica em sangue de cobaio (Tabela 14), mas não foi possível correlacionar o grau de atividade hemolítica com a origem ou espécie das cepas estudadas.

Uma vez que nesse estudo foi demonstrada a capacidade hemolítica de todas as cepas testadas, é recomendável a avaliação do grau de similaridade entre as hemolisinas de *Cronobacter* spp. e dos outros membros da família *Enterobacteriaceae*. Pesquisas complementares devem ser realizadas para determinar se no gênero *Cronobacter*, além da atividade lítica de eritrócitos, existe também a atividade lítica de células eucarióticas, ou seja, se esses microorganismos produzem citolisinas. Além disso, é importante determinar o envolvimento de hemolisinas no mecanismo de patogenicidade desse gênero.

Tabela 14 – Atividade hemolítica dos isolados e cepas de referência de *Cronobacter* spp.

Isolado/Cepa	Tipo de Hemólise (halo em mm)			
	Coelho	Cavalo	Carneiro	Cobaio
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	β (4)	β (5)	α	β (1,5)
<i>C. turicensis</i> 3032	β (4)	β (6)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> E922	β (4)	β (6)	α	NT
<i>C. sakazakii</i> E785	β (4)	β (6)	α	β (1)
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	β (3)	β (4)	α	β (1)
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	β (4)	β (4)	α	β (1)
<i>C. sakazakii</i> SK90	β (2)	β (4)	α	β (1)
<i>C. sakazakii</i> INCQS 597 (ATCC 29544)	β (1)	β (2)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> INCQS 583 (ATCC BAA 894)	β (2)	β (5)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2871	β (2)	β (3)	α	β (1,5)
<i>C. malonaticus</i> 2A	β (2)	β (8)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> 4A	β (3)	β (3)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2875	β (1)	β (5)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2876	β (3)	β (4)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> E782	β (3)	β (5)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	β (4)	β (6)	α	β (1)
<i>C. sakazakii</i> 3A	β (2)	β (4)	α	β (1,5)
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	β (3)	β (6)	α	β (2)
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	β (3)	β (6)	α	β (1,5)
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	β (2)	β (5)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> 1390	β (2)	β (5)	α	β (1)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2887 - CDC A8	β (2)	β (6)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2891 - CDC B3	β (1,5)	β (2)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> IOC-PC	β (1)	β (1)	α	β (1,5)

Continua

Continuação da **Tabela 14**

Isolado/Cepa	Tipo de Hemólise (halo em mm)			
	Coelho	Cavalo	Carneiro	Cobaio
<i>C. muytjensii</i> INCQS 579 (ATCC 51329)	β (2)	β (4)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> INCQS 115 (ATCC 29004)	β (2)	β (4)	α	β (1,5)
<i>C. sakazakii</i> INCQS 580 (ATCC 12868)	β (1)	β (4)	α	β (1,5)

4.6.6. Capacidade de hemaglutinação

A capacidade de aderir a superfícies do hospedeiro, como membranas de células das mucosas, epitélios gástrico e intestinal ou tecido endotelial são características inerentes a patógenos bacterianos que causam doença após a colonização. Segundo Adegbola e Old (1983), *Cronobacter* spp. é capaz de produzir hemaglutinina manose-sensível associada a fimbria tipo 1 que tem função de adesina. Assim, tendo em vista o relato desses mesmos autores de que pili tipo 3 (capaz de aglutinar eritrócitos taninizados) são comuns entre as enterobactérias, que os membros dessa família que apresentam atividade de hemaglutinação geralmente são capazes de aderir ao epitélio (DUGUID et al., 1979) e que as enterobactérias que apresentam pili tipo 3 são patógenos oportunistas frequentemente associados a infecções em indivíduos imunocomprometidos (HORNICK et al., 1991; SEBGHATI et al., 1998) esse estudo testou as cepas identificadas como *Cronobacter* spp. (Tabela 4) quanto à sua capacidade de hemaglutinação.

Nesse estudo, os ensaios foram realizados conforme descrito por Old (1972). Foram utilizadas suspensões de eritrócitos (3%) de carneiro, cobaio, coelho e cavalo, com e sem adição de manose (1%) e com e sem tratamento com ácido tânico (DUGUID, 1979). Foram testadas as 27 culturas identificadas como *Cronobacter* spp. e dentre essas 16 (59,3%) apresentaram capacidade de hemaglutinação em pelo menos um dos sistemas testados (Tabela 15).

O comportamento das culturas frente aos eritrócitos foi variável, sendo que hemaglutinação manose sensível (associada à pili tipo 1) foi observada nas cepas *C. dublinensis* CFS 237 (eritrócitos de carneiro e coelho), *C. sakazakii* HPB 2887 – CDC A8 (eritrócitos de cobaio), *C. sakazakii* HPB 2891 – CDC B3 (eritrócitos de coelho). Já a aglutinação de eritrócitos taninizados (associada à pili tipo 3) foi verificada nas cepas *C. sakazakii* E785 (eritrócitos de carneiro e cavalo), *C. dublinensis* CFS 237 (eritrócitos de carneiro, coelho e cobaio), *C. sakazakii* HPB 2891 – CDC B3 (eritrócitos de carneiro e cavalo), *C. sakazakii* 4A (eritrócitos de cavalo, cobaio e coelho), *C. sakazakii* 1390 (eritrócitos de cavalo e cobaio), *C. sakazakii* CDC 3128-77 (eritrócitos de cobaio e coelho), *C. sakazakii* CDC 996-77 (eritrócitos de coelho) e *C. genomoespecie* 1 NCTC 9529 (eritrócitos de coelho) (Tabela 15). Apresentaram hemaglutinação manose resistente as cepas *C. sakazakii* E785 (eritrócitos de carneiro e cavalo), *C. sakazakii* 4A (eritrócitos de carneiro, cavalo, cobaio e coelho), *C. sakazakii* CDC 3128-77 (eritrócitos de cavalo, cobaio),

C. malonaticus 2A (eritrócitos de cavalo, cobaio), *C. dublinensis* CFS 237 (eritrócitos de cavalo e cobaio), *C. sakazakii* HPB 2891 – CDC B3 (eritrócitos de cavalo e cobaio), *C. sakazakii* HPB 2871 (eritrócitos de cobaio), *C. sakazakii* HPB 2875 (eritrócitos de cobaio), *C. sakazakii* HPB 2876 (eritrócitos de cobaio), *C. sakazakii* 3A (eritrócitos de cobaio), *C. sakazakii* 1390 (eritrócitos de cobaio), *C. sakazakii* IOC-PC (eritrócitos de cobaio), *C. sakazakii* ATCC 12868 (eritrócitos de cobaio) e *C. sakazakii* CDC 996-77 (eritrócitos de coelho) (Tabela 15).

É interessante destacar que nenhuma cepa de origem clínica apresentou hemaglutinação manose sensível, associada ao pili tipo 1 (Tabela 15). As cepas *C. dublinensis* CFS 237 (ambiental) e *C. sakazakii* HPB 2891 – CDC B3 (origem desconhecida) apresentaram aglutinação com todos os tipos de eritrócitos utilizados e a cepa brasileira, *C. sakazakii* 4A isolada a partir de FID, apresentou aglutinação manose resistentes com todas as espécies de eritrócitos testados (Tabela 15). As cepas apresentaram maior capacidade de aglutinação com eritrócitos de cobaio (Figura 14).

Mange et al. (2006) testaram três cepas de *Cronobacter* spp., de origem clínica, quanto à capacidade de aderência a células de epitélio (Hep-2 e Caco-2) e relataram que as cepas apresentaram aderência difusa e aderência agregativa às linhagens celulares mesmo quando submetidas a tratamento prévio com tripsina. Entretanto, a adição de manose na concentração de 2% inibiu a aderência difusa, que poderia ser atribuída à presença de pili tipo I, sem interferir na aderência agregativa. Esses autores também testaram as três cepas clínicas de *Cronobacter* spp. quanto à capacidade de aglutinação de hemácias de cavalo, antes e após tratamento com ácido tânico, e obtiveram resultados negativos nesse ensaio. Eles concluíram que *Cronobacter* spp. não apresentam pili tipo I e tipo 3, mas sugeriram estudos com eritrócitos de outros animais. Mange et al. (2006) também relataram que as células de *Cronobacter* spp. cultivadas em ágar LB não apresentaram fímbrias quando observadas através de microscopia eletrônica. Assim, esses autores sugeriram que a adesão de *Cronobacter* spp. às células eucarióticas não é mediada por fímbrias. Os relatos de Mange et al. (2006) não estão de acordo com os resultados do presente estudo que demonstrou a presença de hemaglutininas associadas a pili tipo 1 e/ou tipo 3 em 59,3% das cepas estudadas. Além disso, Mange et al. (2006) pesquisaram fímbrias em células de *Cronobacter* spp. cultivadas

em meio de cultura sólido que, de acordo com Duguid et al. (1979), não favorecem a formação dessas estruturas.

Lehner et al. (2006b), estudando a caracterização genotípica de *Cronobacter* spp., detectaram um *operon* onde se encontram genes que codificam proteínas preditivas com alta similaridade às pilinas, proteínas estruturais de fímbrias/pili, indicando que esse gênero bacteriano pode apresentar pili. Kucerova et al. (2010), em estudo comparativo do genoma de cepas de *Cronobacter* spp. encontraram genes que codificam adesinas únicas em cepas obtidas em surtos ocorridos em unidades neonatais de tratamento intensivo.

No presente estudo, a demonstração de capacidade de hemaglutinação por cepas de *Cronobacter* spp., indicativa de presença de pili tipo 1 e tipo 3 comprovam os achados de Lehner et al. (2006b) e Kucerova et al. (2010) que haviam detectado os genes putativos de adesinas nesse gênero de micro-organismos.

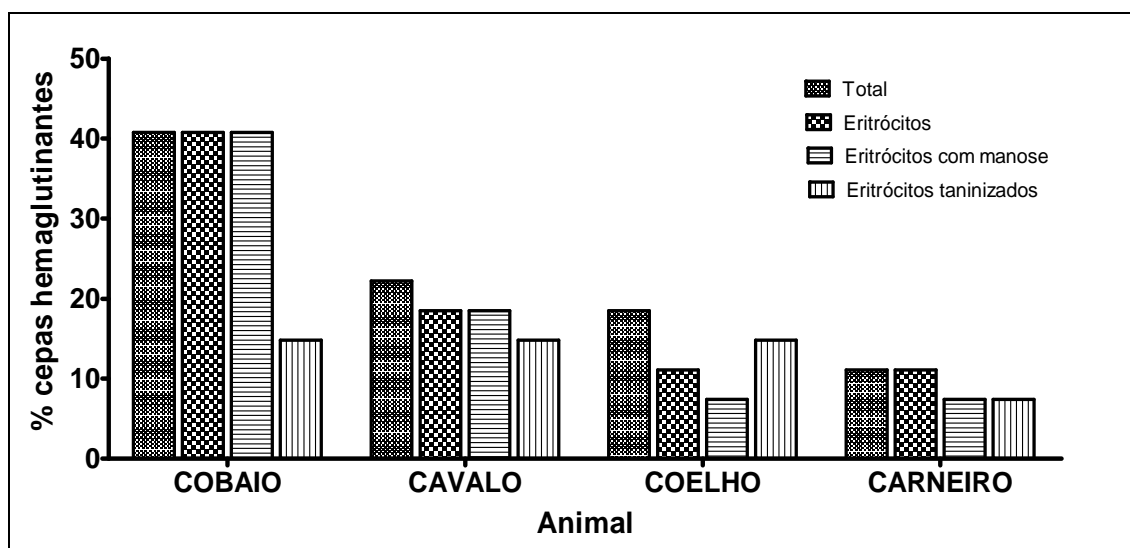


Figura 14 – Porcentagem de cepas de *Cronobacter* com capacidade hemaglutinante frente a eritrócitos de diferentes espécies animais.

Tabela 15 – Classificação das culturas de *Cronobacter* spp. quanto à capacidade aglutinante frente a eritrócitos de diferentes espécies animais.

Isolado/Cepa	Origem	HEMAGLUTINAÇÃO												
		Carneiro			Cavalo			Cobaio			Coelho			
		H ^a	HM ^b	HT ^c	H	HM	HT	H	HM	HT	H	HM	HT	
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	clínica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. turicensis</i> 3032	clínica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> E922	clínica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> E785	clínica	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	clínica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	clínica	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>C. sakazakii</i> SK90	clínica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	clínica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> INCQS 583 ATCC BAA 894	clínica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> HPB 2871	FID ^d	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. malonaticus</i> 2A	FID	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> 4A	FID	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. sakazakii</i> HPB 2875	FID	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> HPB 2876	FID	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> E782	FID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	matéria prima	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> 3A	ambiental	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	ambiental	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	ambiental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	ambiental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. sakazakii</i> 1390	utensílio	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> HPB 2887 – CDC A8	desconhecida	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> HPB 2891 - CDC B3	desconhecida	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> IOC-PC	desconhecida	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	desconhecida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29004	desconhecida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	desconhecida	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

^a – eritrócitos não tratados; ^b - eritrócitos com manose; ^c - eritrócitos taninizados; ^d – Fórmula Infantil Desidratada.

4.6.7. Atividade citotóxica em células Vero

Os micro-organismos apresentam diversas estratégias para romper a membrana das células do hospedeiro e desenvolver infecção e dentre elas se encontram as toxinas bacterianas. As enterobactérias produzem duas classes principais de enterotoxinas, as termo-lábeis (LT) e as termo-estáveis (ST). Uma vez que a via gastrintestinal é a principal porta de entrada de *Cronobacter* spp. no organismo de neonatos, nesse estudo foi avaliada a capacidade citotóxica de cepas desse gênero bacteriano em culturas de células da linhagem Vero, por ser esse um modelo amplamente utilizado no estudo da citotoxicidade bacteriana.

Nessa fase do estudo do potencial patogênico de *Cronobacter* spp. foram selecionadas doze cepas de *Cronobacter* spp. (Tabela 16). A seleção foi realizada de forma a se obter representantes de cada uma das espécies e de diferentes fontes de isolamento, mas com preferência para as cepas clínicas.

Foram empregadas duas metodologias para a detecção de citotoxicidade; a coloração por azul de Comassie e a redução de sal tetrazólio MTT.

Dentre as doze cepas de *Cronobacter* spp. testadas, oito apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos sistemas empregados (Tabela 16). Os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões diferentes. A validade dos ensaios foi avaliada através dos resultados obtidos com os controles positivos e negativos. Uma vez que alguns ensaios realizados com sobrenadantes aquecidos usando o CBBR e outros usando o MTT não foram considerados válidos, não foi possível completar o set de triplicata de resultados, gerando dados incompletos (DI) conforme apresentados na Tabela 16.

Os resultados obtidos pela ação dos sobrenadantes das cepas em teste sobre as monocamadas de células Vero foram comparados individualmente aos resultados obtidos com os sobrenadantes de *E. coli* C600 (controle negativo) a fim de verificar a existência de diferença estatisticamente significativa entre os resultados (item 3.2.6.8.4).

O ensaio empregando o corante CBBR se baseia na capacidade desse agente corar proteínas e lipídios celulares. Assim, após adsorção, eluição e leitura da absorbância do corante eluído é possível determinar a quantidade de células mortas ou destacadas da fase sólida por comparação com o controle.

Já a metodologia que emprega o MTT se baseia na capacidade das células eucarióticas reduzirem esse composto através da ação da enzima mitocondrial

succinato-desidrogenase, gerando cristais de formazan, que são azuis e solúveis em álcool isopropílico. O resultado da determinação da absorbância do corante indica o grau de atividade metabólica das células eucarióticas.

A metodologia que utiliza o CBBR permitiu detectar 7 cultivos capazes de causar efeito citotóxico em células Vero e o método que emprega o MTT apenas 4 cultivos com capacidade citotóxica (Tabela 16). Entretanto, apenas a metodologia que emprega o MTT foi capaz de detectar efeito citotóxico pelo sobrenadante da cepa *C. malonaticus* CDC 1058-77. A detecção de resultados positivos com apenas um sistema, como no caso da cepa *C. malonaticus* CDC 1058-77 com MTT e das cepas *C. turicensis* 3032, *C. sakazakii* E785, *C. sakazakii* CDC 996-77e *C. sakazakii* CDC 3128-77 com CBBR, pode ser explicada pela menor sensibilidade de um dos sistemas, pela possível ação intracelular das toxinas independente da atividade mitocondrial ou pela possível produção de mais de um tipo de citotoxina por *Cronobacter* spp. Esses resultados indicam que a utilização de mais de um sistema para avaliação do efeito citotóxico de *Cronobacter* spp. pode ser necessário.

Alguns cultivos apresentaram citotoxicidade mesmo após aquecimento (100°C/20 min), o que indica que *Cronobacter* spp. é capaz de produzir citotoxinas termo-estável.

Os resultados desse estudo corroboram os dados obtidos por Pagotto et al. (2003) que relataram que o filtrado de alguns cultivos de *Cronobacter* spp. de origem clínica causaram acúmulo de fluido no intestino de camundongos recém-nascidos e que o filtrado de uma dessas cepas apresentou efeito citopático em células Vero (sem aquecimento) e em células Y-1 (com e sem aquecimento). Kothary et al. (2007) demonstraram que *Cronobacter* spp. produz uma metaloprotease que causa efeito citopático em células CHO, que parece estar associada à necrose celular em neonatos com enterocolite necrosante e também parece estar envolvida no processo de travessia da barreira hemato-encefálica.

Dessa forma, uma vez comprovada a capacidade de cepas de *Cronobacter* spp. de produzir citotoxina(s) serão necessários estudos adicionais para determinar o(s) mecanismo(s) de ação dessa(s) citotoxina(s).

Tabela 16 – Avaliação da atividade citotóxica dos sobranadantes de culturas de *Cronobacter* spp. em células Vero.

CEPA	CBBR ^a sem aquecimento			MTT ^b sem aquecimento			CBBR com aquecimento			MTT com aquecimento		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	-	-	-	-	+	+	DI ^c	-	DI	-	+	-
<i>C. turicensis</i> 3032	-	-	+	-	-	-	DI	+	DI	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> E922	-	-	-	-	-	-	DI	DI	DI	-	DI	DI
<i>C. sakazakii</i> E785	-	+	-	-	-	-	DI	DI	DI	DI	-	-
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	-	+	-	-	-	-	DI	DI	DI	-	DI	-
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	-	+	-	-	-	-	DI	DI	DI	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> SK90	-	+	-	-	-	+	DI	DI	DI	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> E782	-	-	-	-	-	-	-	-	DI	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	-	-	+	-	-	+	DI	+	DI	-	-	-
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	-	-	-	-	-	-	DI	-	DI	-	-	-
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	-	-	-	-	-	-	DI	-	DI	-	-	-
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	-	+	-	+	+	+	DI	DI	DI	+	+	-

^a CBBR = Azul Brilhante de Comassie; ^b MTT = brometo de dimetil-tiazol-difenil tetrazólio; ^c DI = Dados Incompletos.

4.6.8. Capacidade invasora de células Vero

Os patógenos bacterianos geralmente causam infecção através de um processo que envolve adesão às células do hospedeiro, colonização de tecidos e, em alguns casos, invasão celular seguida de multiplicação intracelular, disseminação para outros tecidos e persistência (PIZARRO-CERDÁ e COSSART, 2006). A invasão de células eucarióticas por *Cronobacter* spp. foi demonstrada por Townsend et al. (2008) e Kim e Loessner (2008). No presente estudo, cepas de *Cronobacter* spp. de diferentes origens foram testadas quanto à sua capacidade de invadir células Vero.

Dentre as 27 cepas de *Cronobacter* spp. (Tabela 4) estudadas, 17 (63%) demonstraram capacidade de invasão em células Vero ($p < 0,05$), em relação à *E. coli* C600 usada como controle negativo (Tabela 17). As cepas que apresentaram maior percentual de invasão foram *C. sakazakii* ATCC 29544 (origem clínica), *C. sakazakii* E782 (isolada de FID) e *C. sakazakii* IOC-PC (origem desconhecida). Várias outras cepas também apresentaram capacidade de invasão superior à da cepa de *Salmonella* Enteritidis usada como controle positivo (Figura 17).

Vários estudos tem sugerido que OmpA, uma proteína da membrana externa de micro-organismos Gram negativos, contribui significativamente para o potencial de virulência de *Cronobacter* spp., inclusive no que se refere à sua capacidade de invasão de células de mamíferos (MOHAN NAIR & VENKITANARAYANAN, 2007; SINGAMSETTY et al., 2008; MITTAL et al., 2009; MOHAN NAIR et al., 2009). Carranza et al. (2009) estudaram o perfil proteômico da cepa *C. turicensis* 3032 e relataram a presença de OmpA, mas no nosso estudo, essa cepa não mostrou capacidade de invasão de células Vero (Tabela 17; Figura 17). Esse resultado pode ser explicado pela ausência de expressão do gene que codifica OmpA durante os experimentos realizados nesse estudo ou pela necessidade da ativação de OmpA com sistemas ou moléculas específicas, não disponíveis durante os ensaios.

Townsend et al. (2007), usando as cepas *C. sakazakii* ATCC 29544, *C. sakazakii* ATCC 12868, *C. muytjensii* ATCC 51329 e *C. sakazakii* ATCC BAA-894, estudaram a capacidade de invasão de células endoteliais cerebrais de ratos (rBCEC4), persistência em macrófagos humanos (U937) e indução de patologia cerebral em ratos. Esses autores relataram que apesar das quatro cepas apresentarem persistência e capacidade de replicação no interior de macrófagos, apenas as cepas ATCC 12868 e ATCC BAA-894 apresentaram capacidade de

invasão de células endoteliais e desenvolvimento de meningite em ratos. No presente estudo, as quatro cepas *C. sakazakii* ATCC 12868 e *C. sakazakii* ATCC BAA-894, *C. sakazakii* ATCC 29544 e *C. muytjensii* ATCC 51329 foram capazes de invadir células Vero (Tabela 17; Figura 17).

Kim e Loessner (2008) estudaram o mecanismo de invasão de *Cronobacter* spp. em células Caco-2 e relataram a capacidade invasora de *C. sakazakii* ATCC 29544. No presente estudo essa mesma cepa também apresentou capacidade de invadir células Vero (Tabela 17; Figura 6).

Kucerova et al. (2010) estudando a sequência genômica de *C. sakazakii* ATCC BAA-894 encontraram nessa cepa e nas cepas *C. sakazakii* ATCC 29544, *Cronobacter turicensis* 3032 e *Cronobacter malonaticus* CDC 1058-77 o gene que codifica OmpA e um conjunto de genes associados à invasão de células endoteliais microvasculares de cérebro (BMEC) e a casos de meningite por outros patógenos. No presente estudo, as cepas *C. sakazakii* ATCC BAA-894 e *C. sakazakii* ATCC 29544 apresentaram resultado positivo no ensaio de invasão de células Vero, mas as cepas *Cronobacter turicensis* 3032 e *Cronobacter malonaticus* CDC 1058-77 apresentaram resultado negativo (Tabela 17; Figura 17). Essa diferença de comportamento das cepas pode ser explicada pela ausência de expressão dos genes associados à invasão celular nas cepas *Cronobacter turicensis* 3032 e *Cronobacter malonaticus* CDC 1058-77 ou pela existência de mecanismos distintos para a ativação do mecanismo de invasão tendo em vista que esses microorganismos não pertencem à espécie *C. sakazakii*.

Townsend et al. (2008), em estudo *in vitro* com cepas de *Cronobacter* spp. associadas a um surto em unidade de tratamento intensivo de neonatos, na França, demonstraram que existe variação no potencial invasivo dessas cepas. Eles concluíram que não foi possível correlacionar os sintomas dos pacientes com os resultados dos ensaios *in vitro*. No nosso estudo, as cepas *C. malonaticus* CDC 1058-77, *Cronobacter turicensis* 3032, *C. sakazakii* E785, *C. sakazakii* CDC 996-77 e *C. sakazakii* CDC 3128-77, apesar de terem sido isoladas de casos clínicos, não apresentaram capacidade de invadir células Vero. Esses resultados podem ser explicados pela perda ou ausência de expressão de genes responsáveis pela invasão celular. Outra hipótese para explicar esse resultado pode estar associada à linhagem celular empregada, que pode não ser o melhor modelo para os estudos de invasão por *Cronobacter* spp.

Estudos adicionais empregando outras linhagens celulares são importantes para a avaliação de cepas de *Cronobacter* spp. quanto à capacidade de invasão de células eucarióticas e ao mecanismo de patogenicidade.

Tabela 17 – Capacidade invasora de células Vero por cepas de *Cronobacter* spp., em relação à *E. coli* C600 (controle negativo).

Isolado/Cepa	Origem	Capacidade de invasão (valor <i>p</i>)	
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	clínica	Neg	(-)
<i>C. turicensis</i> 3032	clínica	Neg	(-)
<i>C. sakazakii</i> E922	clínica	Pos	(<i>p</i> <0,05)
<i>C. sakazakii</i> E785	clínica	Neg	(-)
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	clínica	Neg	(-)
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	clínica	Neg	(-)
<i>C. sakazakii</i> SK90	clínica	Pos	(<i>p</i> <0,05)
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	clínica	Pos	(<i>p</i> <0,05)
<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA 894	clínica	Pos	(<i>p</i> <0,05)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2871	FID ^b	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. malonaticus</i> 2A	FID	Neg	(-)
<i>C. sakazakii</i> 4A	FID	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2875	FID	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2876	FID	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. sakazakii</i> E782	FID	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	matéria prima	Pos	(<i>p</i> <0,05)
<i>C. sakazakii</i> 3A	ambiental	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	ambiental	Neg	(-)
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	ambiental	Neg	(-)
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	ambiental	Neg	(-)
<i>C. sakazakii</i> 1390	utensílio	Neg	(-)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2887 - CDC A8	desconhecida	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. sakazakii</i> HPB 2891 - CDC B3	desconhecida	Pos	(<i>p</i> <0,05)
<i>C. sakazakii</i> IOC-PC	desconhecida	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	desconhecida	Pos	(<i>p</i> <0,01)
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29004	desconhecida	Pos	<i>p</i> <0,05
<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	desconhecida	Pos	(<i>p</i> <0,01)
Total cepas = 27	-	17	-

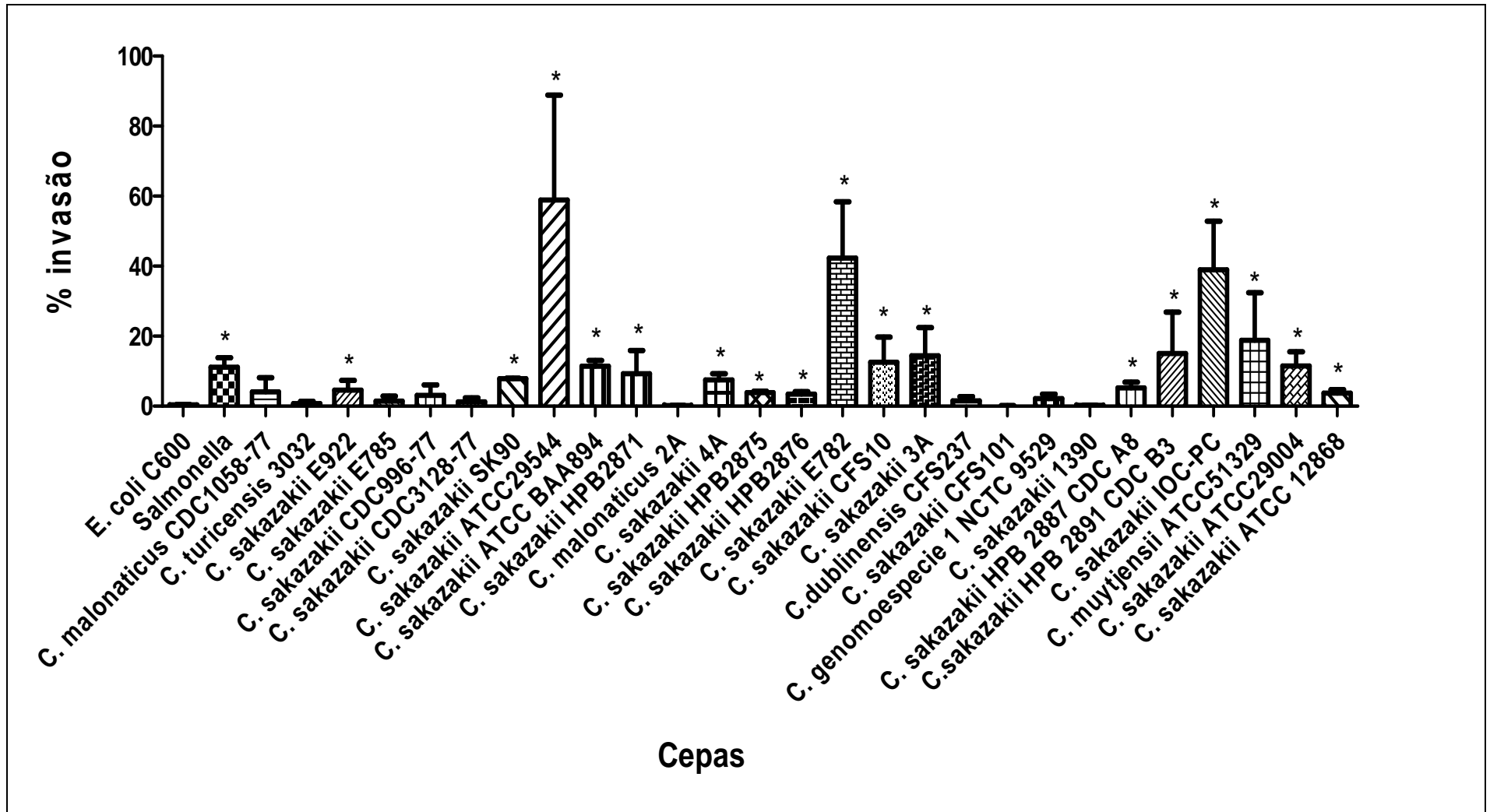


Figura 15 – Porcentagem de invasão de células Vero por *Cronobacter* spp. * = diferença estatisticamente significativa por comparação com *E. coli* C600.

4.7. Avaliação final dos resultados dos ensaios de virulência

A Tabela 18 exibe um resumo dos resultados encontrados nos ensaios para detecção de marcadores de virulência. Foi considerado como resultado final positivo qualquer resultado positivo entre as variações/sistemas testados (p. ex.: tempo de incubação, meio de cultura empregado, espécie de eritrócito, etc.).

O resumo de resultados indica que quatro cepas (*C. sakazakii* E785, *C. sakazakii* CDC 996-77, *C. sakazakii* CDC 3128-77 e *C. sakazakii* HPB 2876) reuniram o maior número de resultados positivos (6) para os marcadores de virulência testados. Dentre essas cepas, 3 (*C. sakazakii* E785, *C. sakazakii* CDC 996-77 e *C. sakazakii* CDC 3128-77) tem origem clínica e apresentaram resultados positivos nos ensaios de atividade de protease, formação de cápsula, produção de biofilme, atividade hemolítica, capacidade de hemaglutinação e produção de citotoxinas com ação sobre células Vero. A outra cepa (*C. sakazakii* HPB 2876), isolada a partir de FID, apresentou resultados positivos para os ensaios de atividade de protease, formação de cápsula, produção de biofilme, atividade hemolítica, capacidade de hemaglutinação e capacidade de invasão de células Vero. Entretanto, essa cepa, além de outras, não foi testada quanto à capacidade de produção de citotoxinas porque não foi selecionada através dos critérios empregados para a seleção de cepas a serem submetidas a esse ensaio. A realização dessa avaliação com essa cepa será necessária para que se obtenha mais informações relevantes.

Considerando somente as cepas de origem clínica, *C. sakazakii* E922, isolada a partir de secreção bronquial, também apresentou grande potencial patogênico, com resultados positivos para 4 fatores de virulência (atividade de protease, formação de cápsula, atividade hemolítica e capacidade de invasão de células Vero) e resistência a 5 drogas e/ou associações (ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, cefalotina e piperacilina/tazobactam). Esses dados comprovam o potencial de virulência dessa cepa.

A avaliação do perfil de sensibilidade das cepas de origem clínica indicou que a maioria delas apresentou resistência aos β -lactâmicos e cefalosporinas e uma cepa foi resistente ao aztreonam (monobactama) que é um β -lactâmico resistente a algumas β -lactamases.

Dentre as cepas clínicas, apenas *C. sakazakii* E922, *C. sakazakii* SK90, *C. sakazakii* ATCC 29544 e *C. sakazakii* ATCC BAA894 foram capazes de invadir células Vero. Interessante observar que as duas cepas isoladas de casos de meningite (*C. turicensis* 3032 e *C. sakazakii* CDC 996-77) não foram consideradas invasoras para células Vero, mas foram citotóxicas para essa linhagem de células. Observou-se ainda que todas as cepas testadas, com exceção de *C. sakazakii* E922, foram positivas para atividade citotóxica em células Vero e por isso os estudos para esse marcador de virulência devem ser aprofundados.

Dentre as cepas isoladas a partir de FID a cepa *C. sakazakii* HPB 2876 merece destaque com relação ao seu potencial de virulência pois, além das características apresentadas anteriormente (6 marcadores de virulência presentes) apresentou resistência a duas classes de antimicrobianos (β -lactâmicos e cefalosporinas), incluindo a cefoxitina que é uma cefalosporina de segunda geração. Outras cepas isoladas de FID que também merecem destaque são a *C. sakazakii* HPB 2871, *C. sakazakii* E782, *C. malonaticus* 2A e *C. sakazakii* 4A.

C. sakazakii HPB 2871 também parece apresentar grande potencial de virulência. Além de ter sido considerada como fortemente aderente pelo ensaio de formação de biofilme, apresentou resultados positivos para outros 4 fatores de virulência (produção de cápsula, atividade hemolítica, capacidade de hemaglutinação e capacidade de invasão de células Vero) e resistência a 5 antimicrobianos e/ou associação de drogas (ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, cefalotina e piperacilina/tazobactam). Essa cepa será posteriormente testada quanto à capacidade citotóxica para células Vero.

C. sakazakii E782 apresentou resultados positivos para 5 marcadores de virulência (atividade de protease, formação de cápsula, atividade hemolítica, atividade citotóxica em células Vero e capacidade de invasão de células Vero) e ainda resistência a duas classes de antimicrobianos (β -lactâmicos e cefalosporinas).

Dentre as cepas brasileiras *C. malonaticus* 2A apresentou resultados positivos para 4 marcadores de virulência (formação de cápsula, produção de biofilme, atividade hemolítica e capacidade de hemaglutinação) e ainda será testada quanto à produção de protease após 10 dias de incubação e atividade citotóxica para células Vero. Além disso, também apresentou resistência a duas classes de antimicrobianos (β -lactâmicos e cefalosporinas), incluindo a cefoxitina.

A outra cepa brasileira, *C. sakazakii* 4A, foi capaz de formar cápsula, produzir biofilme, apresentar atividade hemolítica, capacidade de hemaglutinação e invasão de células Vero (5 marcadores) e ainda será testada quanto à produção de protease após 10 dias de incubação e atividade citotóxica para células Vero. Apresentou apenas resistência intermediária à cefalosporina.

De uma forma geral, o grupo de cepas isoladas de FID apresentou resultados positivos para vários marcadores de virulência sendo que algumas delas apresentaram resistência a diferentes antimicrobianos. Assim, a avaliação final do potencial de virulência do grupo de cepas isoladas de FID indica que as mesmas podem vir a causar problemas à saúde dos bebês se presentes em FID, realçando a necessidade continuada de atenção especial tanto por parte dos produtores das FID como dos manipuladores desse tipo de alimento.

A cepa *C. sakazakii* CFS 10, isolada de caseína ácida que é um ingrediente usado na produção de FID, apresentou resultados positivos para 5 marcadores de virulência (formação de cápsula, produção de biofilme, atividade hemolítica, atividade citotóxica em células Vero e capacidade de invasão de células Vero) e apresentou resistência às cefalosporinas, incluindo a cefoxitina.

Dentre o grupo de cepas de fonte ambiental, destaca-se a cepa *C. sakazakii* 3A, isolada de ambiente de lactário de maternidade brasileira (São Paulo) e que apresentou resultados positivos para 5 marcadores de virulência (formação de cápsula, produção de biofilme, atividade hemolítica, capacidade de hemaglutinação e invasão de células Vero) e ainda será testada quanto à produção de protease após 10 dias de incubação e atividade citotóxica em células Vero. Essa cepa apresentou resistência aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos e cefalosporinas, incluindo a cefoxitina.

Outra cepa ambiental, *C. sakazakii* CFS 101, isolada de ambiente de fábrica produtora de FID, apresentou o menor número de resultados positivos (produção de cápsula e atividade hemolítica). Por outro lado, apresentou resistência a β -lactâmicos e cefalosporinas, incluindo a cefoxitina e ainda resistência intermediária ao aztreonam. Essa cepa ainda será testada quanto à sua capacidade citotóxica em células Vero. A outra cepa isolada de ambiente de fábrica produtora de FID, *C. dublinensis* CFS 237 apresentou resultados positivos para 4 marcadores de virulência e também será testada sua atividade citotóxica em células Vero. Essa cepa apresentou resistência intermediária às cefalosporinas.

A cepa *C. genomoespecie* 1 NCTC 9529, também de origem ambiental, apresentou resultados positivos nos ensaios de atividade de protease, produção de cápsula, capacidade hemolítica, hemaglutinação e atividade citotóxica em células Vero, mas foi sensível a todos os antimicrobianos testados indicando que seria facilmente controlada no caso de estar associada a infecção.

A cepa brasileira *C. sakazakii* 1390, isolada de bico de mamadeira de um lactário de maternidade em Belo Horizonte apresentou resultados positivos para 4 marcadores de virulência (formação de cápsula, produção de biofilme, atividade hemolítica e capacidade de hemaglutinação) e ainda será testada para produção de cápsula após 10 dias de incubação e citotoxicidade para células Vero. Ela apresentou ainda resistência a β -lactâmicos (ampicilina) e a cefalosporinas (cefalotina e cefoxitina).

Avaliando os dados referentes às cepas isoladas de matéria prima, ambiente de produção de FID e de lactário e à cepa isolada de utensílio em lactário, verificou-se que seu comportamento é semelhante àquele obtido com as cepas isoladas de FID. Apesar de todos os esforços que tem sido implementados quer seja pela indústria produtora de FID quer seja pelos lactários, ainda é necessário aprimorar os cuidados referentes ao ambiente, com treinamentos freqüentes de colaboradores tanto nas questões relativas à higienização como ao preparo, manipulação e estocagem das fórmulas infantis reidratadas.

Os resultados referentes aos marcadores de virulência obtidos com as cepas de origem desconhecida (*C. sakazakii* HPB 2887 - CDC A8, *C. sakazakii* HPB 2891 - CDC B3, *C. sakazakii* IOC-PC, *C. muytjensii* ATCC 51329, *C. sakazakii* ATCC 29004 e *C. sakazakii* ATCC 12868) foram bastante semelhantes entre si. Todas apresentaram entre 4 e 5 resultados positivos, sendo capazes de produzir biofilme, apresentar atividade hemolítica e invadir células Vero, com variações na capacidade de produção de cápsula e hemaglutinação. Essas cepas ainda serão submetidas a ensaios de citotoxicidade em células Vero. Com relação aos antimicrobianos elas apresentaram, de uma forma geral, o mesmo padrão de resistência aos β -lactâmicos (ampicilina) e às cefalosporinas (cefalotina e cefoxitina), com exceção da cepa *C. sakazakii* ATCC 12868 que foi sensível à cefoxitina e da cepa *C. sakazakii* HPB 2891 - CDC B3 que apresentou resistência à associação ampicilina/sulbactam.

Considerando apenas as cepas brasileiras, *C. malonaticus* 2A e *C. sakazakii* 4A, *C. sakazakii* 3A e *C. sakazakii* 1390, verificamos que elas apresentaram resultado

positivo para 4 a 5 marcadores de virulência, com variação na capacidade de invadir células Vero. Esses dados indicam que essas cepas também apresentam potencial de virulência e a exemplo das cepas isoladas em outros países as cepas brasileiras de *Cronobacter* spp. também tem desenvolvido resistência aos β -lactâmicos e cefalosporinas incluindo a cefoxitina.

A avaliação final dos resultados não indicou correlação entre potencial de virulência e origem ou espécie das cepas. Apesar da maioria das cepas estudadas pertencer à espécie *C. sakazakii* e incluir apenas poucos representantes das demais espécies (duas cepas de *C. malonaticus*, uma de *C. turicensis*, uma de *C. dublinensis*, uma de *C. genomoespecie 1* e uma de *C. muytjensii*) pode-se considerar que os resultados positivos para os fatores de virulência pesquisados apresentaram distribuição uniforme entre as diferentes origens e espécies.

Os resultados obtidos com as cepas de origem clínica sugerem que a capacidade citotóxica em células Vero parece ser o marcador de virulência mais importante para o gênero *Cronobacter*, apesar da ausência de dados ou dados incompletos para algumas cepas.

A maioria das cepas apresentou resultado positivo para quatro (40,7%) ou cinco (33,3%) marcadores de virulência (Tabela 19). Assim, esses dados sugerem que todas as espécies do gênero *Cronobacter* apresentam potencial patogênico e requerem atenção especial no que se refere às questões de controle de ambientes e produtos associados aos grupos de risco para infecção por esses micro-organismos.

Tabela 18 – Resumo dos resultados dos ensaios para determinação de marcadores de virulência nos isolados e cepas de referência de *Cronobacter* spp.

Isolado/Cepa	Origem	RA ^a	Protease	Cápsula	Biofilme	HE ^b	HA ^c	Citotox ^d	Inv ^e	MV ^f
<i>C. malonaticus</i> CDC 1058-77	clínica	2	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos *	Neg	4
<i>C. turicensis</i> 3032	clínica	2	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos *	Neg	3
<i>C. sakazakii</i> E922	clínica	5	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg*	Pos	4
<i>C. sakazakii</i> E785	clínica	2	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos *	Neg	6
<i>C. sakazakii</i> CDC 996-77	clínica	2	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos *	Neg	6
<i>C. sakazakii</i> CDC 3128-77	clínica	2	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos *	Neg	6
<i>C. sakazakii</i> SK90	clínica	2	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos *	Pos	5
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	clínica	4	Neg*	Neg	Pos	Pos	Neg	NT ^g	Pos	3
<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA 894	clínica	2	Neg*	Pos	Pos	Pos	Neg	NT	Pos	4
<i>C. sakazakii</i> HPB 2871	FID ^h	5	Neg	Pos	Pos ^s	Pos	Pos	NT	Pos	5
<i>C. malonaticus</i> 2A	FID	3	Neg*	Pos	Pos	Pos	Pos	NT	Neg	4
<i>C. sakazakii</i> 4A	FID	1	Neg*	Pos	Pos	Pos	Pos	NT	Pos	5
<i>C. sakazakii</i> HPB 2875	FID	1	Neg*	Neg	Pos	Pos	Pos	NT	Pos	4
<i>C. sakazakii</i> HPB 2876	FID	3	Pos *	Pos	Pos	Pos	Pos	NT	Pos	6
<i>C. sakazakii</i> E782	FID	2	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos *	Pos	5

Continua

Continuação da Tabela 18

Isolado/Cepa	Origem	RA ^a	Protease	Cápsula	Biofilme	HE ^b	HA ^c	Citotox ^d	Inv ^e	MV ^f
<i>C. sakazakii</i> CFS 10	matéria prima	2	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	5
<i>C. sakazakii</i> 3A	ambiental	3	Neg*	Pos	Pos	Pos	Pos	NT	Pos	5
<i>C. dublinensis</i> CFS 237	ambiental	2	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg*	Neg	4
<i>C. sakazakii</i> CFS 101	ambiental	4	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg*	Neg	2
<i>C. genomoespecie</i> 1 NCTC 9529	ambiental	0	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos *	Neg	5
<i>C. sakazakii</i> 1390	utensílio	3	Neg*	Pos	Pos	Pos	Pos	NT	Neg	4
<i>C. sakazakii</i> HPB 2887-CDC A8	desconhecida	3	Neg*	Pos	Pos	Pos	Pos	NT	Pos	5
<i>C. sakazakii</i> HPB 2891-CDC B3	desconhecida	4	Neg*	Neg	Pos	Pos	Pos	NT	Pos	4
<i>C. sakazakii</i> IOC-PC	desconhecida	3	Neg*	Neg	Pos	Pos	Pos	NT	Pos	4
<i>C. muytjensii</i> ATCC 51329	desconhecida	3	Neg*	Pos	Pos	Pos	Neg	NT	Pos	4
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29004	desconhecida	3	Neg*	Pos	Pos	Pos	Neg	NT	Pos	4
<i>C. sakazakii</i> ATCC 12868	desconhecida	2	Neg*	Pos	Pos	Pos	Pos	NT	Pos	5

^a RA= número de antimicrobianos que apresenta resistência; ^b HE = atividade hemolítica; ^c HA = hemaglutinação; ^d Citotox = atividade citotóxica de sobrenadantes filtrados em células Vero; ^e Inv = capacidade de invasão com diferença estatisticamente significativa por comparação com controle negativo; ^f MV = número de marcadores de virulência detectados; ^g NT = não testada; * = dados incompletos; ^h § = cepa fortemente produtora de biofilme.

Tabela 19 – Distribuição dos marcadores de virulência entre as cepas de *Cronobacter* spp. estudadas.

Nº de marcadores de virulência	Nº de cepas	Porcentagem
2	1	3,7
3	2	7,4
4	11	40,7
5	9	33,3
6	4	14,8
Total	27	100

4.8. Propostas de ações de Vigilância Sanitária

A RDC nº 12 de 02/01/01 – ANVISA é o regulamento técnico brasileiro atual que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos e determina os critérios para a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano. Entretanto, esse regulamento ainda não contempla o gênero *Cronobacter* spp. apesar da importância do controle desses micro-organismos em alimentos destinados aos grupos de risco de infecção por *Cronobacter* spp. O Codex Alimentarius, organismo que regulamenta o comércio internacional de alimentos, aprovou o documento “Code Of Hygienic Practice For Powdered Formulae For Infants And Children” CAC/RCP 66-2008 Revisão 1, que estabelece os limites para *Cronobacter* spp. em FID. Assim, se faz necessária a revisão da RDC nº 12 de 02/01/01 – ANVISA com a inclusão dos limites para *Cronobacter* spp.

Entretanto, o controle apenas da contaminação intrínseca desses produtos não é suficiente. A utilização de ingredientes como aditivos de FID e as formulações não industriais, preparadas nos lactários, podem representar uma ameaça à saúde dos bebês tendo em vista que os componentes, principalmente o amido, podem conter *Cronobacter* spp. Dessa forma, é importante a conscientização de pediatras e nutricionistas sobre o risco que representa a prescrição dessas fórmulas para populações de risco.

Outro aspecto a ser considerado se refere à questão da manipulação das fórmulas infantis em lactários ou no ambiente doméstico. Durante a etapa de

reidratação, utensílios mal-higienizados tais como colher, copo de liquidificador, recipientes, mamadeiras, bicos de mamadeiras e outros podem consistir em fontes de contaminação de *Cronobacter* spp. Além disso, a estocagem das fórmulas infantis reidratadas também é uma etapa crítica uma vez que a manutenção dessas preparações em temperatura inadequada pode permitir a multiplicação de células de *Cronobacter* spp. caso estejam presentes no alimento, mesmo em pequeno número.

Assim, dentre as ações de vigilância sanitária necessárias ao controle das infecções por *Cronobacter* spp. incluem-se também o planejamento e execução de treinamentos frequentes dos profissionais que trabalham em lactários nas atividades de higienização de ambientes e utensílios e daqueles envolvidos nos procedimentos de preparo, manipulação e estocagem das fórmulas infantis reidratadas.

5. CONCLUSÕES

- O emprego da metodologia ISO/TS 22964:2006 pode causar a inibição do crescimento de cepas de *Cronobacter* spp. na etapa de enriquecimento seletivo, acarretando o não isolamento desses micro-organismos. Por essa razão, deve ser substituída por um protocolo mais sensível;
- O kit API 20E não apresentou bom desempenho na identificação de *Cronobacter* spp. e seu uso deve ser avaliado com cuidado;
- Dentre os kits comerciais disponíveis, o ID 32E foi o que apresentou o melhor desempenho;
- A identificação de *Cronobacter* spp. através da caracterização fenotípica deve ser complementada com técnicas moleculares;
- O protocolo de PCR com alvo em *dnaG*, proposto nesse estudo, se mostrou eficaz e, após sua validação, pode representar uma boa alternativa na utilização da metodologia USFDA para os laboratórios com menos recursos tecnológicos;
- *Cronobacter* spp. tem desenvolvido resistência aos β -lactâmicos e cefalosporinas e recomenda-se que o tratamento de infecções por esses micro-organismos seja baseado em julgamento clínico associado a ensaios de sensibilidade *in vitro*;
- A produção de cápsula parece ter interferido na formação de biofilme sinalizando a possível existência de um mecanismo comum na regulação da expressão desses fenótipos;
- Algumas cepas de *Cronobacter* spp. são capazes de apresentar atividade de protease;

- A atividade hemolítica é uma característica comum às cepas de *Cronobacter* spp. e sua função na patogenicidade desse micro-organismo ainda deve ser avaliada;
- *Cronobacter* spp produz hemaglutininas associadas a pili tipo 3, fato esse ainda não descrito na literatura;
- A atividade citotóxica em células Vero é um importante marcador de virulência para *Cronobacter* spp.;
- A avaliação da capacidade invasora de células Vero revelou que algumas cepas de *Cronobacter* spp. apresentam grande capacidade de invasão dessas células.;
- Todas as espécies do gênero *Cronobacter* apresentam potencial patogênico e requerem atenção especial;
- Esse estudo permitiu a implantação de métodos de detecção e identificação de *Cronobacter* spp. no Setor de Alimentos do INCQS/Fiocruz que poderá atuar, caso necessário, na elucidação de surtos/infecções por esses micro-organismos. Esses conhecimentos também poderão ser repassados aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública do Brasil (LACEN);
- A implantação de métodos de estudo de fatores de virulência de *Cronobacter* spp. no Setor de Alimentos resultou de uma colaboração multidisciplinar, envolvendo profissionais e infra-estrutura de outros setores do Departamento de Microbiologia (DM) e dos Departamentos de Imunologia (DI) e de Farmacologia e Toxicologia (DFT). Esses métodos também poderão ser repassados a outros setores do DM, para estudo de outros patógenos, ou empregados em estudos em colaboração com outras Unidades da Fiocruz ou instituições de pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

ADAMSON, D.H; ROGERS, J.R. *Enterobacter sakazakii* meningitis with sepsis. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.3, p.19–20, 1981.

ADEGBOLA, R.A.; OLD, D.C. Fimbrial haemagglutinins in *enterobacter* species. **Journal of General Microbiology**, v.129 p.2175-2180, 1983.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Pregestemil e enfamil têm comercialização suspensa. **Notícias da ANVISA**, 2004.

AL-DUGHAM, A.M.; YASSIEN, N.A. Surface contamination of camel carcasses. **Scientific Journal King Faisal University** (Basic and Applied Science), v.2, p.129–138, 2001.

ARAÚJO, H. P. **Avaliação da metodologia oficial *in vivo* e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade *in vitro* para a determinação de potência de soro antibotrópico**. Rio de Janeiro, 2008. Tese(Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

ARSENI, A. et al. A fatal case of sepsis in a premature newborn baby associated with *Enterobacter sakazakii* bacteremia. **Acta Microbiologica Hellenica**, v.29, p.402–407, 1984.

ARSENI, A. et al. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Hospital Infection**, v.9, n.2, p.143–150, 1987.

BALEBONA, C. M. et al. Modified most-probable-number technique for the specific determination of *Escherichia coli* from environmental samples using a fluorogenic method. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p.235–245, 1990.

BAR-OZ, B. et al. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. **Acta Pædiatrica**, n.90, p.356–358, 2001.

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

BARTOLUCCI, L. et al. A Proposed method for determining bacterial colonization in drinking-water pipe networks. **Water Supply**, v.14, p.453–471, 1996.

BESSE, N. G. et al. Evaluation of the International Organization for Standardization – International Dairy Federation (ISO-IDF) draft standard method for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulas. **Journal of AOAC International**, v.89, p.1309-1316, 2006.

BIERING, G. et al. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2054-2056, 1989.

BLOCK, C. et al. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.21, p.613-616, 2002.

BOUER, H. W.; ROULLAND-DUSSOIX. A Complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v.41, p.459, 1969.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado, 1988. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constitui%C3%A7ao.htm>. Acesso em 27 set. 2005.

BRASIL. Resolução ANVISA RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p.45.

BRAUN, V.; FOCARETA, T. Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolisins). **Critical Reviews in Microbiology**, v.18, n.2, p.115-158 (1991).

BREEUWER, P. et al. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.967-973, 2003.

BROWN, M.R.W.; FOSTER, J.H.S. A Simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Pathology**, v.23, p.172-177, 1970.

BULGARELLI, M.A.; BEUCHAT, L.R.; MCWATTERS, K.H. Microbiological quality of cowpea paste used to prepare Nigerian Akara. **Journal of Food Science**, v.53, p.442, 1988.

BURDETTE, J.H.; SANTOS, C. *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. **Pediatric Radiology**, n.30, p.33–34, 2000.

CABASSI, C.S. et al. Bacteriologic findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failures. **Avian Diseases**, v.48, p.716–722, 2004.

CAMPER, A.K. et al. Bacteria associated with antigranulocytes activated carbon particles in drinking-water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.434–438, 1986.

CANTEY, J.R. Pathogenesis and risk factor. **American Journal of Medicine**, v.78, p.65-75, 1985.

CARRANZA, P. et al. Proteomic profiling of *Cronobacter turicensis* 3032, a food-borne opportunistic pathogen. **Proteomics**, v.9, n.13, p.3564-3579, 2009. Disponível em: www.proteomics-journal.com. Acesso em: 25 jun. 2010.

CASTANO, A. et al. Counts, behaviour and species of *Enterobacteriaceae* during the manufacture of dry-cured lacon, a spanish traditional meat-product. **Alimentaria**, v.323, p.61–66, 2001.

CAUBILLA-BARRON, J. et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3979-3985, 2007.

CAWTHORN, D.M.; BOTHA, S.; WITTHUHN, R. C. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p.129-138, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION . *Cronobacter* species isolation in two infants-New Mexico, 2008. **Mortality Morbidity Weekly Report**, v.58, n.42, p.1179-1183, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION . *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula – Tennessee. **Morbidity and Mortality Weekly Report** v.51, p.297–300, 2001. Reprinted in **Journal of the American Medical Association**, v. 287, p.17, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION . Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 2006. **Mortality Morbidity Weekly Report**, v.58, n.22, p.609-615, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Cronobacter* species isolated in two infants - New Mexico, 2008. **Mortality Morbidity Weekly Report**, v.58, p.1179-1183, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Information provided in response to the FAO/WHO Call for Data**, 2001.

CHAVES-LOPEZ, C. et al. Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.353–360, 2006.

CHEN, Y.; HAMMACK, T.; SONG, K.Y.; LAMPEL, K. A. Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollaborative study. **Journal of AOAC International**, v.92, p.862-872, 2009.

CHOI, S.H.; CHOI, J.J.; LEE, S.B. Gram-negative bacteria selective medium to detect post-pasteurization contamination of market milk by using dye reduction test. **Korean Journal of Dairy Science**, v.21, p.231–240, 1999.

CLARK, N.C. et al. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.13, p.467–472, 1990.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing **Twentieth Informational Supplement**, v.30, n.1, 2010.

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

COOTE, J. G. et al. Comparison of virulence-associated *in vitro* properties of typed strains of *Campylobacter jejuni* from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p. 722-732, 2007.

COTTYN, B. et al. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. **Phytopathology**, v.91, p.282–292, 2001.

CRUZ, A. et al. Characterization of *Enterobacter sakazakii* isolated from different sources. In: ASM General Meeting, 104., 2004. **Annals**. New Orleans, USA, 2004.

DANCER, G.I.; KANG, D-H. *Cronobacter* gen. nov. (*Enterobacter*) *sakazakii*: current knowledge and future considerations. In: **Microbiologically safe foods**. Editado por Norma Heredia, Irene Wesley e Santos Garcia. 2009. cap.3

DE CLERCK, E. et al. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.3664–3672, 2004.

DE HAAST, J.; BRITZ, T.J. Characterization of aerobic and facultative anaerobic bacteria from the liquid phase of an anaerobic fixed-bed digester treating a cheese whey substrate. **Microbial Ecology**, v.12, p.173–179, 1986.

DENTER, J.; BISPING, B. Formation of B-vitamins by bacteria during the soaking process of soybeans for tempe fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.22, p.23–31, 1994.

DEWANTI, R.; WONG, A.C.L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.147-164, 1995.

DREDGE, D. C.; KRISHNAMOORTHY, K. S. Neonatal meningitis. **eMedicine**. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/1176960-overview>. Acesso em 11 nov. 2010.

DRUDY, D. et al. Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.127-134, 2006.

DRUGGAN, P.; IVERSEN, C. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.169-178, 2009.

DUGUID, J.P.; CLEGG, S.; WILSON, M.I. The Fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v.12,p.213-227,1979.

EL-SHAROUD, W. M. et al. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. **BMC Microbiology**, v.9, p.24-33, 2009

ENTEROBACTERSAKAZAKII BLOG. Disponível em: <<http://www.enterobactersakazakiiblog.com>>. Acesso em: 18 out. 2010.

FANJAT, N. et al. Comparison of the phenotyping methods ID 32E and Vitek 2 compact GN with 16S rRNA gene sequencing for the identification of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.6, p.2048-2050, 2007.

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

FARMER, J. J. III et al. *Enterobacteriaceae* Study Group. *Enterobacter sakazakii*: a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.30, p.569-584, 1980.

FARMER, J.J. et al. *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. Biochemical identification of new species and biogroups of **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, p.46–76, 1985.

FEDERAL OFFICE OF CONSUMER PROTECTION AND FOOD SAFETY. Federal microbiology food monitoring programme. International communication. Berlin, 2003.

FINLAY, B. B.; FALKOW. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v.53, p.210-230, 1989.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. ***Enterobacter sakazakii* and Salmonella in powdered infant formula**. Meeting Report. Geneva: WHO, 2006. 115p. (Microbiological Risk Assessment Series, 10)

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. ***Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae**. Meeting Report. Geneva:WHO, 2008. 90p. (Microbiological Risk Assessment Series, 15)

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Comission 32nd

session, Rome, 29 June-4 July, 2009. **Proceedings**. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/report/714/al32_13e.pdf>. Acesso em: 5 set. 2010.

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: <<http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/feb2004/en/>>. Acesso em: 22 ago. 2005.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Codex Alimentarius**: code of hygienic practice for foods for infants and children. CAC/RCP 21-1979, 1994. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/297/CXP_021e.pdf>. Acesso em: 12 set. 2005.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Codex Alimentarius**: code of hygienic practice for foods for infants and children. CAC/RCP 66, 2008. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11026/CXP_066e.pdf>. Acesso em: 30 set. 2010.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Codex Alimentarius**: standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants. CODEX STAN 72 - 1981, Rev. 1, 2007. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/288/CXS_072e.pdf>. Acesso em: 30 set. 2010.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula. **Guidelines**. Geneva:WHO, 2007. 26p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf>. Acesso em 10 nov. 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Enforcement report 2005**. Disponível em: www.naba-breastfeeding.org/images/Recalls.pdf. Acesso em: 07 set. 2007.

FOUAD, K.E.; HEGEMAN, G.D. Microbial spoilage of tofu (soybean curd). **Journal of Food Protection**, v. 56, p.157–164, 1993.

FOX, E. M.; JORDAN, K. N. Towards a one-step *Enterobacter sakazakii* enrichment. **Journal of Applied Microbiology**, v.16, p.1-10, 2008.

FRANCIS, G.A.; O'BEIRNE, D. Effects of the indigenous microflora of minimally processed lettuce on the survival and growth of *Listeria innocua*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.33, p.477–488, 1998.

FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.1-10, 2007.

FRIEDEMANN, M. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v.28, n.11, p.1297-1304, 2009.

GALLAGHER, P.G.; BALL, W.S. Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. **Pediatric Radiology**, n.21, p.135–136, 1991.

GALLI, A. et al. Indagine preliminare sulla qualità microbiologica delle insalate della quarta gamma. **Annals of Microbiology**, v.40, p.33–46, 1990.

GASSEM, M.A.A. Study of the micro-organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.221–225, 1999.

GEIGES, O.; STÄHLIN, B.; BAUMANN, B. The Microbiological evaluation of prepared salad vegetables and sprouts. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v.81, p.684–721, 1990.

GERLACH, R.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesions: the molecular armory of gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v.297, p.401-415, 2007.

GOSNEY, M. A. et al. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. **European Journal of Internal Medicine**, v.17, p.185-188, 2006.

GOULLET, P.; PICARD, B. Characterization of *Enterobacter cloacae* and *E. sakazakii* by electrophoretic polymorphism of acid phosphatase, esterases, and glutamate, lactate and malate dehydrogenases. **Journal of General Microbiology**, v.132, pt. 11, p.3105–3112, 1986.

GRAY, K.J. et al. Transmissible fosfomycin resistance markers in urinary isolates and imported foodstuffs in the UK during 1994 and 1995. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.744–745, 2001.

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

GUILLAUME-GENTIL, O. et al. A Simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter dakazakii* in environmental samples. **Journal of Food Protection**, v.68, p.64-69, 2005.

GURTLER, J. B.; KORNACHI, 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.

HARRINGTON, D.J. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. **Infection and Immunity**, v.64, p.1885-1891, 1996.

HASSAN, A. A. et al. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.214-220, 2007. Disponível em: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro. Acesso em 26 out. 2007.

HEALY, B. et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, p.339-350, 2010.

HIMELRIGHT, I. et al. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula - Tennessee, 2001. **Mortality Morbidity Weekly Report**, v.61, p.298-300, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/mm5114a1.htm>. Acesso em: 27 set. 2002.

HORNICK, D.B. et al. Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.9, p.1795-1800, 1991.

HURRELL et al. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.227-231, 2009.

INGMER, H.; BRONDSTED, L. Proteases in bacterial pathogenesis. **Research in Microbiology**, v.160, p.704-710, 2009.

INTERNATIONAL BABY FOOD ACTION NETWORK. Risks of formula feeding. 2005. Disponível em: <http://www.ibfan.org/site2005/Pages/index2.php?iui=1>. Acesso em: 17 nov. 2008.

INTERNATIONAL BABY FOOD ACTION NETWORK. Risks of formula feeding. 2008. Disponível em: <http://www.ibfan.org.br>. Acesso em: 5 set. 2010.

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

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

ISTIVAN, T. S. et al. Characterization of campylobacter concisus hemolysins. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.54, n.2, p. 224–235, 2008.

IVERSEN C., et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii* and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp.

dublinensis subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, pt. 6, p.1442-7, 2008.

IVERSEN, C. et al. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.5368–5370, 2004.

IVERSEN, C. et al. Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: the use of artificial neural networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. **BMC Microbiology**, v.6, p.28, 2006a. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/28>. Acesso em: 02 out. 2007.

IVERSEN, C. et al. The Biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. **BMC Microbiology**, v.6, p.94, 2006b. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/94>. Acesso em: 07 nov. 2007.

IVERSEN, C. et al. The Taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, com. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.64, 2007a. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/6>. Acesso em: 15 mai. 2007.

IVERSEN, C. et al. The Identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.11, p.3814-3816, 2007b.

IVERSEN, C.; DRUGGAN, P.; FORSYTHE, S. J. A Selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*: a preliminary study. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p.133-139, 2004a.

IVERSEN, C.; FANNING, S. Introductory note to the *Cronobacter* special issue. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.151, 2009.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.48-52, 2007.

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

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

- IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant formula. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, p. 443-454, 2003.
- IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S.J. The Growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.378-382, 2004b.
- JARADAT, W. Z. et al. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. **BMC Microbiology**, v.9, p.1-11, 2009.
- JAYARAO, B. M.; WANG, L. A Study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2620–2624, 1999.
- JIMENEZ, E.; GIMENEZ, C. Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.4, p.30, 1982.
- JIMENEZ, S. M. et al. The Role of visible faecal material as a vehicle for generic *Escherichia coli*, coliform, and other enterobacteria contaminating poultry carcasses during slaughtering. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.451–456, 2003.
- JOKER, R.N.; NORHOLM, T.; SIBONI, K.E. A Case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. **Danish Medical Bulletin**, v.12, p.128–130, 1965.
- JOSEPH, L.A.; WRIGHT, A.C. Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. **The Journal of Bacteriology**, v.186, p.889-893, 2004.
- JUNG, M.K.; PARK, J.H. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. **Food Science Biotechnology**, v.15, p.152–157, 2006.
- KANDHAI, M. C. et al. A New protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1267-1270, 2004.
- KEYSER, M. et al. Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*. **Biotechnology Letters**, v.25, p.1893–1898, 2003.
- KIM, H.; BANG, J.; BEUCHAT, L.R.; RYU, J.H. Fate of *Enterobacter sakazakii* attached to or in biofilms on stainless steel upon exposure to various temperatures or relative humidities. **Journal of Food Protection**, v.71, p.940-945, 2008.
- KIM, H.; RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Attachment and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.5846–5856, 2006.

- KIM, H.; RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.1256–1265, 2007.
- KIM, K-P. ; LOESSNER, M.J. *Enterobacter sakazakii* invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction. **Infection and Immunity**, v.76, n.2, p.562-570, 2008.
- KIM, S. K. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. **The Journal of Infectious Disease**, v.186, p.220-224, 2002.
- KIMURA, B. et al. Evaluation of TaqMan PCR assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. **Journal of Food Protection**, v.62, p.329–335, 1999.
- KLEIMAN, M. B. et al. Meningocephalitis and compartmentalization of cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.14, n.3, p. 352–354, 1981.
- KLEIMAN, M. B. et al. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.14, p.352-354,1981.
- KLEMM, P.; VEJBORG, R.M.V.; SHERLOCK, O. Self-associating autotransporters, SAATs: Functional and structural similarities. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.187-195, 2006.
- KOTHARY, M.H. et al. Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.4142-4151, 2007.
- KUCEROVA, E. et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. **PLoS ONE**, v.5, n.3, p.1-10, 2010. Disponível em: <http://www.plosone.org>. Acesso em: 19 out. 2010.
- KYNE, L. *Cronobacter* in elderly. In: Conferência Internacional sobre *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*, 1, UCD, Dublin, Irlanda, 2009. **Anais**. Disponível em: <http://abeetle.tripod.com/kyne.pdf>. Acesso em: 10 set. 2010.
- LACK, W.K. et al. Influence of two types of commercial cooling systems on the microbial development on fresh ready-to-serve salads. **Archiv fuer Lebensmittelhygiene**, v.50, p.73–120, 1999.
- LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults: case reports and a review of the literature. **Medicine**, v.80, p.113-122, 2001.
- LAMPEL, K. A.; CHEN, Y. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii (Cronobacter)* from powdered infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.179-184, 2009.

LANGSTRAAT, J.; BOHSE, M.; CLEGG, S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. **Infection and Immunity**, v.69, n.9, p.5805-5812.

LAW, D. Virulence factors of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v.26, p.1-10, 1988.

LECLERC, H. et al. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annual Review of Microbiology**, v.55, p.201–234, 2001.

LECLERCQ, A., WANEGUE, C., BAYLAC, P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1631–1638, 2002.

LECOUR, H. et al. Treatment of childhood bacterial meningitis. **Infection**, v.17, p.343–346, 1989.

LEE, D.G.; KIM, S.J. Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.317–324, 2003.

LEHNER, A. et al. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, v.68, n.11, p.2287-2294, 2005.

LEHNER, A. et al. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. **BMC Microbiology**, v.6, p.15, 2006a. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/15>. Acesso em: 01 nov. 2006.

LEHNER, A. et al. Molecular characterization of the α -glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinosa metabolism. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.609-625, 2006b. Disponível em: <http://www.elsevier.de/syapm>. Acesso em: 29 out. 2007.

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

LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPHAN, R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. **BMC Microbiology**, v.4, p.43, 2004. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/4/43>. Acesso em: 01 nov. 2006.

LEUSCHNER, R.G.K. et al. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Food Microbiology**, v. 21, p.527–533, 2004.

LINGGOOD, M. A.; INGRAM, P. L. The role of alpha haemolysin in the virulence of *Escherichia coli* for mice. **Journal of Medical Microbiology**, v.15, p.23-30, 1982.

LIU, Y. et al. PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Molecular and Cellular Probes**, v.20, p.11-17, 2005. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/ymcpr>. Acesso em: 17 out. 2007.

LIU, Y. et al. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Journal of Microbiological Methods**, v.65, p.21-31, 2006. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth>. Acesso em: 17 out. 2007.

MALACHOWA, N. & DELEO, F.R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p.3057-3071, 2010.

MANGE, J-P et al. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. **BMC Microbiology**, v.6, p.58-67, 2006.

MARGIS, R.; BOROJEVIC, R. Quantification of attached cells in tissue culture plates and on microcarriers. **Analytical Biochemistry**, v.181, p.209-211, 1989.

MENSAH, P. et al. Street foods in Accra, Ghana: how safe are they? **Bulletin of the World Health Organization**, v.80, p.546–554, 2002.

MIRANDA, C.D. et al. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.883–888, 2003.

MITTAL, R. et al. Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A. **Laboratory Investigation**, v.89, p.263-277, 2009.

MIYOSHI, S.; SHINODA, S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. **Microbes and Infection**, v.2., p.91-98, 2000.

MOHAN NAIR, K.M. et al. Outer membrane protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* binds fibronectin and contributes to invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.4, p.495-501, 2009.

MOHAN NAIR, K.M.; VENKITANARAYANAN, K. Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.2539-2546, 2006.

MOHAN NAIR, K.M.; VENKITANARAYANAN, K. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. **Pediatric Research**, v.62, n.6, p.664-669, 2007.

MONROE, P.W.; TIFT, W.L. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (Yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.10, n.6, p.850–851, 1979.

MULLANE, N. R. et al. Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic-magnetic-bead capture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.6325-6330, 2006.

MUSGROVE, M.T. et al. Identification of *Enterobacteriaceae* from washed and unwashed commercial shell eggs. **Journal of Food Protection**, v.67, p.2613–2616, 2004.

MUYTJENS, H. L. et al. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, p.115-120, 1983.

MUYTJENS, H. L.; ROELOFS, W. H.; JASPAR, G. H. J. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, p.743-746, 1988.

MUYTJENS, H. L.; VAN DER ROS-VAN DE REPE, J.; VAN DRUTEN, H. A. M. Enzymatic profile of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the α -glucosidase reaction and reproducibility of the test system. **Journal of Clinical Microbiology**, v.20, p.684-686, 1984.

NAQVI, S.H.; MAXWELL, M.A.; DUNKLE, L.M. Cefotaxime therapy of neonatal gram-negative bacillary meningitis. **Pediatric Infectious Disease**, v.4, n.5, p.499–502, 1985.

NASSEREDDIN, R.A.; YAMANI, M.I. Microbiological quality of sous and tamarind, traditional drinks consumed in Jordan. **Journal of Food Protection**, v.68, p.773–777, 2005.

NATARO J. P. et al. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **The Journal Infectious Disease**, v.152, p.560-565, 1985.

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

NEWELL, D.G. et al. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, n.1, p.S3-S15, 2010.

NKETSIA-TABIRI, J. et al. Optimising processing conditions for irradiated cured fish. **International Atomic Energy Agency Technical Documents**, v. 1337, p. 207–216, 2003.

NO, H.K. et al. Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. **Journal of Food Science**, v.67, p.1511–1514, 2002.

NORIEGA, F. R. et al. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.9, p.447-449, 1990.

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

OGER, C. et al. On the coliform organisms and their count in water-supply analysis. **Annals of Microbiology**, v. A132, p.183-189, 1981.

OGIER, J.C. et al. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.5628-5643, 2004.

OH, S. W.; KANG, D. H. Fluorogenic selective and differential médium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.5692-5694, 2004.

OLD, D. C. Inhibition of the interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by D-manose and other carbohydrates. **Journal of General Microbiology**, v.71, p.149-157, 1972.

OLIVEIRA, A. C.; MARTINS, M. A. Investigação de surto por *Enterobacter sakazakii* na Unidade de Neonatologia e no Centro de Terapia Intensiva no Hospital das Clínicas da UFMG. In: Congresso Brasileiro de Enfermagem, 5º Congresso Panamericano de Enfermagem, 10. **Anais**. Florianópolis ,(SC),1999.

OLIVER, E.D. Atypical, non-lactose fermenting isolates shown to be total coliforms by the β -galactosidase (ONPG) reaction. **American Water Works Association Water Technology Conference**, p.225-231, 1997.

ONG et al. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.3, p. 1054-1063, 2008.

OSTERBLAD, M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.503-509,1999.

OTTAVIANI, F. et al. Remarks on gram-negative bacteria recovered from vegetable salads by Fc and presumptive *Escherichia coli*-tests. **Industrie Alimentari**, v.31, p.541-545, 1992.

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

- PESSOA-SILVA, C. L. et al. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.21, p.140, 2000.
- PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v.124, p.715-727, 2006.
- PRESTON, A. J. et al. Oral flora of elderly patients following acute medical admission. **Gerontology**, v.45, p.49-52, 1999.
- PRIBYL, C. et al. Aztreonam in the treatment of serious orthopedic infections. **American Journal of Medicine**, v.8, n.78, p.51-56, 1985.
- RESTAINO, L. et al. A Chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources. **Journal of Food Protection**, v. 69, p.315-322, 2006.
- RICHARDS, G.M.; GURLER, 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. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.844–850, 2005.
- RIES, M.; HARMS, D.; SCHARF, J. Multiple cerebral infarctions in a premature baby with meningitis due to *Enterobacter sakazakii* leading to multicystic encephalomalacia. **Klinische Padiatrie**, v.206, n.3, p.184–186, 1994.
- ROBERTSON, L.J. et al. Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v.75, p.119–126, 2002.
- ROCOURT, J. et al. **The Present state of foodborne disease in OECD countries**. Food Safety Department. WHO, Geneva, 2003. Cap.1 .Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/oecd/en/. Acesso em: 28 out. 2010.
- ROIG-SAGUÉS, A.X.; MOLINA, A.P.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **European Food Research Technology**, v.215, p.96–100, 2002.
- ROSA, A. C. P. et al. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **Bacterial Pathogenicity and Characterisation**, v.47, p.781-790, 1998.
- SANTOS, M. et al. Infection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.21, n.2, p.140, 2000.
- SANTOS, R. F. S. et al. Identificação de enterobactérias isoladas nos meios seletivos diferenciais de detecção de *Enterobacter sakazakii*. In: Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 15, 10-13 jun. 2007, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza, SBAAL, 2007.

SCHALCH, B.; EISGRUBER, H.; STOLLE, A. Microwave-reheating of vacuum-packaged cooked sausage cold cuts for shelf life improvement. **Fleischerei**, v.45, p.4–12, 1994.

SCHEEPE-LEBERKÜHNE, M.; WAGNER, F. Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii*. **Biotechnology Letters**, v.8, p.695–700, 1986.

SCHEMBRI, M.A.; DALSGAARD, D.; KLEMM, P. Capsule shields the function of short bacterial adhesions. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.1249-1257, 2004.

SCHINDLER, P.R.G. Enterobacteria in various kinds of mineral water, spring water and table water. **Gesundheitswesen**, v.56, p.690–693, 1994.

SCHINDLER, P.R.G.; METZ, H. Coliform bacteria in drinking water from South Bavaria: identification by the API 20E-system and resistance patterns. **Water Science and Technology**, v.24, p.81–84, 1991.

SCOTTISH CENTRE FOR INFECTION AND ENVIRONMENTAL HEALTH. **Weekly Report** 11.3.1997.

SEBGHATI, T.A.S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesions of *Klebsiella* strains. **Infection and Immunity**, v.66, n.6, p.2887-2894, 1998.

SEE, K.C.; THAN, H.A.; TANG, T. *Enterobacter sakazakii* bacteremia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. **Age Ageing**, v.37, p. 595-596, 2007.

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

SIMI, S. et al. A low molecular weight enterotoxic hemolysin from clinical *Enterobacter cloacae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, n.7, p. 479-482.

SIMMONS, B.P. et al. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.10, p.398–401, 1989.

SINGAMSETTY, V. K. et al. Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion. **Microbial Pathogenesis**, v.45, p.181-191, 2008.

SORIANO, J.M. et al. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. **Food Microbiology**, v.18, p.159–163, 2001.

SOTO, G.E.; HULTGREN, S.J. Bacterial adhesions: common themes and variations in architecture and assembly. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.1059-1071, 1999.

STEPANOVIC, S. et al. A Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, p.175-179, 2000.

STEPHAN R. et al. *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov., isolated from fruit powder. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p. 820-826, 2007.

STOCK, I., WIEDERMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, p.564-578, 2002.

TAMURA, A. et al. Flavour components and microorganisms isolated from Suancha (sour tea, Takezutsu-sancha in Japanese). **Journal of Home Economics of Japan**, v.46, p.759–764, 1995.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, n.1-2, p.31-41, 2002.

TEKKOK, I., et al. Abscedation of posterior fossa dermoid cysts. **Child's Nervous System**, n.12, p.318–322, 1996.

TERAMOTO et al. A first fatal neonatal case of *Enterobacter sakazakii* infection in Japan. **Pediatrics International**, v.52, n.2, p.312-313, 2010.

TEUBER, M. Antibiotikaresistente bakterien in lebensmitteln. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersushung und Hygiene**, v.92, p.10–27, 2001.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Comission regulation (EC) n°2073/2005 of 15 de November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v.48, p.L338/1-26. Disponível em: <http://europa.eu.int/eur-lex/lex/JOIndex.do?ihmlang=em>. Acesso em :29 out. 2007.

TORRES-CHAVOLLA, E.; RAMIREZ-CERDA, E.; GUTIÉRREZ-ROJO, R. Isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formulas. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, p.164-168, 2007.

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

TOWNSEND S.; FORSYTHE, S. The Neonatal intestinal microbial flora, immunity and infections. In: Farber, J.M., Forsythe, S.J. (Ed.), **Enterobacter sakazakii**. Washington: ASM Press, 2008. chap.3.

TOWNSEND S.; HURRELL, E.; FORSYTHE, S. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. **BMC**

Microbiology, v.8, p.64, 2008, doi:10.1186/1471-2180-8-64. Disponível em: www.biomedcentral.com/1471-2180/8/64. Acesso em: 17 nov. 2008.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Inspections, compliance, enforcement and criminal investigation. **Center for Food Safety and Applied Nutrition**, 2003. Disponível em: <http://www.fda.gov/ICECI/EnforcementActions/EnforcementStoryArchive/ucm095929.htm>. Acesso em: 30 set. 2010.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Isolation and enumeration of *E. sakazakii* from dehydrated powdered infant formula 2002**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>. Acesso em: 26 fev. 2007.

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

VAN ACKER, J. et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.293-297, 2001.

WAALWIJK, C. et al. In vivo function of hemolysis in the nephropathogenicity of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.42, n.1, p.245-249, 1983.

WATANABE, I.; ESAKI, M. Studies on an unusual case of fermentation of meat-products during the curing process. **Journal of Antibacterial and Antifungal Agents**, v.22, p.9-14, 1994.

WEISS, C.; BECKER, B.; HOLZAPFEL, W. Application and acceptability of three commercial systems for detection of *Enterobacter sakazakii* in ready-to-eat vegetable salads. **Archiv fuer Lebensmittelhygiene**, v.56, n.34-38, 2005.

WILLIAMS, M.M.; BRAUN-HOWLAND, E.B. Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5463-5471, 2003.

WILLIS, J.; ROBINSON, J.E. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.7, n.3, p.196-199, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula – **Guidelines**. 2007. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf . Acesso em: 17 nov. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General information related to microbiological risks in food**. Disponível em: www.who.int/foodsafety/micro/general/en/index.html. Acesso em: 5 set. 2010.

ZHAO, T. et al. Health relevance of the presence of fecal coliforms in iced tea and leaf tea. **Journal of Food Protection**, v.60, p.215-218, 1997.