

## Pesquisa de *Cronobacter* spp. em fórmulas infantis desidratadas

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

RIALA6/1607

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO<sup>1\*</sup>, Natália Scudeller UMEDA<sup>1</sup>, Ivano de FILIPPIS<sup>2</sup>

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

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

Recebido: 10.01.2014 - Aceito para publicação: 26.06.2014

#### RESUMO

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

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

#### ABSTRACT

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

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

## INTRODUÇÃO

O leite humano é internacionalmente reconhecido como a melhor forma de nutrição para neonatos. Contudo, existem casos em que ele pode ser insuficiente ou não estar disponível. Nestes casos, uma das opções para dieta dos neonatos é o uso de fórmulas infantis desidratadas (FID)<sup>1</sup>. *Cronobacter* spp. é considerado um patógeno emergente que representa perigo microbiológico em FID, por causar infecções, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunodeficientes, internados em hospitais. As principais síndromes clínicas das infecções por *Cronobacter* spp. incluem meningite, enterocolite necrosante e bacteremia; associadas com alta taxa de mortalidade<sup>2</sup>.

As infecções causadas por *Cronobacter* spp. são raras e geralmente não são notificadas<sup>2</sup>. No Brasil, casos de infecções por *Cronobacter* spp. em crianças e neonatos já foram reportados<sup>3</sup>. Contudo, este número é provavelmente subestimado, uma vez que a identificação correta destes micro-organismos nos serviços de assistência à saúde é dificultada pela ausência de métodos adequados disponíveis nestes serviços<sup>4</sup>.

Em 2008, o *Codex Alimentarius* publicou uma revisão do Código de Prática de Higiene para fórmulas em pó para lactantes de primeira infância (CAC/RCP 66 – 2008)<sup>1</sup>, que cria um critério para *Cronobacter* spp. no controle da qualidade de fórmulas infantis em pó para lactantes (FIL) e FIS com propósitos médicos especiais, sendo estipulado um plano de duas classes com:  $n = 30$ ,  $c = 0$ , e  $m = 0/10g$ ; onde 'n' é o número de amostras que devem estar em conformidade com o critério; 'c' é o número máximo de unidades defeituosas da amostra em um plano de duas classes; e 'm' é o limite microbiológico que, em um plano de duas classes, separa o produto com qualidade satisfatória do produto defeituoso. Já para fórmulas de seguimento para lactantes em pó (FIS), a Comissão decidiu que, em países com substancial população de bebês até doze meses com comprometimento imunológico, devem ser adotados para FIS os mesmos critérios para FIL. No Brasil, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n.º 12/2001<sup>5</sup>, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, não contempla o padrão de pesquisa de *Cronobacter* spp. para FIL. Entretanto, tendo em vista a preocupação com o risco da contaminação de FID por *Cronobacter* spp., a ANVISA publicou em 2011 as RDC n.º 43<sup>6</sup>, 44<sup>7</sup> e 45<sup>8</sup>, que estabelecem o regulamento técnico para FIL; para FIS; e

para FIL e FIS destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, respectivamente. Nestas resoluções, foi adotado que os fabricantes devem cumprir o disposto no CAC/RCP 66 – 2008<sup>1</sup> e suas atualizações.

A maioria dos trabalhos que pesquisaram *Cronobacter* spp. em FID utilizaram a norma ISO/TS 22964<sup>9</sup>, atualmente ainda em vigor. Contudo, relatos de resultados errôneos demonstraram que esta metodologia não é confiável e precisa ser melhorada<sup>4</sup>. Recentemente, o *Food and Drug Administration* (FDA) publicou uma revisão da metodologia para detecção/isolamento de *Cronobacter* spp. em FID<sup>10</sup>. Essa nova metodologia apresentou sensibilidade e especificidade satisfatória para identificação de *Cronobacter* spp. nestes produtos e ainda não foram observados trabalhos na literatura que apontem falhas nesta técnica.

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

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

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

### Cepas bacterianas

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

testes utilizados na caracterização fenotípica.

### **Análise microbiológica**

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

### **Identificação de *Cronobacter* spp. por caracterização fenotípica**

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

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

A partir das culturas crescidas em BHI, foi realizada a extração de DNA com uso do kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, sendo eluído um volume final de 100 µL. Posteriormente as culturas foram submetidas a reação da polimerase em cadeia (PCR) com alvo no gene *gluA*, responsável pela atividade 1,6 α-glicosidase, para amplificação de um fragmento de 105 pares de base (pb) segundo o protocolo descrito por Iversen e colaboradores<sup>11</sup>.

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

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

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nenhuma amostra de FID analisada apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. As amostras de FIS não apresentaram crescimento de colônias em nenhum dos meios cromogênicos utilizados e dentre as amostras de FIL, apenas uma amostra apresentou colônias características (atividade α-glicosidase positiva) nos três meios cromogênicos. Contudo, as colônias suspeitas selecionadas não foram confirmadas como *Cronobacter* spp. tanto com o uso de técnicas fenotípicas como pela PCR. Apesar do ESIA não ser recomendado pela metodologia do FDA<sup>10</sup>, o mesmo foi incluído neste estudo por ser o meio cromogênico recomendando na metodologia ISO/TS 22964<sup>9</sup>. O ESIA apresentou o mesmo resultado dos meios DFI e ESPM, propiciando apenas o crescimento da cepa não-*Cronobacter* na amostra de FIS. Na caracterização fenotípica, a cepa não-*Cronobacter* também apresentou atividade α-glicosidase positiva, tanto no ID 32E quanto no Vitek 2.0, que é exatamente o marcador utilizado nos meios cromogênicos.

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

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

Brasil, Santos e colaboradores<sup>12</sup> detectaram *Cronobacter* spp. em 20,0 % (3/15) e em 85,7 % (6/7) das amostras de FIL e FIS, respectivamente, que analisaram na cidade de Campinas/SP. Contudo, este percentual pode estar associado ao fato de que no período do estudo (2007) os fabricantes não necessitavam cumprir o disposto no CAC/RCP 66 – 2008<sup>1</sup>. Em pesquisas realizadas também no Estado de São Paulo após a publicação do CAC/RCP 66 – 2008<sup>1</sup>, nenhuma amostra de FID contaminada com *Cronobacter* spp. foi encontrada<sup>14,15</sup>.

A FAO/WHO<sup>2</sup> recomenda a pesquisa de *Enterobacteriaceae* em FID. Estas enterobactérias não-*Cronobacter* foram classificadas como “categoria B - plausíveis de causarem infecções, mas sem o apoio de evidências epidemiológicas” pelas comissões de especialistas. Neste estudo, as cepas da família *Enterobacteriaceae* não-*Cronobacter* isoladas a partir de uma amostra de FIL que apresentaram maior percentual de identificação foram *Pantoea* spp. (93,0 %), *Serratia ficaria* (99,8 %) ou *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Ozaenae* (48,8 %) de acordo com o Vitek 2.0, ID 32 E e API 20E, respectivamente. Outros autores já relataram a identificação destes micro-organismos em amostras de FID comercializadas no Brasil<sup>12</sup> e em outros países<sup>13</sup>. Bactérias do gênero *Klebsiella* e *Pantoea* já foram associadas com infecções neonatais, mas nunca tendo FID identificadas como o veículo de contaminação<sup>2</sup>.

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

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

1. Codex Alimentarius Comission - CAC. Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for powdered formulae for infants and young children. CAC/RCP 66. 2008. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?no\_cache=1].
2. Food and Agricultural Organization /World Health Organization – FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Meeting Report. Genova: WHO, 2006. 115p. Microbiological Risk Assessment Series N° 10. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/].
3. Santos M, Pessoa da Silva CL, Sampaio J, Marangoni DV, Pinto M, Moreira BM. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Control Hosp Ep*.2000;21(2):140.
4. Warnken MB, Brandao MLL, Souza AE, Romão CMCP, Nogueira ACMA, Destro MT. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71(1):21-31.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção 1, p 45.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º43 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactantes. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 90-2.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º44 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 92-4.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º45 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis lactantes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 94-6.
9. International Organization for Standardization - ISO. ISO/TS 22964 (IDF/RM 210:2006). Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*. 2006. 13p.
10. Chen Y, Lampel K, Hammack T. *Cronobacter*. In: Bacteriological analytical manual. 8ª ed. Revision A, 1998. United States: Food and Drug Administration. Chapter 29, mar. 2012. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm].
11. Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R, et al. The identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J Clin Microbiol*.2007;45(11):3814-16.

12. Santos RFS, Silva N, Junqueira VCA, Kajsik M, Forsythe S, Pereira JL. Screening for *Cronobacter* Species in Powdered and Reconstituted Infant Formulas and from Equipment Used in Formula Preparation in Maternity Hospitals. *Ann Nutr Metab*.2013;63(1-2):62-8.
13. Abdullah Sani N, Hartantyo SH, Forsythe SJ. Microbiological assessment and evaluation of rehydration instructions on powdered infant formulas, follow-up formulas, and infant foods in Malaysia. *J Dairy Sci*.2013;96(1):1-8.
14. Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J, et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol*.2009;136(2):185-8.
15. Freitas LG, Ristori CA, Jakabi M, Paula AMR, Rowlands REG. Ocorrência de *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) em alimentos infantis adquiridos em um hospital público. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2011;70(4):548-53.