



# Pesquisa, identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil

## Detection, identification and antimicrobial susceptibility profile of *Cronobacter* spp. in products for infant feeding

RIALA6/1690

Gisele Olivieri Soares MEIER, Marcelo Luiz Lima BRANDÃO\*, Valéria de Mello MEDEIROS, Carla de Oliveira ROSAS, Débora Alves Ferreira da SILVA, Carla Trece CARVALHO, Cátia Cardoso da SILVA, Natália Scudeller UMEDA, Silvia Maria dos Reis LOPES

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Alimentos e Saneantes, 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: marcelollb8@gmail.com

Recebido: 18.09.2015 - Aceito para publicação: 05.01.2016

### RESUMO

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

**Palavras-chave.** *Cronobacter*, alimentos infantis, antibiograma, PCR.

### ABSTRACT

*Cronobacter* spp. emerged as a microbiological hazard in powdered infant formulas (PIF) causing severe infections in newborns. However, among these patients many of them had not ingested PIF indicating that other foods categories might be as the pathogen vehicle. This study aimed at investigating *Cronobacter* spp. in infant foods, identifying the species and evaluating the antimicrobial susceptibility profile of the isolated strains. Forty-seven samples of precooked grain-based cereals, corn starch and milk flours were analyzed. The microbiological analysis was performed with pre-enrichment in buffered peptone water, followed by selective-enrichment in *Cronobacter* Screening Broth, isolation in *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar and identification in Vitek 2.0. The identification of species was performed by polymerase chain reaction targeting *rpoB* and *cgcA* genes. The antibiogram was carried out using the agar diffusion method (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. was identified in 11 samples (23.4 %). Eight strains were identified as *C. sakazakii* (72.7 %), two as *C. malonaticus* (18.2 %) and one as *C. dublinensis* (9.1 %). Only one *C. malonaticus* strain showed an intermediate resistance to ciprofloxacin. The evaluated samples produced for infant feeding might cause hazard when ingested by patients belonging to the risk group as newborns and elderly.

**Keywords.** *Cronobacter*, infant food, antibiogram, PCR.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Cronobacter* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto por sete espécies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter universalis* e *Cronobacter condimenti*<sup>1</sup>. Contudo, apenas as seis primeiras supracitadas foram associadas a casos de infecções<sup>2</sup>. *Cronobacter* spp. emergiu como perigo microbiológico em fórmulas infantis desidratadas (FID) causando infecções em crianças, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunodeficientes<sup>3</sup>. As síndromes clínicas incluem enterocolite necrosante, bacteremia e meningite, com taxa de mortalidade variando de 10-41,9 % e os sobreviventes podem apresentar sequelas graves<sup>4</sup>.

A meningite bacteriana em neonatos necessita de tratamento rápido e eficiente, levando a uma preocupação quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos nas infecções por *Cronobacter* spp.<sup>4,5</sup>. A antibioticoterapia utilizando as combinações ampicilina/gentamicina<sup>6</sup> ou meropenem/amicacina<sup>7</sup> são exemplos de procedimentos empíricos adotados no tratamento inicial de suspeita de infecção por *Cronobacter* spp. Entretanto, alguns autores já relataram o isolamento de cepas de *Cronobacter* spp. resistentes a essas drogas<sup>5,7,8</sup>. Cepas resistentes a outros antimicrobianos como cefalotina<sup>6</sup>, cefoxitina<sup>8</sup>, ceftazidima<sup>9</sup>, eritromicina<sup>10</sup> e tetraciclina<sup>10,11</sup> também já foram identificadas. Estes dados demonstram que existe variabilidade no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos entre as cepas de *Cronobacter* spp., demonstrando a importância de se conhecer este perfil de resistência, de forma a identificar as classes de antimicrobianos que apresentem ação rápida e eficiente no tratamento das infecções.

Surtos causados por *Cronobacter* spp. já foram reportados em diversos países<sup>3</sup>, incluindo o Brasil<sup>9,12</sup>. Contudo, em muitos surtos o veículo de contaminação não pôde ser identificado e muitos pacientes não ingeriram FID, o que leva a crer que outras fontes poderiam ser o veículo de contaminação deste patógeno<sup>3,13</sup>. *Cronobacter*

spp. já foi isolada de uma série de produtos alimentícios, incluindo produtos destinados a alimentação infantil como cereais, amido de milho e outras misturas<sup>10,14,15</sup>.

Apesar das infecções por *Cronobacter* spp. estarem, a princípio, associadas a neonatos, já existem diversos relatos de casos de infecção em crianças com mais de seis meses e adultos<sup>13,16,17</sup>. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, a incidência de casos de infecções por *Cronobacter* spp. foi estimada em 0,66 casos/100.000 habitantes, sendo crianças com idade menor de 5 anos e idosos os mais afetados<sup>16</sup>. O relato de casos de infecções nestes grupos sugere que existem potenciais fontes de contaminação por *Cronobacter* spp. nos alimentos ingeridos por estes indivíduos. Pacientes idosos, principalmente os que apresentam disfagia, ingerem alimentos semissólidos na sua dieta, como papas e mingaus de cereais<sup>17</sup>. Logo, a presença de *Cronobacter* spp. nestes tipos de alimentos pode representar um risco a estes indivíduos<sup>10,14,15</sup>. Outro problema é o uso incorreto destes produtos na alimentação de crianças com idade inferior a recomendada pelo fabricante, uma vez que muitas famílias não adquirem FID devido ao alto custo e/ou falta de conhecimento do risco do uso destes alimentos na idade inadequada<sup>18</sup>.

Devido a indicação de que outros alimentos infantis além das FID podem atuar como veículos de contaminação em casos de infecções por *Cronobacter* spp., os objetivos deste estudo foram pesquisar e identificar as espécies de *Cronobacter* em cereais pré-cozidos à base de grãos variados, farinhas lácteas e amidos de milho e avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas isoladas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

No período de março a maio de 2015, foram analisadas 47 amostras de alimentos industrializados destinados à alimentação infantil de 12 marcas distintas. As amostras foram coletadas de forma aleatória e em diferentes estabelecimentos comerciais (supermercados, drogarias, entre outros) localizados nos

municípios do Rio de Janeiro e Niterói do Estado do Rio de Janeiro. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio durante o período de análises. Deste total, 16 amostras eram à base de cereais variados (TU1-16), 11 de cereais à base de arroz (AR1-11), nove de cereais à base de milho (MI1-9), duas de cereais à base de aveia (AV1-2), quatro de farinhas lácteas (FL1-4) e cinco misturas para preparo de mingaus à base de amido de milho (AM1-5). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e enviadas para o laboratório para análise.

### Análise microbiológica

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada de acordo com Iversen et al<sup>19</sup>. Vinte e cinco gramas da amostra foram pesados em um saco plástico *Whirl-Pak* (Nasco, EUA), seguido da adição de 225 mL de água peptonada tamponada (Merck, Alemanha) e homogeneização em *Stomacher* durante 60 s. Após incubação a 35 °C/24 h, uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada a 10 mL de *Cronobacter Screening Broth* contendo vancomicina (CSB/v;Oxoid, Inglaterra) e este incubado a 42 °C/24-48 h. Posteriormente, as amostras que apresentaram alteração da coloração do meio para amarelo foram semeadas em *Enterobacter sakazakii Isolation Agar* (ESIA; AES-Chemunex, França) e as placas incubadas a 44 °C/24 h. As colônias características foram isoladas em ágar nutriente (BD, EUA) e submetidas à confirmação no sistema Vitek 2.0 (bioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante.

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

### Identificação das espécies

Para a identificação das espécies de *Cronobacter* foram utilizados dois protocolos de reação em cadeia pela polimerase (PCR),

sendo um com alvo no gene *rpoB*<sup>20,21</sup> e outro *Multiplex* (M-PCR) com alvo no gene *cgcA*<sup>22</sup>. Os iniciadores, condições de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados para cada espécie estão descritos na **Tabela 1**.

A extração de DNA foi realizada com o kit *Dnasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi dosada em espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA). As reações foram preparadas em um volume total de 25 µL contendo: 5 µL de DNA molde (20-60ng/µl), 5,0 pmol de cada iniciador e *PCR MasterMix1X* (ThermoScientific, EUA). A amplificação foi realizada no *Simpli Amp Thermal Cycler* (AppliedBiosystems, Singapore).

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

Água livre de DNase/RNase (BioBasic, Canadá) foi utilizada como controle negativo em cada reação. O DNA extraído das cepas de referência *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578), *C. malonaticus* LMG 23826 (INCQS 00619), *C. turicensis* LMG 23827 (INCQS 00615), *C. muytjensii* ATCC 51329 (INCQS 00579), *C. dublinensis* LMG 23823 (INCQS 00618) e *C. universalis* NCTC 9529 (INCQS 00599) foi utilizado como controle positivo em cada reação específica.

### Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

As cepas identificadas como *Cronobacter* spp. foram avaliadas quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão (Kirby-Bauer) em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015)<sup>23</sup>. Foram testados os antimicrobianos (BIO-RAD Laboratories Inc, França) recomendados para avaliação de cepas da família *Enterobacteriaceae*, nas seguintes

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

Gene alvo	Micro-organismo alvo	Iniciadores	Condições de amplificação	Tamanho (pb)	Referência		
<i>rpoB</i>	<i>C. sakazakii</i> e <i>C. malonaticus</i>	Csakf: ACGCCAAGCCATATCTCCGGG Csakr: ACGGTTGGCGTCATCGTG	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 67 °C-30 s, 72 °C-1 min); 72 °C-5 min	514	Stoop et al <sup>20</sup>		
	<i>C. malonaticus</i>	Cmalf: CGTCGTATCTCTGCTCTC Cmalr: AGGTTGGTGTTCGCCCTGA	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 60 °C-30 s, 72 °C-30 s); 72 °C-5 min	251			
	<i>C. turicensis</i>	Cturf: CCGTAAAAGAGTTCTTCGGC Cturr: GTACCGCCACGTTTCGCC	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 61 °C-30 s, 72 °C-1 min); 72 °C-5 min	628			
	<i>C. dublinensis</i>	Cdubl f: GCACAAGGTCGTATCTCC Cdubl r: TTGGCGTCATCGTGTCC	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 62 °C-3 s, 72 °C-30 s); 72 °C-5 min	418			
	<i>C. muytjensii</i>	Cmuyf: TGTCCGTGTATGCCAGACC Cmuyr: TGTTCGCACCCATCAATGCG	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 61 °C-30 s, 72 °C-30 s); 72 °C-5 min	289			
	<i>C. universalis</i>	Cgenom f: ACAAAAGTCGTATCTCTGG Cgenom r: AGCACGTTCCATACCGGTC	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 61 °C-30 s, 72 °C-30 s); 72 °C-5 min	506			
	<i>C. condimentii</i>	Ccon-f: AACGCCAAAGCCAATCTCG Ccon-r: GTACCGCCACGTTTGTCT	95 °C-2 min; 30x(95 °C-1 min, 58 °C-30 s, 72 °C-1 min); 72 °C-5 min	689			
	<i>egcA</i>	<i>C. dublinensis</i>	Cdub-40F: GATACCTCTCTGGCCGCGC Cdm-469R <sup>a</sup> : CCACATGGCCGATATGCACGCC			430	Lehner et al <sup>21</sup>
		<i>C. muytjensii</i>	Cmuy-209F: TTCTTCAGGGGGAGCTGACCT			260	
		<i>C. turicensis</i>	Cmstu-825F <sup>b</sup> : GGTGGCSGGTATGACAAAAGAC Ctur-1036R: TCGCCATCGAGTGCAGCGTAT	94 °C-3 min; 25x(94 °C-30 s, 58 °C-30 s, 72 °C-1 min); 72 °C-5 min		211	
<i>C. universalis</i>			Cuni-1133R: GAAACAGGCTGTCCGGTCCAGC	308			
<i>C. sakazakii</i>		Csak-1317R: GGCGGACGAAGCCCTCAGAGAGT		492			
<i>C. malonaticus</i>		Cmal-1410R: GGTGACCACACCTTCAGGCAGA		585			

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



concentrações: ampicilina-sulbactam (SAM; 10/10 µg), amoxicilina-clavulanato (AMC; 20/10 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg) e sulfametoxazol-trimetoprima (SXT; 1,25/23,75 µg). O diâmetro da zona de inibição foi mensurado e as cepas classificadas como sensível, intermediária ou resistente de acordo com as recomendações do CLSI<sup>23</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Cronobacter* spp. foi detectada em 11 (23,4 %) das 47 amostras analisadas. A maior ocorrência foi observada em amostras à base de aveia (100,0 %) e arroz (54,5 %), seguido de farinha láctea (25,0 %) e de cereal à base de milho (11,1 %). Apenas uma amostra à base de cereais variados (TU1), composta por aveia e arroz, apresentou contaminação pelo micro-organismo. Nenhuma amostra de mistura à base de amido de milho apresentou contaminação (Tabela 2). O isolamento desta bactéria nestes tipos de alimentos já foi reportado anteriormente, com uma ocorrência variando de 11,2-45,0 %<sup>10,15,24</sup>. No Brasil, Freitas et al<sup>15</sup> isolaram *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos infantis a base de farinha de milho, mas, em contraste, não detectaram em amostras à base de arroz e aveia.

O uso do CSB/v permite a decisão de liberar amostras negativas após 48 h do início do ensaio<sup>19</sup>. Neste estudo, 17 amostras não apresentaram viragem da coloração do meio

e, portanto, não foram submetidas à etapa de isolamento. Após a semeadura das amostras positivas no meio de cultura ESIA, observaram-se colônias características em 12 amostras e 11 foram confirmadas como *Cronobacter* spp. pelo Vitek 2.0. A cepa não confirmada foi isolada da amostra AR6 e identificada como *Enterobacter aerogenes* - bionúmero 0607736151720011. O isolamento de outras enterobactérias que também apresentam atividade α-glicosidase já foi relatado, o que demonstra a importância do uso de técnicas confiáveis para identificação de *Cronobacter* spp. após o isolamento nos meios cromogênicos<sup>19,25</sup>.

As instruções nos rótulos das amostras AR3, AR4, AR8, AR9, AR11, MI5, TU1, AV1 e AV2, que apresentaram contaminação por *Cronobacter* spp., informam que estes alimentos são pré-cozidos e não necessitam de aquecimento antes do consumo, indicando o uso de leite ou água para sua reconstituição. De acordo com Richard et al<sup>26</sup>, populações muito baixas de *Cronobacter* spp. podem se multiplicar rapidamente em cereais infantis à base de arroz reconstituídos com água ou leite. Desta forma, o risco aumenta se a mistura for preparada e mantida a temperatura ambiente por longos períodos. De acordo com a revisão na literatura realizada por Osaili e Forsythe<sup>27</sup>, bactérias do gênero *Cronobacter* quando presentes em produtos desidratados por longos períodos apresentam maior resistência à temperatura. Contudo, os trabalhos levantados

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

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

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

pelos autores mostram que *Cronobacter* spp. não sobrevive a tratamentos térmicos como de 58 °C por 32 s em FID reconstituídas artificialmente contaminadas. Estas características do micro-organismo sugerem que a contaminação nos produtos destinados a alimentação infantil analisados neste estudo possa ter ocorrido porque o binômio tempo/temperatura ou algum outro processo utilizado pelos produtores no pré-cozimento, como por exemplo, a extrusão, não seja suficiente para eliminação do patógeno. Outra possibilidade é que a contaminação ocorra em etapas após este tratamento térmico, uma vez que *Cronobacter* spp. já foi isolada de amostras de superfícies de ambientes de fábrica<sup>28</sup>, indicando que o micro-organismo pode estar presente nestes ambientes.

A ingestão de alimentos destinados à alimentação infantil, contaminados por *Cronobacter* spp., por indivíduos pertencentes ao grupo de risco (ex.: neonatos com menos de seis meses e idosos) representa um perigo em potencial. Logo, os consumidores devem estar atentos aos rótulos dos produtos para ofertá-los as crianças apenas da idade recomendada. A aplicação de um tratamento térmico antes do consumo poderia ser uma alternativa para tentar eliminar a contaminação pelo patógeno nestes produtos. Além disso, em ambientes que

se preparam diferentes categorias de alimentos infantis, como aqueles que são ofertados para crianças com menos de seis meses, cuidados devem ser tomados para evitar contaminação cruzada.

Das 11 cepas de *Cronobacter*, oito (72,7 %) foram identificadas como *C. sakazakii*, duas (18,2 %) como *C. malonaticus* e uma (9,1 %) como *C. dublinensis*. Ambos os protocolos da PCR apresentaram os mesmos resultados na identificação das espécies de *Cronobacter*. Estes resultados foram similares aos de outros estudos que também relataram maior ocorrência da espécie *C. sakazakii* em produtos alimentícios e em outras fontes<sup>10,24</sup>.

As cepas apresentaram nove fenótipos distintos baseados no perfil do Vitek 2.0. As cepas da espécie *C. sakazakii* foram agrupadas em sete fenótipos distintos (A, B, C, D, F, G e I), sendo as cepas C163 e C171 agrupadas no mesmo fenótipo. A cepa de *C. sakazakii* C168 apresentou o mesmo fenótipo da cepa C173 identificada como *C. malonaticus*. Este resultado não é incomum, pois estas duas espécies são muito próximas geneticamente e inicialmente foram descritas como pertencentes à mesma espécie<sup>2</sup>. A cepa *C. malonaticus* C177 e *C. dublinensis* C175 apresentaram fenótipos únicos (**Tabela 3**).

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

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

Na avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, das 11 cepas isoladas, 10 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Somente a cepa *C. malonaticus* C173, isolada de amostra à base de farinha láctea (FL02), apresentou resistência intermediária a ciprofloxacina. Resultados similares foram relatados por outros autores que isolaram de alimentos cepas de *Cronobacter* spp. susceptíveis a maioria dos antimicrobianos testados<sup>14,29-31</sup>. Kilonzo-Nthenge et al<sup>11</sup> isolaram cepas da espécie *C. sakazakii* de cozinhas domésticas resistentes a ciprofloxacina. Os resultados do presente estudo sugerem que cepas de *Cronobacter* spp. isoladas de alimentos apresentam baixo potencial de resistência aos antimicrobianos.

## CONCLUSÃO

*Cronobacter* spp. foi detectada em produtos destinados a alimentação infantil com maior ocorrência em produtos à base de aveia e arroz. Foram identificadas três espécies de *Cronobacter*, sendo a maioria das cepas pertencentes a espécie *C. sakazakii*. Conclui-se que estes alimentos representam um risco caso sejam ingeridos por indivíduos como neonatos com menos de seis meses e idosos. No caso decorrer de uma investigação epidemiológica durante um surto causado por *Cronobacter* spp., estes tipos de alimentos devem ser considerados como uma fonte potencial de contaminação caso tenham sido ingeridos pelos indivíduos acometidos. Estudos futuros de análise de risco quanto à ingestão destes alimentos por indivíduos pertencentes ao grupo de risco devem ser considerados pelos órgãos de Vigilância em Saúde.

## AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo e ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz no qual Gisele Meier é residente.

## REFERÊNCIAS

1. Nomenclature-Genus *Cronobacter*. 2017. [acesso 2017 03 Jan]. Disponível em: [http://www.bacterio.net/cronobacter.html].
2. Joseph S, Sonbol H, Hariri S, Desai P, McClelland M, Forsythe SJ. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multi locus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):3031-9. [DOI: 10.1128/JCM.00905-12].
3. Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Geneva, WHO, 2008. (15),90 p.
4. Friedemann M. Epidemiological of invasive *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(11):1297-304. [DOI: 10.1007/s10096-009-0779-4].
5. Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80 (2):113-22.
6. Asato VC, Vilches VE, Pineda MG, Casanueva E, Cane A, Moroni MP, et al. First clinical isolates of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Argentina: characterization and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45(3):160-4.
7. Broge T, Lee A. A case of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) bacteremia in a breastfed infant. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2013;2(4):e1-2. [DOI: 10.1093/jpids/pit021].
8. Kim JB, Cho SH, Park YB, Lee JB, Kim JC, Lee BK, et al. Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. *Yonsei Med J*. 2008;49(6):1017-22. [DOI: https://doi.org/10.3349/ymj.2008.49.6.1017].
9. Barreira ER, Souza DC, Gois PF, Fernandes JC. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. *Pediatria (São Paulo)*. 2003;25(1/2):65-70.

10. Hochel I, Růžičková H, Krásný L, Demnerová K. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. *J Appl Microbiol*. 2012; 112(6):1257-65. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05292.x].
11. Kilonzo-Nthenge A, Rotich E, Godwin S, Nahashon S, Chen F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in middle Tennessee, United States. *J Food Prot*. 2012;75 (8): 1512-7. [DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-442>].
12. Brandão ML, Umeda NS, Carvalho KR, Filippis I. Investigação de um surto causado por *Cronobacter malonicus* em um hospital maternidade em Teresina, Piauí: caracterização e tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):91-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3395/2317-269x.00290>].
13. Tsai HY, Liao CH, Huang YT, Lee PI, Hsueh PR. *Cronobacter* infections not from infant formula, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(1):167-9. [DOI: 10.3201/eid1901.120774].
14. Molloy C, Cagney C, O'Brien S, Iversen C, Fanning S, Duffy G. Surveillance and characterization by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):198-203. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.007>].
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.
16. Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A, Wymore K, et al. Incidence of *Cronobacter* spp. Infections, United States, 2003-2009. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(9):1520-3. [DOI: 10.3201/eid2009.140545].
17. Gosney MA, Martin MV, Wright AE, Gallagher M. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. *Eur J Intern Med*. 2006;17(3):185-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2005.11.010>].
18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Edital de Chamamento n.º 2, de 29 de julho de 2014. Edital de Chamamento para coletar dados e informações a respeito do risco de infecções de lactantes maiores de seis meses por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 30 de jul. 2014. Seção 3, nº144. p.92-93.
19. Iversen C, Druggan P, Schumacher S, Lehner A, Feer C, Gschwend K, et al. Development of a novel screening method for the isolation of "Cronobacter" spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74 (8):2550-3. [DOI: 10.1128/AEM.02801-07].
20. Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R. Development and evaluation of rpoB based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):165-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.023>].
21. Lehner A, Fricker-Feer C, Stephan R. Identification of the recently described *Cronobacter* condimenti by an rpoB-gene-based PCR system. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 7):1034-5. [DOI: 10.1099/jmm.0.042903-0].
22. Carter L, Lindsey LA, Grim CJ, Sathyamoorthy V, Jarvis KG, Gopinath G, et al. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter*. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(2):734-7. [DOI: 10.1128/AEM.02898-12].



23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement, Wayne, PA, USA. 2015;35(3):M100-S15.
24. Singh N, Goel G, Raghav M. Prevalence and characterization of *Cronobacter* spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples. *Curr Microbiol*. 2015;71(1):31-8. [DOI: 10.1007/s00284-015-0816-8].
25. 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.
26. Richards, GM, Gurtler JB, Beuchat LR. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. *J Appl Microbiol*. 2005;99(4):844-50. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02656.x].
27. Osaili T, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):214-20. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006>].
28. Jacobs C, Braun P, Hammer P. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *J Dairy Sci*. 2011;94(8):3801-10. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4318>].
29. Lee YD, Park JH, Chang H. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control*. 2012;24(1-2):225-30. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.09.023].
30. Xu X, Li C, Wu Q, Zhang J, Huang J, Yang G. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *Int J Food Microbiol*. 2015;204:17-23. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.003>].
31. Terragno R, Salve A, Pichel M, Epszteyn S, Brengi S, Binsztein N. Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in Argentina. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):193-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.013>].