

AVALIAÇÃO DO MÉTODO ISO MODIFICADO PARA DETECÇÃO DE *Cronobacter sakazakii* EM ALIMENTOS

JULIANA P. **BASSO**¹; VALÉRIA C.A. **JUNQUEIRA**²; ROSANA F.S. **SANTOS**³;
NEUSELY da **SILVA**⁴; THAIS B. **REIS**⁵.

Nº0901008

**Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos,
Instituto de Tecnologia de Alimentos.**

RESUMO

Crianças de até um ano de idade imuno suprimidas, prematuros e recém nascidos de baixo peso corporal são consideradas suscetíveis a invasão pelo microrganismo *Cronobacter sakazakii*. Esta bactéria é considerada um patógeno de alto risco para esta população restrita, causando patogenidades como sepse, meningite e enterocolite necrosante, podendo levar a morte ou causar seqüelas crônicas de longa duração. O foco dessa contaminação ocorre principalmente em fórmulas infantis lácteas, usadas na preparação de mamadeiras. Alguns métodos para o seu isolamento vêm sendo desenvolvidos e aprimorados. Devido à grande ocorrência de surtos, a alta taxa de mortalidade e a grande dificuldade do isolamento deste patógeno, se faz necessário testar a eficiência de métodos novos como o uso do Ágar DFI da Oxoid como meio alternativo para o Ágar ESIA, validando a modificação do método ISO/TS 22964 (2006) e a inclusão do ensaio confirmativo no sistema BAX.

ABSTRACT

Children up to one year of age immune suppressed, and premature infants of low body weight are considered susceptible to invasion by micro *Cronobacter sakazakii*. This bacterial pathogen is considered a high risk for this population restricted, causing pathogen as sepsis, meningitis and necrotizing enterocolitis, which can lead to death or cause chronic squealed of long duration.

1. BOLSISTA CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica, Campinas-SP, ju_priscila@hotmail.com
2. ORIENTADORA: Pesquisadora, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos/ITAL, Campinas-SP, vcaj@ital.sp.gov.br
3. COLABORADORA: Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica, Campinas-SP
4. COLABORADORA: Graduação em Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP
5. COLABORADORA: Graduação em Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica, Campinas-SP

The focus of such contamination occurs mainly in infant formula milk, used in the preparation of bottles. Some methods for their isolation have been developed and improved. Due to the high occurrence of outbreaks, the high mortality rate and the difficulty of isolation of this pathogen, it is necessary to test the efficiency of new methods as the use of the Oxoid Ágar DFI as an alternative means for Ágar ESIA, validating the modification of the method ISO / TS 22964 (2006) and the inclusion of confirmatory testing in the BAX system.

1 INTRODUÇÃO

A enterobactéria *Enterobacter sakazakii* possui forma de bastonete, gram-negativa, catalase positiva, não esporogênica, anaeróbia facultativa, oxidase negativa e possui flagelos peritríquios (BRENNER *et al.*, 2005).

Esta bactéria é considerada um microrganismo emergente por ser um patógeno pouco estudado. Recentemente foi considerada pela International Commission on Microbiological Specificatino for Foods como de risco severo para população restrita como crianças de até um ano de idade imuno suprimidas, prematuros e recém nascidos de baixo peso corporal (SILVA *et al.*, 2007). Podendo causar patogenidades como sepse, meningite e enterocolite necrosante, podendo levar a morte ou causar seqüelas crônicas de longa duração (FDA/WHO, 2004).

Segundo INFOSAN (2005), o foco de contaminação por esse microrganismo foi identificado principalmente em fórmulas infantis lácteas em pó, utilizadas em hospitais e maternidades para a preparação de mamadeiras.

Através de métodos de hibridização, a bactéria *Enterobacter sakazakii* foi reclassificada, pertencendo a Família Enterobacteraceae, porém em um novo gênero, sendo doravante denominado *Cronobacter sakazakii*. Esta mudança foi devido a pequenas diferenças no DNA de diversas cepas de *Enterobacter sakazakii* que não eram notadas pelas bioquímicas tradicionais (IVERSEN *et al.*, 2008).

Inúmeros métodos vêm sendo utilizados para a detecção de *Cronobacter sakazakii*. Todos possuem basicamente as mesmas etapas, com variações nos meios de cultura e condições de incubação utilizadas.

O método do sistema Bax de detecção por PCR (BAX SYSTEM, 2000) é um método rápido que detecta a presença ou ausência da bactéria alvo sem isolamento cultural. Desta forma é necessário estudos para continuação do ensaio confirmativo através de método cultural de isolamento e identificação do microrganismo.

Em 2006 a International Organization for Standardization (ISO) publicou a ISO/TS 22964 (2006), para a detecção da presença ou ausência de *Enterobacter sakazakii* “*Cronobacter sakazakii*” em fórmulas infantis, leite em pó e amostras do ambiente de fabricação desses produtos.

O Método ISO/TS 22964 (2006) modificado possui o mesmo procedimento do método ISO/TS 22964 (2006), com exceção do item com (plaqueamento diferencial), no qual o Ágar de Isolamento de *E. sakazakii* (ESIA) foi substituído pelo Ágar Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) da Oxoid, incubado a 35°C/24h, desta forma testando outros métodos como meio alternativo para o Ágar ESIA, validando a modificação do método ISO/TS 22964 (2006) e a inclusão do ensaio confirmativo no sistema BAX.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Foram utilizadas 16 amostras de fórmulas infantis em pó para lactentes, 15 amostras de leite em pó integral, 15 amostras de amido de milho e 15 amostras de açúcar refinado, totalizando 61 amostras coletadas no varejo ou fornecidas por fabricantes dos produtos.

2.2.1 MÉTODO ISO/TS 22964 (2006)

Pré enriquecimento. A amostra foi homogeneizada em Água Peptonada Tamponada (BPW) diluição 1:10 e incubada a 37±1°C/18±2h. **Enriquecimento seletivo.** Foi transferido 0,1ml do BPW para 10ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (mLST-V) e incubado a 44±0,5°C/24±2h. **Plaqueamento diferencial.** Foram realizadas estrias de esgotamento do mLST-V em uma placa de Ágar de Isolamento de *E. sakazakii* (ESIA) e incubado a 44±1°C/24±2h. **Ensaio confirmativo.** Cada colônia foi inoculada em uma placa de Ágar Tripticase de Soja (TSA) e incubadas a 25±1°C/44-48h, na presença de colônias típicas realizar o teste de confirmação em uma galeria API 20E (BioMérieux).

4.2.2 MÉTODO ISO/TS 22964 (2006) MODIFICADO

Realizado o mesmo procedimento do método ISO/TS 22964, com substituição do ESIA, no plaqueamento diferencial, pelo Ágar Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) da Oxoid, com incubação a 35°C/24h.

4.2.3 MÉTODO BAX (DUPONT QUALICON, 2000) COM ENSAIO CONFIRMATIVO

Enriquecimento seletivo. Homogeneizar a amostra em Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (mLST-V) 1g da amostra em 9ml de mLST-V e incubar a $44\pm0,5^{\circ}\text{C}/24\pm2\text{h}$. **2º Enriquecimento.** Transferir 10µl do mLST-V para 500µl de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), em um tubo de 2º enriquecimento. Incubar os tubos por 3 horas a 35-37°C. **Preparação do ensaio.** Procedimentos descritos no manual do Sistema BAX (DUPONT QUALICON, 2000). **Confirmação dos resultados positivos presuntivos.** A partir do caldo mLST-V continuar o ensaio conforme o método ISO/TS 22964 (2006) nos meios ESIA e DFI.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as 61 amostras analisadas neste trabalho, em 98% foi observada concordância entre os resultados obtidos com os dois meios, sendo encontradas 06 amostras positivas usando o ESIA e 05 amostras positivas usando o Ágar DFI, de acordo com o procedimento preconizado pelo método ISO/TS 22964 (2006) (**Tabela 1**)

Tabela 1. Resultados da detecção de *C. sakazakii* em amostras analisadas pelo método ISO/TS 22964 (2006), usando o ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Ágar) e o DFI (Druggan-Forsythe-Iversen Agar) para isolamento de colônias presuntivas.

*Número de amostras analisadas /número de amostras presuntivas positivas

Amostra	ESIA *	DFI*
Fórmula infantil em pó	16/1*	16/1*
Leite em pó integral	15/2*	15/2*
Amido solúvel	15/3*	15/2*
Açúcar	15/0	15/0

O Sistema BAX (ensaio presuntivo) apontou *C. sakazakii* em 18 amostras, mas em apenas quatro a presença foi confirmada culturalmente no isolamento em placas de ESIA ou DFI, indicando muitos resultados presuntivos falsos positivos e necessidade de continuidade do ensaio confirmativo. Os resultados podem ser vistos na Tabela.2

Tabela 2. Resultados da detecção de *C. sakazakii* em amostras analisadas pelo Sistema BAX, usando o ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Ágar) e o Ágar DFI (Druggan-Forsythe-Iversen) para isolamento de colônias, a partir de resultados positivos presuntivos.

Amostra	ESIA *	DFI*
Fórmula infantil em pó	6/0	6/0
Leite em pó integral	6/2*	6/2*
Amido solúvel	4/2*	4/2*
Açúcar	2/0	2/0

*Número de amostras analisadas /número de amostras presuntivas positivas

Na família Enterobacteriaceae existem outras espécies que também utilizam substratos para α -glicosidase (IVERSEN & FORSYTHE, 2004, LEHNER et al., 2006), resultando em falso positiva a detecção de *C. sakazakii* a partir de meios de cultura desenvolvidos com estes substratos como agente diferencial único. A colônia típica nos meios ESIA ou DFI deve ser considerada ainda como presuntiva, sendo necessário o emprego de testes bioquímicos complementares em etapa confirmativa.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se afirmar que o Ágar DFI da Oxoid pode substituir o Ágar ESIA com sucesso, sendo observado a concordância de 98% entre os resultados obtidos com os dois meios. A comparação dos métodos Bax System , ISO/TS 22964 e ISO Modificado, demonstrou que houve discordância entre os resultados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAX SYSTEM. PCR assay with automated detection for bacterial screening: **user guide**. Wilmington: DUPONT / QUALICON, 2000.
- BRENNER, D.J.& FARMER III, J.J. Family I. Enterobacteriaceae. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2.ed, v.2. New York: Springer Science+Business Media Inc., P.587-607, 2005.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. Joint FAO/WHO **Workshop on *Enterobacter sakazakii***, and other microorganisms in powdered infant formula. Food and Agriculture Organization/ World Health Organization, 2004. Disponível em:

<<http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en>>. Acesso em: 21 fev. 2009.

INFOSAN. INTERNATIONAL FOOD SAFETY AUTHORITIES NETWORK. *Enterobacter sakazakii* on powdered infant formula: January 13, 2005. Disponível

em:<http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/No_01_Esakazakii_Jan05_en.pdf>. Acesso em: 03 maio. 2009.

LEHNER, A.; NITZSCHE, S.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; THELEN, K.; STEPHAN, R. Comparasion of two chromogenic media and evolution of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. **BMC Microbiology**. v. 6, n. 15, p. 1-8, 2006.

ISO/TS 22964:2006(E). Milk and Milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*. **The International Organization for Standardization**, 2006.

IVERSEN, C.; MULLANE, N.; MCCARDELL, B. *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**, n.58, p. 1442-1447, 2008.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos**, 3.ed. São Paulo: Varela, 2007. p.111-118.