

1. INTRODUÇÃO

Enterobacter sakazakii é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastão, pertencente à família Enterobacteriaceae. Esta espécie não faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal humano ou animal e é reconhecida como um potencial patógeno emergente de origem alimentar (FARBER, 2004).

Até os anos 80, *E. sakazakii* era conhecido como “*Enterobacter cloacae* pigmentado de amarelo”. Entretanto, estudos de homologia de DNA, características bioquímicas, capacidade de produzir pigmento (FARMER et al., 1980), incapacidade de fermentar D-sorbitol e principalmente, a atividade da α -glucosidase, indicaram ser esta espécie única e diferente de *Enterobacter cloacae* (NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997a).

O reservatório natural de *E. sakazakii* é ainda desconhecido, entretanto, outros membros do mesmo gênero são normalmente encontrados em fezes humanas e de animais, no esgoto, na água e no solo (SAKAZAKI, 1974). Relatos demonstram que o microrganismo pode ser isolado em diversos tipos de ambientes e alimentos (LECLERCQ et al., 2002; IVERSEN; FORSYTHE, 2004; MUJTJENS; KOLLÉE, 1990; KANDHAI et al., 2004a).

De maneira geral, *Enterobacter* são considerados patógenos oportunistas que raramente causam doença em indivíduos saudáveis. *E. sakazakii*, no entanto, tem sido relacionado a diversos surtos e casos esporádicos de doenças envolvendo neonatos debilitados. Por esta razão, este microrganismo vem ganhando atenção de autoridades de saúde pública em diversos países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004; LAI, 2001).

Pouco se sabe sobre sua ecologia, taxonomia (WHO, 2004) e sobre o seu mecanismo de virulência específico, mas o microrganismo parece ter uma propensão a infectar o sistema nervoso central, causando meningite, cistos ou abscessos cerebrais (LAI, 2001).

A morbidade relacionada à infecção causada por *E. sakazakii* é muito baixa, tendo sido relatada por STOLL et al. (2004) como sendo de 1:10660 bebês com peso muito baixo. Já a taxa de mortalidade é bastante elevada, com relatos variando entre 20 e 80 por cento dependendo da fonte de informação (WHO, 2004; FARBER, 2004) com neonatos indo à óbito poucos dias após o parto. Os pacientes que se recuperam podem apresentar seqüelas neurológicas severas, como hidrocefalia, tetraplegia e desenvolvimento neurológico retardado (FARBER, 2004).

Com relação à virulência de *E. sakazakii*, parece haver variações entre diferentes cepas. O estudo realizado por BLOCK et al. (2002) sugere que existam diferentes biotipos do microrganismo com capacidade em causar doença em humanos.

Alguns fatores de virulência de *E. sakazakii* foram descritos por PAGOTTO et al. (2003). Nesse trabalho, o primeiro a descrever algum fator de virulência do microrganismo, dezoito cepas de *E. sakazakii* isoladas de casos clínicos e de alimentos foram avaliadas quanto a sua capacidade em causar a morte de camundongos recém-nascidos. Eles verificaram que enquanto algumas cepas são virulentas e capazes de causar a morte de camundongos, outras cepas são avirulentas.

A infecção por *E. sakazakii* é rara sendo que, ao redor do mundo, há até o momento 76 casos documentados (GURTLER et al., 2005), mas de acordo com o relato da WHO (2004), este número provavelmente é subestimado. Isto ocorre porque muitos laboratórios clínicos não pesquisam o organismo e também por falhas nos sistemas de relato de doenças.

A população de maior risco são os bebês prematuros, bebês com baixo peso ao nascer que necessitem de cuidados especiais (UTI neonatal) e imunocomprometidos de qualquer idade (UNITED STATES, 2003).

De particular preocupação para alguns países em desenvolvimento é o montante de crianças filhas de mulheres portadoras de HIV, uma vez que estas crianças devem receber fórmulas infantis em pó e são mais suscetíveis à infecção (WHO, 2004).

Apesar da principal síndrome relacionada ao *E. sakazakii* ser a meningite severa, também podem ocorrer enterocolite necrotizante, bacteremia e septicemia (NAZAROWEC-WHITE; FABER 1997a; SIMMONS et al., 1989; VAN ACKER et al., 2001; LAI, 2001).

A maior suscetibilidade dos recém-nascidos, principalmente dos bebês prematuros, a este microrganismo pode ser decorrente do pH menos ácido de seu estômago quando comparado ao estômago dos adultos (WHO, 2004).

Mesmo não tendo sido claramente identificados o reservatório e o modo de transmissão de *E. sakazakii*, relatos têm demonstrado que fórmulas infantis desidratadas, a base de leite, foram a fonte da infecção e o veículo da bactéria (NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997b; SIMMONS et al., 1989; VAN ACKER et al., 2001; MUYTJENS et al., 1988).

Em 1961, na Inglaterra, foi publicado o primeiro relato de meningite de evolução fulminante em dois recém-nascidos, causada por uma variante de *Enterobacter cloacae*, formadora de colônia amarela. Ambos morreram de infecção generalizada após alguns dias de vida. A incubadora foi implicada como fonte da contaminação bacteriana (URMENYI; FRANKLIN, 1961).

MONROE; TIFT (1979) descreveram o primeiro caso de bacteremia neonatal ocorrido no Estado de Geórgia (EUA) associado com *E. sakazakii*. A infecção ocorreu seis dias após o nascimento e o recém-nascido foi hospitalizado apresentando febre elevada e irritabilidade. O microrganismo foi isolado de amostra de sangue e seguiu-se o tratamento com ampicilina. Aos dois meses de idade, exames revelaram crescimento e desenvolvimento normais do bebê.

KLEIMAN et al. (1981) descreveram um caso de meningite severa em um bebê com cinco semanas de vida no Estado de Indiana (EUA). A infecção, causada por *E. sakazakii*, resultou na necrotização do cérebro com formação de abscessos e a compartimentalização dos ventrículos cerebrais. O microrganismo foi identificado no fluido cérebro-espinhal.

MUYTJENS et al. (1983) relataram, na Holanda, oito casos de meningite neonatal e septicemia por *E. sakazakii*, associados ao leite em pó contaminado. A taxa de mortalidade imediata foi de 75% (seis neonatos). Os dois sobreviventes apresentaram hidrocefalia e um deles apresentou seqüelas (retardamento físico e mental). Ambos vieram a falecer após 29 meses e 16 meses, respectivamente.

ARSENI et al. (1987) descreveram, numa Unidade de Terapia Intensiva na Grécia, 11 casos de infecção por *E. sakazakii* em neonatos, ocorridos de setembro à outubro de 1984. O microrganismo não foi isolado do sangue, mas

sim, da garganta e do reto dos neonatos que apresentaram sinais clínicos severos de septicemia, sendo detectada meningite em um dos casos. Dos 11 neonatos, quatro vieram a falecer, resultando numa taxa de mortalidade de 37%.

SIMMONS et al. (1989) relataram em Memphis, Tennessee (EUA), infecções em neonatos causadas por *E. sakazakii*, envolvendo quatro recém-nascidos. As infecções foram relacionadas ao consumo de fórmulas infantis em pó contaminadas. Os pacientes apresentaram bacteremia e/ou septicemia, infecção no trato urinário, diarreia sanguinolenta, entre outros sintomas. Todos os bebês responderam aos antibióticos administrados e se recuperaram sem complicações.

BIERING et al. (1989) descreveram três casos de infecção neonatal em um hospital na Islândia, ocorridos entre 1986 e 1987 e causados por *E. sakazakii*. Dois dos neonatos nasceram normais e sobreviveram à infecção, mas apresentaram seqüelas graves e irreversíveis (danos cerebrais). O terceiro, nascido com síndrome de Down e má formação cardíaca severa, veio a falecer após alguns dias de vida. Na avaliação realizada, o patógeno não foi isolado dos utensílios usados na preparação da fórmula e nem do ambiente (berçário ou lactário). Entretanto, estava presente em vários lotes de fórmulas infantis em pó utilizadas no hospital no aleitamento dos bebês.

Bacteremia nosocomial foi relatada em criança com seis meses de vida em Baltimore (EUA) tendo *E. sakazakii* e *Leuconostoc mesenteroides* sido identificados como sendo os agentes causadores. De acordo com os pesquisadores, esses microrganismos não foram isolados de amostra de fórmula em pó, mas sim, do liquidificador utilizado no hospital para a reconstituição da

fórmula. Foram administrados gentamicina e ampicilina e a criança sobreviveu (NORIEGA et al., 1990).

MUYTJENS; KOLLÉE (1990) ressaltam que infecções de neonatos por *E. sakazakii* ocorridas na Holanda podem ter sido devido à ingestão de fórmulas infantis contaminadas e não pela transmissão vertical da mãe ao recém-nascido durante o nascimento.

Na revisão realizada por LAI (2001) constam cinco casos de infecções por *E. sakazakii*, ocorridos entre janeiro de 1995 e dezembro de 1996, em Massachusetts (EUA), envolvendo indivíduos imunocomprometidos com 3, 39, 73, 76 e 82 anos de vida. Somente os dois pacientes mais novos sobreviveram após tratamento com antibióticos.

VAN ACKER et al. (2001) descreveram o que ficou conhecido como “surto da Bélgica”. Neste surto 12 neonatos foram infectados por *E. sakazakii* ainda no hospital desenvolvendo enterocolite necrotizante (NEC), com falecimento de duas crianças. O microrganismo foi isolado de aspirado estomacal, “swab” do ânus e/ou amostra sanguínea de 6 dos 12 pacientes. Tipificação molecular indicou similaridade genética entre cepas isoladas dos pacientes e aquelas isoladas das mamadeiras preparadas e as obtidas das embalagens fechadas de fórmulas infantis (Alfaré-Nestlé) utilizadas no hospital. Este foi o primeiro estudo relacionando à contaminação intrínseca de fórmulas infantis em pó pelo *E. sakazakii* e o desenvolvimento de enterocolite necrotizante.

BAR-OZ et al. (2001) descreveram dois casos de meningite neonatal ocorridos em um hospital de Israel. Nesse estudo foi verificado que amostras

colhidas do liquidificador utilizado na reconstituição das fórmulas infantis foram positivas para *E. sakazakii*.

Também em 2001, casos de meningite ocorridos em uma Unidade de Terapia Intensiva neonatal, no Estado do Tennessee (EUA), foram epidemiologicamente associados a um lote de fórmula infantil em pó. Todas as crianças que foram infectadas/colonizadas pelo microrganismo receberam a fórmula Portagen produzida pela Mead Johnson Nutritionals (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002).

BLOCK et al. (2002) descreveram quatro casos de bacteremia por *E. sakazakii* sendo três crianças e um adulto. No primeiro caso infantil, a fórmula em pó reconstituída foi envolvida. No segundo, uma criança desenvolveu conjuntivite por *E. sakazakii* após a cesariana. No terceiro caso, o microrganismo causou meningite numa criança que nasceu de parto normal. No adulto, o microrganismo foi isolado do cateter utilizado para transplante de medula óssea.

Em dezembro de 2004, na França, quatro bebês de uma mesma maternidade na região de Paris apresentaram infecções por *E. sakazakii*. Dos quatro, três estavam recebendo fórmula infantil desidratada da marca Pregestimil (Mead Johnson Nutritionals) que foi incriminada como veículo da infecção. A contaminação do quarto bebê ocorreu, segundo os autores, provavelmente por contaminação cruzada dentro do berçário. A taxa de mortalidade neste surto foi de 50% (FRANCE, 2004).

Esses casos ocorridos na França levaram a Mead Johnson a fazer a recolha (“recall”) de lotes do produto distribuídos ao redor do mundo. Em 29 de dezembro daquele ano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)

proibiu, em todo o território nacional brasileiro, o ingresso, a comercialização, a distribuição, a exposição ao consumo e ao uso da fórmula infantil/produto “leite infantil com ferro para lactentes”, em pó, das marcas Pregestimil e Enfamil Pregestimil, fabricados na Holanda (BRASIL, 2004).

JARVIS (2005) descreveu uma infecção fatal associada com fórmula infantil em pó, em uma Unidade de Terapia Intensiva de neonatos, na Nova Zelândia. O microrganismo foi isolado de amostra de sangue de um recém-nascido prematuro, que mesmo após tratamento com antibióticos, veio a falecer no 18º dia de vida.

Poucos são os relatos de casos ou surtos de infecção por *E. sakazakii* no Brasil. O primeiro caso relatado foi descrito por OLIVEIRA et al. (1999). Os autores investigaram um surto de infecção por *E. sakazakii* na unidade de neonatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e implementaram algumas medidas no local visando à diminuição da contaminação hospitalar, dentre elas, refrigeração adequada do leite, ações educativas e restrições das internações na maternidade.

SILVA et al. (2000) descreveram um surto de septicemia por *Enterobacter sakazakii* em sete pacientes (dois adultos, uma criança e quatro neonatos) em quatro Unidades de Terapia Intensiva durante setembro e outubro de 1998, em diferentes hospitais públicos no Rio de Janeiro, Brasil. Os dois adultos vieram a falecer.

O caso mais recente foi relatado por BARREIRA et al. (2003) que descreveram um caso de meningite por *E. sakazakii* atendido no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo acometendo um bebê de 14 dias,

amamentado exclusivamente ao seio. Na cultura do líquido, foi detectada *E. sakazakii*, causando no recém-nascido um mal convulsivo, seguido de edema cerebral e extensa hemorragia, coma, abaulamento acentuado da fontanela e disjunção de suturas cranianas. O bebê não respondeu ao tratamento com antibióticos e veio a falecer no 15º dia de internação. Os autores não sugerem qual a causa da infecção.

A maioria dos casos de infecções por *E. sakazakii* citados na literatura referem-se à ocorrência em neonatos. Entretanto, existem trabalhos relacionados à infecção em adultos.

HAWKINS et al. (1991) relataram um caso de bacteremia em paciente idoso em Bethesda (EUA). LAI (2001) relata que em Massachusetts (EUA), ocorreram casos de infecção por *E. sakazakii* em adultos, com idade superior a 39 anos, relacionados à bacteremia, osteomielite no pé, apendicite e sepsia biliar. ONGRÁDI (2002) descreveu um caso, em um hospital de Budapeste, de infecção vaginal pelo patógeno. Dentre estes estudos, nenhum descreve casos de meningite em adultos.

Clinicamente, os sinais e os sintomas da meningite causada por *E. sakazakii*, como por exemplo, febre e irritabilidade (WILLIS; ROBISON, 1988) são semelhantes à sintomatologia da meningite causada por outras bactérias Gram-negativas, porém, a frequência de complicações e a letalidade são mais elevadas (LAI, 2001). Esta semelhança de sintomas pode dificultar o tratamento.

São vários os patógenos causadores de meningites no período neonatal. Os mais frequentes são os bacilos entéricos Gram-negativos e os estreptococos

do grupo B, seguidos pela *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus*, *Candida spp* e outros microrganismos mais raros (BARREIRA et al. 2003).

No preparo das fórmulas infantis em pó utiliza-se o leite de vaca, que sofre algumas alterações para simular o leite materno. Dentre estas alterações pode-se citar a redução no conteúdo protéico e de minerais, aumento no conteúdo de carboidratos, aumento na relação Ca/P, adição de vitamina e de gordura modificada (NAZAROWEC-WHITE, 1998).

Na produção de fórmulas infantis em pó processos diferentes podem ser usados. De acordo com a WHO (2004), as fórmulas infantis desidratadas podem ser industrialmente preparadas de três formas:

- a) Processo úmido: quando todos os ingredientes são misturados em uma fase líquida, são submetidos à pasteurização e são posteriormente desidratados.
- b) Processo seco: quando os ingredientes individuais são preparados, termicamente tratados quando adequado, desidratados e então misturados a seco.
- c) Processo combinado: quando parte dos ingredientes é processada conforme descrito em a para produzir uma base à qual os outros ingredientes são adicionados, conforme b.

No Brasil, a única empresa que produz fórmulas infantis desidratadas ainda utiliza o processo úmido, mas irá mudar para o seco, para se alinhar com as demais fábricas do grupo.

Fórmulas infantis em pó são utilizadas quando as mães são impossibilitadas ou simplesmente optam por não amamentar seus filhos com o leite materno (NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997c).

As fórmulas infantis em pó têm sido consumidas com segurança por crianças por mais de 50 anos e constitui cerca de 80% do volume de fórmula infantil consumida no mundo todo. Como não é um produto estéril, pode conter baixos níveis de patógenos oportunistas, como por exemplo, *E. sakazakii* (UNITED STATES, 2005).

A atividade de água (a_w) de fórmula infantil em pó é baixa, igual a 0,2 (BREEUWER et al., 2003), o que garante a sua estabilidade. EDELSON-MAMMEL et al. (2005) demonstraram que *E. sakazakii* pode sobreviver por períodos longos (dois anos) em fórmulas infantis desidratadas.

BREEUWER et al. (2003) verificaram que *E. sakazakii* possui capacidade de sobreviver em ambientes com baixa atividade de água e discutiram mecanismos que a bactéria usa para sobreviver nessas condições, como por exemplo, o acúmulo de trealose nas células. Para isso, eles testaram “in vitro” a resistência osmótica de *E. sakazakii* a uma a_w igual a 0,934 (em caldo BHI suplementado com 40 % de sorbitol) e a 45°C e observaram que o microrganismo é mais resistente que *Salmonella senftenberg*, *S. typhimurium* e *S. enteritidis*.

A fonte de contaminação das fórmulas infantis em pó não está totalmente esclarecida, mas MUYTJENS et al. (1988) sugeriram que a contaminação com Enterobacteriaceae pode ocorrer pós-processamento térmico.

É importante destacar que as fórmulas infantis incriminadas nos surtos e casos de doenças relacionados a *E. sakazakii* e relatados até o momento atendiam às especificações microbiológicas vigentes do Codex Alimentarius. Estas especificações estabeleciam para coliformes um plano amostral onde para cinco amostras examinadas (n), uma (c) poderia conter população de coliformes entre < 3 (m) e 20 (M) (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION/ WHO FOOD STANDARDS, 1979).

Em 2005, foi feita uma proposta de alteração do padrão Codex sugerindo a ausência de *E. sakazakii* em 10g, sendo que a amostragem deve ser representativa de 30 unidades do mesmo lote (n=30) (UNITED STATES, 2005). Este novo plano, mais estrito, visa garantir uma maior segurança aos bebês.

Apesar de serem submetidas ao tratamento térmico durante seu processamento, diferentemente da fórmula infantil líquida, as fórmulas infantis desidratadas não recebem calor para tornarem-se estéreis (UNITED STATES, 2002a).

Por esta razão, o Food and Drug Administration (FDA, EUA) tem se preocupado cada vez mais com o uso desse produto na alimentação de recém-nascidos prematuros em Unidades de Cuidado Neonatal Intensivo. Para minimizar riscos de infecção tem sido recomendado por eles que as fórmulas infantis em pó não sejam utilizadas nestas unidades, a menos que não exista outra alternativa disponível (UNITED STATES, 2002a).

Isto por que mesmo baixos níveis de contaminação por *E. sakazakii* em fórmulas infantis em pó são considerados fator de risco significativo, dado ao

potencial de multiplicação do microrganismo durante o preparo e o tempo de espera, prévio ao consumo da fórmula reconstituída (WHO, 2004).

Se a única opção disponível para atender as necessidades nutricionais de um recém-nascido em particular é a fórmula em pó, o FDA sugere que as seguintes medidas sejam tomadas para que os riscos de infecção sejam reduzidos (UNITED STATES, 2002b):

- a) Reconstituição da fórmula em pó com água fervente e subsequente refrigeração antes do uso. Deve-se reconhecer que provavelmente ocorrerá perda de algumas vitaminas (por exemplo, tiamina, ácido ascórbico);
- b) Preparação a cada refeição de somente um pequeno volume da fórmula reconstituída, a fim de reduzir o tempo que a fórmula permanece em temperatura ambiente;
- c) Diminuição do tempo de espera entre a preparação e o consumo, seja em temperatura ambiente ou sob refrigeração;
- d) Redução do tempo de permanência da fórmula preparada em temperatura ambiente, seja em mamadeiras, copos ou bolsa para a administração nasogástrica. Este tempo nunca deve exceder quatro horas.

Com relação a termotolerância de *E. sakazakii*, FARMER et al. (1980) avaliaram a capacidade de 57 cepas de *E. sakazakii* em multiplicar a diferentes temperaturas e observaram que cepas do microrganismo podiam se multiplicar a 25, 36 e 45°C. Eles verificaram ainda que 15 das cepas testadas se multiplicaram a 47°C, mas nenhum dos isolados o fez a 4 °C ou 50°C.

KINDLE et al. (1996) inocularam 10^5 UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus*

aureus, *Candida albicans*, *Mycobacterium* em cinco amostras de fórmulas infantis preparadas e verificaram uma diminuição significativa na população dos microrganismos após aquecimento em microondas. Os autores concluíram que esse tipo de aquecimento pode ser um método rápido e conveniente na redução da contaminação microbiana em fórmulas infantis em pó preparadas.

Em outro estudo, NAZAROWEC-WHITE; FARBER (1997a) observaram que a temperatura máxima para multiplicação dos isolados de *E. sakazakii* esteve entre 41°C (isolados de origem clínica e de alimentos) e 45°C (somente os isolados de alimentos). Para as cepas estudadas, a temperatura mínima de multiplicação do *E. sakazakii* em fórmulas infantis reconstituídas foi de 5,5°C tanto para os isolados clínicos como para os de alimentos. O tempo de geração para ambos os grupos foi de 40 minutos a 23°C (temperatura ambiente) e de 4,64 horas a 10°C (temperatura de refrigeração). Estes resultados indicam que o patógeno, se presente em fórmulas infantis reconstituídas mantidas em temperatura ambiente, pode se multiplicar rapidamente.

NAZAROWEC-WHITE; FARBER (1997c) determinaram a resistência térmica a 52, 54, 56, 58 e 60°C de um “pool” de 10 cepas de *E. sakazakii* (cinco isolados clínicos e cinco de alimentos) em fórmula infantil em pó reconstituída. Os valores D para cada temperatura foram, respectivamente, 54.8, 23.7, 10.3, 4.2 e 2.5 min. Com base nestes resultados, os autores concluíram que *E. sakazakii* é um dos membros mais termotolerantes da família Enterobacteriaceae encontrados nos produtos lácteos.

NAZAROWEC-WHITE et al. (1999) verificaram a redução em cerca de 5 log da população de *E. sakazakii* suspensa em leite bovino após tratamento

térmico de 68°C por 16 segundos. Isto indica que a pasteurização padrão é suficiente para reduzir a população do microrganismo a um nível seguro.

Todas as 22 cepas *E. sakazakii* testadas por BREEUWER et al. (2003) foram capazes de se multiplicar a 47°C em caldo infusão de cérebro e coração (BHI), resultado esse muito semelhante ao previamente encontrado por FARMER et al. (1980).

Fórmulas infantis em pó reidratadas foram inoculadas com 12 cepas *E. sakazakii* e posteriormente aquecidas a temperaturas de 56, 58, 60, 65 e 70°C (EDELSON-MAMMEL; BUCHANAN, 2004). O valor D_{58} variou de 30,5 a 591,9 segundos e o valor z da cepa mais termorresistente (isolado clínico) foi de 5,6°C. Estes autores concluíram que cepas diferentes podem apresentar diferentes respostas ao tratamento térmico.

LEE et al. (2006) compararam a eficiência da reidratação de fórmulas com água aquecida a 80°C e a utilização de irradiação com cobalto 60 para redução da população de *E. sakazakii* em fórmulas infantis desidratadas. Eles verificaram uma redução de 3 log na população tanto empregando 3 KGy como água aquecida a 80°C na reidratação da fórmula e que com 5 KGy, o microrganismo não pode ser recuperado.

Ainda são poucos os estudos sobre ocorrência de *E. sakazakii* em fórmulas infantis desidratadas.

MUYTJENS et al. (1988), na Holanda, examinaram 141 amostras provenientes de 35 países, quanto à presença de membros da família Enterobacteriaceae. *E. sakazakii* foi isolado em 20 amostras (14%).

No Canadá, NAZAROWEC-WHITE; FARBER (1997a) avaliaram a ocorrência de *E. sakazakii* em 120 latas de fórmulas infantis de cinco produtores e lotes diferentes, encontrando oito amostras positivas (6,7%).

IVERSEN; FORSYTHE (2004), na Inglaterra, avaliaram a presença de *E. sakazakii* em 82 amostras de fórmulas infantis e verificaram que duas (2,4%) das fórmulas examinadas continham o microrganismo.

No Brasil, SANTOS et al. (2005) avaliaram 86 amostras de fórmulas infantis em pó, 20 amostras de fórmulas reconstituídas e cinco amostras de amido. Do total de amostras analisadas, doze (14%) fórmulas em pó e quatro (80%) amostras de amido apresentaram o microrganismo. *E. sakazakii* não foi detectado nas amostras de fórmulas reconstituídas analisadas.

MUYTJENS; KOLLÉE (1990), na Holanda, investigaram a presença de *E. sakazakii* numa grande variedade de amostras: fezes de gado bovino, roedores e de pássaros, na superfície corpórea de pacientes em hospitais e de animais, águas superficiais, lama, sementes, solo, madeira em decomposição e no leite cru de bovinos, porém não isolaram o patógeno.

E. sakazakii também já foi isolado a partir de leite humano armazenado em banco de leite, segundo estudo de NOVAK et al. (2001) realizado no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Os autores relataram a identificação de três (0,2%) isolados de *E. sakazakii* dentre os 873 obtidos a partir das amostras examinadas.

SORIANO et al. (2001), na Espanha, isolaram *E. sakazakii* de alface “in natura” (um entre 40 amostras), mas não de alface processada pronta para o consumo. Na França, LECLERCQ et al. (2002) verificaram que outros alimentos também podem abrigar o patógeno, como queijos, carne bovina moída, embutidos e hortaliças.

Visto que o organismo não faz parte da flora intestinal normal humana e dos animais, IVERSEN; FORSYTHE (2003) sugerem que o solo, água e os vegetais possam ser as principais fontes ambientais e em segundo plano, os vetores como os ratos e as moscas contribuiriam para a disseminação da contaminação. A importância das moscas como vetores, foi comprovada por HAMILTON et al., (2003) que verificaram que o *E. sakazakii* pode ser encontrado no trato gastrointestinal de insetos.

IVERSEN; FORSYTHE (2004) isolaram *E. sakazakii*, na Inglaterra, de alimentos secos (incluindo proteína de soja, coco ralado, amêndoas, pistaches), de queijos, ervas e condimentos.

NASSEREDDIN; YAMANI (2005) avaliaram a qualidade microbiológica de 65 amostras de duas bebidas não alcoólicas preparadas, a base de extratos de plantas e tradicionalmente consumidos na Jordânia e em outros países árabes durante os meses do verão e o Ramadã. A presença do *E. sakazakii* foi confirmada somente em uma das duas amostras positivas para membros da família Enterobacteriaceae.

KANDHAI et al. (2004b), na Holanda, verificaram que *E. sakazakii* pode estar amplamente distribuído tanto no ambiente doméstico como no industrial

(fábricas produtoras de leite em pó, massas, cereais, chocolate, farinha de batata e condimentos). O microrganismo foi isolado em 35 de 147 amostras provenientes de nove fábricas de alimentos e em 16 casas avaliadas.

KANDHAI et al. (2004a) também analisaram 152 amostras ambientais, obtidas em três fábricas diferentes produtoras de leite em pó. Os autores isolaram *E. sakazakii* em 18 (12%) amostras, como por exemplo, na poeira, nos sacos de aspirador e em resíduos próximos aos equipamentos.

As indústrias produtoras de leite em pó, ou de fórmulas infantis, podem apresentar diferenças em vários aspectos, desde os materiais utilizados na sua construção, a idade da fábrica, o “design”, até a facilidade de limpeza do ambiente e isto pode influenciar diretamente no nível de eficiência do controle da contaminação microbiana no ambiente (GURTLER et al., 2005).

RESTAINO et al. (2006) em Illinois (EUA), não encontraram o microrganismo em 20 amostras de fórmulas infantis em pó analisadas, mas isolaram *E. sakazakii* de farinha de trigo, milho, soja e de arroz (17,9% das amostras analisadas), de cereais infantis em pó (33,3%), do ambiente (8%) e de vegetais e condimentos secos (20%).

MRAMBA et al. (2006) isolaram *E. sakazakii* em duas (0,2%) das 928 moscas de estábulo (*Stomoxys calcitrans* L.) analisadas e coletadas em Kansas e na Flórida nos EUA. O isolamento do microrganismo associado às moscas de estábulo indica, que o esterco animal é uma reserva natural em potencial deste patógeno.

Nos casos de doenças provocadas por fórmulas infantis administradas em hospitais, estudos têm demonstrado a importância de equipamentos e utensílios utilizados no preparo dessas fórmulas como fonte de *E. sakazakii*.

MUYTJENS; KOLLÉE (1990) associaram a contaminação de liquidificadores e de escovas de limpeza utilizadas nas cozinhas, com doenças infantis causadas por *E. sakazakii*.

BLOCK et al. (2002) não isolaram o microrganismo em fórmulas infantis em pó, mas sim na fórmula reconstituída e no liquidificador utilizado para o seu preparo, em um hospital de Jerusalém.

A presença de *E. sakazakii* em equipamentos e utensílios pode ser decorrente de sua capacidade em aderir às superfícies e formar biofilmes. IVERSEN et al. (2004b) investigaram o potencial de cepas de *E. sakazakii* em formar biofilmes em materiais comumente encontrados tanto em ambiente industrial como doméstico tais como o silicone, látex, policarbonato (usado na confecção de mamadeiras) e aço inoxidável. A formação de biofilme foi verificada em todos os materiais.

A capacidade de formação de biofilmes, combinada com a alta resistência ao estresse osmótico de *E. sakazakii*, pode facilitar a sua persistência no ambiente, permitindo a colonização de equipamentos utilizados na preparação dos alimentos (LEHNER; STEPHAN, 2004).

O grande problema relacionado à presença de biofilmes é que eles são mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos usados no processo de higienização do ambiente (MOSTELLER; BISHOP, 1993).

Da mesma forma que ocorre na indústria ou em lactários, os biofilmes de *E. sakazakii* também podem se formar no ambiente doméstico. Por esta razão IVERSEN et al. (2004b) recomendam que mamadeiras e utensílios usados na preparação da fórmula em pó infantil sejam limpos logo após a sua utilização, eliminando ou minimizando a formação de biofilmes.

1.1 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *E. sakazakii*

MUYTJENS et al. (1984) demonstraram que é possível distinguir, de forma simples e rápida, *E. sakazakii* de outras Enterobacteriaceae através da reação de α -glucosidase.

Por estar presente em baixos números nos alimentos, as metodologias descritas até o momento para pesquisa de *E. sakazakii* em fórmulas infantis, baseiam-se na técnica do número mais provável (NMP), empregando-se um ou dois enriquecimentos.

Em 1988, MUYTJENS et al. descreveram o primeiro método quantitativo para o isolamento de *E. sakazakii* de fórmulas infantis em pó. Nesse método, porções de 100g, 10g e 1g, em triplicata, são pesadas e diluídas na proporção 1:10 com água peptonada tamponada (BPW) a 45°C e incubadas "overnight" a 36°C. Alíquotas de 10ml são transferidas para 90ml de caldo de enriquecimento para Enterobacteriaceae (EEB) e incubadas por 18 horas a 36°C. Após o período de incubação, 1ml é semeado em profundidade em ágar glicose bile vermelho

violeta (VRBGA) e incubado por 18 horas a 36°C. Cepas características de Enterobacteriaceae são então cultivadas em ágar sangue de carneiro e em ágar eosina azul de metileno (EMB). Colônias são confirmadas como *E. sakazakii* através do teste de produção de colônias amarelas em ágar nutriente após 48 horas a 25°C, produção de DNASE extracelular em ágar azul de toluidina e reação positiva α -glucosidase. O API 20E pode ser usado para identificar as cepas. A população de Enterobacteriaceae é determinada pela técnica do número mais provável (NMP).

NAZAROWEC-WHITE; FARBER (1997a) utilizaram o método proposto por MUYTJENS et al. (1988) com modificação. Ao invés de BPW, a amostra em pó é suspensa em água estéril. Colônias presuntivas de *E. sakazakii* também são confirmadas através do sistema de identificação bioquímica API 20E e a população do microrganismo são estimadas empregando-se número mais provável.

O método proposto pelo FDA (UNITED STATES, 2002a) é muito semelhante ao utilizado por NAZAROWEC-WHITE; FARBER (1997a). A principal diferença está na semeadura do enriquecimento secundário em duas placas contendo VRBGA, sendo uma semeadura por esgotamento e outra por espalhamento superficial (0,1ml) e ambas são incubadas a 36°C por 18 horas. Além disso, até cinco colônias são transferidas para placa contendo ágar soja tripticase (TSA) e incubadas a 25°C por 48-72 horas. Colônias de cor amarela intenso no ágar TSA são consideradas suspeitas de *E. sakazakii* e são

submetidas ao teste de produção de oxidase, identificação empregando-se o kit API-20E e a avaliação da produção de α -glucosidase.

GUILLAUME-GENTIL et al. (2005) descrevem um método para detectar e identificar *E. sakazakii* em amostras de ambiente. Estes autores sugerem que após o enriquecimento primário em água peptonada as amostras sejam submetidas ao enriquecimento seletivo a 45°C em caldo lauril sulfato triptose suplementado com 0,5M NaCl (mLST) e 10 mg de vancomicina /litro de caldo por 22-24h. A seguir é semeada em TSA com sais biliares que é então incubado a 37°C por 24 horas com luz. O microrganismo nestas condições produz colônias amarelas. Confirmação das colônias suspeitas de *E. sakazakii* é feita através do teste de α -glucosidase e também empregando-se o API 20E. Por esse método, o microrganismo foi isolado em 40% das amostras testadas, mas em apenas em 26% das amostras analisadas pelo método preconizado pelo FDA (UNITED STATES, 2002a).

Apesar dos métodos mencionados basearem a identificação de *E. sakazakii* na capacidade deste microrganismo gerar colônias amarelas, sabe-se que esta característica muitas vezes pode falhar.

Para superar este problema, vários meios cromogênicos têm sido desenvolvidos utilizando a capacidade de reagir com a α -glucosidase.

IVERSEN et al. (2004a) formularam um meio cromogênico chamado DFI (ágar Druggan-Forsythe-Iversen) para a detecção seletiva do *E. sakazakii*. Esse meio é baseado na reação de α -glucosidase, detectada através do 5-bromo-4-cloro-indol- α -D-glucopiranoside (X α Glc). Na figura 1 tem-se uma placa de ágar

DFI com colônias de *E. sakazakii* (verde), *Proteus* (amarela) e *Serratia* (vermelha). Este meio é comercializado pela Oxoid (Inglaterra).

Os Laboratórios R&F (EUA) também desenvolveram um meio cromogênico para isolamento do *E. sakazakii* chamado “ágar cromogênico de plaqueamento para *E. sakazakii*” (ESPM). O meio contém dois substratos cromogênicos, três açúcares, indicador de pH e inibidores que contribuem para a seletividade e propriedades diferenciais. As colônias características do microrganismo apresentam-se de cor azul-escuro após incubação a 35°C por 24 horas (figura 2). RESTAINO et al. (2006) avaliaram a eficiência deste meio para o isolamento presuntivo de colônias do microrganismo em amostras ambientais e de alimentos.

A empresa AES Laboratoire (França) desenvolveu o “ágar cromogênico de isolamento do *E. sakazakii*” (ESIA) utilizado no método preconizado pela ISO (TC 34/SC 5N) (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2004), onde colônias típicas do microrganismo apresentam-se na cor azul-esverdeadas.

Além dos métodos convencionais descritos, há também aqueles que empregam a PCR (reação da polimerização em cadeia), como é o caso do sistema BAX[®], da Du Pont ou ainda métodos empregando imunoseparação como o Pathatrix da Matrix MicroScience (Inglaterra).

O BAX é um método de análise microbiológica que pode ser empregado tanto para alimentos como para amostras ambientais (BAX[®] System, 2000). O sistema BAX[®] é automatizado e permite a detecção em tempo real da presença do patógeno. O teste consiste de um enriquecimento inicial da amostra, segundo um protocolo específico para o tipo de alimento. As amostras são, então,

combinadas com uma solução de lise e tratadas termicamente, o que leva a liberação do DNA. Os reagentes necessários para a PCR e mais o corante fluorescente “SYBR Green”, peletizados e pré-distribuídos em tubos de reação, são reidratados com a amostra lisada. Os tubos são transferidos ao termociclador/detector, onde ocorre a amplificação do fragmento de DNA específico ao microrganismo. O DNA amplificado gera um sinal fluorescente que é interpretado pelo BAX[®]. Os resultados são então, mostrados no monitor como símbolos positivos ou negativos (BAX[®] System, 2000).

O sistema PATHATRIX, patenteado pela empresa Matrix MicroScience faz uso de partículas paramagnéticas catiônicas revestidas de anticorpos específicos aos patógenos alvo. A amostra de alimento, diluída 1:10, é circulada no equipamento por um período de tempo permitindo o contato entre antígeno e anticorpo. Após este período é realizada a concentração das partículas paramagnéticas e após lavagem, estas podem ser utilizadas tanto para PCR como para semeadura direta (PARTON et al., 2006). Os autores consideram o equipamento simples e eficiente por requerer pouco tempo de trabalho e por permitir o isolamento do microrganismo em populações tão baixas quanto 10 UFC/100g de amostra.

1.

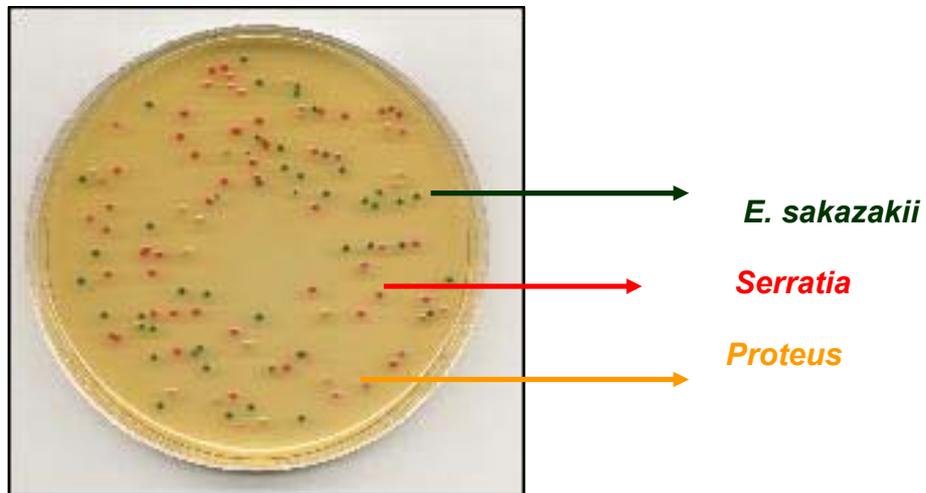


Figura 1. Placa de ágar DFI com colônias de *E. sakazakii* (verde), *Proteus* (amarela) e *Serratia* (vermelha) (<http://www.rapidmicrobiology.com/news/603h93p.JPG>).

2.

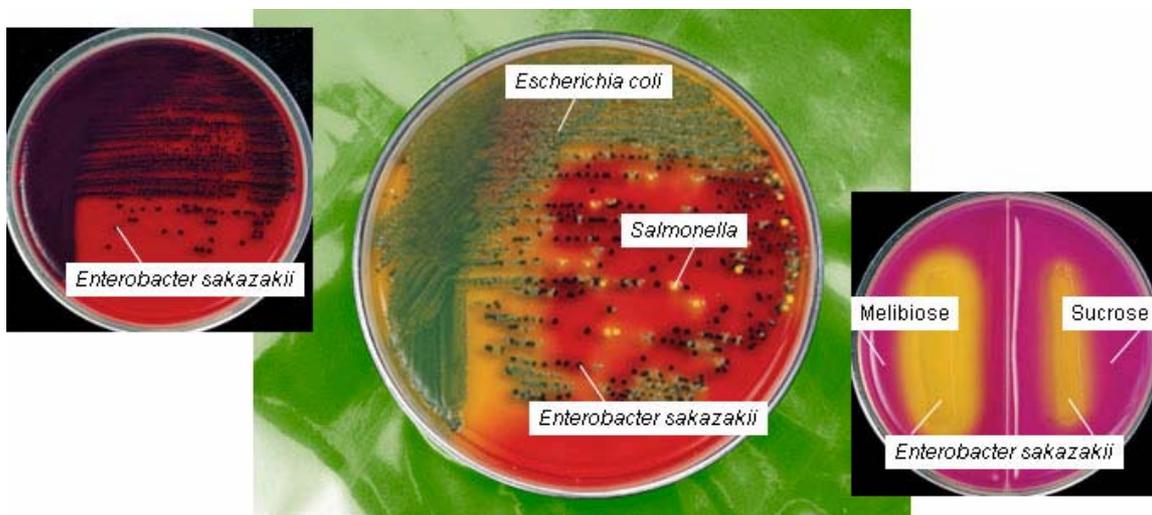


Figura 2. Placa de ágar ESPM com colônias de *E. sakazakii* (azul-escuro), *Escherichia coli* (verde) e *Salmonella* (amarela) e *E. sakazakii* em placa com melibiose e sucrose. (http://www.biosynth.com/media/pictures_culture_media/enterobacter_sakazakii/enterobacter-sakazakii.jpg)

2. OBJETIVOS

- Avaliar a eficiência do meio cromogênico DFI na identificação do *E. sakazakii*.
- Verificar a eficiência das metodologias ISO (TC 34/SC 5N) modificada (utilização do meio DFI) e FDA (UNITED STATES, 2002a) empregadas na enumeração de *E. sakazakii*.
- Avaliar a população de *Enterobacter sakazakii* e de Enterobacteriaceae em fórmulas lácteas infantis, desidratadas, importadas ou nacionais, específicas para a faixa 0-6 meses de idade comercializadas na cidade de São Paulo, Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. CEPAS BACTERIANAS

As cepas bacterianas utilizadas no estudo foram *Escherichia coli* ATCC8739 e *Enterobacter aerogenes* ATCC13048 pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP e *Enterobacter sakazakii* CDC7006 doado pela empresa Nestlé. As cepas foram mantidas a - 70°C em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) adicionado de glicerol (20%).

3.1.2. FÓRMULAS INFANTIS

Foram examinadas 150 amostras de fórmulas lácteas infantis desidratadas, de diferentes produtores e marcas comerciais, para alimentação de bebês de 0-6 meses de idade, adquiridas no comércio varejista da cidade de São Paulo. Foram coletadas três amostras, de 50 lotes diferentes de produtos, adquiridas em pontos diferentes de venda.

Os 50 lotes examinados eram de dois produtores sendo que 30% das amostras correspondem a empresa A e 70% a empresa B. Dentre as amostras da empresa A, dois tipos de produtos foram examinados (fórmula infantil para lactentes de 0 a 6 meses e fórmula infantil com ferro) e dentre as da empresa B foram examinados 5 tipos de fórmulas infantis (com ferro indicada para crianças de 0 à 6 meses; com ferro indicada para crianças de 0 a 12 meses; acidificada; anti-regurgitação de 0 a 12 meses e hipoalergênica).

As amostras foram transportadas para o laboratório e armazenadas em temperatura ambiente e em local seco, até o momento do uso. As coletas de amostras no comércio ocorreram no período de abril a setembro de 2005.

3.1.3 PREPARO DAS AMOSTRAS:

A tampa plástica das latas foi sanificada com álcool 70%, antes da retirada do lacre em fluxo laminar. A seguir, retirou-se a tampa de alumínio e a colher de medida contida no interior da lata.

De cada lata de leite em pó, foram pesadas, em triplicata (balança Marte^R modelo AS2000, Brasil) porções de 1g, 10g e 100g com o auxílio de colher previamente flambada, para a enumeração de *E. sakazakii*. Para enumeração de Enterobacteriaceae foram pesadas porções de 10g.

3.2 MÉTODOS

Todos os meios de cultura empregados foram da marca Oxoid (Reino Unido).

3.2.1. CURVAS DE CRESCIMENTO

As cepas *E. sakazakii*, *E. coli* e de *E. aerogenes* (conforme descrito em 3.1.1) foram ativadas por semeadura em placa contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, uma colônia isolada foi adicionada a 50 ml de caldo de soja triptona (TSB) e foi incubada a 35°C com agitação a 140-150 rpm em agitador rotativo INNOVA 4000-Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, EUA). Para a determinação da

população no tempo zero e a cada 30 minutos até o período máximo de seis horas, foram realizadas diluições seriadas decimais em solução salina 0.85% seguidas de semeadura em profundidade em ágar BHI (em duplicata). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A população foi determinada através da contagem das colônias nas placas apresentando de 30-300 colônias e multiplicando-se o valor encontrado pelo inverso da diluição, sendo a população expressa em UFC/ml. Estes experimentos foram repetidos pelo menos três vezes com cada microrganismo.

3.2.2. PREPARO DAS SUSPENSÕES DE MICRORGANISMOS

Com base nos resultados obtidos em 3.2.1 preparou-se as suspensões de microrganismos a serem utilizadas nos testes de avaliação das metodologias. As cepas padrão foram semeadas em placa contendo ágar BHI e incubadas a 37°C/24 horas. A seguir, uma colônia isolada foi adicionada a 50 ml de caldo TSB com posterior incubação a 35°C com agitação 140-150 rpm por 2,5 horas para *E. coli* e *E. aerogenes* e por 5 horas para *E. sakazakii*. Após esse período, diluições decimais seriadas foram preparadas em solução salina 0.85% de modo a obter a população necessária aos experimentos.

3.2.3. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MEIO DFI E DAS METODOLOGIAS PARA A DETECÇÃO DE *E. sakazakii*

3.2.3.1. Avaliação da eficiência do meio cromogênico *E. sakazakii* (formulação DFI)

Nesse teste foram utilizadas as cepas padrão de microrganismos *E. sakazakii*, *E. coli* e *E. aerogenes* (conforme descrito no item 3.1.1). Cada microrganismo foi semeado por esgotamento por duas vezes consecutivas em placa contendo ágar BHI e incubado a 37°C por 24 horas. Após este período, uma colônia de cada microrganismo foi selecionada e adicionada a um mesmo tubo contendo 10ml de solução salina 0,85%. Depois de homogeneizado, foram feitas diluições decimais seriadas que foram semeadas por esgotamento em placas contendo ágar DFI (anexo 2). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas sendo então examinadas para identificação das colônias características de *E. sakazakii*. Esse teste foi repetido três vezes.

3.2.3.2. Método FDA (UNITED STATES, 2002a) para detecção de *E. sakazakii* em fórmulas infantis em pó.

As porções de 100g, 10g e 1g em triplicata (conforme item 3.1.3) foram diluídas com 900 ml, 90ml e 9ml (1:10), respectivamente, em água destilada estéril a 45°C e incubadas a 36°C por 18 horas. A seguir, alíquotas de 10 ml de cada série em triplicata foram transferidas para 90 ml de caldo de enriquecimento para Enterobacteriaceae (EEB) (enriquecimento secundário) e incubadas a 36°C por 18 horas. As amostras enriquecidas foram semeadas por esgotamento e por espalhamento superficial (0,1ml) em placas contendo ágar glicose bile vermelho violeta (VRBGA) que foram incubadas a 36°C por 18 horas. Até cinco colônias típicas (cor púrpura com halo também púrpura) foram transferidas para placa contendo ágar soja tripticase (TSA) e incubadas a 25°C por 48-72 horas.

Colônias de cor amarela intenso no ágar TSA foram consideradas suspeitas de *E. sakazakii* e foram submetidas ao teste de produção de oxidase (Difco, EUA), à identificação empregando-se o kit API-20E (BioMerieux, França) e a avaliação da produção de α -glucosidase (MUYTJENS et al., 1984) empregando-se o tablete de teste α -glucosidase (Rosco Diagnostica, Dinamarca). Para este teste, deve-se colocar o tablete em um tubo de ensaio, 0,25 ml de salina 0,85 % e uma colônia suspeita de *E. sakazakii* e homogeneizar. Após 4 horas em banho-maria, a 37°C, a presença de coloração amarela, indica resultado positivo para produção de α -glucosidase.

Na figura 3a tem-se a representação esquemática da metodologia empregada pelo FDA.

3.2.3.3 Método ISO (TC34/SN 5N) modificado para detecção de *E. sakazakii*.

Porções de amostras conforme descrito em 3.2.3.2. foram diluídas 1:10 em água peptonada tamponada (BPW) e incubadas a 37°C por 18 horas. A seguir, alíquotas de 0,1ml foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo lauril sulfato triptose modificado (mLST) (LST adicionado de 0,5M de NaCl) adicionado de vancomicina (INLAB-HCl Purex) na concentração final de 10 μ g/ml mLST (anexo 1). Os tubos foram incubados a 45°C por 24 horas. Após incubação, os caldos foram semeados por esgotamento em placas contendo ágar DFI que foram incubadas a 37°C por 24 horas. Uma a cinco colônias apresentando coloração azul-esverdeada no ágar DFI foram transferidas para placas de ágar TSA e incubadas a 25°C por 48 horas para verificar a produção

de pigmento amarelo. A confirmação das colônias apresentando coloração amarela seguiu conforme descrito no item 3.2.3.2.

Na figura 3b tem-se a representação esquemática desta metodologia.

3.2.3.4 Avaliação da eficiência das metodologias ISO modificado e FDA para detecção de *E. sakazakii* em fórmulas infantis.

A fim de avaliar a eficiência das duas metodologias, porções de fórmulas lácteas infantis foram pesadas e diluídas com os diluentes especificados em cada metodologia (3.2.3.2 e 3.2.3.3). A seguir foram contaminadas com as cepas bacterianas preparadas conforme apresentado em 3.2.2.

Dois grupos de experimentos foram realizados. No primeiro, cada 100 ml de fórmula diluída foram contaminados com 0,1 UFC de *E. sakazakii* e 10 UFC de *E. coli* e de *E. aerogenes*. No segundo grupo, utilizou-se 0,01 UFC de *E. sakazaki*, mas manteve-se a população das outras bactérias em 10 UFC/ 100ml.

A seguir as amostras foram tratadas conforme apresentado em 3.2.3.2 e 3.2.3.3. Estas avaliações foram repetidas três vezes.

3.2.4. ENUMERAÇÃO DE *E. sakazakii* EM FÓRMULAS INFANTIS

A enumeração de *E. sakazakii* foi realizada empregando-se o método ISO (TC 34/SC 5 N) com modificação (3.2.3.3) e a técnica do número mais provável recomendada pelo FDA (UNITED STATES, 2002a).

A população de *E. sakazakii* foi estimada empregando-se a tabela de Número Mais Provável (BLODGETT, 2006). Na figura 4 tem-se a representação esquemática da metodologia empregada para avaliação das fórmulas infantis.

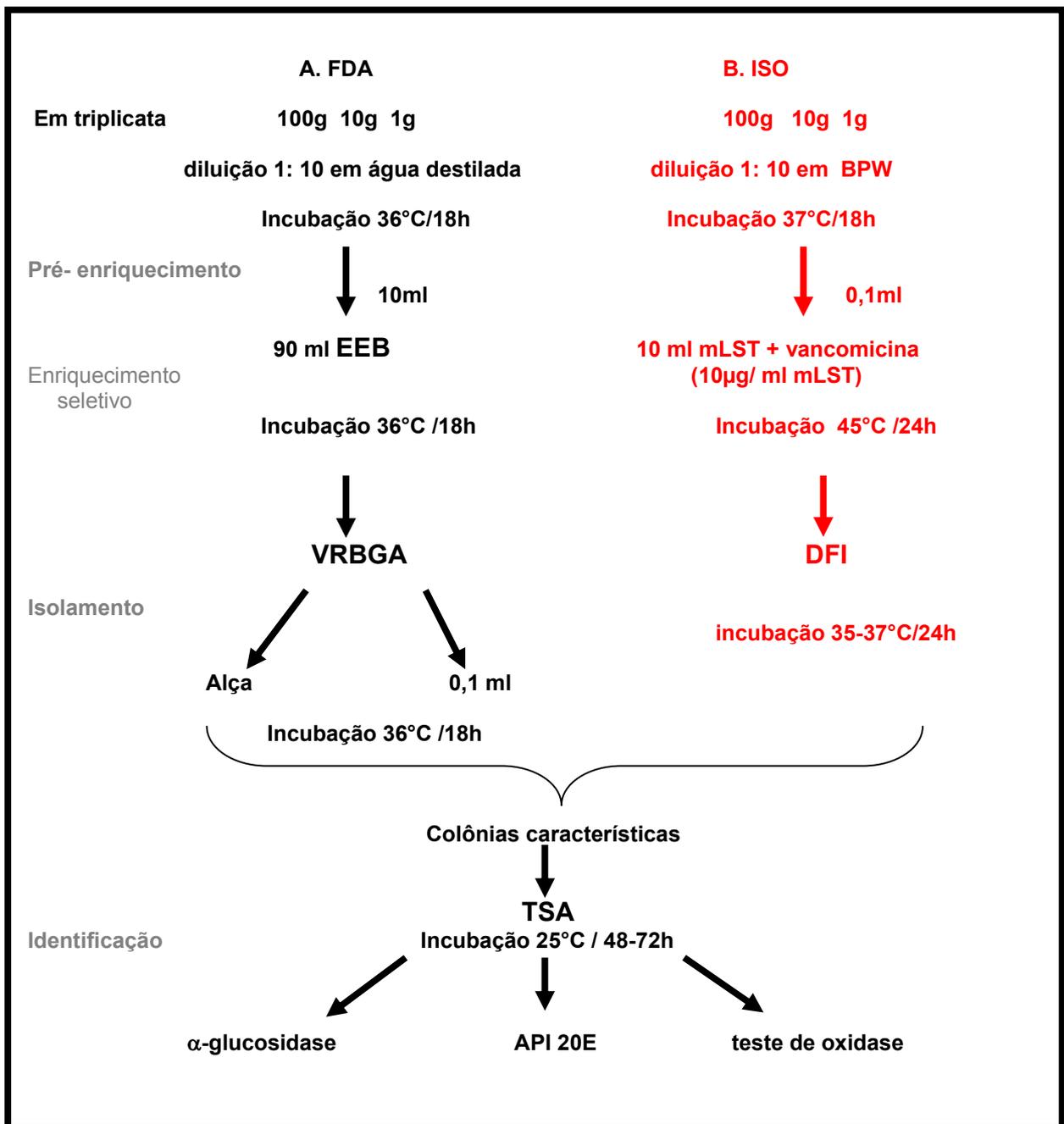


Figura 3. Representação esquemática de duas metodologias para pesquisa / enumeração de *E. sakazakii* em fórmulas infantis/ leite. A) FDA (UNITED STATES, 2002a) e B) ISO (TC34/SC 5N) modificado. BPW (Água peptonada tamponada); EEB (caldo de enriquecimento para Enterobacteriaceae); mLST (caldo lauril sulfato triptose modificado); DFI (ágar cromogênico *E. sakazakii*); VRBGA (ágar glicose bile vermelho violeta); TSA (ágar soja tripticase).

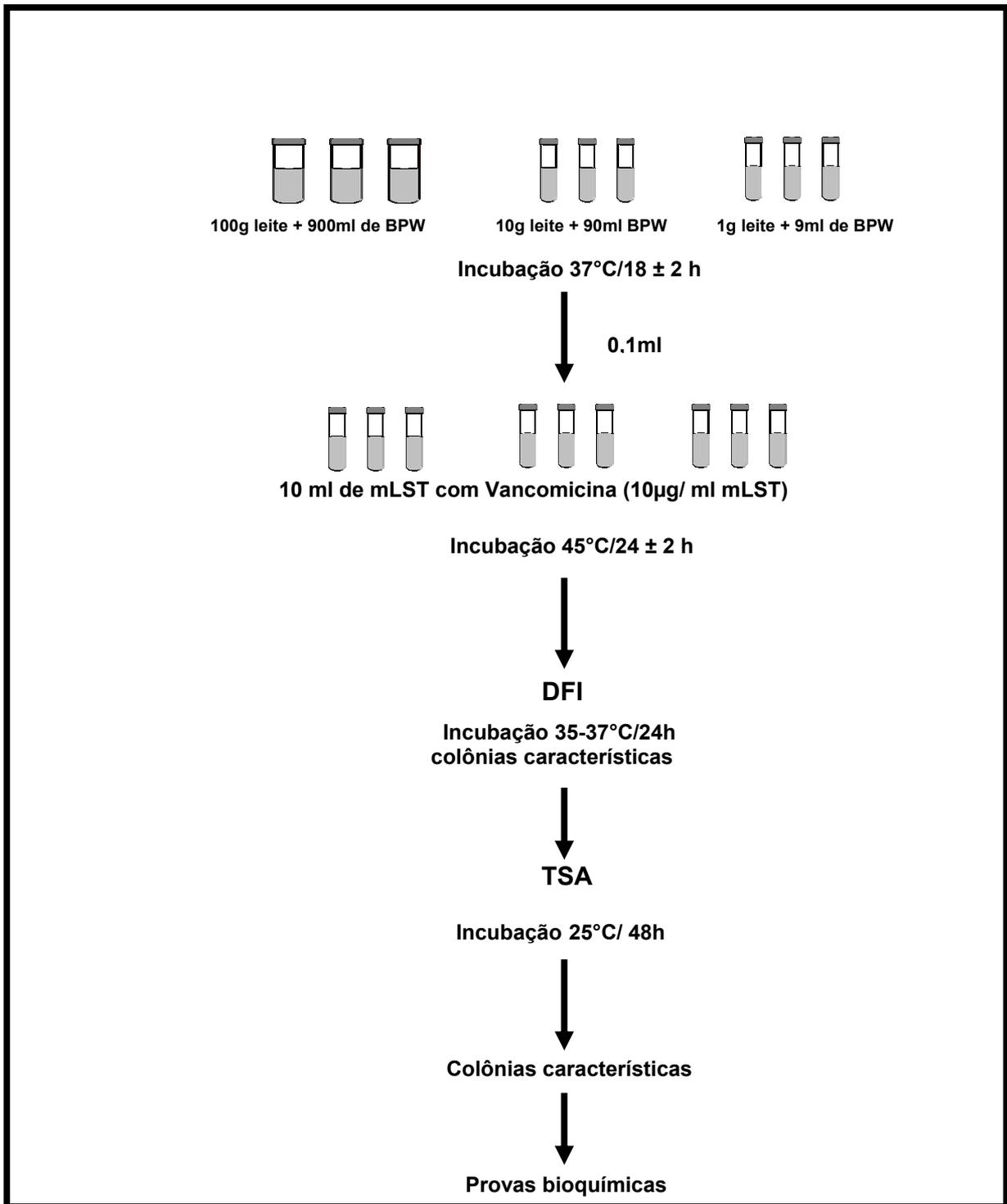


Figura 4. Representação esquemática da metodologia ISO (TC34/SC 5N) modificado empregada para enumeração de *E. sakazakii* em fórmulas infantis. BPW (água peptonada tamponada); mLST (caldo lauril sulfato triptose), TSA (ágar soja tripticase)

3.2.5. ENUMERAÇÃO DE Enterobacteriaceae (KORNACKI;JOHNSON, 2001)

Porções de 10g de fórmula infantil foram assepticamente pesadas e diluídas em 40ml de BPW. Após homogenização diluições decimais seriadas foram preparadas e 1ml das diluições aplicado na superfície de placas de Petrifilm™ contagem de enterobactérias (EB) da 3M™ (EUA).

Após o período de solidificação do gel, (1 minuto), as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

As placas contendo colônias vermelhas com zonas amarelas e/ou colônias vermelhas com bolhas de gás com ou sem zonas amarelas são consideradas positivas para Enterobacteriaceae. De acordo com as instruções do fabricante, somente foram contadas placas que continham entre 25 e 250 colônias. A população foi calculada levando-se em conta o fator de diluição.

Na figura 5 tem-se a representação esquemática dessa metodologia.

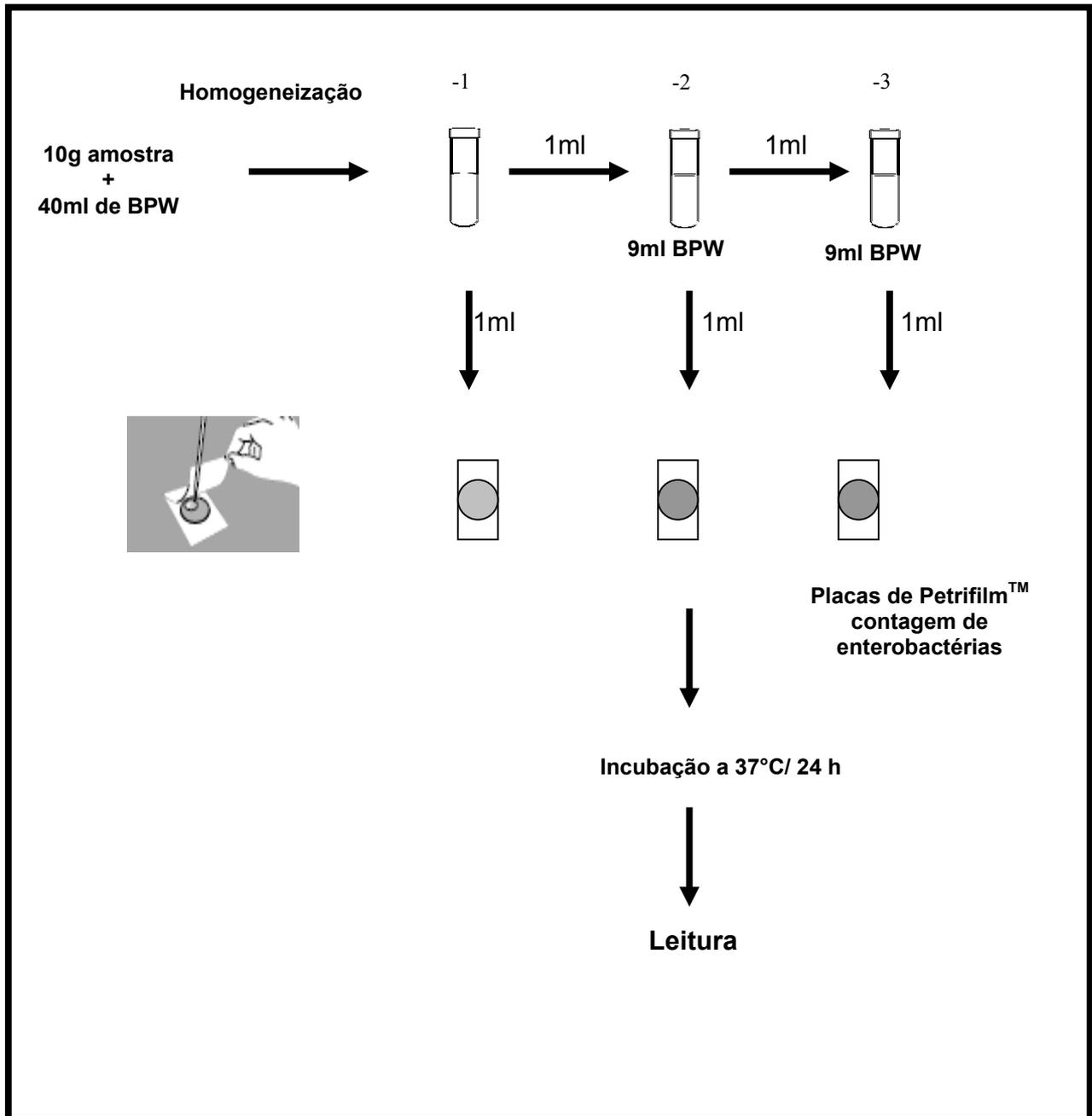


Figura 5. Representação esquemática da metodologia para enumeração de Enterobacteriaceae empregando-se placas de Petrifilm™ contagem de enterobactérias (EB). BPW (água peptonada tamponada).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CURVAS DE CRESCIMENTO

Para avaliar o comportamento dos microrganismos a serem utilizados nos experimentos e padronizar a população a ser inoculada, curvas de crescimento foram realizadas. Os caldos (TSB) foram incubados a 37°C sob agitação de 140 a 150 rpm e as populações determinadas a cada 30 minutos. Conforme pode ser verificado nas figuras 6 e 7, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* entraram em fase estacionária após 3,5 horas de incubação, tendo atingido 10^8 UFC/ml após 2,5 horas de incubação. A cepa de *Enterobacter sakazakii* entrou em fase estacionária após 4,5 horas de incubação, tendo atingido população de 10^{10} UFC/ml (figura 8)

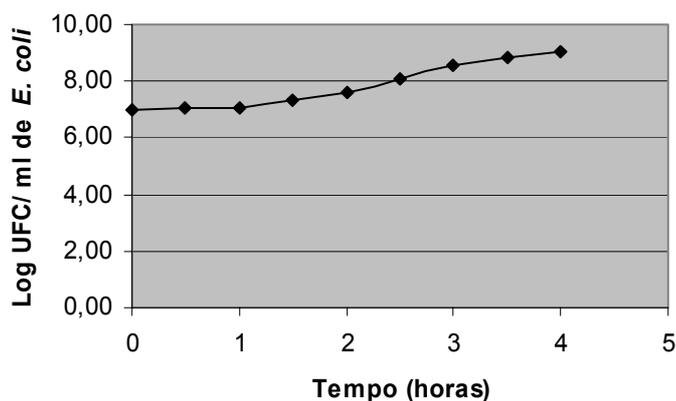


Figura 6. Curva de crescimento de *E. coli* em caldo TSB incubado a 37°C (média de 3 repetições).

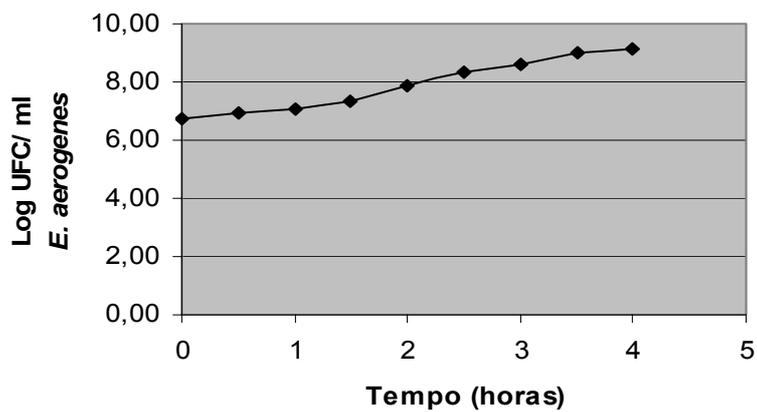


Figura 7. Curva de crescimento de *E. aerogenes* em caldo TSB incubado a 37°C (média de 3 repetições).

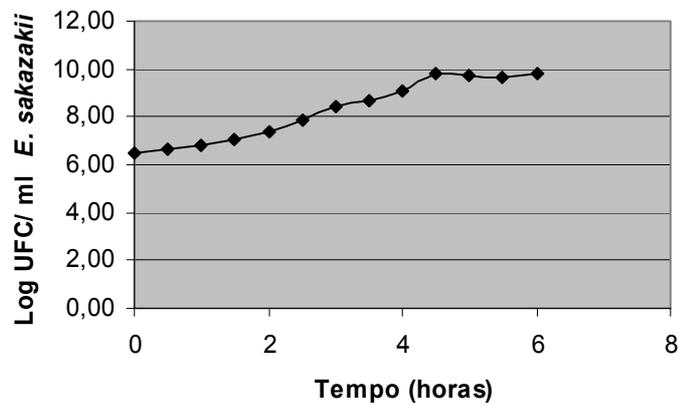


Figura 8. Curva de crescimento de *E. sakazakii* em caldo TSB incubado a 37°C (média de 3 repetições).

4.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MEIO CROMOGÊNICO-DFI

Para avaliar a capacidade do meio cromogênico DFI em permitir a diferenciação das cepas bacterianas relacionadas (*E. coli*, *E. aerogenes* e *E. sakazakii*) combinaram-se os três microrganismos e, por esgotamento, semeou-se em placas contendo DFI.

As colônias de *E. sakazakii* foram facilmente identificadas, mesmo na presença dos demais microrganismos, isto por que, *E. sakazakii* apresenta-se de cor azul-esverdeada (figura 9a), enquanto as colônias de *E. coli* são de cor amarelo transparente (figura 9b) e *E. aerogenes* de cor palha (figura 9c).

O meio cromogênico DFI (anexo 2) foi desenvolvido por IVERSEN et al. (2004a) e a diferenciação de *E. sakazakii* está baseada na reação de α -glucosidase, detectada através do 5-bromo-4-cloro-indol- α -D-glucopiranoside ($X\alpha$ Glc). *E. sakazakii* hidrolisa este substrato originando um pigmento índigo, que torna as colônias azul-esverdeadas neste meio de cultura.

A capacidade de *E. sakazakii* em produzir α -glucosidase foi relatada pela primeira vez por MUYTJENS et al. (1984). Esses autores verificaram que enquanto 100% dos 129 isolados de *E. sakazakii* testados apresentavam esta capacidade, nenhum dos isolados de outras espécies de *Enterobacter* o faziam.

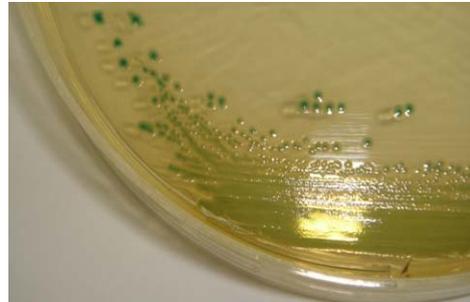
Para avaliar a especificidade e sensibilidade do ágar DFI, IVERSEN et al. (2004a) testaram 95 cepas de *E. sakazakii* e 148 cepas não-*E. sakazakii* e verificaram 100% de sensibilidade e 87,2% de especificidade.

Num outro estudo, IVERSEN; FORSYTHE (2004) verificaram que *Enterobacter sakazakii* pode ser isolado de 67 de um total de 486 amostras de

alimentos testados quando utilizaram o ágar DFI, enquanto somente 19 amostras mostraram-se positivas empregando-se os meios recomendados pelo FDA (UNITED STATES, 2002a).

Existem outros meios cromogênicos para o isolamento e identificação de *E. sakazakii*, como por exemplo, o ESIA (AES laboratoire) e o ESPM (R&F Lab) entre tanto, estes meios não possuem representantes em nosso país, o que dificultaria sua aquisição. Uma vez que o DFI apresentou bom desempenho, optou-se por utilizá-lo neste estudo.

A



B



C



Figura 9. Colônias de algumas Enterobacteriaceae em meio DFI. (A) *E. sakazakii*, (B) *E. coli* e (C) *E. aerogenes*.

4.3. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DAS METODOLOGIAS ISO E FDA

Para avaliar a eficiência dos dois métodos, inoculou-se porções de fórmula infantil reconstituída com dois níveis de inóculo de *E. sakazakii* (0,1 e 0,01UFC/100ml), mantendo-se constante em 10UFC/100ml a população dos outros microrganismos (*E. aerogenes* e *E. coli*). Nas três repetições realizadas para cada nível de *E. sakazakii* verificou-se que independentemente da população de *E. sakazakii*, o patógeno pode ser recuperado e isolado todas as vezes que se empregou a metodologia ISO e o meio DFI. Todas as colônias características de *E. sakazakii* em meio DFI foram submetidas à caracterização bioquímica, tendo sido confirmadas como *E. sakazakii*.

Através da metodologia proposta pelo FDA, em uma das três repetições não se obteve colônia característica de *Enterobacter* no meio VRBGA, tanto por esgotamento como por espalhamento superficial com alça de Drigalski. Todas as colônias obtidas neste experimento apresentaram-se com cor atípica (marrom) e o crescimento foi confluyente, impedindo a obtenção de colônias isoladas.

Nas outras duas repetições empregando-se o método da FDA obteve-se colônias características de *Enterobacter* no meio VRBGA (cor púrpura com halo também púrpura), porém, quando submetidas à avaliação bioquímica não apresentaram reação característica para *E. sakazakii*.

Uma vez que VRBGA não é um meio específico para *E. sakazakii*, seu emprego faz com que um maior número de colônias suspeitas sejam testadas, para evitar ocorrência de resultados negativos falsos. Para minimizar falhas, a totalidade das colônias presentes nas placas deveria ser analisada, o que é inviável para uma rotina laboratorial.

Como o meio DFI permite a diferenciação de *E. sakazakii* dos demais *Enterobacter* ou microrganismos relacionados, a análise se torna mais rápida, simples e segura.

Além do meio de isolamento, o meio de enriquecimento secundário, também pode ter contribuído para a maior capacidade de recuperação de *E. sakazakii* pelo método ISO. Nesse método, o caldo secundário tem como base o caldo lauril sulfato triptose, amplamente utilizado para pesquisa de coliformes em alimentos, adicionado de 0,5M NaCl/ litro de caldo (LST) e 10µg de vancomicina/ml mLST. A adição do NaCl explora a maior tolerância de *E. sakazakii* ao estresse osmótico enquanto a adição de vancomicina inibe outras Enterobacteriaceae como *Salmonella*, *E. coli* e outros *Enterobacter*.

BREEUWER et al. (2003) relatam a maior osmotolerância de *E. sakazakii*, quando comparada a outros membros da espécie e EPINE (2006) a resistência a vancomicina.

Com base nestes resultados, optou-se pelo emprego da metodologia ISO com semeadura em ágar DFI para este estudo. Uma vez que se propôs a quantificar o patógeno nas amostras de fórmula láctea infantil desidratada, foi necessária a utilização da técnica de tubos múltiplos. Assim, utilizou-se para quantificação a proposta da FDA.

4.4. ENUMERAÇÃO DE *Enterobacter sakazakii* e Enterobacteriaceae

Na busca de formas mais eficientes para garantir a segurança da população novas abordagens têm sido empregadas, a avaliação de Risco Microbiológico-ARM (“microbial risk assessment”-MRA) é uma delas. A ARM é um processo científico para avaliar o potencial de exposição e para estimar a relação dose-resposta (WHO, 1999; INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 2002).

Os dados necessários para ARM devem ser quantitativos, o que faz com que boa parte dos dados existentes sobre patógenos na literatura seja de pouca valia por serem qualitativos. Para que se possa estimar o risco de ocorrência de determinadas doenças veiculadas por alimentos há necessidade de se obter dados quantitativos para patógenos específicos em determinados alimentos (“Data Collection for International Microbial Food Safety Risk Assessments”, ILSI Risk Science Institute, Washington, abril, 2004).

Para que se possa avaliar a exposição (“exposure assessment”) deve-se ter uma estimativa da ocorrência do patógeno em questão (ou sua toxina) e sua população (ou concentração) em uma porção específica de alimento no momento do consumo, pelos diferentes grupos da população (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Os dados gerados por um processo de avaliação de risco podem ser usados para ajudar a tomar decisões relacionadas ao gerenciamento do risco (“risk management”).

Por esta razão, optou-se por quantificar a população de *E. sakazakii* nas fórmulas lácteas infantis, desidratadas, para bebês de até seis meses.

Todas as 150 amostras examinadas neste estudo, independente de marca ou origem, apresentaram população de *Enterobacter sakazakii* inferior a 0,03 NMP/100g e de Enterobacteriaceae inferior a 5 UFC/g.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo com aqueles encontrados na literatura é dificultada pela ampla variedade de métodos empregados. Na maioria dos estudos realizou-se apenas a avaliação da presença/ausência de patógenos nas amostras.

Dentre os estudos publicados, somente MUYTJENS et al. (1983), BLOCK et al. (2002) e RESTAINO et al. (2006) não encontraram o patógeno nas amostras de fórmulas infantis examinadas.

MUYTJENS et al. (1983) estudando um surto ocorrido em um hospital na Holanda não isolaram *E. sakazakii* na fórmula em pó, nem na água utilizada na sua preparação, mas o microrganismo foi, por inúmeras vezes, isolado na fórmula infantil preparada, na escova de limpeza e na colher da mistura. Estes autores sugerem que utensílios possam ser veículo de transmissão do patógeno.

BLOCK et al. (2002) também não isolaram o microrganismo em fórmulas infantis em pó, mas sim na fórmula reconstituída e no liquidificador utilizado para o preparo das fórmulas em um hospital de Jerusalém.

RESTAINO et al. (2006) não isolaram o microrganismo nas 20 latas de fórmulas infantis em pó examinadas.

Outros autores relatam a presença do patógeno em amostras de fórmulas infantis desidratadas, porém a frequência e/ou a população de *E. sakazakii* nestas amostras é baixa.

MUYTJENS et al. (1988) relataram populações variando entre 0,36 a 66,0 UFC/100g de fórmula infantil em pó em 20 das 141 amostras examinadas na Holanda e provenientes de 35 países. Vale ressaltar que as duas amostras brasileiras por eles examinadas não apresentavam o patógeno.

SIMMONS et al. (1989) estimaram população de 8 células/100g para uma lata de fórmula infantil em pó aberta que estava sendo utilizada durante o tempo em que houve um surto de infecções em uma Unidade de Cuidados Intensivos de neonatos em Memphis, Tennessee (EUA).

Na avaliação realizada por BIERING et al. (1989) *E. sakazakii* estava presente em cinco das sete latas de fórmulas infantis utilizadas no aleitamento dos bebês em um hospital na Islândia.

NAZAROWEC-WHITE; FARBER (1997a) analisaram 120 latas de fórmulas infantis em pó, representando cinco produtores diferentes. Estes pesquisadores encontraram *E. sakazakii* somente em 8 (6,7%) amostras com população de 0,36 UFC/100g.

VAN ACKER et al. (2001) descreveram um surto de infecção por *E. sakazakii* em 12 neonatos. Tipificação por PCR, confirmou similaridade entre cepas isoladas dos pacientes, das mamadeiras preparadas e nas embalagens fechadas de fórmula infantil (Alfaré-Nestlé) utilizadas no hospital. Na avaliação realizada, o patógeno não foi isolado na água utilizada na reconstituição da fórmula, nem na água de lavagem dos liquidificadores.

BAR-OZ et al. (2001) verificaram que amostras colhidas do liquidificador e da fórmula infantil utilizada na alimentação dos bebês em um hospital de Israel foram positivas para *E. sakazakii*.

IVERSEN; FORSYTHE (2004) utilizando o método do FDA e semeadura em paralelo em ágar VRBGA e DFI isolaram *E. sakazakii* em duas das 82 latas de fórmulas infantis em pó examinadas.

No Brasil, SANTOS et al. (2005) avaliaram 86 amostras de fórmulas infantis em pó e 20 amostras de fórmulas reconstituídas. Do total de amostras analisadas, 12 (14%) fórmulas em pó apresentaram o microrganismo. O *E. sakazakii* não foi detectado nas amostras de fórmulas reconstituídas analisadas.

Não se encontrou na literatura estudos que também tenham avaliado a presença/ ausência ou enumerado a população de Enterobacteriaceae em fórmulas infantis. Em um único estudo encontrado, SCHWAB et al. (1982) avaliaram a presença de coliformes neste produto. Os autores investigaram a qualidade microbiológica de 1574 amostras de produtos substitutos do leite e produtos que continham leite. Essas fórmulas eram provenientes de 11 produtores diferentes e englobavam exemplares com adição de ferro, acidificadas, hipoalergênicas e com aroma. Eles verificaram que a população de coliformes em 1322 (84%) amostras era inferior 3 NMP/g e nas demais amostras a população foi superior a 3NMP/g.

O habitat natural do *E. sakazakii* ainda é desconhecido, mas relatos demonstraram que o microrganismo pode ser isolado em vários tipos de alimentos e também nas unidades produtoras de alimento. Mas somente as fórmulas infantis em pó tem sido associadas a ocorrência de doenças (LEHNER et al, 2005).

A fim de minimizar problemas ocorridos durante a produção de fórmulas lácteas infantis desidratadas e de garantir a inocuidade de seus produtos, as empresas produtoras monitoram a presença de *E. sakazakii* e de seus indicadores, tanto na matéria prima como no ambiente de produção.

Neste estudo foram obtidos, junto à empresa B, resultados referentes à monitoração da contaminação ambiental e de matérias primas utilizadas na elaboração dos lotes avaliados.

Na figura 10, tem-se a representação da planta de processamento com a identificação dos pontos amostrados e na tabela 1 tem-se a identificação destes pontos.

Nesta empresa, o monitoramento ambiental é feito pela enumeração de Enterobacteriaceae e, segundo as normas da empresa, quando qualquer amostra ambiental apresenta população de Enterobacteriaceae superior a 100UFC/g, a pesquisa de *E. sakazakii* é realizada empregando-se tanto o método ISO como o BAX®.

Foi examinado um total de 542 amostras ambientais. Nenhuma amostra das áreas críticas de processamento, sendo 373 de superfícies externas dos equipamentos (E1) e 169 de pisos e aspiradores (E2), apresentou *E. sakazakii*. Conforme pode ser verificado na tabela 2, do total de 542 amostras avaliadas, 11 (2%) apresentaram populações de Enterobacteriaceae superiores a 100UFC/g, sendo que três eram de superfície externa de equipamentos e oito de pisos e aspiradores. Entretanto *E. sakazakii* não foi isolado destas amostras.

A fim de facilitar a visualização dos resultados apresentados na Tabela 2 construiu-se o gráfico apresentado na figura 11. Observa-se que a grande maioria das amostras, tanto de superfície externa de equipamentos como de chão e aspiradores, apresenta população de Enterobacteriaceae inferior a 10 UFC/g.

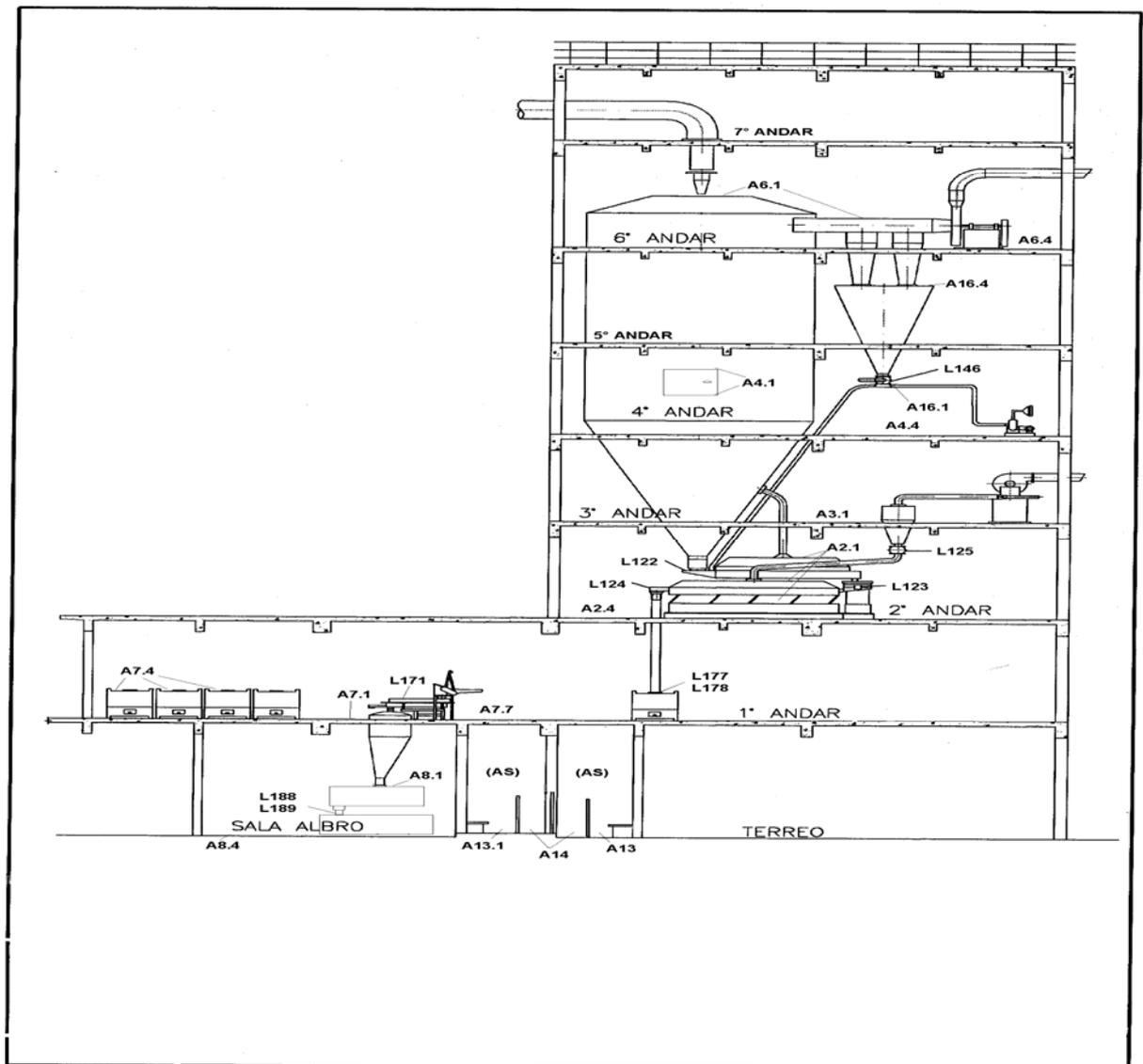


Figura 10. Representação da planta de processamento da empresa B com a identificação dos pontos amostrados. Ver tabela 1 para identificação dos pontos de coleta das amostras.

Tabela 1. Identificação dos pontos amostrados pela empresa B no ambiente da linha de processamento de fórmulas lácteas infantis desidratadas.

Amostra	Local	Andar	Pontos de amostras
L171	Enlatamento 1	1º andar	Peneira Tote Tilt
L122	Linha 1	2º andar	Fluid Bed Secador
L123	Linha 1	2º andar	Refugo peneira Intermediária
L124	Linha 1	2º andar	Fluid Bed Resfriador
L125	Linha 1	2º andar	Válvula Separadora de finos
L146	Linha 1	4º andar	Válvula multiclone
L177	Linha 1	1º andar	Primeiro pó que sai do secador – início do 1º tote
L178	Linha 1	1º andar	Último pó que sai do secador – final do último tote
L188	Linha 1	Térreo	Primeira lata envasada na linha
L189	Linha 1	Térreo	Última lata envasada na linha

Tabela 2. População de Enterobacteriaceae em amostras de ambiente de linha de produção de fórmula láctea infantil desidratada empresa B, coletadas na superfície externa dos equipamentos (E1) e de pisos e aspiradores (E2). Amostras referentes aos lotes avaliados neste estudo.

População (UFC/g)	Tipo de amostra	
	E1	E2
<10	352	132
10 a 100	18	29
> 100	3	8
Total	373	169

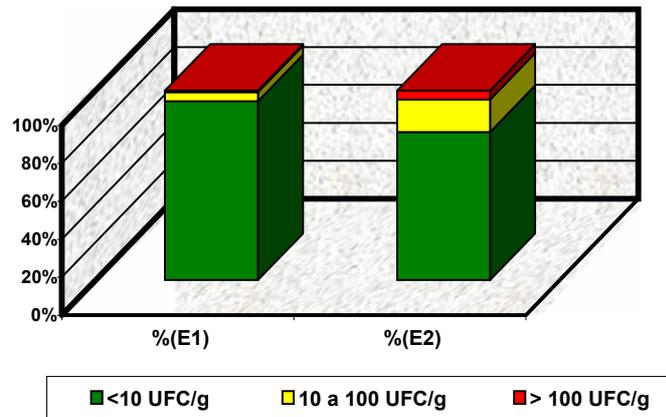


Figura 11. Gráfico representativo da população de Enterobacteriaceae de linha de produção de fórmula láctea infantil desidratada (empresa B). E1(superfícies externas dos equipamentos); E2 (pisos e aspiradores). Amostras referentes aos lotes examinados neste estudo.

O não isolamento de *E. sakazakii* nos lotes de fórmula láctea infantil desidratada produzidos pela empresa B e analisados nesse experimento, condiz com os resultados obtidos nas amostras de ambiente de fábrica apresentados.

Dentre as características de *E. sakazakii*, merecem destaque por sua importância para a indústria de alimentos, a sua elevada tolerância à desidratação e sua termotolerância. A primeira dá a este patógeno uma vantagem competitiva em ambientes secos, como é o caso de linhas de processamento de fórmulas infantis em pó, aumentando o risco da contaminação

pós-pasteurização do produto (BREEUWER et al., 2003; EDELSON-MAMMEL et al., 2005).

A termotolerância de *E. sakazakii* também é superior a das demais Enterobacteriaceae conforme foi verificado por NAZAROWEC-WHITE; FARBER (1997c) e por EDELSON-MAMMEL; BUCHANAN (2004). Estes últimos pesquisadores verificaram ainda que esta termotolerância é cepa-específica, com algumas se mostrando ainda mais resistentes que outras.

Apesar desta termotolerância, NAZAROWEC-WHITE et al. (1999) verificaram que a pasteurização padrão (68°C por 16 segundos) é eficiente na inativação de *E. sakazakii*.

IVERSEN; FORSYTHE (2003) relacionam cinco medidas relevantes para o controle de *E. sakazakii* em fórmulas lácteas infantis desidratadas. Destas cinco medidas, quatro podem ser aplicadas pelas indústrias processadoras. São elas:

1. Controle da população inicial de *E. sakazakii* na matéria prima;
2. Redução da contaminação pelo tratamento térmico do leite cru e dos ingredientes adicionados às fórmulas;
3. Prevenção da contaminação pós-processamento;
4. Aplicação de critérios microbiológicos;
5. Fornecimento de informações apropriadas e instruções para preparação.

FARBER (2004) esboçou estratégias para indústria dos alimentos reduzirem a ocorrência de *E. sakazakii*, sendo obrigatório um monitoramento do meio ambiente de fábrica, melhores práticas de higiene e testes do produto final.

É importante enfatizar que a fórmula infantil em pó produzida de acordo com os padrões atuais não é um produto estéril e, ocasionalmente, patógenos podem ser encontrados. Mesmo níveis baixos de contaminação por *E. sakazakii* na fórmula infantil em pó são considerados fatores de riscos significativos, dado seu potencial de multiplicação durante o preparo e o tempo de espera prévia ao consumo da fórmula reconstituída.

De acordo com as recomendações da WHO (2004) a indústria de alimentos infantis deve ser incentivada a:

a) desenvolver uma maior variedade de fórmulas alternativas, comercialmente estéreis, para os grupos de alto risco;

b) reduzir a concentração e a prevalência de *E. sakazakii*, tanto no ambiente fabril quanto na fórmula infantil em pó. Para isto, a indústria deve levar em conta a implementação de um programa efetivo de monitoramento ambiental e avaliar a presença de Enterobacteriaceae ao invés de coliformes, como indicador do controle higiênico das suas linhas de produção.

Conforme foi verificado, a empresa B já emprega Enterobacteriaceae como indicador higiênico de suas linhas de produção de fórmulas lácteas desidratadas para bebês. Dados referentes a empresa A não foram obtidos.

6. CONCLUSÕES:

- a) O ágar DFI foi eficiente para a detecção de colônias de *E. sakazakii*, mesmo na presença de *E. coli* e *E. aerogenes*.
- b) A metodologia ISO (TC 34/SC 5N) modificada foi mais eficiente na detecção de *E. sakazakii* que o método preconizado pelo FDA.
- c) As amostras de fórmulas lácteas infantis, desidratadas, importadas ou nacionais, analisadas neste estudo não representam risco de disseminação de *E. sakazakii* à população infantil, além de apresentarem baixa população de Enterobacteriaceae (<5 UFC/g).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARSENI, A.; MALAMOU-LADAS, E.; KOUTSIA, C.; XANTHOU, M.; TRIKKA, E. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Hospital Infection**, v.9, n.2, p.143-150, 1987.

BAR-OZ, B.; PELEG, O.; BLOCK, C.; ARAD, I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. **Acta Paediatrica**, v.90, p.356-358, 2001.

BARREIRA, E.R.; SOUZA, D.C.; GÓIS, P.F.; FERNANDES, J.C. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de um caso. **Pediatria**, v.25, n.1/2, p.65-70, 2003.

BAX[®] System PCR assay with automated detection for bacterial screening: user guide. Wilmington: Du Pont Qualicon, 2000.

BIERING, G.; KARLSSON, S.; CLARK, N.C.; JÓINSDÓTTIR, K.E.; LÚDVGSSON, P.; STEINGRÍMSSON, O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.9, p.2054-2056, 1989.

BLODGETT, R. most probable number from serial dilutions appendix 2. bacteriological analytical manual online, 2006. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.htm>. Acesso em 05 mai.2006.

BLOCK, C.; PELEG, O.; BAR-OZ, B.; SIMHON, A.; ARAD, I.; SHAPIRO, M. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.21, n.8, p.613-616, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.321, de 29 de dezembro de 2004**. Proíbe em todo o território nacional, transitoriamente e em caráter de emergência, 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, registro na ANVISA/MS n.4.8195.0074.001-5, fabricado na Holanda pela empresa Mead Johnson e importado para o Brasil pela empresa Bristol-Myers Squibb Farmacêutica Ltda. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=14834&word=#>. Acesso em: 15 ago. 2005.

BREEUWER, P.; LARDEAU, A.; PETERZ, M.; JOOSTEN, H.M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.967-973, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula,

Tennessee, 2001. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.51, p.297-300, 2002.

EDELSON-MAMMEL, S.G.; BUCHANAN, R.L. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. **Journal of Food Protection**, v.67, p.60-63, 2004.

EDELSON-MAMMEL, S.G.; PORTEOUS, M.K.; BUCHANAN, R.L. Survival of *E. sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1900-1902, 2005.

EPINE- Estudio de prevalência de las infecciones nosocomiales em los hospitales Españholes 17° estudio, 2006. Disponível em : http://www.vhebron.es/ac/preventina/epine/3_protocol_epine_2006.pdf. Acesso em: 04 mai.2006.

FAO/WHO FOOD STANDARDS. Codex Alimentarius. Official Standards. Official Codex Standards. List. CAC/RCP - 21 - 1979. **Recommended International Code of hygienic practice for foods for infants and children**. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en. Acesso em: 05 set. 2004.

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

FARMER III, J.J.; ASBURG, M.A.; HICKMAN, F.W.; BRENNER, D.J. The 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.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in food**. Rome: FAO, WHO, 2003.

FRANCE. Ministère des Solidarités, de la Santé et de la Famille. Retrait des lots de Prégestimil suite à la survenue d'infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés prématurés hospitalisés ayant consommé ce produit. Paris, 2004. Disponível em: <http://www.sante.gouv.fr/> Recherche directe: *Sakazakii*
Acesso em: 02 fev. 2005.

GUILLAUME-GENTIL, O.; SONNARD, V.; KANDHAI, M.C.; MARUGG, J.D.; JOOSTEN, H. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. **Journal of Food Protection**, v.68, n. 1, p.64-69, 2005.

GURTLER, J.B.; KRNACKI, 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.

HAMILTON, J.V.; LEHANE, M.J.; BRAIG, H.R. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.10, p.1355-1356, 2003.

HAWKINS, R.E.; LISSNER, C.R.; SANFORD, J.P. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. **Southern Medical Journal**, v.84, n.6, p.793-795, 1991.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2002. p.36-37. (Microorganisms in foods, 7).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TC 34/SC 5N: milk and milk products- Detection of *Enterobacter sakazakii***. Geneva: ISO, 2004.

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

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.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S.J. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, v.14, n.11, p.443-454, 2003.

IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. 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.

JARVIS, C. Fatal *Enterobacter sakazakii* infection associated with powdered infant formula in neonatal intensive care unit in New Zealand. 3:25-3:40 PM: abstract ID 54157: new investigator award, blue ribbon abstract award. **American Journal of Infection Control**, v.33, n.5, p.E19, June 2005.

KANDHAI, M.C.; REIJ, M.W.; GORRIS, L.G.M.; GUILLAUME- GENTIL, O.; VAN SCHOTHORST, M. Research note: a new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. **Journal of Food Protection**, v.67, n.6, p.1267-1270, 2004a.

KANDHAI, M.C.; REIJ, M.W.; van-PUYVELDE, K.; GUILLAUME- GENTIL, O.; BEUMER, R.R.; VAN SCHOTHORST, M. Occurrence of *E. sakazakii* in food production environments and households. **Lancet**, v.363, p.39-40, 2004b.

KINDLE, G.; BUSSE, A.; KAMPA, D., MEYER-KÖNIG, U.; DASCHNER, F.D. Killing activity of microwaves in milk. **Journal of Hospital Infection**, v.33, p.273-278, 1996.

KLEIMAN, M.B.; ALLEN, S.D.; NEAL, P.; REYNALDS, J. Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *E. sakazakii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.14, p.352-354, 1981.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. p.69-82.

LAI, K.K.; DMD, M.D. *Enterobacter sakazakii* Infection among neonates, infants, children, and adults: case reports and review of the literature. **Medicine**, v.80, p.113-122, 2001.

LECLERCQ, A.; WANEGUE, C.; BAYLAC, P. Comparasion 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.

LEE, J.W; OH,S.H.; KIM, J.H.; YOOK, H.S.; BYUN, M.W. Gamma radiation sensitivity of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. **Journal of Food Protection**, v.69, n.6, p.1434-1437, 2006.

LEHNER, A.; RIEDEL, K., EBERL, L., BREEUWER, P., DIEP, B., STEPHAN, R. 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.; STEPHAN, R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Food Protection**, v.67, n.12, p.2850-2857, 2004.

MONROE, P.W.; TIFT, W. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*). **Journal of Clinical Microbiology**, p.850-851, 1979.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

MRAMBA, F.; BROCE, A.; ZUREK, L. Isolation of *Enterobacter sakazakii*. From stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. **Journal of Food Protection**, v.69, n.3, p.671-673, 2006.

MUYTJENS, H.L.; KOLLÉE, L.A. *Enterobacter sakazakii* meningites in neonates: causative role of formula? **Pediatric Infectious Disease**, v.9, p.372-73, 1990.

MUYTJENS, H.L.; REPE, J.R.; DRUTEN, H.A.M. Enzymatic profiles of *E. sakazakii* and related species with special reference to the α -Glucosidase reaction and reproducibility of the system. **Journal of Clinical Microbiology**, v.20, p.684-686, 1984.

MUYTJENS, H.L.; ZANEN, H.C.; SONDERKAMP, H.J.; KOLLÉE, L.A.; WACHSMUTH, K.; FARMER III, J.J. 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.; WILLEMSE, H.R.; 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, n.4, p.743-746, 1988.

NASSEREDDIN, R.A.; YAMANI, M.I. Microbiological quality of sous and tamarind, traditional drinks consumed in Jordan. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.773-777, 2005.

NAZAROWEC-WHITE, M. Biological characterization of *Enterobacter sakazakii*. **Ottawa: Carleton Institute of Biology**, p.165, 1998.

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J.M. *E. sakazakii*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, p.103-113, 1997b. [Review].

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J.M. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Journal of Food Protection**, v.60, n.3, p.226-230, 1997a.

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J.M. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, n.1, p.9-13, 1997c.

NAZAROWEC-WHITE, M.; Mc KELLER, R.C.; PIYASENA, P. Predictive modeling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. **Food Research International**, v.32, p.375-379, 1999.

NORIEGA, F.R.; KOTLOFF, K.L.; MARTIN, M.A.; SCHWALBE, R.S. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides*

resulting from extrinsic contamination of infant formula. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.9, n.6, p.447-449, 1990.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; ASENSI, M.D.; MORAES, B.A.; RODRIGUES, D.P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n.3, p.713-717, 2001.

OLIVEIRA, A.C.; MARTINHO, G.H.; DIAS, R.R.; SAVASSI, L.C.M. Investigação de surto por *E. sakazakii* na unidade de neomatologia do HC/UFMG. In: BIENAL DE EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE DE MINAS GERAIS, 2., Belo Horizonte, 1999. **Anais**. p.103, 1999.

ONGRÁDI, J. Vaginal infection by *Enterobacter sakazakii*. **Sexually Transmitted Infections**, v.78, p.467-468, 2002.

PAGOTTO, F.J.; NAZAROWEC-WHITE, M.; BIDAWID, S.; FARBER, J.M. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.370-375, 2003.

PARTON, A.; MURRAY, J.; PRENTICE, N.; SCOTT, M.; COOMBS, J.; MULLANE, N.; FANNING, S. **The detection of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from milk powders using paramagnetic cationic particles**. Golden: Matrix MicroScience; Dublin: University College Dublin, 2006. (International Association for Food Protection-IAFP, in Calgary, Alberta, Canada, August 13 to 16) [Poster].

RESTAINO, L.; FRAMPTON, E.W.; LIONBERG, W.C.; BECKER, R.J. 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, n.2, p.315-322, 2006.

SAKAZAKI, R. *Enterobacter cloacae*. In: BERGEY, D.H.; BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E., eds. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8.ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1974. p.325.

SANTOS, R.F.S.; SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; PEREIRA, J.L.; MOITTA, G.C.; SILVA, I.F. Incidência de *Enterobacter sakazakii* em alimentos infantis. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS – SIMPOCAL, 3., Florianópolis, 2005. Resumo. CDROM.

SCHWAB, A.H.; SWARTZENTRUBER, A.; WENTZ, B.A.; READ Jr., R.B. Microbiological quality of dry-milk mixes and milk substitute infant formulas. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.389-391, 1982.

SILVA, C.L.P.; SANTOS, M.; SAMPAIO, J.; MARANGONI, D.V.; PINTO, M.; MOREIRA, B.M. Detection 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.

SIMMONS, B.P.; GELFAND, M.S.; HAAS, M.; METTS, L.; FERGUSON, J.; *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.

SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTÓ, J.C; MAÑES, J. Incidence of microbial flora in lettuce, meat, Spanish potato omelette from restaurants. **Food Microbiology**, v.18, p.159-163, 2001.

STOLL, B.J.; HANSEN N.; FANAROFF A.A.; LEMONS, J.A. *Enterobacter sakazakii* is rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW Infantis. **Journal of Pediatrics**, v.144, n.6, p.821-823, 2004.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Proposed draft revision on the recommended international code of practice for food for infants and children. Regulations & Policies. International Affairs. Codex Alimentarius. Recent Delegation Reports. 2005 Reports. Food Hygiene (Mar 14-19, 2005) Buenos Aires, Argentina. **Report of the U.S. Delegate, 37th Section of Codex Alimentarius Committee on Food Hygiene Buenos Aires, Argentina, Mar 14 – 19, 2005**. cap.4. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/regulations/Delegate_Report_37CCFH/index.asp. Acesso em: 20 jan 2006.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Food. Infant Formula. Program Areas: Infant Formula. Regulatory/Guidance Documents & Advisory Meetings. Advisory Meetings: Meetings Agenda, Briefing Materials and Transcript. March 18-19, 2003 Contaminants and Natural Toxicants Subcommittee. **Contaminants and Natural Toxicants Subcommittee Meeting on *Enterobacter sakazakii* contamination in powdered infant formula**. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cfsan03.html>. Acesso em: 04 mai.2005.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* Infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units**: April 11, 2002; Revised October 10, 2002b. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>. Acesso em: 23 mar. 2005.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula: July 2002; revised August 2002a**.

Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>. Acesso em: 05 out. 2004.

URMENYI, A.M.C.; FRANKLIN, A.W. Neonatal death from pigment coliform infection. **Lancet**, v.1, p.613-615, 1961.

VAN ACKER, J.V.; SMET, F.; MUYLDERMANS, G.; BOUGATEF, A.; NAESSENS, A.; LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *E. sakazakii* in powdered milk formula. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.1, p.293-297, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Sites. Food Safety. Microbiological Risks. JEMRA. JEMRA Meetings. **Joint FAO/ WHO Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Geneva, 2-5 February 2004**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/feb2004/en/>. Acesso em: 04 fev. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Sites. Food Safety. Publications. Microbiological Risks Publications. **Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment, CAC/ GL-30 (1999)**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/cac1999/en/>. Acesso em: 15 ago 2005.

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

ANEXOS

1. Formulação do meio caldo lauril sulfato triptose modificado (mLST) adicionado de vancomicina

Componente	g/l
Cloreto de sódio (NaCl)	34
Enzima digestiva de tecido animal e planta	20
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	5
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	2,75
Fosfato de potássio dibásico anidro (K ₂ HPO ₄)	2,75
Sulfato lauril (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₅ S)	0,1
Água	1000ml

Dissolver cada componente em 1000ml de água. Ajustar, se necessário, o pH para $6,8 \pm 0,2$ a 25°C. Dispensar 10ml de mLST em tubos de ensaio de dimensões 9mm x 180mm. Esterilizar os tubos a 121°C por 15 minutos.

Dissolver a vancomicina (10mg) em 10 ml de água e esterilizar a solução por filtração. Esta solução pode ser mantida de 0 a 5°C por até 15 dias.

No momento do uso, adicionar 0,1 ml da solução de vancomicina para cada 10ml de mLST, de modo a obter uma concentração final de vancomicina de 10 µg/ ml de mLST.

Este meio pode ser preparado a partir do meio comercial lauril sulfato triptose adicionando-se 29g de NaCl/ l do meio e a solução de vancomicina.

2. Formulação ágar cromogênico *Enterobacter sakazakii* (formulação DFI)

Componente	g/litro
Triptona	15,00
Peptona de soja	5,00
Cloreto de sódio	5,00
Citrato de amônio férrico	1,00
Desoxicolato de sódio	1,00
Tiosulfato de sódio	1,00
Reagente cromogênico	0,10
ágar	15,00

Suspender 43,1g do ágar cromogênico em 1000ml de água destilada. O pH final deverá ser de $7,3 \pm 0.2$. Após completa dissolução, esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Este meio é comercializado pela Oxoid sob número CM1055.