

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Métodos para detecção de <i>E. sakazakii</i>	20
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material	27
3.1.1 Cepas bacterianas.....	27
3.1.2 Fórmulas infantis.....	27
3.1.3 Preparo das amostras.....	28
3.2. Métodos	28
3.2.1 Curvas de crescimento.....	28
3.2.2 Preparo das suspensões dos microrganismos.....	29
3.2.3 Avaliação de eficiência do meio DFI e das metodologias para detecção de <i>E. sakazakii</i>	29
3.2.3.1 Avaliação da eficiência do meio cromogênico-DFI.....	30

3.2.3.2 Método FDA para a detecção de <i>E. sakazakii</i> em fórmulas infantis em pó	30
3.2.3.3 Método ISO (TC34/SN 5N) para detecção de <i>E. sakazakii</i> ..	31
3.2.3.4 Avaliação da eficiência das metodologias ISO e FDA.....	32
3.2.4 Enumeração de <i>E. sakazakii</i> em fórmulas infantis.....	32
3.2.5 Enumeração de Enterobacteriaceae.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
4.1 Curvas de crescimento.....	37
4.2 Avaliação da eficiência do meio cromogênico DFI.....	39
4.3 Avaliação da eficiência das metodologias ISO e FDA.....	42
4.4 Enumeração de <i>E. sakazakii</i> e Enterobacteriaceae.....	44
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Placa de DFI com colônias <i>E. sakazakii</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i>	25
Figura 2. Placa de ESPM com colônias <i>E. sakazakii</i> , <i>E.coli</i> e <i>Salmonella</i>	25
Figura 3. Representação esquemática dos métodos a. FDA e b.ISO para enumeração de <i>E. sakazakii</i>	33
Figura 4. Representação esquemática da metodologia para enumeração de <i>E. sakazakii</i>	34
Figura 5. Representação esquemática da metodologia para enumeração de Enterobacteriaceae.....	36
Figura 6. Curva de crescimento de <i>E. coli</i>	37
Figura 7. Curva de crescimento de <i>E. aerogenes</i>	38
Figura 8. Curva de crescimento de <i>E. sakazakii</i>	38
Figura 9a. Imagem da placa de ágar DFI com <i>E. sakazakii</i>	41
Figura 9b. Imagem da placa de ágar DFI com <i>E. coli</i>	41
Figura 9c. Imagem da placa de ágar DFI com <i>E. aerogenes</i>	41
Figura 10. Representação da planta de processamento da empresa B.....	49
Figura 11. Gráfico representativo da população de Enterobacteriaceae no ambiente de fábrica da empresa B.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos pontos amostrados na planta de processamento da empresa B	50
Tabela 2. População de Enterobacteriaceae no ambiente de fábrica da empresa B.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Formulação do meio caldo lauril sulfato triptose modificado (mLST).....	64
Anexo 2. Formulação do meio cromogênico <i>Enterobacter sakazakii</i> (Formulação DFI).....	65

RESUMO

Enterobacter sakazakii é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, pertencente a família Enterobacteriaceae e que não faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal humano ou animal. É reconhecida como um patógeno emergente de origem alimentar e já foi relacionada a diversos surtos e casos esporádicos de doenças envolvendo neonatos debilitados. A população de risco à infecção é composta por bebês prematuros ou bebês nascidos a termo até atingirem quatro a seis semanas de idade, bebês imunocomprometidos de qualquer idade e bebês que necessitem de cuidados especiais (UTI neonatal). Apesar do reservatório e do modo de transmissão de *E. sakazakii* não estarem claramente identificados, relatos mostraram que fórmulas infantis desidratadas, a base de leite, foram a fonte e o veículo de infecções para a população de risco. Os objetivos deste estudo foram avaliar a eficiência do meio cromogênico DFI na identificação do *E. sakazakii*; verificar a eficiência das metodologias ISO (TC 34/SC 5N) e FDA empregadas na enumeração de *E. sakazakii* e 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. Para tanto, foram examinadas 150 amostras de fórmulas lácteas infantis desidratadas, de diferentes lotes e marcas comerciais, adquiridas no comércio varejista da cidade de São Paulo. Para enumeração de *E. sakazakii* empregou-se o método preconizado pela ISO (TC 34/SC 5 N) com modificação. A enumeração de

Enterobacteriaceae foi realizada empregando-se placas Petrifilm™ contagem de enterobactérias (3M™). Todas as amostras examinadas, independente de marca comercial ou origem, apresentaram população de *Enterobacter sakazakii* < 0,03 NMP/100g e de Enterobacteriaceae < 5 UFC/g. O ágar DFI foi eficiente na identificação de colônias de *E. sakazakii*, mesmo na presença de *Escherichia cloacae* e *Enterobacter aerogenes*. E a metodologia ISO (TC 34/SC 5N) foi mais eficiente na enumeração de *E. sakazakii* que o método preconizado pelo FDA.

ABSTRACT

Enterobacter sakazakii is a Gram-negative rod from the Enterobacteriaceae family. This microorganism is not part of the normal microbiota of the human or animal gastrointestinal tract. It is recognized as an emergent pathogen of food origin and has already been related to outbreaks and sporadic cases of illnesses mainly involving weak in neonates. The population at risk of infection is composed by premature babies or newborn till they reach four to six weeks of age, immunocompromised babies of any age and babies in need of special care (neonatal ICU). Although the reservoir and the form of transmission of *E. sakazakii* is not clearly identified yet, studies have shown that milk-based dried-infant formula have been the source and the vehicle of infections for the at risk population. The objectives of this study were to evaluate the efficiency of DFI agar in the identification of *E. sakazakii*; to verify the efficiency of the methodologies proposed by ISO (TC 34/SC 5N) and FDA for the enumeration of *E. sakazakii* and to evaluate the population of *Enterobacter sakazakii* and Enterobacteriaceae in dehydrated infant milk formula, imported or domestic, specific for 0-6 months of age commercialized in the city of Sao Paulo, Brazil. 150 dehydrated milk infant formula samples from different commercial brands, acquired at retail level in the city of Sao Paulo, SP, Brazil were examined. For enumeration of *E. sakazakii* a modification of the method recommended by ISO (TC 34/SC 5N) was used. The enumeration of Enterobacteriaceae was carried out using Petrifilm™ Enterobacteriaceae count plate (3M™). All the examined samples, independent of commercial brand or origin, presented population of *Enterobacter sakazakii* < 0,03 MPN/100g and < 5 CFU/g of Enterobacteriaceae.

The DFI agar was efficient in the identification of colonies of *E. sakazakii*, even in the presence of *Escherichia cloacae* or *Enterobacter aerogenes*. The methodology ISO (TC 34/SC 5N) was more efficient for the enumeration of *E. sakazakii* than the one recommended by FDA.