UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* no ambiente de lactários
de Maternidades da Grande São Paulo

Gabriela Palcich

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo
2007

16936

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013036

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Palcich, Gabriela

P155o Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* no ambiente de lactários
de maternidades da Grande São Paulo / Gabriela Palcich. --
São Paulo, 2007.
65p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Destro, Maria Teresa

1. Bromatologia 2. Microbiologia de alimentos 3. Microbiologia
I. T. II. Destro, Maria Teresa, orientador.

641 CDD

Gabriela Palcich

Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* no ambiente de lactários de
Maternidades da Grande São Paulo

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
orientadora/presidente

Prof.^a Dr.^a Mariza Gondral
1º examinador

Prof.^a Dr.^a Miyoko Jakobi
2º examinador

3º examinador

São Paulo, 18 de julho de 2007.

“Para se alcançar um desejado alvo, É preciso descobrir a
estrada certa. E nela prosseguir até o fim”.
(Merril C. Tenney)

Dedico esta Tese

Aos meus pais, Iasmim e Cláudio, à minha irmãzinha querida, Daniele;
a pessoa especial que escolhi para dividir minha vida, Daniel;
ao meu cunhadinho querido, Rodrigo.

Muito obrigada pelo apoio e amor incondicional. Amo vocês!

Maria Teresa Destro

*"Ao final de cada ciclo de nossas vidas fazemos um balanço
de nossos progressos profissionais e pessoais.
É hora de refletirmos sobre nossas ações, traçar novos planos;
é o momento de renovação.
Quero agradecer a você, que tem me acompanhado e apoiado,
contribuindo para novas conquistas na minha vida profissional.
Com muito carinho, obrigada".*

Gabriela Palcich

Agradecimentos:

Primeiramente a Deus, que me inspirou, me motivou e me concedeu a oportunidade e a honra de produzir esta pesquisa.

Aos meus pais que desde cedo me ensinaram o caminho que deveria trilhar. À minha irmã, meu cunhado, familiares e amigos especiais que de uma maneira ou de outra me influenciaram positivamente.

Ao Daniel, que tem tornado minha vida tão especial.

À Profa. Dra. Maria Teresa Destro, pela orientação, pelos conselhos, força e apoio.

Aos amigos: "Anjos que nos deixam em pé quando nossas asas tem problemas em se lembrar como voar..."

Lina, Cecília, Toninho, Tatiana, Vanessa, Aninha, Cíntia e Katinha, que sempre estiveram ao meu lado desde o início.

Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Às professoras Dra. Bernardette D.G.M. Franco e a Dra. Mariza Landgraf, pelos ensinamentos, orientações, convívio e amizade.

Aos amigos do Laboratório: Lúcia, Matheus, Kátia Lima, Ângela, Cristina, Marildes, Patrícia Kary, Paulo, Patrícia Bettini, Vanessa Tsu, Alcina, Ana Boanova, Cristiano, Danielle, Denise, Eb, Gunnar, Graciela, Hans, Janine, Luciano, Monika, Ricardo, Susana, Vanessa Vieira e Vinícius. Nunca os esquecerei.

A CAPES, pelo fornecimento de bolsa de estudo.

Aos Hospitais que gentilmente cederam seus lactários como pontos de coleta desta pesquisa e as nutricionistas e lactaristas que estavam sempre prontas a ajudar.

A empresa Nestlé Brasil Ltda pela disponibilidade de material para análises e suporte técnico.

A Biotrace, pela doação de esponjas para coleta das amostras

A R&F Products pela doação dos meios de cultura cromogênico.

A SFDK por ceder material e meio de cultura para as análises.

A Adriana da empresa 3M pelos ensinamentos e disponibilidade.

Aos funcionários do Departamento de Ciências dos Alimentos e Nutrição Experimental: Mônica, Tânia e Edilson.

A secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmaceuticas: Elaine e Jorge.

Aos professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos.

E a todos que diretamente ou indiretamente cooperaram com a concretização deste sonho.

Meu muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
ÍNDICE DE ANEXOS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Material.....	15
3.2 Métodos.....	16
3.2.1 Coleta das amostras.....	16
3.2.2 Avaliação Microbiológica.....	20
3.2.2.1 Determinação da presença ou ausência de <i>E. sakazakii</i> (ISO TC34/SN 5N, 2004).....	20
3.2.2.2 Determinação do número mais provável (NMP) de <i>E. sakazakii</i> (ISSO TC34/SN 5N, 2004; FDA, 2002).....	24
3.2.2.3 Enumeração de <i>Enterobacteriaceae</i>	27
3.2.3 Confirmação dos isolados de <i>E. sakazakii</i>	28
3.2.4 Comportamento <i>in vitro</i> de <i>E. sakazakii</i>	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Avaliação da condição de preparo das fórmulas nos Hospitais visitados.....	31
4.2 Ocorrência e população de <i>E. sakazakii</i> e <i>Enterobacteriaceae</i> em três maternidades da Grande São Paulo.....	37
4.3 Ocorrência de <i>E. sakazakii</i> e <i>Enterobacteriaceae</i> nas fórmulas infantis reconstituídas e desidratadas.....	42
4.4 Confirmação da identificação dos isolados de <i>E. sakazakii</i>	50
4.5 Comportamento das cepas de <i>E. sakazakii</i> isoladas simulando às condições de serviço de fórmulas aos bebês.....	51
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coleta de amostra da caixa de distribuição das mamadeiras para berçário e/ou UTI neonatal.....	18
Figura 2. Coleta da amostra do chão no ambiente do lactário, com auxílio de esponja.....	18
Figura 3. Coleta da amostra da caneca plástica usada na reconstituição da fórmula infantil, com auxílio de um <i>swab</i>	19
Figura 4. Coleta da “área suja” do lactário: a. esponja; b. escova de lavagem das mamadeiras.....	19
Figura 5. Coleta da amostra da fórmula infantil reconstituída.....	19
Figura 6. Representação esquemática da metodologia empregada para determinação de presença e ausência de <i>E. sakazakii</i>	23
Figura 7. Representação esquemática da metodologia empregada para determinação de NMP de <i>E. sakazakii</i> nas amostras de fórmula infantil reconstituídas.....	25
Figura 8. Representação esquemática da metodologia empregada para determinação de NMP de <i>E. sakazakii</i> nas amostras de fórmula infantil desidratadas.....	26
Figura 9. Representação esquemática da metodologia empregada para enumeração de <i>Enterobacteriaceae</i> em todas as amostras.....	28
Figura 10. Galão de água mineral usado na reconstituição da fórmula no Hospital B.....	35
Figura 11. Bancada usada na reconstituição da fórmula infantil, no lactário do Hospital B.....	36
Figura 12. Área de lavagem dos utensílios usados na preparação da fórmula no Hospital B.....	36
Figura 13. Relação genética entre os três isolados de <i>E. sakazakii</i> empregando-se PFGE e a enzima <i>XbaI</i>	50
Figura 14. Ribotipos dos três isolados de <i>E. sakazakii</i> determinados com o Riboprinter®	51
Figura 15. Comportamento de <i>E. sakazakii</i> em fórmula infantil reidratada e caldo tripticase de soja.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação da forma de amostragem e análise de <i>E. sakazakii</i> para cada tipo de amostra.....	21
Tabela 2. Temperaturas da geladeira do Hospital A, onde eram armazenadas as "mamadeiras finais".....	33
Tabela 3. Temperaturas da geladeira do Hospital B, onde eram armazenadas as "mamadeiras finais".....	35
Tabela 4. População de <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras coletadas do Hospital A.....	38
Tabela 5. População de <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras coletadas do Hospital B.....	39
Tabela 6. População de <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras coletadas do Hospital C.....	41
Tabela 7. População de <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras coletadas do Hospital A.....	43
Tabela 8. População de <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras coletadas do Hospital B.....	44
Tabela 9. população de <i>Enterobacteriaceae</i> nas amostras coletadas do Hospital C.....	45
Tabela 10. Ocorrência de <i>E. sakazakii</i> em amostras coletadas em três hospitais da Grande São Paulo, de ambiente, utensílios e fórmulas infantis.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Formulação do meio caldo lauril sulfato triptose modificado (m-LST).....	65
--	----

RESUMO

Enterobacter sakazakii é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Este microrganismo vem ganhando a atenção das autoridades de saúde pública ao redor do mundo, não tanto pela morbidade, que é baixa, mas pela elevada taxa de mortalidade que varia de 40-80%. O patógeno afeta principalmente recém-nascidos de baixo peso e bebês com até seis meses de idade. Em comum, estas crianças têm o fato de serem alimentadas com fórmula infantil desidratada, a base de leite. Em nosso país ainda não existem muitos estudos sobre a ocorrência deste patógeno em fórmulas infantis, nem no ambiente de preparo das mesmas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de produção de mamadeiras para recém-nascidos em maternidades da Grande São Paulo, além de determinar a população de *E. sakazakii* em fórmulas infantis desidratadas e reidratadas. A população de *Enterobacteriaceae* e a presença de *E. sakazakii* também foram avaliadas em amostras ambientais, de utensílios e mão de manipuladores. Avaliou-se ainda o comportamento do patógeno em fórmula infantil reidratada simulando as condições de oferecimento aos bebês. Coletou-se amostras de três hospitais maternidades diferentes (A-escola/B-público/C-particular) e analisou-se a presença de *E. sakazakii* usando método ISO. Para fórmulas desidratadas e reidratadas usou-se a mesma metodologia e a técnica de número mais provável (NMP). A população de *Enterobacteriaceae* foi determinada usando-se Petrifilm™ 3M. *E. sakazakii*

foi detectada em duas amostras do Hospital A (na sobra da mamadeira que voltou do berçário e de uma amostra da lata lacrada da fórmula infantil desidratada. A população nesta amostra foi de 0,03 NMP/100g.) No Hospital B, foi detectada em apenas uma amostra (na esponja de lavagem das mamadeiras contaminadas). No Hospital C, *E. sakazakii* não foi detectada nas amostras analisadas. Quanto à população de *Enterobacteriaceae* nos lactários, observou-se uma variação, sendo que as amostras colhidas no hospital C foram as que apresentaram populações mais elevadas. As cepas de *E. sakazakii* isoladas apresentaram comportamento similar àquele da cepa padrão, ocorrendo um aumento de 2 log na população do patógeno quando simulou-se as condições de serviço das fórmulas, via naso-gástrica, aos bebês nos berçários.

Abstract

Enterobacter sakazakii is a bacillus belonging to the *Enterobacteriaceae* family. It is considered an opportunistic pathogen that has been gaining attention from health authorities all over the world. While morbidity associated with this bacterium is low, mortality rates can range from 40-80%. The pathogen affects mainly low-birth-weight neonates (first 28 days), but babies less than 6 month old are also at risk. Powdered infant formula has been incriminated as the possible source of the microorganism to the infected babies. In Brazil, as in several other countries, there is scarce information regarding the incidence of *E. sakazakii* in powdered infant formula, in reconstituted formula, and in milk kitchens areas in hospitals. The objective of this study was to evaluate the presence of *E. sakazakii* in the environment, utensils, handlers, powdered and rehydrated infant formula from milk kitchens from different maternity wards in Sao Paulo, Brazil. Moreover, it was evaluated the behavior of the pathogen in rehydrated infant formula. Samples were collected from 3 hospitals maternities (A-school/B-public/C-particular) and analyzed for *E. sakazakii* using the ISO method. For formula (powdered or rehydrated) the MPN technique was used. *Enterobacteriaceae* population was determined using Petrifilm™ 3M. *E. sakazakii* was found in one unopened formula can collected from Hospital A (0,03 MPN/100g), although the pathogen could not be detected in other cans from the same lot. *E. sakazakii* was also found in leftovers from one nursing bottle from

the same hospital and from one cleaning sponge from Hospital B. *E. sakazakii* was not detected in none of the samples from Hospital C. A variation in *Enterobacteriaceae* population in milk kitchens was observed. Samples collected in Hospital C presented the highest population. Isolated strains of *E. sakazakii* presented similar behavior to standard strains, When spiked in rehydrated infant formula. A 2 log increase in the population of the pathogen was observed when simulating the conditions of formula administration to the babies by naso-gastric tubing.

1. Introdução

Enterobacter sakazakii é um patógeno de interesse para a saúde pública e para as indústrias de alimentos. Os microrganismos desta espécie eram até 1980 identificados como "yellow pigmented *Enterobacter cloacae*", até que Farmer et al. (1980), baseando-se em testes de hibridização do DNA e reações bioquímicas, verificaram tratar-se de espécie única, propondo o nome *Enterobacter sakazakii*.

E. sakazakii apresenta-se na forma de bacilo Gram negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, não esporulado, anaeróbio facultativo com temperatura ótima de multiplicação entre 30-37°C. Este microrganismo não faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal humano ou animal e tem sido reconhecido como um potencial patógeno emergente de origem alimentar (Farber, 2004).

Todas as espécies do gênero *Enterobacter* possuem características bioquímicas semelhantes o que dificulta a identificação. Entretanto, *E. sakazakii* não fermenta D-sorbitol e produz deoxirribonuclease e α -glucosidase (Kleiman et al., 1981; Nazarowec-White; Farber, 1997c).

Pouco se sabe ainda sobre a ecologia e epidemiologia deste microrganismo. Apesar do reservatório e do modo de transmissão de *E. sakazakii* não estarem claramente identificados, relatos de surtos têm demonstrado que fórmulas infantis desidratadas foram a fonte e o veículo de infecções (Muytjens et al., 1988; Simmons et al., 1989; Nazarowec-White; Farber, 1997a; Van Acker et al., 2001; WHO, 2004). Entretanto, como outros membros do gênero também são encontrados em fezes humanas e de outros animais (Monroe; Tift., 1979) e estão amplamente distribuídos na natureza: água, solo, esgoto, plantas, detritos e vegetais (Hensyl, 1994), assim como no ambiente industrial e doméstico (Kandhai et al, 2004).

Muytjens; Kollée (1990), na Holanda, investigaram a presença de *E. sakazakii* em uma grande variedade de amostras: lama, sementes, solo, madeira em decomposição, leite cru de bovinos e na superfície corpórea de pacientes em hospitais e de animais, porém não conseguiram isolar o patógeno.

Soriano et al. (2001), na Espanha, isolaram de 40 amostras, uma positiva para *E. sakazakii* de alface *in natura*, mas não de alface processada pronta para consumo. Na França, Leclercq et al. (2002) verificaram que outros tipos de alimentos como queijos, carne bovina moída, embutidos e hortaliças, também podem apresentar o patógeno.

Na Inglaterra, Iversen; Forsythe (2004) isolaram *E. sakazakii* de alimentos secos (amêndoas, pistache, coco ralado), de queijos, ervas e condimentos.

Muytjens; Kollée (1990) investigaram a presença de *E. sakazakii* em uma grande variedade de amostras ambientais, fezes de gado bovino e leite cru de bovinos, mas não isolaram o microrganismo.

De maneira geral, *Enterobacter* são considerados patógenos oportunistas e que raramente causam doença em indivíduos saudáveis. *E. sakazakii* 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 (Lai, 2001; FAO, 2004).

Todos os bebês com menos de seis meses de idade fazem parte da população de risco, entretanto, o patógeno afeta principalmente recém-nascidos de baixo peso, prematuros ou imunocomprometidos. Em comum, estas crianças têm o fato de serem alimentadas com fórmulas infantis desidratadas à base de leite (Food Advisory Committee, 2003).

Uma preocupação, em especial para alguns países em desenvolvimento, é o número de crianças filhas de mães portadoras do vírus HIV, uma vez que estas crianças devem receber fórmulas infantis em pó e são mais susceptíveis à infecção (WHO, 2004).

Adultos podem ser também afetados, porém isto ocorre raramente e o resultado relatado na doença no adulto, parece ser significativamente leve (Lehner; Stephan., 2004).

Embora *E. sakazakii* tenha sido detectado em vários tipos de alimentos, somente na fórmula em pó infantil foi vinculado a um surto da doença causado por *E. sakazakii* (Lehner; Stephan., 2004).

Com relação à virulência das cepas 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 de causar doença em humanos.

Alguns fatores de virulência de *E. sakazakii* foram descritos por Pagotto et al. (2003). Eles verificaram que enquanto algumas cepas são virulentas e possuem a capacidade de causar a morte de camundongos recém-nascidos, outras cepas são avirulentas.

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 para bebês com muito baixo peso. Já a taxa de mortalidade em bebês é bastante elevada, com relatos entre 20-50% ou mais (FAO, 2004) ou de 40-80% (Farber, 2004), com neonatos indo a 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).

Uma vez que a dose infectante do microrganismo não está estabelecida (FAO; WHO, 2004) todo cuidado deve ser tomado para evitar a sua multiplicação nas fórmulas infantis reidratadas após estas serem preparadas.

A infecção por *E. sakazakii* é rara sendo que, ao redor do mundo, há aproximadamente 76 casos documentados (Gurtler et al., 2005), mas, de acordo com a FAO/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.

E. sakazakii quando presente em fórmulas desidratadas, pode causar uma rara, mas ameaçadora forma de meningite neonatal, além de bacteremia, enterocolite necrotizante (NEC) e meningocefalite necrotizante (Iversen; Forsythe., 2003).

A veiculação de *E. sakazakii* por leite humano também pode ocorrer. Em estudo realizado por Novak et al. (2001) em amostras provenientes de banco de leite humano, da cidade do Rio de Janeiro, verificou-se a presença de *E. sakazakii*, além de outras *Enterobacteriaceae*.

Os primeiros casos descritos de meningite causados por *E. sakazakii* foram reportados por Urmenyi; Franklin (1961). Duas crianças morreram na Inglaterra de infecção generalizada (incluindo meningite) após dois dias do início dos sintomas sendo que a principal anormalidade patológica foi vista no cérebro.

Joker et al. (1965) relataram, na Dinamarca, um caso de recém nascido (RN) que se manteve bem nos quatro primeiros dias de vida e então começou a apresentar sinais de meningite, que evoluiu para abscesso cerebral e hidrocefalia. Após contato com Urmenyi; Franklin, verificaram tratar-se de uma enterobacteria incomum, muito semelhante àquelas isoladas previamente, na Inglaterra.

Monroe; Tift (1979) reportaram o primeiro caso de bacteremia neonatal, ocorrido no Estado da Geórgia (EUA), na ausência de meningite, associada ao *E. sakazakii*. A infecção ocorreu seis dias após o nascimento e foi tratada com ampicilina. Após dois meses a criança passou por uma avaliação e verificou-se crescimento e desenvolvimento normais.

Kleiman et al. (1981) reportaram um caso de meningite neonatal severa ocorrido em Indiana, EUA, em que uma criança sadia de cinco semanas desenvolveu meningite causada por *E. sakazakii*. A criança desenvolveu severa seqüela neurológica.

Muytjens et al. (1983) na Holanda fizeram uma análise retrospectiva de cepas isoladas de vários casos de meningite em bebês. Avaliando cepas de *Enterobacter* isoladas de amostras de sangue e liquor encontraram oito casos de meningite causados por *E. sakazakii*, sendo que seis dos RN morreram e dois recuperaram-se com seqüelas neurológicas severas.

Arseni (1984) descreveu um caso fatal de infecção por *E. sakazakii* em um RN prematuro; no mesmo mês 11 dos RN da mesma enfermaria neonatal apresentaram sinais clínicos de septicemia severa e *E. sakazakii* foi isolado. Quatro destes RN morreram.

Três casos de infecção neonatal causada por *E. sakazakii* foram reportados pelo Department of Neonatal Intensive Care do National University Hospital, Reykjavik, Islândia. Esses casos ocorreram num período de nove meses entre 1986 e 1987. *E. sakazakii* não foi isolado dos utensílios usados na preparação do leite, na enfermaria ou no lactário,

mas em alguns lotes das fórmulas de leite em pó usadas no hospital (Bierling et al., 1989).

Em um surto epidêmico, na Bélgica, de enterocolite necrotizante (NEC) associada ao *E. sakazakii*, um total de 12 RN foram afetados. *E. sakazakii* foi isolado do aspirado estomacal, *swab* anal e/ou amostras de sangue de seis dos 12 RN. A avaliação epidemiológica revelou que 10 dos 12 pacientes tinham recebido fórmula infantil de uma mesma marca comercial (Alfaré-Nestlé) utilizadas no hospital. *E. sakazakii* foi isolado de fórmulas reidratadas, bem como de várias latas fechadas de um dos lotes testados, mas não do outro (van Acker et al., 2001).

O caso mais recentes envolvendo *E. sakazakii* ocorreu na França, no final de 2004 quando quatro bebês de um hospital na região de Paris apresentaram meningite, sendo que dois deles foram a óbito. Três dos bebês estavam recebendo Pregestimil, fórmula infantil desidratada produzida pela Mead Johnson Nutrition. O quarto bebê deve ter sido vítima de contaminação cruzada (Ministère dês Solidarités, de la Santé et de la Famille, 2004).

O leite materno é reconhecidamente a melhor alternativa para crianças recém nascidas. A segunda opção pode ser a fórmula infantil desidratada, pois esta é formulada de forma a simular ao máximo a composição do leite materno. A fórmula infantil desidratada é usada quando mães são impossibilitadas de amamentar seus bebês ou escolhem não fazê-lo (Nazarowec-White; Farber, 1997b).

Uma vez que *E. sakazakii* é termo-sensível, conforme verificado por Nazarowec-White; Farber (1997b) e por Breeuwer et al. (2003), o grande problema é sua capacidade de sobreviver em ambientes com baixa atividade de água e sua elevada tolerância à dessecação, decorrente do acúmulo de trealose nas células (Breeuwer et al., 2003). Esta característica confere ao *E. sakazakii* uma vantagem competitiva sobre as demais *Enterobacteriaceae* nos ambientes secos, como os encontrados nas fábricas de leite em pó, representando um risco elevado de contaminação pós-pasteurização do produto final.

Edelson-Mammel et al. (2005) demonstraram que *E. sakazakii* pode sobreviver por períodos longos (acima de um ano) em fórmulas infantis desidratadas.

Devido às características tecnológicas do processamento da fórmula infantil desidratada, a contaminação deste produto pode ocorrer principalmente durante a etapa de secagem, ou pós-processamento durante a reidratação, quer seja em lactários de hospitais ou em uma residência (Nazarowec-White; Farber, 1997b).

A população bacteriana nas fórmulas infantis desidratadas é baixa, entretanto a manutenção da fórmula reidratada em temperatura ambiente, em aquecedores, ou mesmo em refrigeradores por tempo prolongado pode propiciar a multiplicação bacteriana (Farmer et al., 1980; Kindle et al., 1996; Edelson-Mammel; Buchanan, 2004; Lee et al., 2006).

Por esta razão 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).

Equipamentos e utensílios utilizados na reidratação das fórmulas infantis desidratadas também são importantes fontes de contaminação deste alimento.

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

Bar-Oz et al. (2001) em um Hospital de Israel, identificaram o liquidificador usado para reconstituição da fórmula infantil desidratada como fonte do microrganismo; Block et al. (2002) também em Israel recuperaram este microrganismo da fórmula preparada e do liquidificador utilizado para sua homogeneização.

A presença de *E. sakazakii* em equipamentos e utensílios pode ser decorrente da sua capacidade em formar biofilmes combinada com a alta resistência ao estresse osmótico deste microrganismo. O biofilme pode facilitar sua persistência no ambiente, permitindo a colonização de equipamentos e utensílios utilizados na preparação dos alimentos. (Lehner; Stephan, 2004). Por esta razão Iversen et al. (2004) recomendam que mamadeiras e utensílios usados na preparação das fórmulas infantis sejam limpos imediatamente após o uso, eliminando ou minimizando desta maneira a formação de biofilmes.

No Brasil não se tem dados sobre a ocorrência de *E. sakazakii* em ambiente de lactários.

O tratamento térmico das fórmulas infantis antes do consumo tem sido usado como uma forma de reduzir os riscos associados às patogenias de origem alimentar de RN (Edelson-Mammel; Buchanan., 2004). Entretanto, a esterilização das fórmulas reidratadas é desestimulada pelos produtores devido à destruição de nutrientes fundamentais para o bom desenvolvimento dos bebês.

Alguns estudos encontrados na literatura relatam a pesquisa de *E. sakazakii* em fórmulas infantis desidratadas, bem como a qualidade microbiológica destes produtos.

Muytjens et al. (1988) avaliaram a qualidade da fórmula infantil em pó com respeito aos membros da família *Enterobacteriaceae*. Das 141 amostras examinadas, provenientes de 35 países, 52,5% continham espécies da família *Enterobacteriaceae*. As espécies mais freqüentes foram; *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *E. sakazakii* e *Klebsiella pneumoniae*.

No Canadá, Nazarowec-White; Farber (1997b) avaliaram a ocorrência de *E. sakazakii* em 120 amostras de fórmulas infantis de cinco produtores e lotes diferentes das quais oito (6,7%) foram positivas, sendo a população do patógeno de 0,36 UFC/100g.

Iversen; Forsythe (2004), na Inglaterra, avaliaram 82 amostras de fórmulas infantis, além de outros tipos de amostras, para a presença

de *E. sakazakii* e verificaram que duas (0,2%) das 82 fórmulas examinadas continham o microrganismo.

Em estudo realizado por Santos et al. (2005) na região de Campinas, S.P, foram analisadas 112 amostras, sendo 86 de fórmula infantil em pó, 20 de fórmula infantil reidratada e 5 de amido. Destas, 12 de fórmula infantil em pó e quatro de amido foram positivas para *E. sakazakii*.

Gillio et al. (2006) avaliaram 150 amostras de fórmulas infantis desidratadas, importadas ou nacionais, adquiridas de supermercados e farmácias da cidade de São Paulo, Brasil. Destas, independente de marca ou origem, nenhuma apresentou-se positiva para *E. sakazakii*.

De acordo com o Jornal Folha de São Paulo, no ano de 2005 foi feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a interdição do lote nº. 040719P (de 19 de julho de 2004) do leite em pó Aptamil, da empresa Support Produtos Nutricionais Ltda, em razão da presença de *E. sakazakii*. A medida, de caráter transitório e emergencial, ocorreu após o resultado da análise de rotina realizado por um instituto de pesquisa indicar a presença do patógeno. Porém, ensaios posteriores realizados pela Vigilância Sanitária não confirmaram o isolamento, sendo o lote, em seguida liberado. Consultas ao D.O.U. não permitiram, entretanto, a localização desta medida (Jornal Folha de São Paulo, 2005).

Um outro caso de interdição da comercialização devido à presença de *E. sakazakii* ocorreu na Argentina. Em um primeiro exame

efetuado em amostras do lote nº.5248121521 do produto "Fórmula Láctea em pó com Ferro para lactantes de 0 a 6 meses", da marca Nestlé –NAN 1, com vencimento em dezembro de 2006, foi detectado o patógeno. O Departamento de Vigilância Alimentícia da Cidade de Buenos Aires notificou a empresa Nestlé Argentina S.A., que procedeu a retirada do referido lote do produto do mercado. Após realizadas as análises, não houve confirmação da bactéria no lote do produto (Destro, comunicação pessoal).

No Brasil os relatos de infecção de bebês por *E. sakazakii* são ainda raros. Não são raros, entretanto, os relatos na mídia de casos de óbitos de bebês em UTIs neonatais ou berçários que ficam sem esclarecimento (Jornal Folha de São Paulo, 1998).

Após uma exaustiva busca nas bases de dados nacionais encontrou-se somente três relatos. Dois trabalhos, Oliveira et al. (1999) e Silva et al. (2000) foram apresentados em congressos, sendo que não tivemos acesso ao resumo do primeiro. O segundo relata o surto causado por *E. sakazakii* envolvendo quatro UTIs (1 para adultos, 1 pediátrica e 2 neonatais) de quatro hospitais particulares do Rio de Janeiro, ocorrido durante 3 semanas, de setembro à outubro de 1998. Sete episódios de infecção por *E. sakazakii* foram detectados: dois na UTI adulto, um na UTI pediátrica e quatro na UTI neonatal. O estudo incluiu uma revisão da medicação intravenosa administrada aos pacientes 12 horas antes da detecção da infecção por *E. sakazakii* e da alimentação parenteral. *E.*

sakazakii foi isolado tanto de bolsas não utilizadas contendo a alimentação parenteral como da esponja usada na limpeza externa das bolsas, na empresa que preparava a alimentação. *E. sakazakii* não foi isolado de frascos vazios, desta forma a alimentação parenteral foi implicada como causa deste surto.

O único estudo brasileiro publicado (Barreira et al., 2003) relata o caso de uma criança de 14 dias de vida a qual foi levada ao Serviço de Urgência do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, apresentando hipoatividade, palidez, recusa alimentar e vômito. Os antecedentes perinatais eram normais e a alimentação era exclusivamente com leite materno. Os sintomas indicavam hipertensão intracraniana e a cultura de líquido permitiu o isolamento de *E. sakazakii*. O RN evoluiu para quadro de coma, seguido de óbito.

2. Objetivos

Diagnosticar, em lactários de maternidades da Grande São Paulo, a forma de produção das mamadeiras e verificar a ocorrência e população de *E. sakazakii* e de *Enterobacteriaceae* no ambiente, nas mãos de manipuladores, nos utensílios e equipamentos, além da enumeração do patógeno nas fórmulas usadas pelos hospitais.

Avaliar "in vitro" o comportamento das cepas isoladas, simulando as condições de fornecimento das fórmulas reidratadas aos bebês.

3. Material e Métodos

3.1 Material

Lactários de três hospitais da Grande São Paulo foram objeto de avaliação neste estudo: A hospital maternidade-escola; B hospital público (municipal); C hospital com atendimento preferencialmente a clientes particulares. Cada hospital foi visitado uma vez ao mês, por quatro meses consecutivos, no período de maio de 2005 a março de 2006.

Em todas as visitas avaliou-se o processo de produção de mamadeiras, registrou-se quando possível as temperaturas dos refrigeradores e a do banho-maria do berçário, no caso do hospital A.

Foram coletadas amostras de liquidificadores; utensílios (colheres, funis, jarras, etc.); do ambiente do lactário (chão e bancada); mão dos manipuladores e mamadeiras vazias esterilizadas. Também coletou-se amostras de mamadeiras recém preparadas pelas lactaristas, que eram imediatamente administradas aos RN, bem como as armazenadas sob temperatura de refrigeração por um período de 5 h aproximadamente, até nova administração aos RN.

Quando possível foram coletados os restos do leite das mamadeiras administradas aos bebês no período noturno, que voltavam do berçário para serem desprezados. Estas amostras foram colhidas em uma mesma embalagem estéril e tratadas como uma única amostra. Foram coletadas também três latas lacradas de fórmula infantil desidratada, do mesmo lote, utilizadas no hospital naquela coleta.

Todas as amostras foram coletadas em condições assépticas.

Um total de 292 amostras foi analisada. Empregou-se como controle nos diferentes estudos a cepa de *E. sakazakii* CDC 7006, gentilmente cedida pela empresa Nestlé Brasil.

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta das amostras

As amostras de ambiente (chão e bancada) foram coletadas em quatro pontos diferentes da mesma área, utilizando esponjas embebidas em caldo letheen (Biotrace, EUA) e com o auxílio de amostradores plásticos descartáveis, com uma área aproximada de 100 cm² (figura 2). As esponjas foram colocadas em embalagem estéril para transporte ao laboratório, onde mais tarde foram acrescidas com 100 ml de caldo letheen (Difco, EUA) e homogeneizadas. As caixas de distribuição, onde as mamadeiras eram acondicionadas para serem levadas ao berçário e/ou UTI neonatal para serem administradas aos bebês, também foram

coletadas com o auxílio de uma esponja embebida em caldo letheen (Biotrace, EUA) com a ajuda de um amostrador plástico de área 100 cm² (Figura 1).

Amostras de utensílios e liquidificador foram coletadas com a ajuda de *swab* (Figura 3) umedecidos em caldo letheen, posteriormente recolhido em tubo de ensaio contendo 10 ml do mesmo meio.

Amostras da esponja de lavagem e escova de lavagem das mamadeiras (área suja) foram coletadas em embalagem estéril contendo 100 ml de caldo letheen (Figura 4).

As mamadeiras estéreis e seus bicos foram amostrados pela lavagem com 30 ml de solução de NaCl a 0,85% (LabSynth, Brasil). Já a boca das mamadeiras foram amostradas com um *swab* umedecido em caldo letheen e posteriormente recolhidas em tubo estéril contendo 10 ml de caldo letheen.

As amostras das mãos dos manipuladores foram colhidas por enxágüe em 100 ml de solução de NaCl a 0,85%, acondicionada em saco estéril, conforme Destro et al. (1996). Amostras de pelo menos 100 ml da água usada no preparo das fórmulas foram coletadas em recipiente estéril.

Três porções de aproximadamente 120 ml da fórmula recém preparada pelas lactaristas no início do serviço e três daquelas armazenadas em geladeira até nova distribuição (aproximadamente 5 h), foram coletadas em frascos estéreis (Figura 5). Quando possível, sobras

de fórmula das mamadeiras administradas aos bebês, que retornam do berçário para descarte também foram coletadas em embalagens estéreis.

Também foram coletadas, a cada visita ao lactário, três latas lacradas de fórmula infantil desidratada do mesmo lote que estava em uso no momento. Das 36 latas coletadas, 27 pertenciam à marca A e as demais à marca B.

Durante a coleta e transporte, as amostras foram mantidas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável. Todas as amostras coletadas foram analisadas no mesmo dia da coleta, não excedendo 2,5 h entre coleta e análise no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Figura 1. Coleta de amostra da caixa de distribuição das mamadeiras para berçário e/ou UTI neonatal.

Figura 2. Coleta da amostra do chão no ambiente do lactário, com auxílio de esponja e amostrador plástico descartável.

Figura 3. Coleta da amostra da caneca plástica usada na reconstituição da fórmula infantil, com auxílio de um "swab".

Figura 4. Coleta da "área suja" do lactário: a.esponja de lavagem e b.escova de lavagem das mamadeiras.

Figura 5. Coleta da amostra da fórmula infantil reconstituída.

3.2.2 Avaliação Microbiológica

Na tabela 1 estão apresentados os tipos de determinação realizados para cada tipo de amostra.

3.2.2.1 Determinação da presença ou ausência de *E. sakazakii* (ISO TC34/SN 5N, 2004)

Alíquotas de 10 ml de cada uma das amostras de ambiente de processamento, mãos dos manipuladores e água, foram transferidas para frascos contendo 90 ml de água peptonada tamponada (BPW) (OXOID, Inglaterra) e incubadas a 37°C por 24 horas. Para as amostras de utensílios, liquidificador e sobra da fórmula, todo o volume obtido foi transferido para 90 ml de BPW e tratado como descrito anteriormente.

Após o período de incubação, foram retiradas porções de 0,1 ml e transferidas para tubos contendo 10 ml de caldo lauril triptose modificado (m-LST) (OXOID, Inglaterra), adicionado de 0,1 ml de solução de vancomicina (In LAB-HCl Purex) na concentração final de 10 µg/ ml m-LST (anexo 1). Os tubos foram incubados a 45°C por 24 horas.

Tabela 1. Identificação da forma de amostragem e de análise de *E. sakazakii* para cada tipo de amostra.

Tipo Amostra	Amostragem	Deteccção <i>E. sakazakii</i>
Bancada	Esponja; 400 cm ²	P/A*
Chão	Esponja; 400 cm ²	P/A
Fórmula reconstituída	6 x 60 ml	NMP*
Sobra de fórmula	Coleta embalagem estéril	P/A
Esponja	Caldo letheen; 100 ml	P/A
Escova	Caldo letheen; 100 ml	P/A
Mamadeira estéril	Solução NaCl; 30 ml	P/A
Bocal mamadeira estéril	<i>Swab</i>	P/A
Bico mamadeira	Solução NaCl; 30 ml	P/A
Peneira	<i>Swab</i>	P/A
Colher	<i>Swab</i>	P/A
Jarra	<i>Swab</i>	P/A
Caneca plástica	<i>Swab</i>	P/A
Mão manipulador	Solução NaCl; 100 ml	P/A
Água	Frasco estéril	P/A
Caixa distribuição	Esponja; 100 cm ²	P/A
Liquidificador	<i>Swab</i>	P/A
Lata lacrada	3 latas	NMP

*P/A: Presença/Ausência; *NMP: Determinação do número mais provável.

Os tubos foram agitados e alíquotas foram semeadas por esgotamento em placas contendo ágar DFI (OXOID, Inglaterra). Estas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Foi observada a presença de colônias azuis ou azuis-esverdeadas características de *E. sakazakii*. Colônias suspeitas foram semeadas em placas contendo ágar tripticase de soja (TSA) (OXOID, Inglaterra) e foram incubadas a 37°C por 24–48 h para observação de presença de colônias de cor amarelo intenso. Estas colônias foram submetidas ao teste de α -glucosidase (Rosco Diagnostica, Dinamarca).

Para confirmação adicional dos isolados suspeitos de *E. sakazakii* utilizou-se o meio cromogênico ESPM (R&F Products, EUA) incubado a 37°C por 24 horas. Neste meio, colônias de *E. sakazakii* apresentam-se de cor preta e segundo o protocolo do fabricante estas devem ser semeadas em placas contendo ágar púrpura de bromocresol adicionado de melobiose e placas do mesmo meio adicionado de sacarose (R&F Products, EUA). As placas foram incubadas a 37°C, com leitura após 4 h e reincubação até 18 h, *E. sakazakii* utiliza os dois carboidratos, modificando a cor do meio de roxa para amarela. As cepas confirmadas como *E. sakazakii* foram congeladas a -70°C em caldo soja tripticase (TSB) (OXOID, Inglaterra) adicionado de 20% de glicerol.

Na figura 6 tem-se a representação esquemática da metodologia empregada.

Figura 6. Representação esquemática da metodologia empregada para determinação da presença e ausência de *E. sakazakii* nas amostras. BPW - água peptonada tamponada; m-LST - caldo lauril triptose modificado; TSA - ágar soja tripticase.

3.2.2.2 Determinação do número mais provável (NMP) de *E. sakazakii* (ISO TC34/SN 5N, 2004; FDA, 2002)

Para estas determinações utilizou-se o método ISO descrito em 3.2.2.1, empregando-se a técnica de NMP, conforme recomendada pela Food and Drug Administration dos EUA (FDA, 2002), descrita a seguir e apresentada na figura 7.

Da fórmula reconstituída foram retiradas três porções de 10 ml sendo cada uma delas transferida para 90 ml de BPW. Três outras alíquotas, de 1 ml, foram transferidas para 9 ml de BPW. Uma quarta alíquota de 1 ml foi adicionada a 9 ml de BPW e após homogeneização, três porções de 1 ml foram retiradas e adicionadas a tubos contendo 9 ml de BPW. A série de nove frascos/tubos foi incubada a 37°C por 24 h e tratadas conforme descrito em 3.2.2.1.

As três latas lacradas foram submetidas à assepsia com álcool 70% e após, abertas no fluxo laminar. De cada lata foram pesadas porções de 100g, 10g e 1g, que foram diluídas em frascos contendo 900 ml, 90 ml e 9 ml (1:10), respectivamente, de BPW. Estes foram incubados a 37°C por 24 h e a seguir as amostras foram tratadas conforme descrito em 3.2.2.1 (figura 8).

Figura 7. Representação esquemática da metodologia empregada para determinação de NMP de *E. sakazakii* nas amostras de fórmula infantil reconstituída. BPW - água peptonada tamponada; m-LST - caldo lauril triptose modificado; TSA - ágar soja tripticase.

Figura 8. Representação esquemática da metodologia empregada para determinação de NMP de *E. sakazakii* nas amostras de fórmula infantil desidratada. BPW - água peptonada tamponada; m-LST - caldo lauril triptose modificado; TSA - ágar soja tripticase.

3.2.2.3 Enumeração de *Enterobacteriaceae* (Kornacki; Johnson, 2001)

Para as fórmulas infantis desidratadas porções de 10g foram pesadas e diluídas em 40 ml de solução de NaCl a 0,85%. Diluições decimais sucessivas foram preparadas e porções de 1 ml foram semeadas em placas de Petrifilm™ contagem de enterobactérias (EB) da 3M™ (EUA) e incubadas a 37°C por 24 horas. Colônias características de enterobactérias apresentam-se de cor vermelha com zonas amarelas e/ou vermelhas com bolhas de gás com ou sem zona amarela.

Placas contendo entre 15 e 150 colônias características foram contadas, as populações calculadas e os resultados expressos em UFC/g.

Das amostras de fórmula reconstituída foram retiradas alíquotas de 10 ml que foram transferidas para 40 ml de solução de NaCl a 0,85% e tratadas conforme anteriormente descrito. Os resultados foram expressos em UFC/ml.

Para as demais amostras, porções de 1 ml foram diluídas decimalmente em solução de NaCl a 0,85% e semeadas em Petrifilm™ contagem de enterobactérias. Os resultados foram expressos em UFC/ml ou unidade adequada.

Na figura 9 tem-se a representação esquemática da metodologia empregada.

Figura 9: Representação esquemática da metodologia empregada para enumeração de *Enterobacteriaceae* em todas as amostras.

3.2.3. Confirmação dos isolados de *E. sakazakii*

As cepas de *E. sakazakii* foram enviadas para o Bureau of Microbial Hazards, Health Products and Food Branch, Health Canada, onde foram submetidas à confirmação empregando-se o Bax® PCR System (DuPont Qualicon, EUA) e a ribotipagem pelo Riboprinter® (DuPont, Qualicon) e também foram submetidas à tipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) empregando-se a enzima Xba I.

3.2.4. Comportamento "in vitro" de *E. sakazakii*

As cepas isoladas neste estudo e a cepa controle *E. sakazakii* CDC 7006 foram utilizadas para avaliação do seu comportamento tanto em caldo TSB como em fórmula infantil reidratada, para simular a condição de oferecimento de alimentação aos bebês no berçário, via sonda naso-gástrica.

A fórmula infantil desidratada, utilizada nesta etapa do estudo, foi testada para presença de *E. sakazakii*, tendo se mostrado negativa.

As cepas que estavam congeladas foram ativadas através da inoculação em 10 ml de TSB incubado por 24 h à 37°C. Diluições decimais foram preparadas de modo a conter 10^3 UFC/ml e 1 ml desta diluição foi inoculado em 50 ml de TSB. Após homogeneização os frascos foram incubados a 37°C por 10 h, quando as cepas atingiram fase estacionária de multiplicação. Este tempo foi definido em estudos piloto realizados previamente.

As cepas foram então diluídas e alíquotas de 1 ml da suspensão com população de 10^4 UFC/ml foram adicionadas a frascos contendo 100 ml de TSB ou da fórmula infantil reconstituída (T_0). Os frascos foram incubados a 25°C e a cada 1 h por até 10 h, e após 24-25 h de incubação, alíquotas foram retiradas, diluídas decimalmente em solução de NaCl a 0,85% e semeadas em profundidade em ágar TSA. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h; as colônias contadas e a população calculada e expressa em UFC/ml.

A confirmação dos inóculos utilizados também foi feita por semeadura em profundidade em TSA e incubado a 37°C por 24 h.

Estes experimentos foram repetidos por três vezes.

4. Resultados e Discussão

4.1 Avaliação da condição de preparo das fórmulas nos Hospitais visitados

Em visita aos lactários dos hospitais A, B e C, observamos todo o preparo da fórmula infantil administrada aos bebês, como também sua distribuição.

No lactário do hospital A era preparado um grande número de mamadeiras, uma vez que este hospital fornecia as fórmulas reconstituídas também para todas as creches da região. Trabalhavam neste lactário, por turno, quatro lactaristas responsáveis pela produção das fórmulas infantis.

O lactário era composto de três salas independentes, sendo uma para o preparo das fórmulas infantis (área limpa), uma onde eram preparadas as alimentações parenterais e uma sala de lavagem (área suja). Após a lavagem, os utensílios assim como as mamadeiras limpas vazias eram autoclavadas e em seguida encaminhados à área limpa. As mamadeiras, assim como os bicos, eram armazenadas em caixas

plásticas, em temperatura ambiente. Já os utensílios eram mantidos em “pass-through”, com temperatura de aproximadamente 50°C.

Na reconstituição da fórmula infantil utilizava-se água mineral fervida em vasilhame de inox. Após fervura o vasilhame era imediatamente coberto com folha de papel alumínio e deixado resfriar. A temperatura no momento da utilização esteve sempre ao redor de 60°C, conforme constatado neste estudo. A fórmula infantil desidratada era então homogeneizada em uma caneca plástica com o auxílio de uma colher de inox.

O produto era então distribuído às mamadeiras estéreis com o auxílio de uma peneira. Estas mamadeiras eram codificadas com o nome da criança e a quantidade (ml) solicitada pelo médico à nutricionista.

Neste hospital, a quantidade de mamadeiras preparadas em cada vez era suficiente para atender à demanda de dois serviços, um imediato e outro a ser servido 5 h após.

Parte das mamadeiras a serem administradas no próprio hospital era levada imediatamente em caixas plásticas fechadas ao berçário e/ou UTI neonatal (mamadeiras iniciais). Já aquelas que seriam administradas no próximo período (após 5 h aproximadamente) (mamadeiras finais) e as encaminhadas às creches, eram armazenadas em refrigerador com temperatura mínima média de 10,5°C (tabela 2).

As fórmulas recém preparadas levadas ao berçário para administração aos bebês (mamadeiras iniciais) eram mantidas em banho-maria, apesar das nutricionistas indicarem necessidade de serviço

imediatamente. Entretanto, as enfermeiras só as administravam “quando possível”. A temperatura deste banho-maria foi verificada nas quatro visitas e foi de 60°C, 32,8°C, 46,8°C e 50°C respectivamente. Além de falhas na manutenção a quente, em uma das visitas (segunda) notou-se que o banho-maria apresentava-se com pouca água, apenas o suficiente para cobrir a resistência.

Observou-se neste lactário que a cada visita a fórmula infantil desidratada utilizada era de diferentes marcas comerciais.

O lactário do Hospital A apresentava um aspecto desarrumado e o chão apresentava-se sujo em todas as visitas. Há possibilidade de que a aparente sujeira do chão fosse decorrente da grande movimentação das quatro lactaristas e duas nutricionistas naquele pequeno local.

Tabela 2. Temperaturas da geladeira do Hospital A, onde eram armazenadas as “mamadeiras finais”.

	Coletas			
	1° Coleta	2° Coleta	3° Coleta	4° Coleta
Temperatura máxima	22°C	15°C	18°C	15°C
Temperatura mínima	12°C	10°C	10°C	10°C

No lactário do Hospital B, o número de fórmulas infantis preparadas era pequeno, sendo que apenas uma lactarista trabalhava a cada período.

O lactário era dividido em duas salas, uma área limpa, onde eram preparadas as fórmulas infantis (Figura 11) e uma área suja onde os utensílios usados na preparação das fórmulas e as mamadeiras que voltavam do berçário, eram lavados (Figura 12). Na área limpa, após a lactarista higienizar a bancada com álcool para preparação da fórmula infantil, era colocada uma toalha estéril sobre a mesma (Figura 11).

Observou-se em várias visitas que a lactarista lavou utensílios na área limpa. Esta falha nas boas práticas pode ser decorrente do fato da lactarista trabalhar sozinha e da falta de supervisão pelas nutricionistas que não faziam visitas periódicas ao lactário para verificar o andamento do trabalho.

As mamadeiras após a lavagem eram tratadas conforme descrito para o Hospital A. Os utensílios eram mantidos, após esterilização, sob refrigeração.

A preparação e distribuição das fórmulas nas mamadeiras eram iguais a do Hospital A. A única diferença é que os galões de água (20l) usados eram mantidos no chão mesmo após abertos, sendo cobertos apenas com a própria tampa (Figura 10).

Neste hospital, as mamadeiras também eram preparadas em quantidade suficiente para atender a dois serviços, sendo o de imediata administração (mamadeiras iniciais) e aquelas que seriam administradas após 5 h, mantidas sob temperatura de refrigeração com temperatura mínima média de 9,25°C (tabela 3) até nova distribuição. As mamadeiras eram identificadas com o nome dos bebês.

Neste lactário também se observou, como no hospital A, diferentes marcas comerciais de fórmulas infantis desidratadas sendo utilizadas.

O lactário neste hospital era pequeno e com aspecto de limpeza, embora a lactarista transitasse e manipulasse tanto objetos da área limpa como da área suja, praticamente ao mesmo tempo.

Tabela 3. Temperaturas da geladeira do Hospital B, onde eram armazenadas as "mamadeiras finais".

	Coletas			
	1º Coleta	2º Coleta	3º Coleta	4º Coleta
Temperatura máxima	11°C	12°C	11°C	12°C
Temperatura mínima	9°C	9°C	9°C	10°C

Figura 10. Galão de água mineral aberto usado na preparação da fórmula infantil no hospital B.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Figura 11. Bancada usada na reconstituição da fórmula infantil para administração aos bebês, do lactário do hospital B (área limpa).

Figura 12. Área de lavagem dos utensílios usados na preparação da fórmula infantil do lactário do hospital B (área suja).

O lactário pertencente ao hospital C, tinha uma produção intermediária de fórmulas infantis.

Trabalhavam neste lactário duas lactaristas por período. Era composto por duas salas interligadas por porta de "vai-vem" sendo uma dedicada à produção da fórmula infantil (área limpa) e a outra à limpeza do material utilizado (área suja).

A água utilizada para a reconstituição da fórmula infantil era apenas filtrada em filtro do próprio lactário e não fervida.

A fórmula infantil era reconstituída em liquidificador e passada para uma caneca plástica utilizando peneira plástica. Desta caneca plástica a fórmula era então distribuída nas mamadeiras estéreis vazias. As mamadeiras eram codificadas com o nome do paciente e quantidade indicada pelo médico.

Todas as mamadeiras preparadas eram imediatamente enviadas ao berçário para administração aos bebês. Desta forma, neste lactário só se coletou amostras de mamadeiras recém preparadas (mamadeiras iniciais).

As mamadeiras após lavagem eram tratadas conforme descrito no Hospital A. Já os utensílios eram mantidos em armários fechados.

Aparentemente o lactário do Hospital C apresentava padrão higiênico adequado e bem organizado e as nutricionistas se mostravam bastante preocupadas e sempre visitavam o lactário além de ter um programa de treinamento contínuo para as lactaristas.

4.2. Ocorrência e população de *E. sakazakii* e *Enterobacteriaceae* em três lactários de maternidades da Grande São Paulo.

Nas tabelas 4, 5 e 6 encontram-se os resultados referentes às quatro coletas realizadas nos Hospitais A, B e C, respectivamente.

Observa-se na tabela 4 que as amostras coletadas no Hospital A, de ambiente, utensílios, mão dos manipuladores e da água de preparo das

fórmulas apresentaram população de *Enterobacteriaceae* <10 UFC. Enterobactérias só foram regularmente detectadas nas amostras de escova utilizada na lavagem das mamadeiras e nas esponjas de lavagem. As populações obtidas variaram entre 10^2 e 10^4 UFC/escova e 10^2 e 10^5 UFC/esponja. Não se isolou *E. sakazakii* nas amostras de ambiente, utensílio, mão dos manipuladores ou água deste hospital.

Tabela 4: População de *Enterobacteriaceae* nas amostras coletadas do Hospital A, hospital escola.

Tipo de Amostra	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Mamadeira retorna berçário (UFC/ml)	$1,8 \times 10^3$	<10	<10	-
Escova (UFC/unidade)	9×10^4	$2,4 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	$4,8 \times 10^2$
Esponja (UFC/unidade)	$2,6 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	$7,7 \times 10^3$	$5,4 \times 10^5$
Bancada (UFC/cm ²)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
Mamadeira esterilizada (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Boca mamadeira esterilizada (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Bico mamadeira (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Caneca plástica (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Colher (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Jarra (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Peneira (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Chão (UFC/cm ²)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
Mão manipulador 1 (UFC/mão)	<10	<10	<10	<10
Mão manipulador 2 (UFC/mão)	<10	<10	<10	<10
Mão manipulador 3 (UFC/mão)	<10	<10	<10	<10
Mão manipulador 4 (UFC/mão)	<10	<10	<10	<10
Água (UFC/ml)	<10	<10	<10	<10
Caixa de distribuição (UFC/ cm ²)	<10	<10	<10	<10

Somente na primeira coleta isolou-se *Enterobacteriaceae* de amostra de fórmula infantil retornando ao berçário para ser desprezada e

a população foi de $1,8 \times 10^3$ UFC/ml (tabela 4). Estas sobras de mamadeiras ficaram expostas à temperatura ambiente no berçário entre 3h e 5h, o que pode ter propiciado a multiplicação de enterobactérias. Desta mesma amostra isolou-se também *E. sakazakii*, entretanto como o volume de amostra era pequeno a quantificação do patógeno não foi realizada.

Tabela 5: População de *Enterobacteriaceae* nas amostras coletadas do Hospital B, hospital público (municipal).

Tipo de Amostra	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Mamadeira retorna berçário (UFC/ml)	2×10^3	$2,2 \times 10^3$	<10	<10
Escova (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Esponja (UFC/unidade)	$3,1 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$	<10	<10
Bancada (UFC/ cm ²)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
Mamadeira esterilizada (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Boca mamadeira esterilizada (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Bico mamadeira (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Caneca plástica (UFC/unidade)	-	<10	-	<10
Colher (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Jarra (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Peneira (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Chão (UFC/ cm ²)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
Mão manipulador 1 (UFC/mão)	<10	<10	<10	<10
Água (UFC/ml)	<10	<10	<10	<10
Caixa de distribuição (UFC/ cm ²)	<10	<10	<10	<10

Na tabela 5 tem-se os resultados das amostras coletadas do Hospital B. Pode-se verificar que a maioria das amostras coletadas apresentou população de *Enterobacteriaceae* <10 UFC. Enterobactérias só

foram detectadas na primeira e segunda coletas nas amostras de esponja e da sobra da fórmula infantil retornando do berçário para ser desprezada.

As populações obtidas na esponja variaram de 10^3 e 10^4 UFC/esponja e nas sobras da fórmula infantil ficaram em 10^3 UFC/ml (tabela 5). Na segunda coleta, a amostra de esponja que apresentava população de enterobactérias de $2,2 \times 10^4$ UFC/esponja (tabela 5) também abrigava *E. sakazakii*. A presença do patógeno nesta amostra é preocupante uma vez que a lactarista muitas vezes a usava na área limpa. Isto poderia causar a contaminação cruzada dos utensílios e superfícies. Nas coletas seguintes (terceira e quarta) as amostras apresentaram população de enterobactérias <10 UFC.

Esta mudança pode ter sido decorrente da conscientização das nutricionistas sobre a importância das boas práticas de higiene e manipulação, uma vez que a cada coleta os resultados eram informados e discutidos com as mesmas.

Os resultados obtidos para as amostras coletadas no Hospital C podem ser encontrados na tabela 6.

As amostras que se mostraram mais frequentemente contaminadas foram as escovas de lavagem das mamadeiras, esponjas e caneca plástica usadas na distribuição das fórmulas nas mamadeiras. Estas amostras apresentaram, nas três primeiras visitas ao hospital, populações de enterobactérias variando de 10^3 e 10^5 UFC (tabela 6).

Tabela 6: População de *Enterobacteriaceae* nas amostras coletadas do Hospital C, hospital particular.

Tipo de Amostra	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
Mamadeira retorna berçário (UFC/ml)	$2,9 \times 10^3$	2×10^3	-	-
Escova (UFC/unidade)	3×10^3	$3,5 \times 10^3$	9×10^3	<10
Esponja (UFC/unidade)	<10	$1,57 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$	2×10^3
Bancada (UFC/ cm ²)	3×10	10^2	<2,5	<2,5
Mamadeira esterilizada (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Boca mamadeira esterilizada (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Bico mamadeira (UFC/unidade)	<10	7×10^2	<10	<10
Caneca plástica (UFC/unidade)	$4,1 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	4×10^3	<10
Colher (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Liquidificador (UFC/unidade)	$1,1 \times 10^2$	<10	<10	<10
Peneira (UFC/unidade)	<10	<10	<10	<10
Chão (UFC/ cm ²)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
Mão manipulador 1 (UFC/mão)	<10	<10	10^2	<10
Mão manipulador 2 (UFC/mão)	<10	<10	<10	-
Água (UFC/ml)	<10	<10	<10	<10
Caixa de distribuição (UFC/ cm ²)	<10	<10	<10	<10

As amostras coletadas na bancada de preparo das fórmulas apresentaram na primeira visita população de 3×10 UFC/cm² e na segunda 10^2 UFC/cm² (tabela 6).

Outras amostras que em pelo menos uma coleta apresentavam alguma contagem de enterobactérias foram o bico estéril da mamadeira (7×10^2 UFC/bico, na segunda coleta), superfície interna do liquidificador ($1,1 \times 10^2$ UFC, na primeira coleta) e mão de uma das lactaristas (10^2 UFC/mão, na terceira coleta) (tabela 6).

Amostras da sobra da fórmula infantil voltando do berçário, só foram coletadas na primeira e segunda amostragem, apresentando população de enterobactérias de 10^3 UFC/ml.

A amostra da esponja na primeira coleta apresentou população de enterobactérias <10 UFC/esponja. Esta não tendo sido previamente utilizada, o que explica a baixa população.

Com base nos resultados obtidos desde a primeira coleta, sugeriu-se à nutricionista responsável mudanças no procedimento de higienização dos utensílios e equipamentos além dos bicos das mamadeiras. Pode-se verificar pelos resultados obtidos na quarta coleta (tabela 6) que finalmente foi possível a redução na contaminação dos diferentes tipos de amostras, com exceção das amostras de esponja.

Embora neste hospital *Enterobacteriaceae* tenha sido encontrada em diversas amostras, *E. sakazakii* não foi encontrada.

4.3 Ocorrência de *E. sakazakii* e *Enterobacteriaceae* nas fórmulas infantis reconstituídas e desidratadas.

Nas tabelas 7, 8 e 9 encontram-se os resultados para *Enterobacteriaceae* referentes às quatro coletas das fórmulas infantis desidratadas e reidratadas nos hospitais A, B e C, respectivamente.

Tabela 7: População de *Enterobacteriaceae* nas amostras coletadas do Hospital A, hospital escola.

Tipo de Amostra	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	1º coleta	2º coleta	3º coleta	4º coleta
Fórmula infantil desidratada 1 (UFC/g)	<5	<5	<5	5
Fórmula infantil desidratada 2 (UFC/g)	<5	<5	<5	<5
Fórmula infantil desidratada 3 (UFC/g)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira inicial* 1 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira inicial 2 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira inicial 3 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira final 1 ⁰ (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira final 2 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira final 3 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5

*mamadeira inicial – mamadeiras de fórmula infantil recém preparada e imediatamente administradas aos bebês; ⁰mamadeira final – mamadeiras de fórmula infantil preparadas e armazenadas sob temperatura de refrigeração por até 5h.

As latas de fórmula infantil desidratadas de mesmo lote utilizado no lactário no dia das coletas apresentaram população de enterobactérias <5 UFC/g, exceto na quarta coleta em que uma das três latas examinadas (marca B) apresentou população de 5 UFC/g (tabela 7). Desta mesma amostra a população de *E. sakazakii* foi de 0,3 NMP/100g. Esta foi a única amostra de fórmula infantil desidratada que apresentou o patógeno. Outras latas deste mesmo lote foram examinadas por Gillio (2006), mas *E. sakazakii* não foi encontrada.

A frequência de contaminação de latas de fórmula infantil desidrata por *E. sakazakii* é muito baixa, conforme já verificado por (Nazarowe-White; Farber, 1997c; Iversen; Forsythe, 2004; Gillio, 2006). Entretanto, cuidados devem ser tomados durante a abertura da lata e preparo da fórmula no lactário.

A população de enterobactérias em todas as mamadeiras preparadas no hospital A foi <5 UFC/ml (tabela 7) mesmo para aquelas estocadas por até 5 h sob refrigeração.

Populações de *E. sakazakii* <0,003 NMP/g ou ml foram obtidas para as demais amostras deste hospital.

Tabela 8: População de *Enterobacteriaceae* nas amostras coletadas do Hospital B, hospital público (municipal).

Tipo de Amostra	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	1º Coleta	2º Coleta	3º Coleta	4º Coleta
Fórmula infantil desidratada 1 (UFC/g)	<5	<5	<5	<5
Fórmula infantil desidratada 2 (UFC/g)	<5	<5	<5	<5
Fórmula infantil desidratada 3 (UFC/g)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira inicial* 1 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira inicial 2 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira inicial 3 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira final [□] 1 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira final 2 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira final 3 (UFC/ml)	<5	<5	<5	<5

*mamadeira inicial – mamadeiras de fórmula infantil recém preparadas e imediatamente administradas aos bebês; [□] mamadeira final – mamadeiras de fórmula infantil preparadas e armazenadas sob temperatura de refrigeração por até 5h.

Nas amostras de latas da fórmula infantil desidratada, coletadas no hospital B, observou-se população de enterobactérias <5 UFC/g (tabela 8). As mamadeiras, tanto iniciais como finais, de fórmula infantil preparadas pela lactarista também apresentaram população deste microrganismo inferior a 5 UFC/ml.

Populações de *E. sakazakii* <0,003 NMP/g ou ml foram obtidas para todas as amostras deste hospital.

Tabela 9: População de *Enterobacteriaceae* nas amostras coletadas do Hospital C, hospital particular.

Tipo de Amostra	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	1º Coleta	2º Coleta	3º Coleta	4º Coleta
Fórmula infantil desidratada 1 (UFC/g)	<5	<5	<5	<5
Fórmula infantil desidratada 2 (UFC/g)	<5	<5	<5	<5
Fórmula infantil desidratada 3 (UFC/g)	<5	<5	<5	<5
Mamadeira inicial* 1 (UFC/ml)	$1,4 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	4×10^2
Mamadeira inicial 2 (UFC/ml)	9×10^3	$8,5 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$	10^3
Mamadeira inicial 3 (UFC/ml)	$1,8 \times 10^4$	7×10^4	$6,7 \times 10^4$	3×10^2

*mamadeira inicial – mamadeiras de fórmula infantil recém preparadas e imediatamente administradas aos bebês.

No hospital C, as latas de fórmula infantil desidratada também apresentaram população de enterobactérias <5 UFC/g (tabela 9). Já para as mamadeiras preparadas pelas lactaristas neste hospital, observou-se uma variação na população de enterobactérias entre 10^2 a 10^4 UFC/ml nas quatro coletas (tabela 9). As mamadeiras eram preparadas pelas lactaristas e administradas aos bebês imediatamente após o preparo, não existindo neste hospital mamadeiras armazenadas sob refrigeração para posterior administração.

Não foi observada presença de *E. sakazakii* nas amostras coletadas neste hospital.

É difícil identificar a causa da presença de enterobactérias nas amostras de mamadeiras deste hospital, uma vez que a água utilizada na reidratação das fórmulas sempre apresentou população de enterobactérias <1 UFC/ml (tabela 6), não sendo portanto a fonte da contaminação. A caneca plástica utilizada na distribuição da fórmula reidratada pode ser considerada como o veículo da contaminação nas coletas 1, 2 e 3, uma

vez que apresentava população de enterobactérias de $4,1 \times 10^4$ UFC, $4,8 \times 10^4$ UFC e 4×10^3 UFC, respectivamente (tabela 6). Entretanto, na quarta coleta este utensílio apresentou população de enterobactérias <10 UFC, mas mesmo assim, as mamadeiras apresentavam entre 10^2 e 10^3 UFC/ml. O liquidificador que poderia ser o outro responsável pela contaminação, conforme verificado por Bar-Oz et al. (2001) e Block et al. (2002), só apresentou enterobactérias na primeira coleta ($1,1 \times 10^2$ UFC, tabela 6). Nas amostragens seguintes ele havia sido sanificado com hipoclorito de sódio após lavagem, o que levou à redução da população deste grupo de microrganismos para níveis não detectados.

Foi sugerido à nutricionista que utilizasse, como feito nos outros lactários, água fervida e resfriada a 60°C para reidratação da fórmula infantil desidratada, o que foi realizado na quarta coleta, quando foram preparadas mamadeiras com água fervida e sem ferver.

Observou-se que quando a água fervida foi utilizada a população de enterobactérias foi <5 UFC/ml (dados não apresentados). Em visita posterior realizada ao lactário observou-se que a utilização de água fervida havia sido implementada e, nas novas amostras coletadas a população de enterobactérias foi também <5 UFC/ml.

Na tabela 10 tem-se um resumo dos resultados obtidos para detecção e/ou enumeração de *E. sakazakii* no total de amostras examinadas neste estudo. Verifica-se que *E. sakazakii* só esteve presente

em 1% das amostras examinadas, valor este que pode ser considerado baixo.

Tabela 10: Ocorrência de *E. sakazakii* em amostras coletadas em três hospitais maternidades da grande São Paulo.

Tipo de Amostra	<i>E. sakazakii</i> (nº / %)	
	Presença	Ausência
Ambiente	0 (-)	24 (100%)
Utensílios	1 (0,8%)	118 (99,2%)
Fórmula infantil desidratada	1 (2,8%)	35 (97,2%)
Fórmula reconstituída	0 (-)	66 (100%)
Sobra das mamadeiras	1 (11,2%)	8 (88,8%)
Mão Manipuladores	0 (-)	27 (100%)
Água para reconstituição da fórmula	0 (-)	12 (100%)
Total	3 (1%)	289 (99%)

Observou-se neste estudo que a aparência do lactário não é indicação segura da presença ou não de enterobactérias no ambiente ou equipamentos e utensílios. O hospital A que parecia ter condições higiênicas insatisfatórias, além de aparentemente desorganizado apresentou sempre baixo número de amostras positivas para este grupo de microrganismo.

Já o Hospital C, que apresentava a impressão de muito organizado e limpo foi o que apresentou maiores índices de amostras contaminadas, inclusive de mamadeiras.

Estes resultados comprovam que a aparência do local não deve ser utilizada como critério de avaliação de procedimentos de limpeza e sanitificação, sendo necessária a coleta de amostras ambientais para este fim.

São poucos os estudos encontrados na literatura relacionados à avaliação da presença de *E. sakazakii* ou *Enterobacteriaceae* em lactários. Os poucos existentes foram realizados para elucidar surtos ocorridos.

Biering et al. (1989), tentando elucidar surto de meningite neonatal causado por *E. sakazakii* ocorrido em Hospital na Islândia, avaliaram as condições ambientais das enfermarias e do lactário, além das diversas etapas de produção das fórmulas infantis naquele hospital. Eles verificaram que nenhuma das amostras ambientais, tanto de enfermaria quanto do lactário, apresentavam o patógeno. Amostras de água, utensílios e de mamadeiras recém preparadas também foram negativas. *E. sakazakii* foi isolado somente de uma amostra de mamadeira estocada por período desconhecido em um refrigerador de uma das enfermarias, e de latas de fórmula infantil desidratadas de cinco lotes diferentes encontradas no lactário. O perfil das cepas isoladas das fórmulas infantis desidratadas e dos neonatos era idêntico, indicando ter sido a fórmula a causa deste surto.

Já nos estudos conduzidos por Bar-Oz et al. (2001) e Block et al. (2002) tanto as amostras de fórmula infantil desidratadas examinadas como as das mãos das lactaristas não apresentavam *E. sakazakii*, mas as fórmulas reidratadas e amostras do liquidificador foram positivas.

Estes dois trabalhos reforçam a importância das boas práticas na manipulação e preparo das fórmulas infantis.

A ocorrência de *E. sakazakii* em fórmulas infantis desidratadas tem sido estudada por diversos autores.

Em estudo realizado por Van Acker et al., no ano de 2001 na Bélgica, foi observada a presença de *E. sakazakii* em diversas preparações da fórmula infantil Alfaré oferecida a bebês durante um surto de enterocolite necrotizante associado a *E. sakazakii*. O patógeno foi isolado tanto de fórmula reidratada como de latas fechadas do mesmo produto. Outras marcas de fórmulas infantis desidratadas avaliadas, bem como amostras da água mineral e da água de enxágüe do liquidificador usados no preparo da fórmula infantil desidratada, também se mostraram negativas para o patógeno. Com estes resultados eles puderam excluir a possibilidade de contaminação durante o preparo das fórmulas no lactário.

Também em 2001, no Estado de Tennessee (EUA), casos de meningite ocorridos em uma Unidade de Terapia Intensiva neonatal foram associados à fórmula Portagen produzida pela Mead Johnson Nutritionals (Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

Apesar de serem submetidas ao tratamento térmico durante seu processamento, as fórmulas infantis desidratadas não recebem calor para tornarem-se estéreis, diferentemente da fórmula infantil líquida, portanto, o preparo e o consumo devem ser rigorosamente controlados (United States, 2002a).

4.4 Confirmação da identificação dos isolados de *Enterobacter sakazakii*.

Os três isolados obtidos neste estudo foram encaminhados aos laboratórios do Bureau of Microbial Hazards, Health Products and Food Branch, Health Canadá e foram confirmados como sendo *Enterobacter sakazakii* empregando-se o Bax® PCR System.

Quando submetidos à ribotipagem, utilizando-se o Riboprinter® ou à PFGE, estas cepas mostraram-se geneticamente diferentes conforme pode ser verificado nas figuras 13 e 14.

Figura 13. Relação genética entre os três isolados de *E. sakazakii* empregando-se PFGE e a enzima Xba I.

Figura 14. Ribotipos dos três isolados de *E. sakazakii* determinados com o Riboprinter® (1. sobra de mamadeiras; 2. esponja; 3. fórmula infantil desidratada; ES565, 651 e 639 – cepas controle).

4.5 Comportamento das cepas de *E. sakazakii* isoladas simulando as condições de serviço de fórmulas aos bebês.

Uma vez que as diferentes cepas de *E. sakazakii* podem apresentar comportamento diferenciado no que se refere à velocidade de crescimento, resistência térmica, sensibilidade à dessecação, etc (Farmer et al., 1980; Nazarowec-White; Farber, 1997c; Nazarowec-White; Farber, 1997b; Nazarowec-White et al., 1999; Edelson-Mammel; Buchanan, 2004) buscou-se verificar o comportamento dos isolados obtidos neste estudo simulando-se as condições de preparo no lactário e serviço das fórmulas no berçário.

Para a simulação no laboratório empregou-se fórmula infantil reconstituída com água estéril, na proporção recomendada pelo fabricante, inoculada com as cepas isoladas e também a cepa padrão (CDC 7006). As amostras foram mantidas a 25°C, temperatura ambiente das UTIs neonatais.

Na figura 15 tem-se as curvas obtidas. Observa-se que as cepas isoladas neste estudo têm um comportamento muito semelhante ao da cepa padrão quando a 25°C. Após uma hora de incubação (tempo usual de permanência das mamadeiras no berçário) houve um incremento de aproximadamente 0,5 ciclo logarítmico. A taxa de multiplicação manteve-se constante sendo que após 4 h observou-se um aumento total de 2 log na população do patógeno.

É interessante notar que apesar de haver uma tendência de estabilização da população no período entre 7 e 10 h de incubação, o pico de crescimento ocorreu entre 10 e 24 h de incubação (Figura 15).

Em paralelo aos experimentos com fórmula infantil reidratada em água realizou-se também a avaliação da velocidade de crescimento em caldo TSB. Observa-se que em caldo TSB a população inicial se mantém constante por até 3 h, iniciando então a multiplicação mais lentamente que em leite por até 10 h com incremento total de 3 ciclos logarítmicos. Entre 10 e 24 h de incubação o aumento na população foi superior ao observado para fórmula infantil (4 a 5 ciclos logarítmicos de incremento).

Segundo as nutricionistas dos lactários, as mamadeiras devem ser administradas imediatamente ao chegar ao berçário, porém, em alguns casos isto não ocorre. No hospital A elas permaneciam em banheira conforme apresentado em 4.1; nos demais hospitais elas permaneciam à temperatura ambiente por ± 1 hora. Entretanto, existem bebês que recebem a fórmula infantil através de sonda naso-gástrica e esta alimentação pode durar entre 30 min. até o máximo de 4 h.

Como verificado neste estudo, a manutenção da fórmula por até 4 h à temperatura ambiente pode ser um risco adicional à saúde do bebê, pois permite a multiplicação do patógeno eventualmente presente.

Figura 15: Comportamento de *E. sakazakii* em fórmula infantil reidratada com água (linha cheia) e em caldo tripticase de soja (TSB) (linha pontilhada), incubados a 25°C. Resultados médios de três repetições. Cepa controle* - (CDC 7006); Cepa 1□ - (isolado de restos de mamadeiras); Cepa 2◇ - (isolado de esponja); Cepa 3Δ - (isolado de fórmula infantil desidratada).

5. CONCLUSÃO

As diferenças verificadas nas formas de produção de mamadeiras de fórmula infantil desidratada nos lactários não influenciaram na presença de *E. sakazakii* nas mesmas. O patógeno não foi isolado das mamadeiras de fórmula infantil reidratada.

E. sakazakii foi isolado em amostras de sobras de mamadeiras, esponja de lavagem e de uma lata lacrada de fórmula infantil desidratada (0,3NMP/100g). Estas amostras eram provenientes de duas maternidades e representam 1% do total de amostras examinadas.

A ocorrência de *Enterobacteriaceae* nos lactários variou, sendo que as amostras colhidas no hospital C foram as que apresentaram populações mais elevadas.

O treinamento constante das lactaristas e a conscientização das nutricionistas nas boas práticas de produção, são ferramentas importantes para garantir a produção de mamadeiras seguras aos bebês.

A administração da fórmula, através de sonda naso-gástrica, por até quatro horas à temperatura ambiente (25°C), como observado neste

estudo, pode ser um risco adicional à saúde do bebê, pois permite a multiplicação do patógeno eventualmente presente.

6. Referências Bibliográficas

ARSENI, A.; MALAMOU-LADAS, H.; KOSTALOS, C.; STAIKOU, A.; KOUTSIA, C.; A fatal case of sepsis in a premature newborn associated with *Enterobacter sakazakii*. **Acta Microbiologica Hellenica**, v.29, p.402-407, 1984.

BAR-OZ, B.; PREMINGER, A.; PELEG, O.; BLOCK, C.; ARAD, I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. **Acta Paediatrica**, v.90, n.3, 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.; LÚDVIGSSON, 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.

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.

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.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *ENTEROBACTER sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula, Tennessee, 2001. **MMWR. Morbidity and Mortally Weekly Report**, v.51, n.14, p.297-300, 2002.

DESTRO, M.T.; LEITÃO, M.F.F.; FARBER, J.M.; Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.2, p.705-711, 1996.

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.

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 ADVISORY COMMITTEE. Meeting on *Enterobacter sakazakii* contamination in powdered infant formula. Contaminants and Natural Toxicants Subcommittee, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, March 18-19. Disponível em: <http://.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cfsan03.html>.2003. Acesso em: 10 maio. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Risk profile of *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula**: joint FAO/WHO Food Standards Programme – Codex Committee on Food Hygiene. Washington: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2004.

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/> Acesso em: 02 fev. 2005.

GILLIO, C.M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.G.D.M.; DESTRO, M.T. *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis desidratadas para bebês de 0 à 6 meses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, Santos, 2005. **Programa e resumos.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005. p.182.

GURTNER, 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.

HOLT, J.G.; BERGEY, D.H.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; WILLIAMS, S.T., ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TC 34/SC 5N**: milk and milk products: detection of *Enterobacter sakazakii*. Geneve: ISO, 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.; 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.

JOKER, R.N.; NORHOLM, T.; SIBONI, K.E. A case of neonatal meningitis caused by yellow *Enterobacter*. **Danish Medical Bulletin**, v.12, p.128-130, 1965.

POLÍCIA apura morte de 9 bebês em Guarulhos. São Paulo. **Jornal Folha de São Paulo**, 1998. Disponível em: www.uol.com.br. Acesso em: 14 fev. 2005.

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, 2004.

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.; STEPHAN, R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Food Protection**, v.67, n.12, p.2850-2857, 2004.

LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPHAN, R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. **BMC Microbiology**, v.4, n.1, p.43-49, 2004.

MONROE, P.W.; TIFT, W. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.10, n.6, p.850-851, 1979.

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.

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

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

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, 1997b.

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, 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.

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 neonatologia do HC/UFGM. In: BIENAL DE EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE DE MINAS GERAIS, 2, Belo Horizonte, 1999. **Anais**. Belo Horizonte, 1999. p.103.

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.

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**. Florianópolis, 2005. CDROM.

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. 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: Joint FAO/WHO expert meetings on microbiological risk assesment. JEMRA Meetings. **2 February 2004: 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.

ANEXOS

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 155/2005

São Paulo, 01 de novembro de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).
Gabriela Palcich
Orientador: Prof. Maria Teresa Destro
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de outubro de 2005, **APROVOU** o projeto "Ocorrência de *E. sakazakii* em lactários de maternidades da grande São Paulo" (Protocolo CEP nº 330) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr.ª. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP