

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências de Alimentos



**OCORRÊNCIA DE *Enterobacter sakazakii* EM FÓRMULAS INFANTIS PARA
LACTENTES EM HOSPITAIS E MATERNIDADES DA REGIÃO DE CAMPINAS/SP.**

Rosana Francisco Siqueira dos Santos
Bióloga

Dr. José Luiz Pereira
Orientador

Dra. Valéria C. Amstalden Junqueira
Co-orientadora

**Dissertação apresentada à faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência
de Alimentos**

Campinas, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sa59o Santos, Rosana Francisco Siqueira dos
Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospitais e maternidades da região de Campinas/SP / Rosana Francisco Siqueira dos Santos. - - Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: José Luiz Pereira
Co-orientador: Valéria Christina Amstalden Junqueira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. *Enterobacter sakazakii*. 2. Recém-nascidos. 3. Fórmula infantil em pó. I. Pereira, José Luiz. II. Junqueira, Valéria Christina Amstalden. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in infant formula for sucking baby in hospitals and maternities of Campinas region

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Enterobacter sakazakii*, Newly born babies, Powdered infant formula

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: José Luiz Pereira

Valéria Christina Amstalden Junqueira

Dirce Yorika Kabuki

Neliane Ferraz de Arruda Silveira

Neusely da Silva

Data da defesa: 12/12/2006

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Porf. Dr. José Luiz Pereira

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos-DCA

Dra. Dirce Yorika Kabuki

(membro)

Faculdade de Engenharia de Alimentos-DTA

Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira

(membro)

Pesquisadora do Instituto Tecnologia de Alimentos-ITAL

Dra. Neusely da Silva

(membro-suplente)

Pesquisadora do Instituto Tecnologia de Alimentos-ITAL

“...todas as coisas contribuem para o bem daqueles que amam a Deus...”

Romanos 8:28

Ao meu pai, Joaquim (in memorium).
Á minha querida mãe, Marinalva, pelo amor dedicado.
Aos meus irmãos Cícero, Laerte e sobrinhos pelo carinho.

Ao meu querido esposo, Amilton,
Por estar sempre presente e por ser tão
Importante em minha vida e principalmente por ser companheiro.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. José Luiz Pereira**, por ter me acolhido como sua orientada e principalmente por sua amizade e carinho.

À **Dra. Valéria C. Amstalden Junqueira** pelos sábios ensinamentos que perpetuarão por toda minha vida

À **Dra. Neusely da Silva** pela amizade e confiança que tem depositado à minha pessoa, pelas orientações e ajuda em todos os momentos.

À **Dra. Neliane F. Arruda Silveira** pelo companheirismo e amizade.

À **Dra. Marta Hiromi Taniwaki** pela ajuda nas primeiras publicações.

À amiga **Dionir Jeremias Baptista** pelos primeiros ensinamentos na microbiologia e amizade.

À amiga querida **Luciana Maria Ramires Esper** incentivadora em todos os momentos.

À amiga **Karen Signori Pereira** pelo carinho e ajuda em todas as situações.

Aos queridos amigos da Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia que sempre me ajudaram e me apoiaram em tudo: Maria Adelaide dos Santos, Luciara Guimarães, **Silvia Morelli**, **Gabriela C. Moita da Silva**, **Thais B. Anacleto dos Santos**, **Míriam G. Marquezini**, **Cláudia Galusni Pagoto**, **Ivone F. da Silva**, **Heloísa L. Hervatin**, **Juliano Luiz de Souza**, **Beatriz T. Iamanaka**, **Marina V. Copetti**, **Hector Abel Palácios**, **Ana Paula Dizaró das Chagas**, **Flávia Marin**, enfim a todos que de alguma forma faz parte do meu dia-a-dia.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Tabelas.....	xviii
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxv
1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	4
2.1 Objetivo específico.....	4
2.2 Objetivo Geral.....	4
3 Revisão Bibliográfica.....	5
3.1 <i>Enterobacter sakazakii</i> –Taxonomia.....	5
3.1.1 Linhagem Tipo.....	5
3.1.2 Hibridação do DNA.....	5
3.1.3 Morfologia das células.....	6
3.1.4 Características nutricionais e de crescimento.....	6
3.1.5 Características em meios de cultura sólidos à base de peptonas.....	6
3.1.6 Características de crescimento em meios líquidos.....	7
3.1.7 Perfil bioquímico.....	8
3.1.8 Resistência térmica.....	10

3.2 <i>Enterobacter sakazakii</i> – Epidemiologia.....	11
3.2.1 Doenças.....	11
3.2.2 Casos relatados e fontes de contaminação.....	12
3.2.3 Taxa de mortalidade.....	15
3.3 <i>Enterobacter sakazakii</i> – Ecologia.....	16
3.3.1 <i>Enterobacter sakazakii</i> em formulas infantis.....	16
3.3.2 <i>Enterobacter sakazakii</i> nos ingredientes de formulas infantis.....	19
3.3.3 <i>Enterobacter sakazakii</i> em outros alimentos.....	20
3.3.4 <i>Enterobacter sakazakii</i> no ambiente.....	20
3.3.5 Formula infantil em pó.....	22
3.4 Análise de risco.....	23
3.4.1 População de risco.....	26
3.4.2 Dose infectante.....	26
3.4.3 Exposição ao risco.....	27
3.5 Principais microrganismos presentes na fórmula infantil reconstituída.....	28
3.5.1 <i>Bacillus cereus</i>	28
3.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.5.3 Coliformes totais e termotolerantes a 45°C.....	31
3.5.4 <i>Salmonella</i> sp.....	32
3.6 Microrganismos aeróbios mesófilos como indicadores de condições higiênico sanitária nas fórmulas reconstituídas.....	34
3.7 Potabilidade da água utilizada nos lactários.....	34
3.7.1 Contagem de microrganismos heterotróficos.....	34
3.7.2 Coliformes totais e <i>E. coli</i> em água pelo método do substrato cromogênico (Colilert).....	35

3.8 Sistema Bax® para detecção de <i>Enterobacter sakazakii</i>	36
4 Material e Métodos.....	44
4.1 Material utilizado.....	44
4.1.1 Meios de cultura.....	44
4.1.1.1 Lauril Sulfato Triptose modificado suplementado Vancomicina.....	44
4.1.1.2 Caldo tripticase de Soja.....	44
4.1.1.3 Violeta Vermelho Bile Glicose Agar.....	44
4.1.1.4 Ágar Tripticase de Soja – TSA.....	44
4.1.1.5 Ágar Padrão para Contagem.....	44
4.1.1.6 Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina.....	45
4.1.1.7 Baird Parker Ágar.....	45
4.1.1.8 Água Peptonada 0,1%.....	45
4.1.1.9 Meio EC.....	45
4.1.1.10 Caldo Verde Brilhante Bile 2%.....	45
4.1.1.11 Galeria API 20E.....	46
4.1.1.12 Tiras para oxidase.....	46
4.1.1.13 Kit Bax® para identificação de <i>E. sakazakii</i>	46
4.1.1.14 Kit Bax® para identificação de <i>Salmonella</i>	46
4.1.1.15 Kit Colilert.....	46
4.2 Equipamentos utilizados.....	46
4.3 Metodologia utilizada.....	48
4.3.1 Amostragem.....	48
4.3.2 Determinação de <i>E. sakazakii</i> . pelo método FDA modificado.....	48
4.3.2.1 Fórmula infantil em pó.....	49
4.3.2.2 Determinação de <i>Enterobacter sakazakii</i> através do Sistema Bax®.....	53
4.3.3 Fórmula infantil em pó.....	53
4.3.3.1 Formulas preparadas em mamadeiras	55

4.3.3.2 “Swab” (haste de madeira com algodão estéril).....	55
4.3.3.3 Escovas e mamadeiras vazias.....	56
4.4 Determinação de microrganismos indicadores de condições higiênico sanitárias e de patógenos em amostras de fórmulas infantis reconstituídas nos lactários.....	57
4.4.1 Determinação de contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos.....	57
4.4.2 Determinação de coliformes totais e termotolerantes a 45°C.....	57
4.4.3 Determinação de <i>Bacillus cereus</i>	57
4.4.4 Determinação de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
4.4.5 Determinação de <i>Salmonella</i>	58
4.5 Determinação de microrganismos indicadores de condições higiênico sanitário em amostras de utensílios coletados nos lactário.....	59
4.5.1 Determinação de coliformes totais e termotolerantes a 45°C.....	59
4.5.2 Determinação de contagem de microrganismos aeróbios totais.....	59
4.6 Determinação microbiológica da potabilidade em amostras de água coletadas nos lactários.....	59
4.6.1 Determinação de coliformes totais e <i>E. coli</i>	59
4.6.2 Determinação de heterotróficos em amostras de água coletadas nos lactários.....	60
5 Resultados e Discussão.....	61
5.1 <i>Enterobacter sakazakii</i> nas fórmulas infantis em pó e reconstituídas.....	61
5.1.1 <i>E. sakazakii</i> em utensílios utilizados nos lactários.....	64
5.1.2 <i>E. sakazakii</i> em ingredientes.....	65
5.2 Análises microbiológicas em fórmulas infantis reconstituídas para lactentes de 0-6 meses.....	67
5.3 Análises microbiológicas em fórmulas infantis reconstituídas para prematuros e/ou recém-nascidos de baixo peso.....	69
5.4 Análise microbiológica em formulas infantis reconstituídas para crianças	

de até 1 ano.....	70
5.5 Análise microbiológica em leite adicionado de amido.....	72
5.6 Análise de microrganismos indicadores de contaminação em utensílios utilizados nos lactários.....	74
5.7 Determinação da potabilidade da água utilizada na preparação das fórmulas reconstituídas.....	75
6. Conclusão.....	77
7. Referência bibliográficas.....	79
Anexos.....	91
Anexo 1. Fotos ilustrando a condição ambiental de um lactário antes de receber Acompanhamento das praticas de manipulação e orientação.....	91

Listas de Figuras

Figura 1 – Tampão de lise.....	38
Figura 2 – Blocos de aquecimento.....	38
Figura 3 - Bloco de resfriamento.....	39
Figura 4 - Tubos de Eppendorf.....	39
Figura 5 – Termociclador.....	39
Figura 6 - Layout óptico do sistema.....	41
Figura 7 - Símbolos.....	42
Figura 8 - Curva de fusão do padrão fortemente positiva.....	42
Figura 9 - Curva de fusão do padrão fracamente positiva.....	43
Figura 10 - Curva de fusão negativa.....	43
Figura 11 - Fluxograma de metodologia do FDA para formula infantil em pó.....	50
Figura 12 - Caldo de Enriquecimento Enterobactérias -EEB.....	51
Figura 13 - Colônias típicas de <i>Enterobacter sakazakii</i> em Ágar Vermelho Violeta Glicose -VRBG.....	51
Figura 14 - Colônias de <i>Enterobacter sakazakii</i> com pigmento amarelo em Ágar Trypticase de Soja -TSA.....	52
Figura 15 - Galeria API 20E com reações bioquímicas na identificação de	

<i>Enterobacter sakazakii</i>	52
Figura 16 – Fluxograma do método utilizando o Sistema Bax® para detecção de <i>Enterobacter sakazakii</i> em formula infantil em pó.....	54
Figura 17 - Fluxograma do método para determinação de <i>Salmonella</i> sp. em 25g através do Sistema Bax®.....	58
Figura 18 - Fluxograma da metodologia do Colilert (IDEXX) na determinação de Coliformes totais e <i>E. coli</i> em água.....	60

Listas de Tabelas

Tabela 1 – Perfil bioquímico de <i>E. sakazakii</i> , <i>E. cloacae</i> e outras enterobactérias que podem produzir pigmento amarelo e α -glicosidase (Brenner et al., 2005).....	9
Tabela 2 – Resistência térmica (Valor D e valor Z) de <i>Enterobacter sakazakii</i> (linhagem tipo e linhagem encapsulada) avaliada em Caldo Trypticase de Soja (TSB) e em formula infantil reconstituída.....	11
Tabela 3 - Presença de <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>E. sakazakii</i> em ingredientes usados em formulações infantis em pó.....	19
Tabela 4 - Presença de <i>Enterobacter sakazakii</i> em amostra do ambiente doméstico e industrial.....	21
Tabela 5 - Determinação de <i>Enterobacter sakazakii</i> em formulas infantis pelo Método do FDA e Sistema Bax®.....	62
Tabela 6 – Determinação <i>Enterobacter sakazakii</i> em utensílios utilizados em lactários utilizando o Sistema Bax® de detecção.....	65
Tabela 7 - Determinação de <i>Enterobacter sakazakii</i> em ingredientes, leite de Vaca com espessante e leite UHT.....	66
Tabela 8 – Determinações microbiológicas em formulas infantis reconstituídas para lactentes de 0 a 6 meses.....	68
Tabela 9 – Determinação de microrganismos presentes nas formulas infantis reconstituídas para prematuros e recém-nascidos de baixo peso.....	70
Tabela 10 - Determinação de microrganismos presentes nas formulas infantis reconstituídas para crianças de até 1 ano.....	71

Tabela 11 – Determinação de microrganismos presentes no leite com amido utilizados nos lactários.....73

Tabela 12- Determinação de microrganismos presentes nos utensílios usados nos lactários.....74

Tabela 13 – Determinação de microrganismos presentes nas amostras de água para preparo de mamadeiras, coletadas nos lactários.....76

RESUMO

Enterobacter sakazakii é uma bactéria patogênica emergente, recentemente classificado pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) como “de risco severo para população restrita, representando ameaça de morte ou de seqüelas crônicas de longa duração”. A população de risco são crianças de até 1 ano, particularmente os prematuros e os recém nascidos de baixo peso corporal. Esse grupo de risco pode sofrer doenças graves como sepse, meningite e enterocolite necrosante, cuja taxa de mortalidade encontra-se na faixa de 20%. O veículo mais comum das infecções tem sido fórmulas infantis em pó, utilizadas em hospitais e maternidades para a preparação de mamadeiras. A partir das fórmulas em pó, focos de contaminação podem acumular-se em frascos e utensílios usados na preparação das mamadeiras, facilitando a disseminação da bactéria. Assim, o presente trabalho teve como objetivos monitorar a ocorrência e auxiliar no controle do risco de infecções por *E. sakazakii* nos berçários de hospitais e maternidades da região de Campinas (SP), analisando amostras relacionadas, verificando as condições higiênicas na preparação de mamadeiras e utensílios, através de análises microbiológicas e orientando os responsáveis sobre as Boas Práticas de Higiene e Manipulação de Alimentos. Foram analisadas um total de 175 amostras (98 de fórmulas infantis em pó, 15 de fórmulas infantis reconstituídas para lactentes de 0 a 6 meses, 2 fórmulas infantis reconstituídas para prematuros e/ou recém nascidos de baixo peso, 8 de fórmulas infantis reconstituídas para crianças de até 1 ano, 5 de leite de vaca com amido, 3 de leite UHT, 7 de amido, 27 de utensílios usados na preparação das mamadeiras e 10 de água utilizada no preparo das fórmulas reconstituídas). *E. sakazakii* foi detectado em 12

amostras de fórmulas infantis em pó (12,24%) e em 4 amostras de amido. Nas amostras de fórmulas infantis reconstituídas não foi constatada presença de *E. sakazakii*, embora o microrganismo tenha sido detectado em quase todos os tipos de fórmulas infantis em pó analisadas, dentre elas as que se destinam a prematuros até a 2ª idade (de 6 meses a 1 ano). A maior incidência observada dentre as amostras analisadas foi na fórmula infantil em pó de 2ª idade (24,24%), seguida pela fórmula infantil para prematuros e/ou recém nascidos de baixo peso (21,43%), que compreende o grupo de maior risco, e de 1ª idade (6,7%). Outras espécies da família Enterobacteriaceae também foram detectadas nas amostras de 1ª e 2ª idade. Para avaliar as condições higiênico sanitárias das fórmulas infantis reconstituídas foram feitas análises de *Salmonella*, *B. cereus*, *S. aureus*, coliformes totais e termotolerantes e contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios. Em 2 amostras para lactentes de 0 a 6 meses houve presença de coliformes totais ($\geq 2,4 \times 10^3$ NMP/ml), acima do limite estabelecido pela legislação vigente e mesófilos aeróbios totais ($8,9 \times 10^4$ e $3,7 \times 10^3$ UFC/ml). Nas amostras para prematuros e/ou recém nascidos de baixo peso e para crianças de até 1 ano, foi detectada presença de *B. cereus* com valores $5,0 \times 10$ UFC/ml, máximo permitido pela legislação vigente. Nas demais amostras não houve crescimento de patógenos e microrganismos indicadores de condições higiênicas insatisfatórias. Nas amostras de água, apenas uma amostra apresentou contagem de microrganismos heterotróficos ($3,7 \times 10^2$ UFC/ml). Embora a ocorrência *E. sakazakii* na fórmula infantil em pó seja baixa, podemos concluir que seu controle depende basicamente da aplicação de condições higiênicas rigorosa, principalmente no que se refere ao controle de tempo/temperatura durante a preparação, manuseio e armazenamento do produto reconstituído e também o controle contínuo em toda a cadeia de produção uma vez que

o produto não é comercialmente estéril e é uma fonte muito nutritiva após adição de líquido. Se medidas preventivas eficientes não forem tomadas para se evitar a contaminação de alimentos ao longo de sua cadeia produtiva, o risco relacionado a contaminação de natureza microbiológica pode resultar em danos à saúde do consumidor, especialmente em se tratando de alimentos destinados ao consumo específico de indivíduos pertencentes a grupos de risco, como é o caso da alimentação de bebês impossibilitados de receber amamentação materna. As fórmulas infantis em pó reconstituídas e dietas enterais devem receber atenção especial, considerando que os pacientes a quem se destinam são geralmente, mais susceptíveis a infecções e suas conseqüências.

Palavras chave: *Enterobacter sakazakii*, ocorrência, recém-nascidos, fórmula infantil em pó

ABSTRACT

Enterobacter sakazakii is an emergent pathogenic bacteria, recently classified by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) as "severe risk for restricted population, representing threat of death or chronic sequels of long duration". The risk population is children under 1 year old, particularly the prematures and low corporal weight newly born. This group of risk can suffer serious illnesses as sepsis, meningitis and necrotizing enterocolitis, with mortality rate around 20%. The vehicle most common of the infection has been powdered infant formulas, used in hospitals and maternities for the preparation of baby's bottles. From powdered formulas, sources of contamination can accumulate in bottles and utensils used on baby's bottles preparation, facilitating the bacteria dissemination. The present work had as objective to monitor the occurrence and help to control the risk of infections due to *E. sakazakii* in hospitals and maternities nurseries of Campinas region (SP), through microbiological analyses in related samples, verifying the hygienical conditions in the preparation of baby's bottles and utensils, and guiding the responsible ones on Good Hygienical and Manipulation Practices of food. A total of 175 samples (98 powdered infant formula, 15 reconstituted infant formula for babies from 0 to 6 months, 2 reconstituted infant formula for prematures and/or low corporal weight newly born babies, 8 reconstituted infant formulas for children under 1 year old, 5 cow milk with starch samples, 3 UHT milk samples, 7 starch samples, 27 samples of utensils used for preparation of baby's bottles in the hospitals and maternities nurseries and 10 water samples used in the preparation of reconstituted formulas. *E. sakazakii* was detected in 12 powdered infant formula samples (12,24%) and in 4 starch samples. *E. sakazakii*

was not present in the reconstituted infant formula samples, although had been detected in almost all types of powdered infant formulas analyzed, including ones destined to prematures. The highest incidence was observed among 2nd age powdered infant formulas samples (24,24%), followed by powdered infant formula for prematures and low corporal weight newly born babies (21,43%), that comprise the highest risk group, and 1st age powdered infant formulas samples (6,7%). Other species of the Enterobacteriaceae family had been also detected in the samples of 1st and 2nd age. To evaluate the hygienical conditions of reconstituted formula samples analyses of *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, total and termotolerants coliforms and mesophilic aerobic total count had been assayed. In 2 samples for 0 to 6 months babies was detected total coliforms ($\geq 2,4 \times 10^3$ MPN/ml) above the limit established in the current brasilian legislation, with mesophilic aerobic count around $3,7 \times 10^3$ and $8,9 \times 10^4$ CFU/ml. In the reconstituted samples for prematures and low corporal weight newly born babies was detected *B. cereus* ($5,0 \times 10^1$ CFU/ml), at the maximum level limited at current legislation. At the other samples analyzed it was not detected pathogenic bacteria and other indicator microorganisms of unsatisfactory hygienical condition. Among the water samples, only one sample presented heterotrophic microorganism count ($3,7 \times 10^2$ CFU/ml). Although the *E. sakazakii* occurrence in the powdered infant formula are low, we can conclude that its control depends basically on the rigorous application of good hygienical practices, including control of time/temperature during the preparation, handling and storage of the reconstituted product and also the continuous control during all production chain as the product is not commercially steril and constitute a rich nutrient source after liquid reconstitution. If efficient measures of prevention will not be taken to avoid the food contamination throughout its productive chain, the risk related to

microbiological contamination can result in damages to the health of the consumer, with special concern to patients in groups of risk such as newly born babies unable to receive breast-feeding. The powdered infant formula, as well as the reconstituted enters diet must receive special attention in relation to the procedures used for reconstitution and consumption, considering that the patients whom it are destined are generally susceptible to infections and its consequences.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, occurrence, newly born babies , powdered infant formula

1. INTRODUÇÃO

As mudanças na microbiota que coloniza o trato gastrointestinal apresentam uma relação direta com as variações alimentares observadas pelo lactante e a funcionalidade do trato gastrointestinal. As alterações quali-quantitativas nesta população podem desencadear doenças diarréicas bacterianas, associadas ou não à presença de enterotoxinas, com conseqüente má absorção dos nutrientes, perda de líquidos, desnutrição e em alguns casos, o óbito. Desta forma, as infecções que ocorrem ao longo do primeiro ano de vida, se constituem numa das mais importantes causas de elevação dos índices de morbi-mortalidade entre lactantes. A freqüência e a severidade das infecções microbianas influenciadas pela imaturidade do sistema imunológico, são uma peculiaridade desta faixa etária (NOVACK et al., 2001). Ao se referir à alimentação de uma classe de consumidor tão especial, como os bebês prematuros ou de baixo peso, a atenção deve ser redobrada. Muitas dessas crianças são impossibilitadas de receber amamentação materna, ou seja, ficam privadas da alimentação natural, o colostro e o leite materno, essenciais para o bebê adquirir resistência imunológica, tornando-se ainda mais susceptíveis às contaminações advindas dos alimentos administrados para suprir essas necessidades. Entre esses alimentos, as formulações infantis, com base em alimentos desidratados são as mais utilizadas. Muitos estudos vem sendo realizado a partir da década de 90, nesse tipo de produto, uma vez que problemas de saúde pública gravíssimos, atingindo recém-nascidos pré-maturos vem dominando as investigações científicas atuais. Entre os microrganismos oportunistas que estão se destacando nessa área, está a bactéria *Enterobacter sakazakii*, que até a década de 80 era conhecida como *Enterobacter*

cloacae de pigmentação amarela. A partir daí foi reclassificada como *Enterobacter sakazakii*, implicada em formas severas de meningite neonatal e enterocolite necrosante, doenças estas transmitidas através de formulações infantis contaminadas.

Conscientes da necessidade de fornecer uma alimentação segura para todos os infantes, a Food Agriculture Organization and World Health Organization (FAO/WHO) convocaram uma reunião sobre o *E. sakazakii* e outros microrganismos em fórmulas infantis em pó, em Genebra (Suíça), em fevereiro de 2004 (WHO, 2004). Esta reunião foi sustentada por um número de acontecimentos epidemiológicos e as questões microbiológicas relacionadas aos microrganismos em fórmulas infantis em pó, nas práticas das indústrias na produção destes produtos, na variedade dos produtos e em sua preparação para o consumo. Segundo a FAO/WHO, o *E. sakazakii* é um patógeno oportunista emergente e pouco se conhece sobre sua ecologia, taxonomia, virulência e outras características. Esta bactéria tem sido mais freqüentemente isolada do ambiente de produção das fórmulas infantis em pó, tornando-se fonte potencial de contaminação pós-pasteurização. As fórmulas infantis em pó não são produtos comercialmente estéreis e mesmo a ocorrência de baixos níveis de contaminação por *E. sakazakii* é considerada um fator de risco significativo pelo potencial para multiplicação durante a preparação e tempo de conservação sob certas condições anteriores ao consumo da fórmula reconstituída (WHO, 2004)

No Brasil ainda não há dados sobre a ocorrência de *E. sakazakii* relacionado à alimentação artificial de recém nascidos. Em face à importância de um melhor conhecimento sobre a ocorrência desse microrganismo, decidiu-se pela realização da presente pesquisa, visando avaliar a ocorrência do mesmo em fórmulas infantis em pó,

fórmulas reconstituídas, ingredientes adicionais e utensílios utilizados em lactários de hospitais e maternidades da região de Campinas – SP. As condições de preparo das fórmulas infantis reconstituídas nos lactários também foram monitoradas através da avaliação do nível de contaminação microbiológico em amostras de leite de mamadeiras prontas e de utensílios. Adicionalmente, foi realizado um acompanhamento das práticas de manipulação e orientação aos profissionais envolvidos na preparação e alimentação dos recém nascidos, foi apresentado com práticas mais adequadas ao controle desse perigo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Especifico

Avaliar a ocorrência de *Enterobacter sakzarii* em fórmulas infantis em pó, fórmulas reconstituídas, ingredientes adicionais e utensílios utilizados em lactários de hospitais e maternidade da região de Campinas – SP.

2.2. Objetivo Geral

Monitorar à nível microbiológico amostras de mamadeiras prontas e de utensílios utilizados na preparação das mesmas.

Acompanhamento das práticas de manipulação e orientação aos profissionais envolvidos na preparação e alimentação dos recém nascidos, apresentando as práticas mais adequadas ao controle desse perigo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Enterobacter sakazakii* - Taxonomia

Enterobacter sakazakii é uma espécie de bactéria patogênica emergente oportunista, classificada como pertencente à família Enterobacteriaceae, isto é, com morfologia de bastonete Gram negativo, não produtora de esporos, anaeróbia facultativa, fermentadora de glicose e oxidase negativa (BRENNER et al., 2005).

Até 1980 esta enterobactéria foi designada como uma variante da espécie *Enterobacter cloacae* pigmentada de amarelo, quando foi proposta a criação de uma nova espécie (FARMER III et al., 1980). A seguir, são descritas as características típicas da espécie.

3.1.1 Linhagem tipo

American Type Culture Collection (ATCC) cepa 29544, originalmente identificada como CDC 4562-70 (78-067947) (FARMER III, et al., 1980).

3.1.2 Hibridização de DNA-DNA

A linhagem tipo apresenta 83 a 89% de similaridade com outras cepas da mesma espécie, mas apenas 31 a 49% de similaridade com cepas de *E. cloacae* (FARMER III, et al., 1980).

3.1.3 Morfologia das células

Possuem forma de bastonetes com cerca de 3 μ m de comprimento e 1 μ m de diâmetro, móveis por flagelos peritríquios (FARMER III et al., 1980).

3.1.4 Características nutricionais e de crescimento

Este microrganismo utiliza a glicose ou o citrato como únicas fontes de carbono e energia, não apresentando requerimento de vitaminas, aminoácidos ou outros fatores orgânicos de crescimento (FARMER III et al., 1980). Forma capsulas de material polissacarídico, composto de ácido glicurônico (29-32%), D-glicose (23-30%), D-galactose (19-24%), D-frutose (13-22%) e D-manose (0-8%). Sua condição de anaeróbio facultativo permite crescimento sob atmosfera anaeróbia (jarro ou caixa de luvas sem oxigênio). Todas as cepas se desenvolvem 25, 36 e 45°C, outras a 6 e 47°C e nenhuma a 4 ou 50°C (FARMER et al., 1980). A temperatura ótima de crescimento é 37 a 43°C, dependendo do meio de cultura. O tempo de geração a 37°C varia de 14 a 29 minutos, em diferentes meios de cultura e de 19 a 21 minutos em fórmula infantil reconstituída. A 6 e 21°C o tempo de geração é de 13,7 e 1,7h, respectivamente (em fórmula infantil reconstituída) podendo portanto se multiplicarem, ainda que lentamente, sob refrigeração (IVERSEN; LANE; FORSYTHE, 2004).

3.1.5 Características em meios de cultura sólidos à base de peptonas

Como membro da família Enterobacteriaceae, *E. sakazakii* cresce em todos os meios seletivos utilizados para isolamento e contagem de enterobactérias, como o Ágar

MacConkey, o Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB), o Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e outros (IVERSEN; FORSYTHE, 2003). Todas as cepas se multiplicam rapidamente em Ágar Trypticase de Soja (TSA) a 36°C e formam colônias de 2 a 3mm de diâmetro em 24h. À temperatura de 25°C, as colônias geralmente apresentam 1 a 1,5 mm de diâmetro após 24h e aumentam para 2 a 3mm, desenvolvendo uma coloração amarela brilhante em 48h. Essa pigmentação, intensa à 25°C, é muito reduzida sob incubação à temperatura de 36°C e, dentre as outras espécies de *Enterobacter*, somente *E. agglomerans* apresenta características similares. Quando recém isoladas, as cepas apresentam dois ou mais tipos morfológicos de colônias no primeiro repique de purificação por estrias de esgotamento: colônias secas ou mucóides, com bordas imperfeitas, elásticas e difíceis de remover com uma alça ou agulha de inoculação (tipo A) e colônias lisas e fáceis de remover (tipo B). Culturas estoque feitas a partir de colônias tipo A rapidamente convertem ao tipo B. Algumas cepas também produzem colônias lisas com pigmentação muito fraca, difíceis de reconhecer como amarelas (FARMER III et al., 1980).

3.1.6 Características de crescimento em meios líquidos

O crescimento é rápido em Caldo Trypticase de Soja (TSB), passando de 10^4 a 10^9 UFC/ml em uma noite. A massa de células tende a sedimentar e, observado em montagens úmidas com aumento de 440 vezes, o sedimento é similar ao produzido por *Enterobacter agglomerans*, contendo aglomerados de células e massas amorfas (FARMER III et al., 1980). Em Caldo *E. coli* (EC), usado na contagem de coliformes fecais em alimentos, 70 a 90% das cepas produzem gás a partir da fermentação da

lactose a 35°C, mas apenas 58% o fazem a 44,5°C. Esses dados indicam que o microrganismo pode não ser diferenciado nos ensaios que utilizam incubação à temperatura de 44-45°C.

3.1.7 Perfil bioquímico

O perfil bioquímico de *E. sakazakii* relatado na Tabela 1 apresenta algumas características que são típicas de todas as espécies do gênero *Enterobacter*, como positividade para os testes de citrato, Voges Proskauer (VP) e O-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) e testes negativos de produção de H₂S e vermelho de metila (VM). Como membro da família Enterobacteriaceae fermenta a glicose com produção de gás a 35-37°C mas pode não produzir gás a 44,5°C. É estreitamente relacionado à *E. cloacae*, do qual se diferencia, basicamente, pela não fermentação do sorbitol e pela produção de pigmento amarelo. A produção de desoxirribonuclease (DNAse) extracelular é dada como negativa para *E. sakazakii* e *E. cloacae*, de acordo com Brenner e outros (2005) no Bergey's Manual, quando são incubadas a 25°C durante 48h. Farmer III et al. (1980), entretanto, relatam resultado positivo para *E. sakazakii* linhagem tipo (ATCC 29544) após cinco dias de incubação a 25°C e três dias de incubação a 36°C. Segundo esses autores, essa característica é mais forte a 36 °C do que a 25°C e também pode ser utilizada para diferenciar *E. sakazakii* de *E. cloacae*.

Tabela1. Perfil bioquímico de *E. sakazakii*, *E. cloacae* e outras enterobactérias que podem produzir pigmento amarelo e α -glicosidase (Brenner et al., 2005).

Característica ^a	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella planticola</i>
α -glicosidase	96	85	7	25	98	100
Pigmento amarelo	98	0	75	50	1	1
Lisina	0	0	0	85	99	100
Arginina	99	97	0	30	0	0
Ornitina	91	96	0	0	0	0
D-Sorbitol	0	95	30	1	99	92
L-Rhamnose	100	92	85	93	100	100
D-Sacarose	100	97	75	8	100	100
D-Melibiose	100	90	50	100	99	100
Amigdalina	99 ^b	NR	NR	NR	NR	NR
Citrato	99	100	50	0	95	100
Indol	11	0	20	0	99	20
VM	5	5	50	100	20	100
VP	100	100	70	0	95	98
H ₂ S (TSI)	0	0	0	0	0	0
Urease (Christensen)	1	65	20	0	90	98
Motilidade a 36°C	96	95	85	100	0	0
Hidrólise gelatina a 22°C	0 ^c	0	2	0	0	0
Utilização do malonato	18	75	65	85	98	100
Glicerol	15	40 ^c	30	25	99	100
DNase a 25°C	0 ^c	0	0	0	0	0

^a Os números referem-se à porcentagem de cepas positivas após 48h de incubação a 36°C, exceto quando especificada outra condição, NR = Não relatado.

^b Dado da ISO/TS 22964 (2006).

^c Hidrólise da gelatina positiva após 7 dias de incubação, glicerol positivo após 3 dias de incubação, DNase a 25°C positiva após 3 dias de incubação, dado de Farmer III et al. (1980).

Várias outras enterobactérias também podem formar colônias com pigmento amarelo, incluindo *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Enterobacter cowanii*,

Leclercia adecarboxylata, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea stewartii*, *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus* Grupo 5, *Xenorhabdus nematophilus* e 1% das cepas de *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella planticola*. A principal característica que diferencia *E. sakazakii* dessas enterobactérias é a produção da enzima α -glicosidase porque, dentre as espécies que produzem pigmento amarelo, apenas cinco também produzem α -glicosidase: *Escherichia vulneris*, *Enterobacter cowanii*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella planticola*. As principais características dessas espécies também encontram-se sumarizadas na Tabela 1.

3.1.8 Resistência térmica

Iversen; Lane; Forsythe (2004), realizaram uma avaliação da resistência térmica de duas cepas de *E. sakazakii* (linhagem tipo e uma linhagem encapsulada) em Caldo Tripticase de Soja (TSB) e em fórmula infantil reconstituída (Tabela 2). Os resultados estabeleceram valor $D_{58^{\circ}\text{C}}$ na faixa de 1,3 a 3,8 minutos e valor $D_{62^{\circ}\text{C}}$ na faixa de 0,2 a 0,4 minutos, sem diferença significativa entre as linhagens ou entre o TSB e a fórmula infantil reconstituída. O valor z médio, obtido para as duas cepas, foi de $5,7^{\circ}\text{C}$. Esses dados de resistência térmica foram considerados pelos autores como similares aos de outras enterobactérias, como *Salmonella* em leite em pó reconstituído. Utilizando os valores de $D_{60^{\circ}\text{C}}$ (1,1 min) e z ($5,7^{\circ}\text{C}$) os autores fizeram uma previsão do valor D a $71,2^{\circ}\text{C}$, estimado em 0,7 segundos. Com base nessa previsão concluíram que o processo de pasteurização HTST (high temperature short time = $71,7^{\circ}\text{C}/15\text{s}$) é eficaz contra *E. sakazakii*, podendo promover 21 reduções decimais na população alvo.

Tabela 2. Resistência térmica (valor D e valor z) de *Enterobacter sakazakii* (linhagem tipo e linhagem encapsulada) avaliada em Caldo Trypticase de Soja (TSB) e em fórmula infantil reconstituída (IVERSEN; LANE; FORSYTHE, 2004).

Meio	Linhagem	Valor D (min)*			Valor z (°C)*
		58°C	60°C	62°C	
TSB	Tipo	1,3 (0,28)	0,9 (0,17)	0,4 (0,08)	5,6 (0,13)
	Capsulada	1,7 (0,38)	0,2 (0,06)	0,2 (0,13)	5,6 (0,50)
Fórmula infantil	Tipo	2,6 (0,48)	1,1 (0,11)	0,3 (0,12)	5,8 (0,40)
	Capsulada	3,8 (1,95)	1,8 (0,82)	0,2 (0,11)	5,7 (0,12)

*Os dados entre parênteses são desvio padrão.

3.2. *Enterobacter Sakazakii* – Epidemiologia

3.2.1 Doenças

E. sakazakii tem causado vários surtos ou casos esporádicos de sepse, meningite neonatal e enterocolite necrosante (KIM; BEUCHAT, 2005; LEHNER et al., 2005; GURTLER; BEUCHAT, 2005; EDELSON-MAMMEL, et al., 2005; GUILLAUME-GENTIL et al., 2005; IVERSEN; FORSYTHE, 2003). A sepse ou septicemia neonatal é caracterizada por sinais sistêmicos de infecção, acompanhados de hemocultura positiva. O termo septicemia vem sendo abandonado à medida que novos conceitos são definidos, baseados em conhecimentos sobre a fisiopatologia da resposta inflamatória do hospedeiro à infecção. O conceito clínico de sepse, adotado na Conferência dos Membros do Colégio Americano de Patologia Torácica e da Sociedade Americana de Terapia Intensiva (ACCP/SCCM), em 1992, é o de uma resposta

sistêmica à infecção, que se manifesta por duas ou mais condições clínicas: hipo ou hipertermia, taquipnéia e taquicardia e, laboratorialmente, pela presença de anormalidades na contagem de leucócitos no hemograma, não havendo a necessidade da positividade da hemocultura (CECCON et al., 1999). A principal complicação da sepse no recém-nascido é a meningite (CECCON et al., 1999). A enterocolite necrozante neonatal (ECN) é caracterizada por necroses e pneumatoses intestinais, distensão abdominal, vômitos biliosos e hematoquezia, capaz de evoluir para peritonite, pneumoperitonite e choque (ACKER et al., 2001, VIEIRA; LOPES, 2003).

Pouco se sabe sobre os mecanismos específicos de virulência de *E. sakazakii*, mas o microrganismo parece ter uma propensão a infectar o sistema nervoso central, causando meningite, cistos ou abscessos. Retardo do desenvolvimento e hidrocefalia são seqüelas bem reconhecidas (FAO/WHO, 2004).

3.2.2 Casos relatados e fontes de contaminação

Segundo Nazarowec-White e Farber (1997), os dois primeiros casos de meningite neonatal causados por *E. sakazakii* foram relatados por Urmenyi & Franklin, em 1961, embora, nesta época, o microrganismo ainda fosse considerado uma linhagem de *E. cloacae*. Desde então, o número de infecções neonatal tem aumentado em nível mundial e, em muitos casos, a origem do microrganismo é desconhecida. Em um número crescente de relatos, entretanto, as fórmulas infantis em pó têm sido estabelecidas como fonte e veículo das infecções. Várias investigações foram capazes de mostrar associação estatística e microbiológica entre a infecção e consumo de

fórmula infantil em pó, não havendo evidência de transmissão criança - criança ou ambiental (FAO/WHO, 2004). A seguir são descritos em ordem cronológica alguns casos relacionados à infecção por *E. sakazakii*.

Oito casos de meningite neonatal, dos quais dois envolvendo *E. sakazakii*, ocorridos na Holanda, num período de seis anos (1976 a 1982) foram investigados retrospectivamente. Dois pacientes tiveram enterocolite necrosante e meningite simultaneamente. Apesar do tratamento, na maioria dos casos com ampicilina e gentamicina, a taxa de mortalidade foi de 75%. As linhagens eram mais susceptíveis a alguns antibióticos novos como β -lactano do que a ampicilina. O modo de transmissão na maioria dos casos foi pelo canal vaginal (MUYTJENS et al., 1983).

Biering e outros (1989) relataram três casos de infecção neonatal causado por *E. sakazakii*, na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário de Iceland, Geórgia (EUA), no período de 1986 a 1987. Dois bebês que nasceram normais sobreviveram à infecção, porém tiveram lesões cerebrais. O 3º bebê, nascido com Síndrome de Down, morreu devido à má formação do sistema cardíaco. A bactéria foi isolada de amostra do leite em pó utilizado no hospital.

Em dezembro de 1990, dois incidentes de meningite neonatal causados por *E. sakazakii* foram relatados em 2 hospitais canadenses. Em um dos casos, a análise de duas amostras em lata da fórmula, obtidas da casa de uma criança de 1 mês de idade, não mostrou nenhuma contaminação microbiológica. Entretanto, a amostra da lata

original da fórmula tinha sido descartada e não pode conseqüentemente ser avaliada (NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997a).

Lai (2001) relatou cinco casos de infecção nosocomial por *E. sakazakii*, envolvendo uma criança e quatro adultos, ocorridos entre janeiro de 1995 a dezembro de 1996 no Centro Médico da Universidade de Massachusetts, USA. Os casos envolveram hemorragias (três casos) e infecções respiratórias (dois casos), com três mortes, duas comprovadas como decorrentes por *E. sakazakii*.

Acker e outros (2001) descreveram um surto de enterocolite necrosante ocorrido em Bruxelas, Bélgica, entre junho e julho de 1998, com 12 recém nascidos atingidos e duas mortes. *E. sakazakii* foi isolado do estômago, sangue e “swab” anal de seis dos 12 neonatos. Uma revisão no procedimento revelou que 10 dos 12 pacientes foram alimentados oralmente com a mesma marca de fórmula infantil em pó. *E. sakazakii* foi isolada da fórmula em pó (lata aberta e várias outras do mesmo lote) e também das mamadeiras preparadas. A tipagem molecular por RAPD PCR (*arbitrarily primed polymerase chain reaction*) confirmou, embora parcialmente, a similaridade entre as cepas da fórmula infantil e as isoladas dos pacientes. Nenhum outro caso foi observado no mesmo hospital, após a interrupção do uso da fórmula infantil contaminada.

Block e outros (2002) relataram dois episódios de infecção por *E. sakazakii* ocorridos em dezembro de 1999 e janeiro de 2000, na unidade de tratamento intensivo do Hospital Hadassah, Mount Scopus, Jerusalém. O primeiro foi um caso de bacteremia em um bebê prematuro de nove dias, nascido com 620g na 27^a semana de gestação. O

segundo foi um bebê também prematuro, de quatro dias, nascido com 2,115g na 36^a semana de gestação. As duas crianças estavam sendo alimentadas com fórmula infantil e a bactéria não foi encontrada na fórmula infantil em pó, mas sim, nas porções preparadas e no liquidificador usado na preparação.

No Brasil, Barreira e outros (2003) relataram o caso de um bebê de 14 dias, nascido de parto normal com 2,650g, sem antecedentes perinatais e em aleitamento materno exclusivo. A criança foi trazida ao Serviço de Urgência do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP - São Paulo, SP), com hipoatividade, palidez, recusa alimentar e vômitos. No 4^o dia de internação o quadro evoluiu para hipertensão intracraniana, vômitos e grande tensão na fontanela. *E. sakazakii* foi isolado da cultura do líquido (LCR). O recém-nascido evoluiu com quadro de coma arreativo e depressão intensa da atividade elétrica cerebral, que persistiu mesmo após a suspensão de medicação sedativas e anticonvulsivantes. No 13^o dia de internação ocorreu um abaulamento acentuado da fontanela e disjunção das suturas cranianas. A criança evoluiu a óbito no 15^o dia de internação e a origem da infecção não foi determinada.

3.2.3 Taxa de mortalidade

Segundo a FAO/WHO (2004), a taxa de mortalidade por *E. sakazakii* têm sido relatada na faixa de 50% ou maior, mas esse valor tem declinado para <20% nos últimos anos. As seqüelas são significativas entre as crianças atingidas, principalmente as que desenvolveram meningite ou cerebrite. A infecção geralmente responde ao

tratamento com antibióticos, porém, vários autores têm relatado aumento de resistência às drogas comumente usadas no tratamento inicial.

3.3. *Enterobacter sakazakii* – Ecologia

A maioria das cepas de *E. sakazakii* citadas na literatura, até o momento, foram isoladas de espécimes clínicos, incluindo fluído cérebro-espinhal, sangue, medula óssea, saliva, urina, apêndice inflamado, trato intestinal e respiratório, secreção ocular, secreção auricular, feridas e face. (IVERSEN; FORSYTHE, 2003).

O reservatório de *E. sakazakii* é desconhecido em muitos casos, porém, um número crescente de relatos confirma as fórmulas infantis em pó como fonte e veículo de infecções (FAO/WHO, 2004).

3.3.1 *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis.

Formulações infantis em pó, contaminadas foram identificadas como fonte de *Enterobacter sakazakii* (GUILLAUME-GENTIL et al., 2005).

De acordo com Edelson-Mammel e outros (2005), as formulações infantis desidratadas, normalmente apresentam estabilidade microbiológica embora não sejam considerados alimentos estéreis, uma vez que estão em embalagens fechadas, podendo permanecer estáveis até a data de validade. Esses mesmos autores, estudando a sobrevivência de *E. sakazakii* em formulações infantis desidratadas relataram que, embora a maioria das células desse patógeno tenha sido inativada pela

estocagem na formulação desidratada, uma parte dessas células se mostrou altamente resistente às condições de estocagem nesse ambiente, tendo sobrevivido durante 2 anos.

Um levantamento feito por Muytjens e outros (1988) em 141 amostras de fórmulas infantis em pó, originadas de 28 países, revelou a presença de membros da família *Enterobacteriaceae* em 52,5%. As espécies mais freqüentemente encontradas foram *Enterobacter agglomerans* (em 35 amostras), *Enterobacter cloacae* (em 30 amostras), *Enterobacter sakazakii* (em 20 amostras) e *Klebsiella pneumoniae* (em 13 amostras). A contagem desses microrganismos foi menor do que 1UFC/100g em 78% das amostras e as maiores contagens observadas foram de 92UFC/100g para *E. cloacae* e 66UFC/100g para *E. sakazakii*.

Nazarowec-White e Farber (1997a) avaliaram 120 amostras de fórmulas infantis de 3 diferentes fabricantes do Canadá, detectando *E. sakazakii* em 6,7% das amostras. A contagem mais freqüentemente encontrada foi de 0,36UFC/100g.

Heuvelink e outros (2001) avaliaram a presença de *E. sakazakii* em 40 amostras de fórmulas infantis e 170 amostras de leite em pó, detectando a bactéria em 1 amostra de fórmula infantil em pó e em 7 amostras de leite em pó.

De acordo com a FAO/WHO (2004) e Guillaume-Gentil e outros (2005), esses dados indicam um nível de contaminação das fórmulas infantis por *E. sakazakii* baixo mas, ainda assim, de alto risco, devido a capacidade de multiplicação no intervalo entre

a preparação e o consumo do produto reconstituído. Com base nas conclusões preliminares da análise de risco microbiológico (risk assessment), a inclusão de uma etapa letal no momento do preparo e a redução do intervalo entre a reconstituição e o consumo, reduzem o risco (FAO/WHO, 2004). Iversen e Forsythe (2003), que estimaram a dose infectante em 1.000 células, destacam também a importância da higiene dos utensílios usados na preparação, como liqüidificadores, por exemplo. Segundo esses autores, considerando a baixa contagem de *E.sakazaki* no produto em pó (0,36UFC/100g na maioria dos relatos) e o tempo necessário para que essa contagem alcance a dose infectante no produto reconstituído, é muito mais provável que focos do microrganismo nos utensílios sejam a principal fonte de contaminação das mamadeiras e porções servidas. De fato, na investigação de vários surtos e casos esporádicos, o microrganismo foi isolado dos liqüidificadores, frascos, escovas de limpeza e outros itens do ambiente de preparação (KANDHAI et al., 2004). Outro fator que favorece a formação de focos de contaminação é o fato de *E. sakazakii* produzir estruturas chamadas cápsulas. O material das cápsulas é uma goma muito firme e aderente, que facilita a formação de biofilme e dificulta a limpeza e a desinfecção. Estudos de Iversen; Lane e Forsythe (2004) demonstraram que uma linhagem encapsulada de *E. sakazakii* foi capaz de formar densos biofilme em látex, silicone e policarbonato, com contagem mediana de $6,0 \times 10^3$ UFC/cm². Em aço inoxidável a contagem foi de 50UFC/cm². Esses autores também demonstraram que os biofilmes formados pela linhagem tipo de *E. sakazakii* são menos densos do que os formados pela linhagem encapsulada, com uma contagem mediana na faixa de 20 a 400UFC/cm² em látex, silicone e policarbonato.

3.3.2 *Enterobacter sakazakii* nos ingredientes de fórmulas infantis

Nos ingredientes usados na formulação de alimentos infantis (leite em pó, amido, lactose, sacarose, lecitina, vitaminas), a FAO/WHO (2004) destaca que vários destes apresentam alto risco de conter Enterobacteriaceae (amido, por exemplo), enquanto outros não (óleos, por exemplo). Um levantamento apresentado nessa publicação pode ser visto na Tabela 3, onde o amido e a lactose foram os mais freqüentemente contaminados com enterobactérias e *E. sakazakii*.

Tabela 3. Presença de Enterobacteriaceae e *E. sakazakii* em ingredientes usados em formulações infantis em pó (FAO/WHO, 2004).

Ingrediente	n (10g)	Coliformes ou <i>Enterobacteriaceae</i> positivos	<i>E. sakazakii</i> positivos
Vitaminas	793	8 (1,0%)	0
Leite em pó	835	1 (0,1%)	1 (0,1%)
Sacarose	1691	28 (1,65%)	0
Lactose	2219	70 (3,15%)	2 (0,09%)
Lecitina	136	1 (0,7%)	1 (0,7%)
Amido	1389	155 (11,16%)	40 (2,88%)
Total	7063	263 (3,7%)	44 (0,6%)

3.3.3 *Enterobacter sakazakii* em outros alimentos

Além das fórmulas infantis e seus ingredientes, Iversen e Forsythe (2003) destacam alguns relatos de isolamento de *E. sakazakii* em queijo, pão fermentado, tofu, chá azedo, carnes curadas, carne moída, lingüiça e pão tipo Khamir (o organismo faz parte da microbiota superficial da semente de sorgo e também da semente de arroz). Considerando que *E. sakazakii* não faz parte da microbiota normal do homem e outros animais, é provável que o solo, a água e os vegetais sejam as principais fontes de contaminação dos alimentos e que ratos e moscas sejam fontes adicionais de contaminação (IVERSEN; FORSYTHE, 2003). Ainda segundo os autores, é plausível supor que o organismo ocorra em uma variedade maior de alimentos, porém, até o momento, não há estudos detalhados que comprovem isso. Destacam, entretanto, que a eficiência dos métodos de isolamento ainda não foi comprovada e que os levantamentos existentes provavelmente subestimam a prevalência e a concentração de *E. sakazakii* nos alimentos.

3.3.4 *Enterobacter sakazakii* no meio ambiente

No ambiente pouco se sabe sobre a presença de *E. sakazakii* (NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997b). Muytjens e Kollée (1990) não conseguiram isolar este microrganismo de diversas fontes como águas superficiais, solo, lodo, fezes de pássaro, roedores, animais domésticos e gado.

Kandhai e outros (2004), ao contrário, analisando 147 amostras do ambiente de vários tipos de indústrias de alimentos, detectaram *E. sakazakii* em 35 amostras (24%), conforme mostrado na Tabela 4. O microrganismo foi encontrado em quase todos os ambientes industriais e domésticos e a análise estatística mostrou não haver diferença significativa na proporção de amostras positivas entre os ambientes. Segundo os autores, esses dados são uma forte indicação de que *E. sakazakii* é um microrganismo amplamente distribuído no ambiente doméstico e nas indústrias alimentícias.

Tabela 4. Presença de *E. sakazakii* em amostras do ambiente doméstico e industrial (KANDHAI et al., 2004).

Origem	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas para <i>E. sakazakii</i>
Fabrica de leite em pó	23	2 (8,7%)
Fabrica de leite em pó	26	9 (34,61%)
Fabrica de leite em pó	11	1 (9,1%)
Fabrica de leite em pó	8	2 (25%)
Fábrica de chocolate	8	2 (25%)
Fábrica de cereais	9	4 (44,44%)
Fábrica de farinha de batata	15	4 (26,66%)
Fábrica de massas	26	6 (23,1%)
Fábrica de condimentos	5	0
Ambiente doméstico	16	5 (31,25%)
Total	147	35 (24%)

Segundo Muijtjes e outros (1988), o habitat natural de *E. sakazakii* e o modo de transmissão deste organismo são ainda desconhecidos. Hamilton e outros (2003) isolaram esse microrganismo do intestino de larvas da mosca dos estábulos (*Stomoxys*

calcitrans), amplamente encontrada em locais de criação de animais, particularmente o gado. As larvas foram criadas em laboratório (a partir de moscas isoladas de fazendas em North Wales, Reino Unido) e as culturas de *E. sakazakii* foram isoladas a partir da transferência direta dos intestinos para placas de Petri com meio de cultura. Esse resultado, segundo os autores, demonstra que a mosca é um reservatório ambiental da bactéria e levanta a possibilidade de que a contaminação por insetos seja uma forma importante de disseminação.

3.3.5. Fórmula infantil em pó

Os substitutos do leite humano para lactentes foram desenvolvidos a partir do leite de vaca e de outros mamíferos ou da soja, por meio de uma variedade de modificações, estando atualmente disponíveis várias formulações infantis. Os progressos deveram-se especialmente ao melhor entendimento da composição do leite materno, pois o avanço das fórmulas foi em direção à sua equiparação ao leite humano. Atualmente, pediatras e nutricionistas podem escolher a fórmula mais adequada à necessidade de seu paciente, com o objetivo preventivo ou terapêutico, da qual um ou mais constituintes foram removidos, modificados ou substituídos (CARVALHO; BERNAL, 2003).

Acredita-se que a alimentação do primeiro ano de vida influencia no crescimento e no desenvolvimento da criança, na incidência de doenças gastrointestinais, respiratórias e alérgicas na infância e, possivelmente, no metabolismo e na saúde até a vida adulta (CARVALHO; BERNAL, 2003). As infecções que ocorrem ao longo do

primeiro ano de vida, são as causas mais importantes de elevação dos índices de morbi-mortalidade entre os lactentes. A frequência e a severidade destas infecções por bactérias Gram- negativas, influenciadas pela imaturidade do sistema imunológico, são uma peculiaridade desta faixa etária (NOVAK et al., 2001). Assim, a segurança e a eficácia das fórmulas necessitam ser bem avaliadas. Na impossibilidade da manutenção do aleitamento materno, a alimentação da criança deve ser balanceada, composta por quota energética, macro e micronutrientes adequados. A melhor opção é o leite modificado, de acordo com os padrões do Códex Alimentarius FAO/OMS, pois permite uma nutrição adequada, na medida em que fornece um alimento completo e semelhante ao leite materno. Os substitutos do leite humano para lactentes foram desenvolvidos a partir do leite de vaca e de outros mamíferos ou de soja, por meio de uma variedade de modificações, estando atualmente disponíveis várias fórmulas infantis (CARVALHO; BERNAL, 2003).

3.4 Análise de Risco

Nos últimos anos, tem sido recomendado pelos organismos internacionais competentes que o sistema de segurança alimentar nos países seja baseado em análise de risco. A análise de risco é um processo com três componentes: avaliação de risco; gerenciamento do risco e comunicação do risco (TANIWAKI, 2003). Os conceitos de segurança precisam ser construídos dentro do desenvolvimento de produtos, por exemplo, por meio de implementação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FORSYTHE, 2002).

Na avaliação de risco deve-se identificar a natureza do perigo (*hazard identification*); caracterizar o perigo (*hazard characterization*), determinando quão tóxica é a substância ou qual é o comportamento do microrganismo no alimento, doenças provocadas, dose infectante e outras características relevantes na transmissão de doenças, determinar a taxa de exposição da população a esse perigo (*exposure assessment*), determinando-se quanto está sendo consumido e caracterizar a seriedade do risco (*risk characterization*), ou seja, estimar a probabilidade de ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) (TANIWAKI, 2003).

A presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é resultante de uma complexa interação de fatores que envolvem o patógeno em si e o alimento que irá veiculá-lo, que podem atuar para ampliar ou atenuar a contaminação e os níveis de multiplicação destes microrganismos. Entre estes fatores, estão o processamento, a distribuição, o consumo e a imunidade da população (NERO, 2005).

De acordo com a WHO (2004), *E. sakazakii* e as salmonelas entéricas estão na categoria "A" porque ambos são comprovadamente causadores de doença nos infantes (por exemplo, infecção sistêmica, enterocolite necrosante (NEC) e diarreia severa) e foram encontrados na fórmula infantil em pó. A fórmula infantil em pó contaminada foi mostrada de maneira convincente como sendo o veículo e a fonte da infecção nos infantes.

Em setembro de 2004, o painel científico dos riscos biológicos (painel BIOHAZ) da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESAs) emitiu um parecer sobre os riscos microbiológicos nas fórmulas para lactentes e fórmulas de transição. O

referido painel concluiu que *Salmonella* e o *E. sakazakii* são os microrganismos que mais preocupação suscitam nas fórmulas para lactentes, nas fórmulas destinadas a fins medicinais específicos e nas fórmulas de transição (REGULAMENTO CE, nº 2373/2005).

De acordo com WHO (2004), devido à fórmula infantil em pó ser uma fonte de nutrição para muitas crianças ela se torna um risco, devido a um número muito grande desse alimento ser consumido. Assim há uma pequena possibilidade de um único organismo na fórmula infantil em pó reconstituído poder causar a doença.

No Brasil, avaliações de risco são difíceis de serem realizadas devido à escassez de dados, principalmente os epidemiológicos. Recentemente, observa-se um grande esforço do Ministério da Saúde, e em especial das Secretarias de Saúde Estaduais e Municipais, no sentido de monitorar de maneira mais eficiente os surtos de origem alimentar que ocorrem no país, além de compilar e disponibilizar os dados observados. Os dados relativos aos perigos, ou seja, os microrganismos patogênicos de relevância nos diversos alimentos, também são inadequados, pois eles necessitam ser quantitativos. Informações sobre presença ou ausência de um patógeno não são suficientes para uma avaliação de risco quantitativa, sendo necessário conhecer os níveis de contaminação com microrganismos caracterizados como perigos (NERO, 2005).

3.4.1 População de risco

De acordo com a FAO/WHO (2004), *E. sakazakii* já provocou doenças em indivíduos de todas as faixas etárias, porém, a distribuição de casos relatados indica crianças com menos de 1 ano de idade como o principal grupo de risco. Dentre essas, as imunocomprometidas e as recém nascidas (menos de 28 dias de vida) são as mais susceptíveis, particularmente as prematuras ou as que nascem com menos de 2,5kg. O estômago dos recém nascidos, especialmente os prematuros, é menos ácido do que o de adultos, o que parece ser um fator importante na sobrevivência de *E. sakazakii* e no desenvolvimento das infecções. De acordo com Ottoni (1994) o prematuro apresenta menor capacidade digestiva, com déficit de enzimas e menor proteção da barreira ou maior permeabilidade da mucosa.

3.4.2 Dose infectante

A caracterização do risco é a interação entre as avaliações de exposição e de dose-resposta, que permitem a estimativa da probabilidade dos consumidores estarem sujeitos à infecção, morbidade, mortalidade ou qualquer outra resposta biológica, frente ao perigo inicialmente caracterizado (ICMSF, 2002).

Devido à limitação de informações sobre o número de organismos aos quais os pacientes foram expostos, ainda não foi possível desenvolver uma curva dose-resposta para este patógeno (GUILLAUME-GENTIL et al., 2005; FAO/WHO, 2004). Iversen;

Forsythe (2003) consideram razoável estimar a dose infectante na faixa de 1.000 células por grama ou ml.

É importante lembrar que a resposta que o organismo humano possui frente a diferentes quantidades de patógeno é variável, dependendo da virulência do patógeno, quantidade de microrganismos ingerida, condição imunológica do consumidor e características próprias do alimento que podem influenciar no comportamento do consumidor (ICMSF, 2002).

3.4.3 Exposição ao risco

É muito difícil estimar em uma base global a porcentagem de todos os infantes que recebem um dos produtos sob a consideração. Por um lado isso se deve às taxas variáveis de amamentação (materna) em populações diferentes e, por outro lado a disponibilidade dos produtos em diferentes partes do mundo.

De acordo com a WHO (2004) há uma decadência de informação referente à contaminação da fórmula infantil em pó vendida em países em desenvolvimento, e até o presente, não há ainda dados confirmatórios de pesquisas e nem provas da doença resultante do consumo da fórmula infantil em pó contaminada em países em desenvolvimento. Entretanto, se não houver nenhum estudo sobre o produto utilizado nesses países em desenvolvimento relatando a contaminação, os riscos potenciais da contaminação não poderão ser gerenciados fora do país. Por outro lado, os dados

obtidos em diferentes relatórios dos países desenvolvidos mostram que existem certas marcas comerciais de fórmulas infantis em pó contaminadas.

3.5 Principais Microrganismos em Fórmulas Infantis Reconstituídas

O leite, é considerado a nível mundial, como parte integrante de dietas de crianças e idosos, merecendo por isso uma atenção especial. Devido a sua composição e fatores intrínsecos, é um substrato líquido rico em nutrientes, sendo, por isso, muito perecível e alvo de ataque microbiano (ICMSF, 2002).

Entre os principais microrganismos relevantes em saúde pública, que utilizam o leite como veículo de toxinfecção alimentar, podemos citar as bactérias, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, e *Escherichia coli*, entre outros.

3.5.1 *Bacillus cereus*

As bactérias esporuladas estão entre as principais responsáveis por problemas de deterioração na indústria de alimentos, sendo que as do gênero *Bacillus* são amplamente disseminadas no ambiente, podendo contaminar matérias-primas e alimentos processados, provocando diferentes tipos de alterações (CARDOSO, 2000).

B. cereus é uma bactéria móvel, tendo algumas espécies imóveis também, Gram positivo, aeróbio, produtor de esporos, da família Bacillaceae encontrado na poeira, no ar e na água (HILLIARD; SCHELONKA; WAITES, 2003) sendo o solo o seu reservatório natural. Pode causar duas formas distintas de gastroenterite: a síndrome diarréica e a

síndrome emética (FRANCO; LANDGRAFF, 1996). Nos últimos anos tem havido aumento potencializado como patógeno oportunista em imunocomprometidos, doentes críticos, e pacientes debilitados (HILLIARD, SCHELONKA; WAITES, 2003).

O controle de *B.cereus* no processamento de produtos lácteos, pode apresentar dificuldade devido à sua capacidade de esporulação e por ser um contaminante potencial do leite e do ambiente. A característica hidrofóbica dos esporos pode promover a formação de biofilmes nas superfícies de contato com alimentos, de difícil remoção pelos procedimentos de higienização (ANDERSON; RONNER; GRANUN, 1995). A pasteurização, não é suficiente na eliminação deste patógeno (esporos termorresistentes). Muitas cepas de *B. cereus* se apresentam com características psicrótróficas, tornando possível o crescimento deste microrganismo em temperaturas baixas como na faixa de 4 a 6°C, sendo também produtoras de enterotoxinas nessas temperaturas (DUFRENNE et al., 1995; 1994). No período de 1986 a 1989, ocorreram surtos de intoxicação por *B. cereus* na Espanha e na Holanda, cujas cepas cresceram a 7°C e não na sua temperatura usual de microrganismo mesófilo (Van NETTEN et al., 1990).

Anderson; Ronner e Granun (1995) mostraram que de 60-80% das cepas de *B. cereus* isoladas do leite e seus derivados, são capazes de produzir enterotoxina.

3.5.2 *Staphylococcus aureus*

Atualmente são descritas 32 espécies de estafilococos, destas, cinco são capazes de produzir uma enzima extracelular, a coagulase. Entre eles, estão o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hicus* e *Staphylococcus intermedius*. Das espécies denominadas de estafilococos coagulase positiva (ECP), *S. aureus* é a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de produzir enterotoxinas (SILVA; GANDRA, 2004).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, quando visualizados em microscópio, aparecem em formas de cachos de uva, imóveis e não formadores de esporos.

Acredita-se ser necessária entre 10^5 e 10^6 UFC/g de *S. aureus* em alimentos para que a enterotoxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar (FRANCO; LANDGRAFF, 1996).

O *S. aureus* é muito resistente a temperaturas de congelamento, sobrevivendo em alimentos estocados até -20°C . Ele não resiste a temperaturas de pasteurização, porém é capaz de produzir toxinas altamente estáveis ao aquecimento (CARVALHO, 2003).

A distribuição do *S. aureus* é ubíqua, sendo o microrganismo encontrado no ar, poeira, água e superfícies de ambientes e equipamentos. Os humanos (cavidade nasal,

cavidade orofaríngeana, cabelo, pele e ferimento) e os animais (principalmente o rebanho mastítico) constituem os reservatórios primários deste agente patogênico, motivo pelo qual os manipuladores de alimentos são a principal fonte de contaminação alimentar (ICMSF, 1998).

3.5.3 Coliformes totais e termotolerantes a 45°C

O grupo dos coliformes totais corresponde aos membros da família Enterobacteriaceae capazes de fermentar a lactose com produção de gás após incubação a 35° C durante 24 a 48 horas (SILVA et al., 2005). Em alimentos processados, a presença de um número considerável de coliformes totais ou de outros membros da família Enterobacteriaceae, indicam processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, provenientes da matéria-prima, de equipamento sujo, ou manipulação sem cuidados de higiene, e indica também proliferação microbiana que poderia permitir a multiplicação de microrganismos patogênicos e toxigênicos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os coliformes termotolerantes diferenciam-se dos demais membros do grupo coliforme pela capacidade de também fermentar a lactose com produção de gás à temperatura de 45°C em período de 24h. Dentre os coliformes termotolerantes estão incluídas espécies de pelo menos três gêneros do grupo coliforme: *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia*. Como *Enterobacter* e *Klebsiella* podem apresentar cepas de origem não fecal, a presença de coliformes termotolerantes em água e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração

direta de *E. coli*, porém, muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, dada à elevada incidência de *E. coli* dentre os coliformes termotolerantes (SILVA, et al., 2005). Assim sendo, o termo coliforme fecal, utilizado há décadas, não deve ser usado como correspondente a coliforme termotolerante, porém pode ser empregado alternativamente quando da identificação até *E. coli*.

3.5.4 *Salmonella* sp

A fórmula infantil em pó reconstituída é provavelmente um veículo comum de transmissão de salmonelose em crianças, dado seu papel principal na dieta infantil, mas a contaminação da fórmula é mais provável ocorrer devido ao ambiente de preparação do que do processo de fabricação. A ocorrência de surtos devido à contaminação intrínseca da fórmula infantil em pó parece ser rara (WHO, 2004).

Salmonella sp é também um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae. A maioria das espécies são móveis por flagelos peritríquios, porém algumas são imóveis, como *Salmonella* Galinarum e *Salmonella* Pullorum, a maioria reduz nitrato a nitrito (BRENER, 1984). Fermentam glicose geralmente produzindo gás, mas não lactose e sacarose, produz H₂S, são oxidase negativa e catalase positiva (ICMSF,1998). O valores de pH e temperatura ótimos para multiplicação de *Salmonella* são próximos à pH 7,0 e 35-37°C, respectivamente. As doenças causadas por *Salmonella* são divididas em três grupos: febre tifóide (causadas por *Salmonella* Typhi), febre entérica (causadas por *Salmonella* Paratyphi) e as enterocolites ou samoneloses, (causadas pelas demais salmonelas).

O gênero *Salmonella* é extremamente heterogêneo, compreendendo quase 2000 sorotipos, dos quais alguns são patogênicos ao homem. Sendo comumente encontrado no trato intestinal de animais, especialmente aves e suínos, as fontes ambientais deste microrganismo incluem a água, o solo, os insetos, as superfícies de cozinhas e indústrias, as fezes de animais e as carnes, aves e frutos do mar crus. Outros alimentos associados à *Salmonella* sp são ovos, leite e seus derivados, coco ralado, molhos, saladas, misturas para bolo, sobremesas recheadas com creme, gelatina em pó, manteiga de amendoim e chocolate (CARVALHO, 2003). Em relação aos laticínios a contaminação é quase sempre causada por leite cru ou inadequadamente pasteurizado (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Salmonella sp é o principal agente de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Brasil, tendo respondido por 21% do total de casos relatados e 76% dos surtos provocados por bactérias, no período de 1995 a 1999. Também nos países desenvolvidos ocupa o primeiro lugar, só nos Estados Unidos respondendo por 54,5% dos surtos e 46,4% das mortes provocadas por bactérias, no período de 1993 a 1997 (KUSHIDA, 2005).

3.6 Microrganismos aeróbios mesófilos como indicadores de condições higiênicas sanitária nas fórmulas reconstituídas

A contagem de mesófilos aeróbios em placas é comumente utilizada para determinar a carga microbiana geral do alimento e não organismos específicos (FORSYTHE, 2002).

Mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações nas condições organolépticas do alimento, um número elevado de microrganismos indica que o alimento é insalubre (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

3.7 Potabilidade da água utilizada nos lactários

3.7.1 Contagem de microrganismos heterotróficos

A contagem de microrganismos heterotróficos, também conhecida como contagem padrão em placas, é um procedimento que objetiva estimar o número de microrganismos aeróbios mesófilos totais na água, particularmente como uma ferramenta para acompanhar variações nas condições de processo, no caso das águas minerais, ou a eficiência das diversas etapas de tratamento, no caso de águas tratadas. Permite ainda verificar as condições higiênicas em diferentes pontos da rede de distribuição (SILVA et al., 2005).

3.7.2 Coliformes Totais e *E. coli* em água pelo método do substrato cromogênico

Cerca de 95% dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais são *E. coli* e, dentre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. Por esse motivo, as tendências atuais direcionam no sentido da detecção específica de *E. coli*, com desenvolvimento de diversos métodos que permitem a enumeração rápida dessa espécie diretamente (SILVA et al., 2005).

O substrato cromogênico é um método cultural baseado na adição de um substrato definido seletivo e diferencial à 100ml da amostra, em que o exato balanceamento entre todos os componentes garante a especificidade do resultado. No caso o Colilert (IDEXX) é um método oficialmente recomendado pela *American Water and Wastewater Association* – AWWA (EATON; CLESCERI; GREENBERG, 1995). Após a incubação, a presença de coliformes totais é detectada através do desenvolvimento de uma cor amarela, resultante da clivagem do orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG). Este é um substrato cromogênico para a enzima β -galactosidase, produzida pelos coliformes totais e constituinte do complexo enzimático responsável pela fermentação da lactose. A presença de *E. coli* é detectada através do desenvolvimento de fluorescência azul sob luz ultra violeta, decorrente da clivagem do 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo (MUG), que é um composto não fluorescente, utilizado como substrato para a enzima β -glicuronidase, caracteristicamente produzida por *E. coli* (96% das cepas). Quando o MUG é degradado pela β -glicuronidase, o

produto resultante(4-metilumbeliferona) é fluorescente sob luz UV (EATON; CLESCERI; GREENBERG; 1995).

3.8 Sistema Bax® para detecção de *Enterobacter sakazakii*

As técnicas associadas à biologia molecular e à engenharia genética progrediram muito desde a década de 50, quando o DNA teve sua estrutura descrita. O avanço foi tão grande que em pouco tempo, pouco mais de 50 anos, suas aplicações práticas já permeiam o nosso cotidiano. A descoberta da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) faz parte desse progresso, sendo que o mais novo avanço tecnológico partiu da própria PCR, gerando a PCR em Tempo Real (NOVAIS; ALVES; SILVA, 2004).

O sistema BAX® é um sistema automatizado de detecção de bactérias patogênicas em alimentos baseado no DNA. Reduz o problema de contaminação, já que reúne, em um único tablete estável, os reagentes necessários para a PCR, protegido dentro dos tubos de análises, além de reduzir o potencial de erros causados pelo operador técnico (KUSHIDA, 2005).

O sistema BAX® combina velocidade e facilidade de utilização com desempenho, fornecendo resultados confiáveis, de maneira rápida e precisa. Os métodos de análises tradicionais são baseados no comportamento bacteriano, como as características fenotípicas ou resposta de anticorpos, os quais podem apresentar problemas com reatividade cruzada dos organismos relacionados. No entanto, o sistema BAX® DNA

alvo que é específico encontrado apenas no organismo que se queira detectar. O sistema BAX[®] foi o primeiro método de análise a usar a tecnologia de Reação de Polimerase em Cadeia (“**P**olymerase **C**hain **R**eaction” - **PCR**), de forma automatizada e em tempo real, que rapidamente replica um único fragmento de DNA presente na amostra, em milhões de cópias dessa molécula alvo (DUPONT QUALICON, 2000).

O método da PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA, utilizando enzima DNA-polimerase, a mesma que participa da replicação do material genético nas células. Esta enzima sintetiza uma seqüência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento (o iniciador, ou *primer*) já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para início da síntese. Os iniciadores definem a seqüência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada seqüência DNA com bilhões de cópias (NOVAIS; ALVES; SILVA, 2004).

A técnica de PCR é considerada confirmativa, pois está baseada na amplificação de regiões específicas do DNA do patógeno, que é exclusiva, não exigindo confirmação posterior (KUSHIDA, 2005).

Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada de PCR em Tempo Real, vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e na coleção da emissão e um

computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação (NOVAIS; ALVES; SILVA, 2004).

O método do Sistema Bax® requer um pré-enriquecimento da amostra a 45°C por 24h. A partir do pré-enriquecimento 10µl são coletados e adicionados a tubos de Eppendorf contendo 500µl de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 35°C/3h, dando início ao “regrow”.

As instruções de uso do Sistema Bax® segue descrita da Figura 1 a 10.

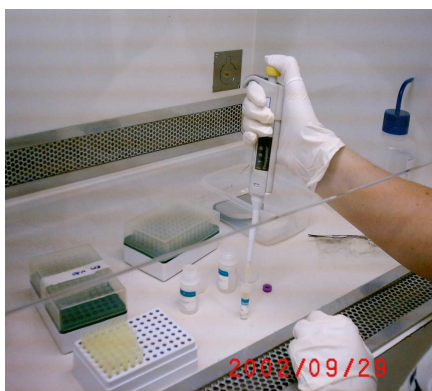


Figura 1: Tampão de lise

O tampão de lise, Figura 1, é preparado adicionando 150µl da protease ao frasco com 12mL de solução tampão, que é por sua vez é distribuído na quantidade de 200µl em tubos Eppendorf estéreis. O início da lise começa com a transferência de 5µl do conteúdo do “regrow” em 200µl do tampão de para extração do DNA em bloco aquecedores.



Figura 2: Bloco de Aquecimento

Nos blocos aquecedores, Figura 2, ocorrem as duas etapas da lise: a primeira ocorre a 37°C por 20 minutos, nesse período ocorre o rompimento da parede celular; a segunda etapa ocorre a 95°C por 10 minutos onde ocorre a liberação do DNA. Para interromper esse processo enzimático, os tubos são colocados no bloco de resfriamento.

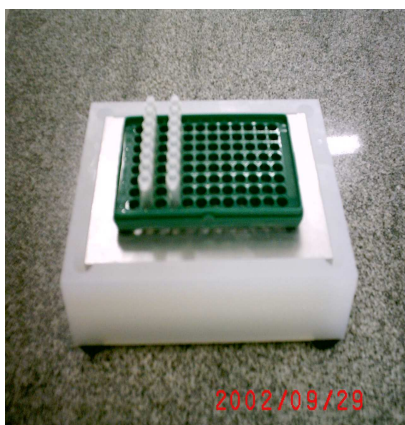


Figura 3: Bloco de resfriamento

O bloco de resfriamento, Figura 3, serve para interromper o processo enzimático. Os tubos são adicionados no bloco e ficam ali por 5 minutos. Acabando esse processo a amostra esta lisada.



Figura 4: Tubos de Eppendorf

Volume de 50 μ l do material lisado são adicionados nos tubos de Eppendorf (Figura 4) contendo os tabletes de PCR (primers + nucleotídeos + Taq DNA polimerase + corante SYBR® GREEN) e fechados com tampas ópticas que acompanham o Kit. Todo esse procedimento não deve passar de 5 minutos para serem colocados no termociclador.



Figura 5: Termociclador

Os tubos de Eppendorf devem estar bem fechados com a tampa ótica para que não se abram durante o processo. Se isso ocorrer pode espalhar aerossóis e líquidos pelo laboratório. Todo procedimento do sistema deve ser feito utilizando-se luvas de nitrila, a qual não contém talco, evitando o entupimento dos canais da passagem da luz durante a amplificação do DNA no termociclador (Figura 5).

No termociclador ocorre uma seqüência de 38 ciclos totalizando 3 horas e meia para obtenção dos resultados. Durante esse período ocorre o aquecimento das amostras à temperatura entre 90-95°C por alguns segundos ocasionando a separação das fitas de DNA; o aleamento dos *primers* ocorre com o resfriamento a 55°C; a elevação da temperatura até 75°C permite a síntese de DNA por meio da adição dos nucleotídeos por ação da Taq DNA polimerase, completando o ciclo.

Na Figura 6, cada tablete de PCR do sistema BAX[®] contém corantes fluorescentes, que se intercalam com o DNA e emitem um sinal fluorescente em resposta à luz. Após a amplificação, o sistema BAX[®] começa a fase de detecção onde o sinal fluorescente é medido. Durante a detecção, a temperatura das amostras é aumentada gradativamente até o ponto onde as fitas de DNA se separam (desnaturação), liberando o corante e o sinal fluorescente atinge o seu nível mínimo. Esta alteração na fluorescência pode ser plotada contra a temperatura para gerar uma curva de fusão que é interpretada pelo software do sistema BAX[®]. Este método de detecção foi otimizado e é exclusivo para uso em análises com o sistema BAX[®].

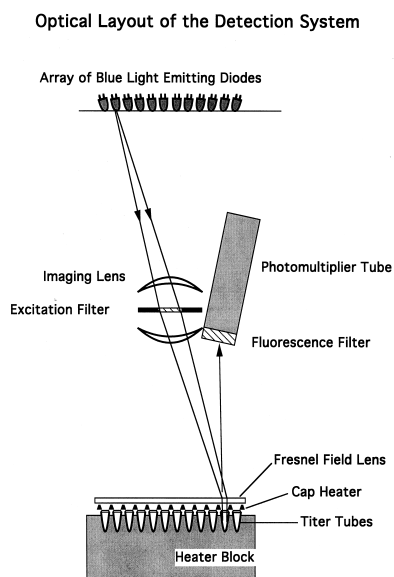


Figura 6. Leitor óptico

O corante SYBR® Green se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR® Green. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green se ligam ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa da desnaturação do DNA, as moléculas do SYBR® Green são liberadas e há queda no sinal de fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado. Após o término dos ciclos aparecerá na tela do computador símbolos com os resultados finais das

patógeno em questão, já o vermelho indica amostra positiva, o amarelo com um ponto de interrogação indica amostra indeterminada e o amarelo com um ponto de interrogação e uma linha diagonal vermelha indica erro de sinal.





	Verde (-)
	Vermelho (+)
	Amarelo (?)
	Amarelo (?) com faixa vermelha

Figura 7: Símbolos

Quando *E. sakazakii* estiver presente com predominância, a curva de fusão do padrão apresentará gráfico com um pico elevado em 87° C (Figura 8), sendo utilizado quase que totalmente, indicando a intensidade da carga microbiana do patógeno em questão. Em níveis ainda mais elevados do alvo, o pico de controle pode ser muito pequeno ou ausente.

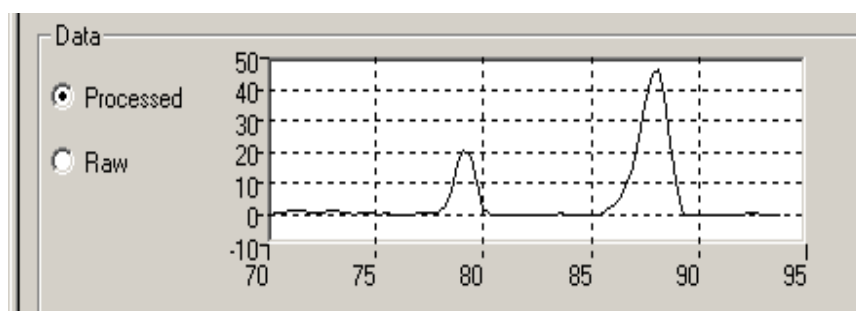


Figura 8: Curva de fusão do padrão fortemente positiva

Quando a amostra for fracamente positiva o pico alvo será menor, e a curva padrão será pouco utilizada, seu pico de fusão continuará em 87°C, Figura 9.

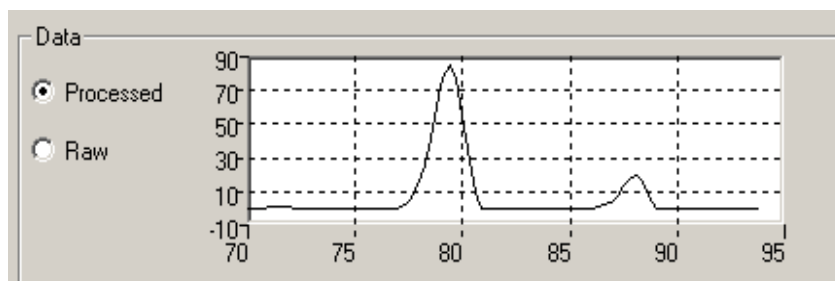


Figura 9: Curva de fusão do padrão fracamente positiva

Quando a amostra for negativa não haverá picos alvo e a curva de fusão será negativa, Figura 10.

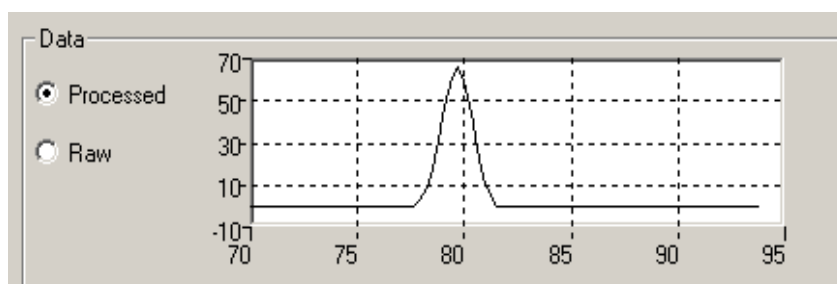


Figura 10: Curva de fusão negativa

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material utilizado

4.1.1. Meios de Cultura

4.1.1.1. Caldo Lauril Sulfato Triptose modificado suplementado com Vancomicina-mLST-V

Caldo Lauril Sulfato Triptose – LST, reidratado segundo as instruções do fabricante (Difco 224150), adicionado de 29,22g de NaCl (Synth C1060.01 AG) por litro e suplementado com 1mL da solução de vancomicina (ABL 0657) concentração de 10mg.

4.1.1.2. Caldo de Enriquecimento de Enterobactérias – EEB

Preparado de acordo com as instruções do fabricante (OXOID CM317)

4.1.1.3. Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose - VRBGA

Preparado de acordo com as instruções do fabricante (OXOID CM 0107 - Violet Red Bile Agar), suplementado com 1% de Glicose.

4.1.1.4. ÁgarTrypticase de Soja – TSA

Preparado de acordo com as instruções do fabricante (MERCK 1.05459.0500), suplementado com 15g de ágar para cada 1000mL.

4.1.1.5. Ágar Padrão para Contagem - PCA

Preparado de acordo com as instruções do fabricante (Acumedia 7157A - Standard Methods Agar).

4.1.1.6. Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina - MYP

Preparado de acordo com as instruções do fabricante (Difco 281010 - Mannitol-Egg Yolk – Polymyxin Ágar).

4.1.1.7. Ágar Baird-Parker - BP

Preparado de acordo com as instruções do fabricante (DIFCO 276840 - Baird-Parker Agar).

4.1.1.8. Água Peptonada 0,1%

Solução diluente contendo 0,1% de peptona - (Difco 211677 - Bacto Peptona) em água destilada, com pH ajustado a 7,0 e esterilizada a 121°C/15 min.

4.1.1.9. Meio EC

Preparado de acordo com as instruções do fabricante (ACUMEDIA 7206A)

4.1.1.10. Caldo Verde Brillante Bile 2% - VB

Preparado de acordo com as instruções do fabricante (ACUMEDIA 7119A)

4.1.1.11. Galeria API 20E

Utilizado segundo instrução do fabricante (BioMerriex - Ref. 20.100).

4.1.1.12. Tiras para reação de oxidase

Utilizado segundo instrução do fabricante (Laborclin – Ref. 570661).

4.1.1.13. Kit Bax para *Enterobacter sakazakii*

Utilizado segundo instrução do fabricante (DuPont/Qualicon – Ref. 17720657).

4.1.1.14. Kit Bax para *Salmonella*

Utilizado segundo instrução do fabricante (DuPont/Qualicon – Ref. 17710608)

4.1.1.15. Colilert

Utilizado segundo instrução do fabricante (IDEXX 98-20705-00)

4.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Balança analítica Metler Toledo, modelo AG 104
- Balança semi-analítica Marte, modelo AS 2000C
- Câmara de fluxo laminar vertical VECO
- Estufa incubadora B.O.D. Nova Ética, modelo 411D
- Estufa incubadora B.O.D Fanem, modelo 347 CD

- Incubadora com agitação (Shaker) Marconi
- Autoclave Primatec, modelo 215 Promastic T
- Aparelho Bax System Dupont Qualicon
- Bloco aquecedor a 37°C Dupont, modelo Dry Block Heater
- Bloco aquecedor a 95°C Dupont, modelo Dry Block Heater
- Banho-maria 44,5°C Fanem, modelo 102
- Termômetro Incoterm, modelo 67492/02
- Micro pipetador Thermo Labsystems, modelo 554959 4500, 5-50µL
- Agitador tubos Vortex-2 Genie, modelo G560
- Pipetador Macro 07T1635-Brand
- Geladeira Eletrolux/Prosdócimo doublé D44
- Microscópio eletrônico Zeiss G 433321
- Incubadora com agitação Marconi

4.3. METODOLOGIA UTILIZADA

4.3.1. Amostragem

As amostras foram obtidas em 4 hospitais/maternidades de Campinas (SP), sendo coletadas fórmulas infantis em pó do mesmo lote em utilização, fórmulas infantis reconstituídas em mamadeiras ou em frasco, mamadeira de leite de vaca com amido cozido, amido em pó, mamadeiras vazias, água esterilizada usada na reconstituição das fórmulas infantis em pó, escovas utilizadas na limpeza das mamadeiras e swabs de utensílios utilizados na preparação das mamadeiras. Também foram utilizadas amostras de fórmula infantil em pó e amido obtidos de indústrias, perfazendo um total de 175 amostras. As amostras industriais foram analisadas no período de maio a julho de 2004.

Foram feitas três a quatro visitas por hospital no período de janeiro a outubro de 2005 sendo coletados 500g da fórmula infantil em pó (lata fechada), 250 a 300ml da fórmula infantil reconstituída, 100ml de água esterilizada usada na reconstituição das amostras, 200g do amido comercial. As amostras foram transportadas do ambiente de preparo ao laboratório em caixa de isopor e estocadas em geladeira até o momento da análise.

4.3.2. Determinação de *Enterobacter sakazakii* pelo método FDA modificado

O ensaio presuntivo, de acordo com a metodologia preconizada pela Food and Drug Administration – FDA, requer um enriquecimento da amostra em série de três

porções múltiplas diluídas em 9 porções, sendo de 3 de 100g, 3 de 10g e 3 de 1g de modo que níveis baixos do microrganismos esperado neste produto possam ser detectados e quantificados. O ensaio, usando a técnica do Número Mais Provável (NMP), requer um mínimo de amostra de 333g de fórmula infantil em pó (FDA, 2002). Para a detecção do *E. sakazakii* em fórmula infantil em pó obtida de indústria foi utilizado o método do FDA, porém com um número de amostra acima do determinada pela metodologia, 5 porções de 100g, de acordo com o item 4.3.2.1.

4.3.2.1. Fórmula Infantil em pó

A determinação de *E. sakazakii* nas amostras de fórmulas infantis em pó, seguiram os procedimentos descritos pela FDA (2002), contudo foram utilizadas 500g de amostra, dividida em 5 porções iguais de 100g, adicionadas de 900ml de água destilada estéril, seguida de homogeneização e incubação a 36°C/24h (Figura 11). Porções de 10ml de cada amostra enriquecida foram adicionadas a 450 ml de Caldo de Enriquecimento de Enterobactérias (EEB) resultando em uma diluição de 1:10 a qual foi homogeneizada e incubada a 36°C/24h (Figura 12). Após o período de incubação a suspensão foi estriada em placa de VRBGA, em duplicata, seguida de incubação a 36°C/24h (Figura 13). Cinco colônias presuntivas em VRBGA de coloração vermelho-violeta, com pigmento de precipitação de bile, gomosas ou secas, foram estriadas em Ágar Trypticase Soja (TSA), para verificação da presença de pigmento amarelo nas colônias formadas após incubação a 25°C durante 48 a 72h (Figura 14). As colônias com pigmento amarelo intenso ou levemente amarela foram selecionadas e submetidas

ao teste de oxidase sendo posteriormente identificadas pelo sistema API 20E, seguindo as instruções do fabricante (Figura 15).

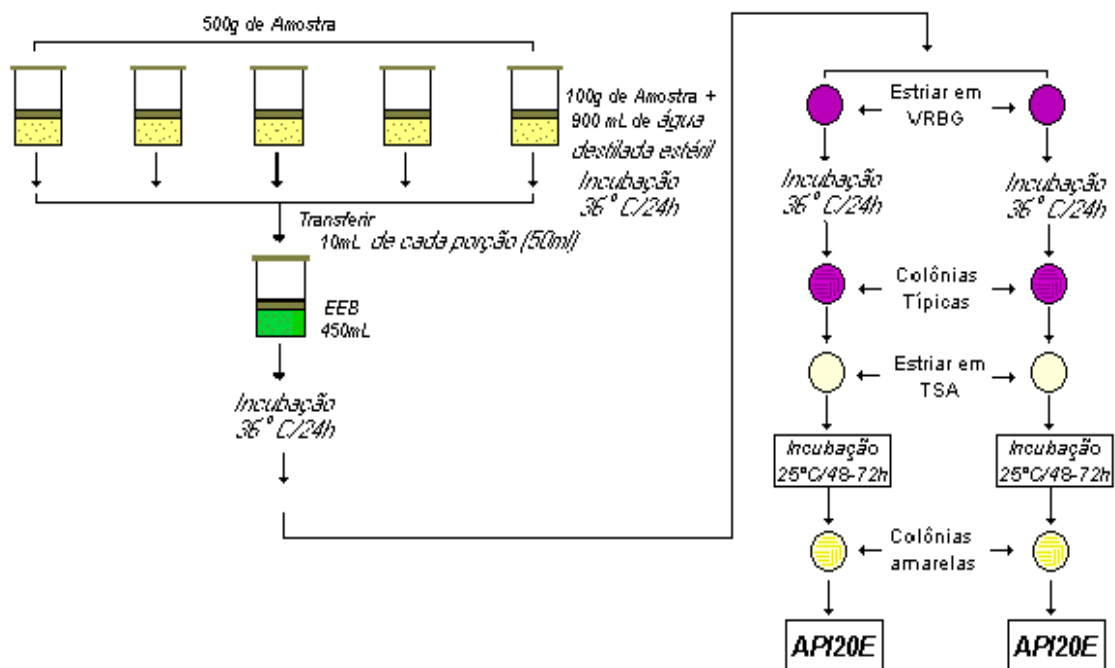


Figura 11. Fluxograma de metodologia do FDA para fórmula infantil em pó.



Figura 12. Caldo Enriquecimento Enterobactérias (EEB)



Figura 13. Colônias típicas de *Enterobacter sakazakii* em Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose



Figura 14. Colônias de *Enterobacter sakazakii* com pigmento amarelo, em Ágar Trypticase Soja.



Figura 15: Galeria API 20E com reações bioquímicas de identificação de *Enterobacter sakazakii*

4.3.2.2. Determinação de *Enterobacter sakazakii* através do Sistema Bax®

As análises foram realizadas segundo as orientações do fabricante do sistema. As amostras positivas seguiram para confirmação e isolamento utilizando o procedimento descrito pela FDA (2002).

4.3.3. Fórmula infantil em pó

- a) Uma unidade analítica de 500g para as fórmulas infantis em pó coletadas nos lactários e para as fórmulas infantis em pó industrial, foram fracionada em 5 porções de 100g, respectivamente, e cada porção foi diluída individualmente em 900ml, respectivamente, em Caldo Lauril Sulfato Triptose modificado suplementado com vancomicina (mLST-V).
- b) As porções em mLST-V foram incubadas a 45°C/24h para enriquecimento.
- c) Após incubação, para o teste de presença/ausência, as porções foram bem homogeneizadas e alíquotas de 1ml de cada porção foram misturadas em um tubo de ensaio estéril. A mistura foi homogeneizada novamente e, a partir desse tubo, foi feito o 2º enriquecimento.
- d) Para o 2º enriquecimento, 10µl da mistura foram transferidos para 500µl de Infusão Cérebro Coração (caldo BHI) e incubados a 37°C por 3 horas.
- e) Após o 2º enriquecimento, toda a seqüência do ensaio (lise e PCR) seguiu as instruções do Manual do Usuário do Sistema Bax® (DUPONT QUALICON, 2000).

Na Figura 16, pode ser observado um fluxograma esquematizado, para as amostras com unidade analítica de 500g.

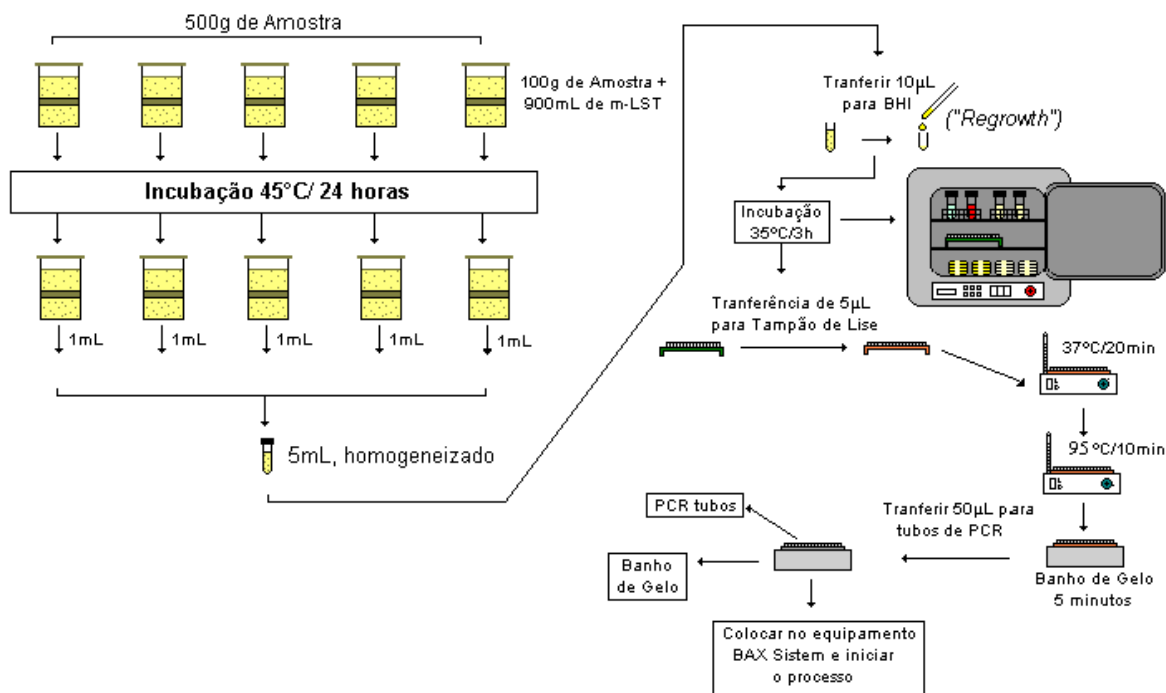


Figura 16. Fluxograma do método utilizando o Sistema Bax® para detecção de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis em pó

Durante o período do teste de presença/ausência, as cinco ou seis porções individuais originais, enriquecidas em mLST-V, foram mantidas sob refrigeração. Em caso de presença do microrganismo, cada porção foi analisada individualmente, a partir do item d para estimativa do Número Mais Provável (NMP) de *E. sakazakii*, através da fórmula (FDA, 1998):

$$\text{NMP/g ou mL} = (1/z) \cdot 2,303 \log (t/n)$$

z = peso ou volume de amostra por porção

t = número total de porções inoculadas

n = número de porções negativas

As misturas de amostras com presença de *E. sakazaki* detectada pelo Sistema Bax® foram estriadas em VRBG, sendo incubados a 35°C durante 24h. As colônias típicas, de coloração vermelho-violeta, com pigmento de precipitação de bile, gomosas ou secas, foram estriadas em TSA, para verificação da presença de pigmento amarelo nas colônias formadas após incubação a 25°C durante 48 a 72h. A partir das colônias pigmentadas foi realizado o teste de oxidases e a partir das colônias oxidase negativa realizou-se o teste de identificação final utilizando a Galeria do API 20E.

4.3.3.1. Fórmulas preparadas em mamadeiras

Conteúdo de 200ml de cada mamadeira foi fracionado em 5 porções de igual volume (40ml/porção). Cada porção foi diluída individualmente (1:10) em Caldo mLST-V, seguindo o procedimento descrito a partir do item 4.3.3.b para as fórmulas em pó.

4.3.3.2. “Swab” (haste de madeira com algodão estéril)

Para análises dos utensílios utilizou-se para coleta das amostras a técnica do “swab”. Retirou-se o “swab” de sua embalagem estéril, segurando a haste na extremidade oposta à do algodão. Foi umedecido o algodão no diluente, comprimindo-o contra as paredes do frasco para remover o excesso de líquido. Foi aplicado o “swab”

com pressão, fazendo movimentos da esquerda para a direita e depois de baixo para cima, rodando continuamente para que toda a superfície do algodão entrasse em contato com os utensílios. Nas amostras do copo dosador e frasco de armazenamento foram aplicados os “swabs” por toda parte interna, já no liquidificador foi aplicado “swab” na parte interna das hélices. Após a coleta, a parte manuseada haste do ‘swab foi cortada com auxílio de uma tesoura estéril antes de mergulhar o restante do “swab” no tubo de diluente. Cada swab foi recolhido em 10ml de água peptonada 0,1% e agitado vigorosamente. Cinco porções de 1 ml foi adicionada em 5 tubos de Caldo mLST-V seguindo o procedimento descrito a partir do item 4.3.3.b.

4.3.3.3 Escovas e mamadeiras vazias

Para as escovas o método utilizado foi de enxaguadura, adicionando à escova, acondicionada em bolsa plástica estéril, 225 ml de água peptonada 0,1%, sendo homogeneizada manualmente durante 5 minutos. Após esse período foi retirado uma alíquota de 200ml para análises de *Enterobacter sakazakii*, dividindo esse conteúdo em 5 porções de 40ml e adicionados em 360ml de Caldo mLST-V, seguindo procedimento descrito a partir do item 4.3.3.b.

As mamadeiras vazias foram adicionadas de 225 ml de água peptonada 0,1%, e homogeneizadas em “shaker” por 20 minutos. Após esse período, 200ml foram fracionados em 5 porções de 40ml e adicionados em 360ml de Caldo mST+V para determinação de *Enterobacter sakazakii*, seguindo procedimento descrito a partir do item 4.3.3.b.

4.4. Determinação de microrganismos indicadores de condições higiênico sanitárias e de patógenos em amostras de fórmulas infantis reconstituída nos lactários.

4.4.1 Determinação de Contagem Total de Microrganismos Aeróbios Mesófilos

Para a determinação desses microrganismos o método utilizado foi de contagem em placas preconizada pela APHA, descrito em Downes e Ito (2001), com inoculação a partir da amostra sem diluir até 10^{-4} .

4.4.2 Determinação de coliformes totais e termotolerantes a 45°C

Para esta determinação nas amostras de fórmulas infantis reconstituídas foi utilizada a técnica de Número Mais Provável (NMP) preconizada pela APHA, de acordo com Downes e Ito (2001), partindo da amostra íntegra até a diluição 10^{-2} .

4.4.3 Determinação de *Bacillus cereus*

Neste ensaio foi utilizada a metodologia preconizada pela APHA (DOWNES; ITO, 2001). A inoculação foi feita a partir da amostra íntegra.

4.4.4 Determinação de *Staphylococcus aureus*

Nesta determinação também foi utilizada a metodologia preconizada pela APHA (DOWNES; ITO, 2001). A inoculação foi feita a partir da amostra sem diluir.

4.4.5 Detecção de *Salmonella*

Esse ensaio foi realizado seguindo o procedimento do Sistema Bax® (DUPONT QUALICON, 2000), Figura 17.

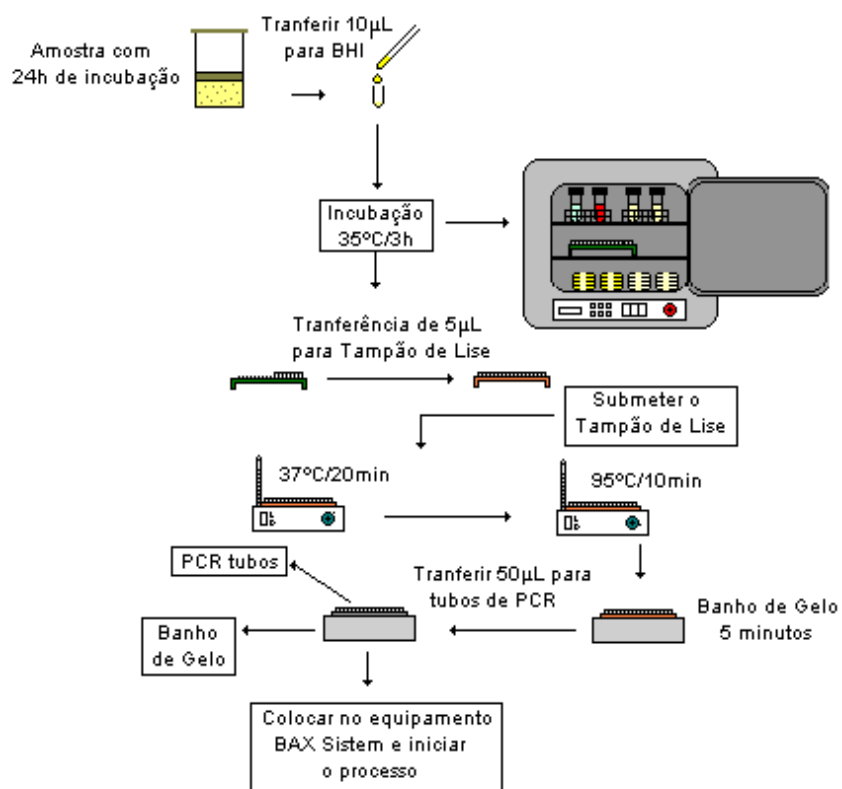


Figura 17. Fluxograma do método para determinação de *Salmonella* sp em 25g através do Sistema Bax®.

4.5. Determinação de microrganismos indicadores de condições higiênicas sanitárias em amostras de utensílios coletados nos lactários

4.5.1. Determinação de coliformes totais e termotolerantes

Foi utilizado a metodologia preconizada pela APHA (DOWNES; ITO, 2001).

4.5.2. Determinação de contagem de mesófilos aeróbios totais

Para análises de contagem total de mesófilos aeróbios totais foi utilizada a metodologia preconizada pela APHA (DOWNES; ITO, 2001).

4.6 Determinação microbiológica da potabilidade em amostras de água coletadas nos lactários

4.6.1. Determinação de Coliformes totais e *E. coli*

Nas amostras de água, a análise qualitativa para determinação de coliformes totais e *E. coli* em 100ml, foi feita pelo método do substrato cromogênico, utilizando o Colilert, conforme Figura 18.

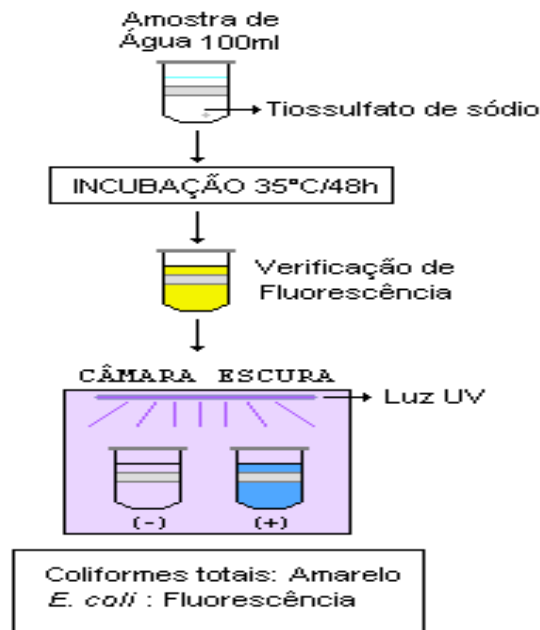


Figura 18: Fluxograma da metodologia do Colilert (IDEXX) na determinação de coliformes totais até *E. coli* em água.

4.6.2. Determinação de heterotróficos em amostras de água coletadas nos lactários

Para a determinação de heterotróficos foi utilizada a metodologia preconizada pela APHA (DOWNES; ITO, 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Enterobacter sakazakii* nas fórmulas infantis em pó e reconstituídas

Conforme pode ser observado na Tabela 5, *E. sakazakii* esteve presente nas formulações para 1ª idade, 2ª idade e naquelas destinadas aos prematuros e/ou de baixo peso. Nas fórmulas reconstituídas não foi detectada a presença do microrganismo. Do total de 98 amostras de fórmula infantil em pó analisadas, 12 (12,24%) apresentaram *E. sakazakii*. Em termos quantitativos, os valores apresentaram-se entre 0,22 a 1,61NMP/100g, sendo que a contagem mais freqüentemente encontrada nas fórmulas em pó foi de 0,51NMP/100g e a média geral foi de 0,54NMP/100g, o maior valor determinado, de 1,61NMP/100g, foi em uma amostra de fórmula infantil em pó para prematuros e/ou de baixo peso. Em um estudo feito por Edelson-Mammel, Porteous & Buchanan (2005), foi relatado que a concentração do microrganismo nas formulas infantis em pó é freqüentemente abaixo de 1UFC/100g ou seja <1,0NMP/100g, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.

O presente estudo não objetivou comparações de metodologias na determinação de *E. sakazakii*, porém, 7 amostras de fórmula infantil de 2º idade, preliminarmente analisadas pelo método do FDA (2002), onde *E. sakazakii* havia sido detectado, também foram analisadas pelo sistema Bax®, indicando a presença deste microrganismo em 6 amostras. Neste caso, as unidades analíticas embora pertencentes à mesma amostra, eram diferentes. Nas formulações em pó para prematuros e/ou de

baixo peso o Sistema Bax® foi capaz de identificar o microrganismo em 3 das 14 amostras analisadas, enquanto que pelo método do FDA (2002), apenas 2 amostras foram confirmativas para *E. sakazakii*. O mesmo aconteceu para as formulações de 1ª idade.

Tabela 5 – Determinação de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis pelo Método FDA e Sistema Bax®.

Descrição das Amostras (Unidade analítica)	No. de Amostras Analisadas	No. de Amostras Positivas	Amostra positiva pelo método FDA*/Bax®**	NMP/100g ou ml***
Fórmula infantil em pó, para prematuros e de baixo peso (500g)	14	3	2/3	1,61; 0,51; 0,22
Fórmula infantil em pó, de 1ª idade - 0 a 6 meses (500g)	45	3	2/3	0,51; 0,22; 0,22
Fórmula infantil em pó, de 2ª idade - 6 meses a 1 ano (500g)	33	8	8/6	0,92; 0,51; 0,51; 0,51; 0,51; 0,22
Fórmula infantil em pó, para lactentes até 1 ano (500g)	6	0	0/0	<0,22
Subtotal	98	14	12/12	0,54
Formula infantil reconstituída para prematuros e de baixo peso (200ml)	2	0	0/0	<0,22
Formula infantil reconstituída para lactentes de 0 - 6 meses (200ml)	15	0	0/0	<0,22
Fórmula infantil reconstituída, para lactentes até 1 ano (200ml)	8	0	0/0	<0,22
Total	123	14	12/12	<0,22 e 0,54

*Pelo método do FDA, só foi feita análise de presença e ausência.

** Pelo método do Sistema Bax® foi realizado a análise utilizando a técnica de numero mais provável descrito na metodologia.

***NMP: Número Mais Provável/100g ou ml

Dentre as amostras de fórmula infantil em pó de 1ª idade e 2ª idade, 21 amostras apresentaram contaminação por Enterobacteriaceae (13 amostras de 2ª idade e 8 de 1ª

idade) e não apresentaram contaminação por *E. sakazakii*. Dentre as Enterobacteriaceae estavam presente *Pantoea* spp, *Leclercia adecarboxylata*, *Klebsiella oxytoca*, *Pasteurella pneumotropical/haemolytica*, *Serratia rubidaea*, *Serratia plymuthica*.

Ainda não existe um padrão microbiológico definido para *E. sakazakii* em formulações infantis, de acordo com o FAO/WHO (2004), o nível de contaminação por *E. sakazakii* nas formulações infantis é baixo, mas mesmo assim considerado de alto risco, dado ao potencial de multiplicação do microrganismo no produto reconstituído.

Segundo o Regulamento CE nº 2373/2005, a presença deste agente patogênico constitui um risco considerável quando as condições após a reconstituição podem favorecer a sua multiplicação. De acordo com Iversen e Forsythe (2003), a fórmula infantil em pó não é um produto comercialmente estéril, e conseqüentemente, após sua rehidratação, o risco de proliferação do organismo torna-se eminente, em função da temperatura e tempo de resfriamento, armazenamento e da susceptibilidade da criança ao receber o alimento.

Gutler e Beuchat (2005), relatam que, embora os estudos científicos não tenham estabelecido até agora um número mínimo de células capazes de provocar a doença nos recém-nascidos, condições de higiene precárias durante a preparação das mamadeiras com fórmulas infantis reconstituídas, exposição à temperatura elevada durante tempo de preparo demasiadamente longo e resfriamento lento, bem como refrigeração em temperatura inadequada, têm sido apontados como fatores que

contribuem para proliferação do microrganismo e conseqüentemente, infecção dos recém-nascidos.

De acordo com Santos e Tondo (2000), durante a manipulação das fórmulas o tempo de exposição à temperatura de risco, entre 10 e 60°C, deve ser, no máximo de 30 minutos e o prazo de validade para fórmulas reconstituídas que não são esterilizadas são de 12 horas, sendo considerada adequada uma temperatura de armazenamento de 4°C, no máximo. De acordo com Iversen e Forsythe (2004), *E. sakazakii* não cresce às temperaturas menores ou iguais a 4°C.

5.1.1 *E. sakazakii* em utensílios utilizados nos lactários

Nas amostras de utensílios coletados nos lactários, no presente trabalho, não foi detectado *E. sakazakii*, conforme relacionado na Tabela 6. De acordo com Simmons e outros (1989) e Bar-Oz e outros (2001), as infecções neonatais tem sido associadas com a colonização de *E. sakazakii* em equipamentos de preparação dos alimentos, tais como escovas, liquidificadores e colheres. De acordo com os mesmos autores, os recipientes, mamadeiras e utensílios, devem ser totalmente limpos tão rapidamente quanto possível após o uso, para impedir a formação de biofilmes do microrganismo. Uma vez que a concentração do microrganismo nas fórmulas infantis em pó é baixa, pode-se verificar que condições de higiene adequadas, bem como controle do binômio tempo e temperatura de resfriamento e armazenamento das fórmulas reconstituídas, minimizam o risco de contaminação e desenvolvimento do microrganismo.

Tabela 6. Determinação de *Enterobacter sakazakii* em utensílios utilizados em lactários utilizando o Sistema Bax® de detecção.

Descrição das Amostras	No. de Amostras Analisadas	No. de Amostras Positivas
Liquidificador	8	0
Copo dosador	3	0
Frasco de Armazenamento	4	0
Mamadeira vazia	7	0
Escova para lavagem	5	0
Total	27	0

De acordo com INTERNATIONAL FOOD SAFETY AUTHORITIES NETWORKS – INFOSAN (2005), em 50-80% dos casos avaliados de infecção neonatal por *E. sakazakii*, a fórmula infantil em pó foi a fonte como o veículo de indução da doença. Nos casos remanescentes (20-50%) a fórmula foi o veículo, mas a fonte do microrganismo foram condições higiênicas precárias durante a reconstituição e manuseio.

5.1.2 *E. sakazakii* em ingredientes

Como ingredientes utilizados na preparação das fórmulas infantis em pó, foram analisadas amostras de amido, leite integral e leite com amido, conforme relacionado na Tabela 7. Não foi detectado *E. sakazakii* nas amostras de leite integral e de leite com amido, contudo o leite era proveniente de processo UHT e o leite adicionado de amido, havia sido preparado no lactário com aquecimento da mistura. Nas amostras de

amido inicialmente analisadas, o microrganismo esteve presente em 100% delas (Amido I, Tabela 7). Posteriormente, em 3 amostras de amido em pó, coletadas em lactários que utilizavam a prática de adicioná-lo ao leite como espessante, não foi detectado *E. sakazakii*, mesmo com unidade analítica total de 200g (Amido II).

Tabela 7. Determinação de *Enterobacter sakazakii* em ingredientes, leite de vaca com espessante e leite UHT

Descrição das Amostras (Unidade analítica)	Amostras Analisadas No	No. Amostras positivas FDA*/Bax**
Amido I (25g)	4	4/4
Amido II (200g)	3	0/0
Leite de vaca com espessante (200ml)	5	0/0
Leite UHT integral (500g)	3	0/0
Total	15	4/4

*Método FDA / ** Sistema Bax®

É importante reforçar que a adição de ingredientes tais como amido e açúcar, à fórmula infantil em pó, pode representar um risco de contaminação do produto. Esses ingredientes adicionados necessitam cumprir com as mesmas exigências da fórmula infantil em pó. O amido é considerado um produto de risco elevado de conter Enterobacteriaceae. De acordo com a FAO/WHO (2004), 1389 amostras de amido foram analisadas, deste total, 155 (11,2%) foram positivas para coliformes e outras Enterobacteriaceae e *E. sakazakii* foi caracterizado em 40 destas amostras (2,9%).

5.2. Análises microbiológicas em fórmulas infantis reconstituídas para lactentes de 0-6 meses

A contagem de coliformes totais nas fórmulas reconstituídas 5 e 12 ($\geq 2,4 \times 10^3$), relacionadas na Tabela 8, está acima do limite permitido para os alimentos infantis que serão consumidos por prematuros ou bebês de até um ano de idade, que é de 10NMP ou UFC/g ou ml (BRASIL, 2001). De acordo com Franco & Landgraf (1996) a presença desses microrganismos no alimento indica condições inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos também apresentou-se elevada nas amostras que apresentaram coliformes totais e na amostra 10. Esta determinação é empregada para indicar a qualidade geral dos alimentos, independente da presença de patógenos, uma contagem elevada é indicativa do uso de matéria-prima contaminada, processamento insatisfatório ou, dependendo das características intrínsecas do produto, abuso durante o armazenamento em relação ao binômio tempo x temperatura (SANTOS; TONDO, 2000).

Os resultados obtidos nas amostras analisadas sugere ocorrência de contaminação durante o preparo, à partir dos utensílios ou do próprio ambiente, uma vez que não foi evidenciada contaminação por patógenos, como *S. aureus*, *B. cereus* e *Salmonella*. No Anexo 1 podem ser observadas imagens do local de coleta dessas amostras.

Tabela 8. Determinações microbiológicas em fórmulas infantis reconstituídas para lactentes de 0-6 meses

Amostra (No.)	<i>Salmonella</i> (em 25ml)	<i>B. cereus</i> (UFC/ml)	<i>S. aureus</i> (UFC/ml)	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	Contagem total (UFC/ml)
1	Ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	<1,0
2	Ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	<1,0
3	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
4	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
5	Ausente	<1,0	<1,0	≥2,4X10 ³	<0,3	8,9X10 ⁴
6	Ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	2,0 x 10
7	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
8	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	2
9	Ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	<1,0
10	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	4,8 X 10 ³
11	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
12	Ausente	<1,0	<1,0	≥2,4X10 ³	<0,3	3,7 X 10 ³
13	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
14	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
15	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
16	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
17	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia por ml

NMP/ml: Número Mais Provável por ml

De acordo com Pinto, Cardoso e Vannetti (2004), a contaminação em sistemas de alimentação enteral está normalmente associada à falta de atenção dos manipuladores para com as técnicas de higiene adequadas, à inabilidade para higienizar equipamentos de preparação e à adição de ingredientes não estéreis às dietas, indicando para a necessidade de implantação de um sistema de controle microbiológico na área de manipulação desses alimentos, estendido aos funcionários envolvidos em tal processo.

5.3. Análises microbiológicas em fórmulas infantis reconstituídas para prematuros e/ou recém nascidos de baixo peso

Verificando os dados registrados na Tabela 9, observamos nas amostras 1 e 7 a presença de *B. cereus*. O limite preconizado pela legislação vigente é de 50UFC/ml, sendo que a amostra 7 apresentou este valor máximo tolerável. Estudos realizados nos Estados Unidos, por Becker et al., (1989, 1994 apud ICMSF, 2000), mostraram que mais de 60% das amostras de leite em pó analisadas apresentavam *B. cereus*. Embora surtos envolvendo este microrganismo nunca tenha sido diretamente atribuído a produtos de leite em pó, a maior preocupação está relacionada a abusos de temperatura nos produtos reconstituídos. A qualidade final do leite em pó depende da qualidade da matéria prima, dos parâmetros do processo e fatores ambientais (ICMSF, 2000).

O nível de microrganismos na contagem total de aeróbios mesófilos nas amostras 1 e 4 ($1,2 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente), pode ser indício de condições de higiene inadequadas. Embora nas demais amostras o nível de contaminação tenha se apresentado baixo, é uma ferramenta para monitorar as condições higiênicas do estabelecimento, dos manipuladores e higienização dos utensílios. Tendo em vista o estado imunológico dos pacientes, o controle da presença desses microrganismos é fundamental.

Tabela 9. Determinação de microrganismos presentes nas fórmulas infantis reconstituídas para prematuros e recém nascidos de baixo peso

Amostra (No.)	<i>Salmonella</i> (em 25ml)	<i>B. cereus</i> (UFC/ml)	<i>S. aureus</i> (UFC/ml)	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	Contagem total (UFC/ml)
1	Ausente	5,0X10	<10	<0,3	<3,0	1,2 X 10
2	Ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	4,0
3	Ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
4	ausente	1,0X10	<1,0	<0,3	<0,3	5,0X10

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia por ml
NMP/ml: Número Mais Provável por ml

Santos e Tondo (2000) analisando 25 fórmulas enterais evidenciaram 17 amostras fora dos padrões estabelecidos para contagem de aeróbios mesófilos totais (<10²UFC/ml).

De acordo com Souza & Campos (2003) é necessário conscientizar os responsáveis pela Unidade de Alimentação e Nutrição de um hospital sobre a necessidade de um controle no processamento de alimentos, seguido de um acondicionamento higiênico-sanitário que atenda às características e à integridade do produto, bem como à saúde dos pacientes internados.

5.4. Análise microbiológica em fórmulas infantis reconstituídas para crianças de até 1 ano

De acordo com a Tabela 10, a condição microbiológica das amostras analisadas se mostrou satisfatória, embora a presença de *B. cereus* tenha sido evidenciada em quantidade abaixo do limite estabelecido de 10² UFC/ml (BRASIL, 2001).

Tabela 10. Determinação de microrganismos presentes nas fórmulas infantis reconstituídas para crianças de até 1 ano

Amostra (No.)	<i>Salmonella</i> (em 25ml)	<i>B. cereus</i> (UFC/ml)	<i>S. aureus</i> (UFC/ml)	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	Contagem total (UFC/ml)
1	ausente	ND	<10	<0,3	<0,3	<1,0
2	ausente	ND	<10	<0,3	<0,3	<1,0
3	ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	1,0 X 10 ²
4	ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	<1,0
5	ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	5,0X10
6	ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	1,1 X 10
7	ausente	2,0 X 10	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
8	ausente	1,0 X 10	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
9	ausente	5,0 X10	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
10	ausente	2,0 X 10	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia por ml
 NMP/ml: Número Mais Provável por ml
 ND : Não determinado

A conservação de alimentos por secagem está baseada no fato de que microrganismos e enzimas necessitam de água para suas atividades, embora algumas espécies de microrganismos sejam destruídas no processo de secagem, este não é letal para todos os tipos de microrganismos, e muitos podem ser recuperados de alimentos secos, especialmente quando estes são de baixa qualidade (JAY, 2005).

Um estudo realizado na cidade de São Paulo por Barros et al., (2001 apud LAGO, 2002, p.543), relatou que de 72 amostras de leite em pó comercializadas, 20 (27,8%) estavam contaminadas por *Bacillus cereus*.

Rangasamy et al. (1993), avaliando 91 amostras de leite e produtos lácteos, detectaram *Bacillus cereus* em seis amostras de leite cru, quatro de leite pasteurizado e três de leite em pó, perfazendo um total de 26,4% das amostras avaliadas, porém no leite UHT não foi evidenciada a presença do microrganismo.

Lago (2002) analisando 120 amostras de leite de vaca (leite em pó, leite cru, leite pasteurizado e leite longa vida), a maioria (58,3%) foi positiva para *Bacillus cereus*, dentre as amostras, o leite pasteurizado, 29 amostras (96,7%), foi o que mais apresentou contaminação, número considerado extremamente alarmante quanto ao risco que tal produto pode trazer à saúde pública. De acordo com a mesma autora, os alimentos prontos com um grande período de vida útil podem levar à sobrevivência, desenvolvimento e formação de toxinas pelo *Bacillus cereus*, mesmo que esses alimentos permaneçam estocados em temperaturas de refrigeração, já que existem cepas psicotróficas de *Bacillus cereus* potencialmente enterotoxigênicas.

5.5. Análise microbiológica de leite adicionado de amido

Nazarowec-White e Farber, (1997), mostraram dados que provam que *Enterobacter sakazakii* tem sido mais termotolerante do que muitos outros microrganismos da família Enterobacteriaceae presentes em produtos derivados do leite, porém menos resistente que a *Listeria monocytogenes*. A pasteurização é um processo térmico que visa destruir os patógenos e reduzir o número de microrganismos em geral (PERRY, 2004). O controle de aquecimento para uma pasteurização eficiente

e segura do leite, está baseado na sobrevivência da bactéria *Coxiella burnetti*, necessitando de um tratamento à temperatura de 71,7°C por 15 segundos (BORGES, 1987). Esta prática de pasteurização tem demonstrado ser eficiente na destruição do *Enterobacter sakazakii* (IVERSEN, LANE & FORSYTHE, 2004).

Os resultados obtidos na análise microbiológica das amostras de leite de vaca com amido estão relacionados na Tabela 11.

Tabela 11. Determinação de microrganismos presentes no leite com amido utilizados nos lactários.

Amostra (No.)	<i>Salmonella</i> (em 25ml)	<i>B. cereus</i> (UFC/ml)	<i>S. aureus</i> (UFC/ml)	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	Contagem total (UFC/ml)
1	ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	4,5 X 10
2	ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	<1,0
3	ausente	<10	<10	<0,3	<0,3	<1,0
4	ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0
5	ausente	<1,0	<1,0	<0,3	<0,3	<1,0

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia por ml
NMP/ml: Número Mais Provável por ml

Santos e Tondo (2000) analisando 25 amostras de leite de vaca adoçadas com açúcar, obtiveram que 21 apresentaram condições higiênico-sanitárias insatisfatórias quando comparadas ao padrão utilizado pelos autores (<100/ml). Dessas, 11 apresentavam-se com contagem de mesófilos totais maiores que 100/ml, 8 evidenciaram presença de coliformes totais e contagem totais de mesófilos acima de 100/ml, 1 apresentava coliformes totais, bolores e leveduras e bactérias mesófilas acima de 100/ml e 1 evidenciou bolores e leveduras e contagem total acima do padrão estipulado.

5.6 Análise de microrganismos indicadores de contaminação em utensílios utilizados nos lactários

Observando a Tabela 12, não foi constatada a presença de indicadores de condições higiênico-sanitária insatisfatória nos utensílios.

Tabela 12. Determinação de microrganismos presentes nos utensílios usados nos lactários

Tipo de Amostras	No. de Amostras Analisadas	Coliformes Totais (NMP/ml)	Coliformes Termotolerantes (NMP/ml)	Contagem Total (UFC/ml)
Liquidificador	8	<3,0	<3,0	<10
Copo dosador	3	<3,0	<3,0	<10
Frasco de armazenamento	4	<3,0	<3,0	<10
Mamadeira	7	<6,7 X 10 ¹	<6,7 X 10 ¹	<2,2 X 10 ²
Escova	5	<6,7 X 10 ¹	<6,7 X 10 ¹	<2,2 X 10 ²

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia por ml

NMP/ml: Número Mais Provável por ml

De acordo com Souza e Campos (2003), foram relatados surtos de toxinfecções alimentares ocorridos em hospitais, onde a fonte de contaminação foi o próprio alimento servido nos refeitórios.

Segundo Pinto, Cardoso e Vanetti (2004), uma taxa de 30 a 90% de contaminação em sistemas de alimentação enteral está normalmente associada à falta de atenção dos manipuladores para com práticas de higiene adequadas, à inabilidade para sanitizar equipamentos de preparação e à adição de ingredientes não estéreis ou contaminados às dietas.

Souza e Campos (2003) relatam que a causa dessas infecções é a falta de um programa de treinamento de boas práticas de higiene para os indivíduos que trabalham direta ou indiretamente com pessoas internadas em hospitais, devendo tal treinamento ser contínuo para todos os envolvidos com a produção de alimentos.

5.7 Determinação da potabilidade da água utilizada na preparação das fórmulas reconstituídas

A análise microbiológica da água utilizada nos lactários mostrou-se satisfatória, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, demonstrando ausência de bactérias do grupo coliformes e *E. coli* em 100ml e ausência de microrganismos mesófilos aeróbios em 1ml na contagem total de mesófilos aeróbios, com exceção da amostra 6 que apresentou uma contagem de $3,7 \times 10^2$ UFC/ml, de microrganismos aeróbios mesófilos totais. De acordo com a legislação vigente, RDC 12, Brasil (2001), a contagem máxima permitida para esses microrganismos em água envasada utilizada no preparo de alimentos infantis e similares é 5×10^2 UFC/ml, demonstrando que para contagem total, esta amostra está dentro dos parâmetros exigidos pela Legislação vigente.

A qualidade microbiológica da água utilizada na reconstituição das fórmulas infantis em pó ajuda a garantir sua inocuidade.

Nos hospitais e maternidades, a disponibilidade de água esterilizada, e condições assépticas durante a preparação das fórmulas infantil se fazem necessárias. Como sugestão, indicamos para avaliação junto aos lactários, a utilização de mamadeiras em vidro refratário ou outro material esterilizável, que pudesse ser esterilizada com a própria água a ser consumida, ficando disponível para o procedimento de reconstituição da fórmula infantil em pó no momento do uso, com homogeneização por agitação diretamente no próprio recipiente tampado, eliminando a utilização de liquidificadores e a estocagem de fórmulas reconstituídas.

Tabela 13. Determinação de microrganismos nas amostras de água para preparo de mamadeiras, coletadas nos lactários

Amostra (No.)	Coliformes Totais (em 100mL)	<i>E. coli</i> (em 100mL)	Contagem Total (UFC/mL)
1	Ausente	Ausente	<1,0
2	Ausente	Ausente	<1,0
3	Ausente	Ausente	<1,0
4	Ausente	Ausente	<1,0
5	Ausente	Ausente	<1,0
6	Ausente	Ausente	3,7 X 10 ²
7	Ausente	Ausente	<1,0
8	Ausente	Ausente	<1,0
9	Ausente	Ausente	<1,0
10	Ausente	Ausente	<1,0

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia por ml

A disponibilidade de envelopes de fórmula infantil em pó, para reconstituição total em 100 ou 200ml de água estéril também evitaria a estocagem de produtos após abertura, principalmente no caso de alimentação de recém nascidos prematuros, de baixo peso e imunodeprimidos.

6. CONCLUSÕES

Enterobacter sakazakii foi detectado em quase todos os tipos de fórmulas infantis em pó analisadas, desde aquelas destinadas a prematuros e/ou recém nascidos de baixo peso até as de 2^a idade (de 6 meses a 1 ano). A maior incidência observada dentre as amostras analisadas foi na fórmula infantil em pó de 2^a idade (24,24%), seguida pela fórmula infantil para prematuros (21,43%) que compreende o grupo de maior risco, e de 1^a idade (0 a 6 meses) (6,7%). Outras espécies da família Enterobacteriaceae também foram detectadas nas amostras de 1^a e 2^a idade.

Em termos quantitativos a maior concentração de *E. sakazakii* foi detectada em uma amostra de fórmula infantil em pó para prematuros e/ou recém nascidos de baixo peso (1,61NMP/100g). No geral a média quantitativa encontrada entre as diversas fórmulas foi de 0,54NMP/100g.

Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que a probabilidade de se ter *Enterobacter sakazakii* nas fórmulas infantis em pó é existente e embora baixo, podendo aumentar se as condições higiênicas no preparo e armazenamento das mamadeiras, até o momento de seu consumo, forem favoráveis.

De acordo com os dados observados na presente pesquisa, pode-se concluir que, se medidas preventivas eficientes não forem tomadas para se evitar a contaminação de alimentos ao longo de sua cadeia produtiva, o risco de uma contaminação, especialmente de natureza microbiológica, pode resultar em danos à saúde do

consumidor, especialmente em se tratando de alimentos destinados ao consumo específico de indivíduos pertencentes a grupos de risco, como é o caso da alimentação de bebês impossibilitados de receber amamentação materna. As fórmulas infantis em pó reconstituídas e dietas enterais devem receber atenção especial, considerando que os pacientes a quem são destinadas são geralmente, mais susceptíveis a infecções e suas conseqüências.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDERSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**. v.28, p.145-155, 1995.

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

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

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

BLOCK, C., PELEG, O. MINSTER, N., 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 Clinical Microbiology. Infection Diseases**. v.21, n. 8, p.613-616, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 15/02/2006.

BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science Business Media Inc., 2005.

BRENNER, D.J. Family I. *Enterobacteriaceae*. In: KREIG, N. R. & HOLT, J. G. (ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore. Williams and Wilkens, v. 1, p. 408-420, 1984

BORGES, S. F. **Qualidade do leite pasteurizado no comércio varejista na região de Campinas, São Paulo**. Campinas, 1987. 60p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CARDOSO, A. L. M. P. **Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarréica por cepas mesófilas e psicrotróficas de *Bacillus cereus*, em leite pasteurizado**. Campinas, 2000. 95p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas**. Campinas, 2003. 107p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CARVALHO, E.; BERNAL, G. A. **Alimentação para lactentes de 6 a 12 meses**, Temas de pediatria n. 75, Nutrição infantil Nestlé, 20p., 2003. Disponível no site: <http://www.nestle.com.br/nutricao infantil>, acesso em: 20/07/2005.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, Coliformes Totais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil), **Ciência Tecnologia Alimento**, Campinas, v.21, n. 3, p. 281-287, set/dez., 2001.

CECCON, M. E. J., FEFERBAUM, R. GIOLO, C. R. et al., Sepsis neonatal – análise comparativa entre duas décadas (1977-1988 e 1988-1998) em relação à incidência dos agentes etiológicos e da morbimortalidade. **Pediatria**. v.21, n.4, p.287-297, 1999.

DOWNES, F. P., K. ITO. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4. ed. American Public Health Association, Washington, D. C. 2001

DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.27, n. 2/3, p.175-183,1995

DUFRENNE, J.; SOENTORO, P.; TATINI, S.; DAY, T.; NOTERMANS, S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, n. 1, p.99-109,1994

DUPONT/QUALICON. **Manual do Usuário**. Sistema BAX® – Análise em PCR com detecção automatizada, São Paulo, 2000.

EATON, A. D., CLESCERI, L. S., GREENBERG A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: American Public Health

Association (APHA), American Water Works Associations (AWWA), Water Environment Federation (WEF), 19. ed. 1995.

EDELSON-MAMMEL, S. G.; FORTEOUS, M. K.; BUCHANAN, R. L. Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula, **Journal of Food Protection**, v. 68, n.9, p.1900-1902, 2005.

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Joint FAO/WHO 2004. **Workshop on *Enterobacter sakazakii*, and other microorganims in powdered infant formula**, Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en>. Acesso em: 14/07/2004.

FARMER III, J. J., ASBURY, M. A., HICKMAN, F. W., BRENNER, D. J., and THE *ENTEROBACTERIACEAE* STUDY GROUP. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.30, n.3, 569-584, 1980.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**. 8. ed. Revisão. A. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA); CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. **Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula**. 2002. disponível no site: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>, acesso em: 14/07/2004.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**, São Paulo: Editora Atheneu, 1996, p.182.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**, trad. Maria Carolina Mardi Guimarães e Cristina Leonhardt. Artmed: Porto Alegre, 2002, 424p.

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

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

GURTLER, J. B.; BEUCHAT, L. R. Performance of media for recovering stressed cells of *Enterobacter sakazakii* as determined using spiral plating and ecometric techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7661-7669, dec., 2005.

HILLIARD,N.J., SCHELONKA,R.L. and WAITES,K.B. *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n. 7, p. 3441-3444, 2003.

HEUVELINK, A.E., KODDE, F.D., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M. & de BOER, E., *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. Keuringsdiennst van Waren Oost. Project number OT 0110, 2001.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF), Microorganisms in food 5: **Microbiological specifications of food pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 513p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in foods 6: **Microbiological Ecology of food Commodities**. Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, 2000. 615p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in foods 7: **Microbiological testing in food safety management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 362p.

INTERNATIONAL FOOD SAFETY AUTHORITIES NETWORKS (INFOSAN), **Information note n. 1/2005**, *Enterobacter sakazakii*, January 13, 2005. Disponível http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/no_01_Esakazakii_jan05_en_pdf
Acesso em: 11/10/2005.

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

IVERSEN, C., LANE, M. & FORSYTHE, S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**. v.38, n. 5, p.378-382, 2004

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**, 6 ed, Artmed, Porto Alegre, 2005. 711p.

KANDHAI, M. C., REIJ, M. W., GORRIS, LEON G. M., GUILLUME-GENTIL, O., SCHOTHORST, M. V. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. **The Lancet**. v.363, n. 9402, p.39-40. 2004.

KIM, H.; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature. **Journal of Food Protection**. v. 68, n. 12, p. 2541-2552, 2005.

KUSHIDA, M. M. Validação de métodos laboratoriais: **avaliação do Sistema Bax® de análise de *Salmonella* sp em alimentos por Reação de Polimerase em cadeia (PCR)**. Campinas, 2005. 166p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

LAGO, N. C. M. R. **Bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite e estudo enterotoxigênico das cepas isoladas**. Jaboticabal, 2002. 70p. Tese (Doutor em medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo.

LAI, K. K. E. *Sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. **Medicine**. v.80, n. 2, p.113-122, 2001.

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

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**. v. 68, n. 11, p. 2287-2294, 2005

LEUSCHNER, R. G. K.; BAIRD, F.; DONALD, B.; COX, L. J. A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant fórmula. **Food Microbiology**. v. 21, p. 527-533, 2004.

MALORNY, B.; WAGNER, M. Detection of *Enterobacter sakazakii* strains by Real Time PCR. **Journal of Food Protection**. v. 68, n. 8, p. 1623-1627, 2005.

MUYTJENS, H. L., KOLLÉE, L. A. A., *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: a causative role of formula. **Pediatric Infectious Diseases Journal**., v.9, p.372-373, 1990.

MUYTJENS, H. L., ROELOFS-WILLEMSE, H., 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., 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, n. 1, p.115-120, 1983.

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

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

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil:** ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. São Paulo, 2005. 122p. Tese (Doutor em Alimentos e Nutrição Experimental) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

NOVAIS, C. M., ALVES, M. P., SILVA F. F. PCR em tempo real, **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 33 ed., jul/dez., 2004.

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. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 713-717, mai/jun., 2001.

OTTONI, C. M. C. **Enterocolite necrosante, Temas de pediatria n. 56**, Serviço de Informação Científica Nestlé, 19p. Disponível no site <http://www.nestle.com.br/nutriçãoinfantil>, acesso em: 20/07/2005.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 3, p.319-326, jul/set., 2004.

RANGASAMY, P.N.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. **Aust. J. Dairy Technol.** v.48, p.93-95, 1993.

ZUCATO, N. Regulamento (CE) N. 2073/2005, da Comissão de 15 de Novembro de 2005. **Jornal Oficial da União Européia**. Relativos a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por rosana@ital.sp.gov.br em 18/01/2006.

SEO, K. H.; BRACKETT, R. E. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a Real-Time PCR assay, **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p.59-63, 2005.

SILVA, N. CANTUSIO NETO, R., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F., **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. Campinas: Instituto Tecnologia de Alimentos. 2005, 164p.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v.18, n. 122, p.32-39, 2004.

SOUZA C. L., CAMPOS, G. D. Condições higiênico-sanitárias de uma dieta hospitalar. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 127-134, jan/mar., 2003.

SOUZA, R. R., GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. Técnica da simulação aplicada ao treinamento de manipuladores de alimentos, como recurso para a segurança de refeições transportadas. **Revista Higiene Alimentar**. v.18, n. 122, p.21-25, Julho, 2004.

SANTOS, M. I. S.; TONDO, E. C. Determinação de perigos e pontos críticos de controle para a implantação de sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em lactário, **Revista Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 3, p. 211-222, set/dez.,2000,

TANIWAKI, M. H. **O conceito de segurança alimentar no contexto internacional** In I Seminário de segurança alimentar, Ital, Campinas, São Paulo, 05 de junho de 2003.

TEIXEIRA, L. A. B., BONACIM, J. E., FRANÇA, J. M., VIEIRA, H. R. A. Aspectos microbiológicos de produtos alimentícios comercializados no município de Curitiba, Paraná, 1998 a 2001. **Revista Higiene Alimentar**. v. 18, n. 126/127, p. 88-97, nov/dez., 2004.

URMENI, A. M. C., FRANKLIN, A. W., Neonatal death from pigmented coliform infection. **Lancet**. v.1, p.313-315, 1961.

Van NETTEN, P.; MOOSDIJK, A.; HOENSEL, P.; MOSSEL, D.A.A.; PERALES, I. Pyschrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **Journal of Applied Bacteriology** v.69, p. 73-79, 1990.

VIEIRA, M. T. C., LOPES, J. M. A. Fatores associados a enterocolite necrosante. **Jornal de Pediatria**. v.79, n.2, p.59-164, 2003.

WORLD HEALTH ASSOCIATION (WHO). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report, **Microbiological Risk Assessment Series, no 6**, 2004 ISBN: 9241562625. Disponível em: www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/em/index/html, acesso em: 22/01/2006.

Anexo 1. Fotos ilustrando a condição ambiental de um determinado lactário, antes de receber acompanhamento das boas práticas de manipulação e orientação.



