



Identificação de *Cronobacter* spp. em queijos e perfil de suscetibilidade antimicrobiana

Identification of *Cronobacter* spp. in cheeses and the antimicrobial susceptibility profile

RIALA6/1697

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO*, Gisele Olivieri Soares MEIER, Carla Trece CARVALHO, Débora Alves Ferreira da SILVA, Natália Scudeller UMEDA, Valéria de Mello MEDEIROS, Carla de Oliveira ROSAS, Sílvia Maria dos Reis LOPES

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Saneantes, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365. Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: 21 3865 5161. E-mail: marcelollb8@gmail.com

Recebido: 22.01.2016 - Aceito para publicação: 15.05.2016

RESUMO

Cronobacter spp. é um patógeno oportunista que pode causar infecções em indivíduos de qualquer idade, cuja incidência é maior em neonatos, pacientes imunocomprometidos e idosos. Neste estudo *Cronobacter* spp. foi pesquisado em 90 amostras de queijos (30 do tipo Minas Frescal, 30 do tipo Prato e 30 do tipo Prato fatiado). As espécies isoladas foram identificadas, e foi avaliado o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. A pesquisa foi realizada utilizando-se pré-enriquecimento em água peptonada tamponada, enriquecimento seletivo no caldo lauril sulfato triptose contendo vancomicina, isolamento no meio *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar e identificação no Vitek 2.0. As espécies foram identificadas por meio de múltipla PCR com alvo no gene *cgcA*. O antibiograma foi realizado pela técnica de difusão em ágar (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. foi isolada em uma (1,1 %) amostra de queijo tipo Minas Frescal, identificada como *C. sakazakii* que apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. *Cronobacter* spp. pode não representar risco à saúde dos indivíduos pelo consumo de queijos produzidos com leite pasteurizado. Entretanto, a presença de *Cronobacter* spp. em uma amostra de queijo demonstra falhas na produção, o que reforça a necessidade de maior adesão às Boas Práticas de Fabricação.

Palavras-chave. *Cronobacter*, queijo, PCR, antibiograma.

ABSTRACT

Cronobacter spp. is an opportunistic pathogen that may cause infections in individuals of any age, and the highest incidence occurs in neonates, immunocompromised patients and elderly persons. This study investigated *Cronobacter* spp. occurrence in 90 cheese samples (30 "Minas Frescal" type cheeses, 30 "Prato" type and 30 sliced "Prato" type). The isolated species were identified and the antimicrobial susceptibility profile of the isolated strains was evaluated. The microbiological assay was performed with pre-enrichment in buffered peptone water, and selective-enrichment in modified lauryl sulphate tryptose broth containing vancomycin. Isolation and identification were done in *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar and in Vitek 2.0, respectively. The species identification was performed by multiple PCR targeting *cgaA* gene. Antibiogram was done using agar diffusion method (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. was isolated from one (1.1 %) sample of "Minas Frescal" type cheese, identified as *C. sakazakii* which was sensitive to all of tested antimicrobials. *Cronobacter* spp. does not represent a risk to the individuals health by consuming cheeses made from pasteurized milk. However, the presence of *Cronobacter* spp. in one sample of analyzed cheese indicates failures in their production, reinforcing the need for following the Good Manufacturing Practices.

Keywords. *Cronobacter*, cheese, PCR, antibiogram.

INTRODUÇÃO

Cronobacter spp. é um patógeno oportunista que pode causar infecções em indivíduos de qualquer idade, sendo neonatos, imunocomprometidos e idosos os grupos com maior incidência¹. Surtos causados por *Cronobacter* spp. já foram reportados em diversos países^{1,2}, incluindo o Brasil³.

Fórmulas infantis desidratadas já foram epidemiologicamente identificadas como veículos de contaminação em casos de infecções por *Cronobacter* spp. em neonatos, levando a quadros graves como bacteremia e meningite^{2,3}. Em idosos e adultos imunocomprometidos não há relatos de casos de meningite, mas já foram descritos outros tipos de síndromes clínicas como: infecções urinárias, pneumonia e bacteremia¹. *Cronobacter* spp. já foi isolado de uma grande diversidade de produtos alimentícios⁴⁻⁶, incluindo alimentos prontos para o consumo como queijos⁷, que são frequentemente recomendados em dietas como fonte de proteínas e de outros nutrientes^{8,9}.

Planzer et al.⁸ realizaram uma pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (RJ) sobre as práticas e hábitos de consumo de queijos e observaram que o queijo Minas Frescal (QMF) e o queijo Prato (QP) eram alguns dos tipos de queijo mais consumidos. Dados da pesquisa também mostraram que a frequência do consumo de queijos em mais da metade dos entrevistados era diária⁸. Logo, a qualidade microbiológica destes queijos é de grande importância tendo em vista o grande consumo que eles possuem. Quando não produzidos seguindo os padrões de higiene, estes produtos podem oferecer riscos aos consumidores devido à presença de patógenos⁹. Logo, a contaminação destes produtos por *Cronobacter* spp. pode representar um risco para estes indivíduos.

Tendo em vista a indicação de que os alimentos possam atuar como veículo de contaminação em casos de infecções por *Cronobacter* spp. em idosos e indivíduos imunocomprometidos, os objetivos deste estudo foram pesquisar a ocorrência de *Cronobacter* spp. em queijos de acordo com a metodologia

ISO 22964:2006¹⁰ com alterações, identificar as espécies e avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

No período de maio a novembro de 2015 foram analisadas 90 amostras de queijos de 34 marcas distintas. As amostras foram coletadas de forma aleatória e adquiridas em embalagens primárias sob a forma íntegra ou fracionada em diferentes estabelecimentos comerciais (supermercados, padarias, mercearias, entre outros) localizados em dois municípios: Rio de Janeiro-RJ e Niterói-RJ. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio durante o período de análises. Deste total, 30 amostras eram de queijo Minas Frescal (QMF), 30 de queijo Prato (QP) e 30 de queijo Prato fatiado (QPF) que foram mantidas refrigeradas (2-8 °C) até o momento das análises.

Análise microbiológica

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada de acordo com a metodologia ISO 22964:2006¹⁰ com alterações. Vinte e cinco gramas da amostra foram pesados em um saco plástico *Whirl-Pak* (Nasco, EUA), seguido da adição de 225 mL de água peptonada tamponada (Merck, Alemanha) e homogeneização em *Stomacher* durante sessenta segundos. Após incubação a 35 °C/24 h, uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada a 10 mL de caldo lauril sulfato triptose contendo vancomicina (mLST/v; Oxoid, Inglaterra) com incubação a 42 °C/24 h. Posteriormente, as amostras foram semeadas por superfície em *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar (ESIA; AES-Chemunex, França) e as placas incubadas a 42 °C/24 h. Optou por se utilizar a temperatura de incubação de 42 °C, ao invés de 44 °C que é a preconizada na metodologia ISO 22964:2006¹⁰, com o objetivo de recuperar cepas termossensíveis, pois já existem relatos na literatura de cepas de *Cronobacter* spp. que não crescem a 44 °C^{4,11,12}. As colônias características foram isoladas em ágar nutriente (BD, EUA) e submetidas à confirmação no sistema Vitek 2.0

(bioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante.

As cepas de *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) e de *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas.

Identificação das espécies

A identificação das espécies de *Cronobacter* foi realizada por múltipla reação em cadeia pela polimerase (M-PCR) com alvo no gene *cgcA*¹³. Foram utilizadas salas segregadas para extração de ácido desoxirribonucleico (DNA), preparo das reações, amplificação do DNA e eletroforese, de forma a evitar contaminação cruzada das amostras.

A extração de DNA foi realizada com o kit *Dnasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi dosada em espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA). As reações foram preparadas em um volume total de 25 µL contendo: 5 µL de DNA molde (20-60 ng/µl), 5,0 pmol de cada iniciador e *PCR MasterMix* 1X (ThermoScientific, EUA). A amplificação foi realizada no *Simpli Amp Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Singapore).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % a 100 V/ 50 min. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (Sigma, EUA) por 15 min e visualizado em analisador de imagens (GE-Healthcare, Inglaterra).

Água livre de DNase/RNase (BioBasic, Canadá) foi utilizada como controle negativo em cada reação. O DNA extraído das cepas de referência *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578), *Cronobacter malonaticus* LMG 23826 (INCQS 00619), *Cronobacter turicensis* LMG 23827 (INCQS 00615), *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329 (INCQS 00579), *Cronobacter dublinensis* LMG 23823 (INCQS 00618) e *Cronobacter universalis* NCTC 9529 (INCQS 00599) foi utilizado como controle positivo.

Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliado pelo método de difusão (Kirby-Bauer) em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015)¹⁴. Foram testados os antimicrobianos (BIO-RAD Laboratories Inc, França) recomendados para avaliação de isolados da família *Enterobacteriaceae*, nas seguintes concentrações: ampicilina (AMP; 10 µg), piperacilina-tazobactam (PPT; 100/10 µg), ampicilina-sulbactam (SAM; 10/10 µg), amoxicilina-clavulanato (AMC; 20/10 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), aztreonam (ATM; 30 µg), meropenem (MER; 10 µg), gentamicina (GEN; 10 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT; 1,25/23,75 µg), ácido nalidíxico (NAL; 30 µg) e nitrofurantoína (NIT; 300 µg). O diâmetro da zona de inibição foi mensurado e os isolados foram classificados como sensível, intermediário ou resistente de acordo com as recomendações do CLSI¹⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cronobacter spp. foi detectado em uma (1,1 %) das 90 amostras analisadas, sendo esta uma amostra de QMF. O isolamento de *Cronobacter* spp. em queijos já foi reportado anteriormente em outros países, também com baixa ocorrência. El-Sharoud et al⁷ pesquisaram *Cronobacter* spp. em 40 amostras de queijos distintos comercializados no Egito, e isolaram a bactéria em quatro amostras (10,0 %), sendo todas de queijos frescos tipo Domiatti. Molloy et al⁴ analisaram 20 amostras de queijos não pasteurizados e Mozrová et al⁶ analisaram 15 amostras de queijo e não detectaram *Cronobacter* spp. Sing et al⁵ analisaram 23 amostras de produtos lácteos, incluindo sete amostras de leite cru, nove de leite pasteurizado, cinco de coalhada e duas de iogurte e somente isolaram o microrganismo de duas amostras de leite cru.

De acordo com a revisão na literatura realizada por Osaili e Forsythe¹⁵, bactérias do gênero *Cronobacter* não sobrevivem a tratamentos térmicos similares ao de pasteurização. A presença de *Cronobacter* spp. em leite cru indica que queijos produzidos a partir desse leite podem apresentar maior risco de contaminação pelo patógeno no produto final.

Neste estudo, a amostra de QMF que apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. possui Selo de Inspeção Federal (S.I.F.) e, de acordo com o rótulo, foi produzida com leite pasteurizado. Isso sugere que a contaminação pode ter ocorrido caso a pasteurização do leite não tenha sido eficiente ou que a contaminação tenha ocorrido em etapas após o tratamento térmico. *Cronobacter* spp. já foi isolado de amostras ambientais como água, solo e poeira⁵, indicando que o microrganismo também pode estar presente em ambientes de produção.

Nenhuma amostra de QP e QPF apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. Estes resultados devem estar associados ao fato de que o QP também é produzido com leite pasteurizado e a massa é submetida a uma etapa de cozimento⁹ o que reduz as chances de recontaminação até essa fase.

No Brasil, Platte¹⁶ analisou 30 amostras de QMF comercializados no município de Niterói/RJ e relatou o isolamento de *Cronobacter* spp. em 13 (43,3 %) amostras. Contudo, a autora utilizou na etapa de identificação a produção de pigmento amarelo e o sistema miniaturizado Bactray[®] I e II e, atualmente, sabe-se que a produção de pigmento amarelo e que estes kits miniaturizados não são confiáveis para identificação do gênero *Cronobacter*, uma vez que já existem relatos na literatura de resultados falso-positivos e falso-negativos com o uso destes procedimentos^{11,12}. De acordo com Druggan e Iversen¹², deve-se tomar muito cuidado com o uso de galerias comerciais de identificação bioquímica devido à baixa eficiência destes sistemas na identificação de *Cronobacter* spp., particularmente nos que a interpretação é

preditiva. Atualmente, os métodos moleculares são considerados mais confiáveis para identificação das cepas do gênero^{11,12}.

Neste estudo, 14 amostras apresentaram colônias características no ESIA e foram submetidas ao Vitek 2.0, sendo apenas um isolado confirmado como *Cronobacter* spp. Bionúmero 0621734051222010, sendo identificado posteriormente, como *C. sakazakii* pela M-PCR. Estes resultados foram similares aos de outros estudos que também relataram maior ocorrência da espécie *C. sakazakii* em produtos alimentícios^{4,6,7}. Por outro lado, El-Sharoud et al⁷ identificaram a espécie *C. malonaticus* em todas as quatro amostras de queijos frescos tipo Domiatti em que isolou o patógeno.

Os isolados não confirmados como *Cronobacter* foram identificados como *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozaenae* e também apresentaram atividade α -glicosidase positiva no Vitek 2.0, que é o marcador responsável pela diferenciação das colônias no meio cromogênico ESIA. O isolamento de outras enterobactérias que também apresentam atividade α -glicosidase já foi relatado, o que demonstra a importância do uso de técnicas confiáveis para identificação de *Cronobacter* spp. após o isolamento nos meios cromogênicos^{11,12}.

Na avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, o isolado de *C. sakazakii* foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Resultados similares foram relatados por Molloy et al⁴ que isolaram *Cronobacter* spp. de alimentos susceptíveis a maioria dos antimicrobianos avaliados no estudo. *C. malonaticus* isolados de queijo por El-Sharoud et al⁷ também apresentaram sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados (ampicilina, sulfonamidas, furazolidona, gentamicina, espectinomicina e estreptomicina). Os autores relataram resistência apenas à neomicina e trimetoprim, contudo estes antimicrobianos não foram avaliados no presente estudo não permitindo assim uma comparação.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados dessa pesquisa pode-se concluir que *Cronobacter* spp. não representa risco à saúde dos consumidores por meio do consumo de queijos produzidos com leite pasteurizado. Entretanto, a ocorrência em uma amostra de queijo tipo Minas Frescal demonstra falhas na produção, reforçando a necessidade de maior adesão às Boas Práticas de Fabricação por parte dos produtores.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo e ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz no qual Marcelo Brandão foi aluno de doutorado e Gisele Meier, Débora Alves e Carla Trece são Residentes. Ao CNPq por concessão de bolsa de iniciação científica a Natália Umeda (PIBIC/Fiocruz).

REFERÊNCIAS

1. Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A, Wymore K, et al. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(9):1520-3. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2009.140545>].
2. Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Genova, WHO, 2008. (15),90 p. [acesso 2015 Dez 17]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_followup.pdf].
3. Brandão MLL, Umeda NS, Carvalho KR, Filippis I. Investigação de um surto causado por *Cronobacter malonaticus* em um hospital maternidade em Teresina, Piauí: caracterização e tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):91-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3395/2317-269x.00290>].
4. Molloy C, Cagney C, O'Brien S, Iversen C, Fanning S, Duffy G. Surveillance and characterization by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int J Food Microbiol*. 2009; 136(2):198-203. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.007>].
5. Singh N, Goel G, Raghav M. Prevalence and characterization of *Cronobacter* spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples. *Curr Microbiol*. 2015;71 (1):31-8. [DOI: 10.1007/s00284-015-0816-8].
6. Mozrová V, Břeňová N, Mrázek J, Lukešová D, Marounek M. Surveillance and characterization of *Cronobacter* spp. in Czech retail food and environmental samples. *Folia Microbiol (Praha)*. 2014;59(1):63-8. [DOI: 10.1007/s12223-013-0266-2].
7. El-Sharoud WM, O'Brien S, Negredo C, Iversen C, Fanning S, Healy B. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol*. 2009;9:24. [DOI:10.1186/1471-2180-9-24].
8. Planzer SB Jr, da Cruz AG, Sant'ana AS, Silva R, Moura MR, de Carvalho LM. Food safety knowledge of cheese consumers. *J Food Sci*. 2009;74(1):M28-30. [DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00995.x].
9. Pinto PSA, Nero LA, Germano MIS, Germano PML. Qualidade do queijo. In: Germano PML, Germano MIS, organizadores. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. Barueri: Manole; 2011.p.147-66.
10. International Organization for Standardization / International Dairy Federation – ISO/IDF. Technical specification: milk and milk products – detection of *Enterobacter sakazakii*. ISO/TS22964:2006; IDF/RM 210;2006.
11. Warnken MB, Brandao MLL, Souza AE, Romão CMCP, Nogueira ACMA, Destro MT. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(1):21-31.

12. Druggan P, Iversen C. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. *Int J Food Microbiol*. 2009;136 (2):169-78.[DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.008>].
13. Carter L, Lindsey LA, Grim CJ, Sathyamoorthy V, Jarvis KG, Gopinath G, et al. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter*. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79 (2):734-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02898-12>].
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement, Wayne, PA, USA. 2015; 35 (3):M100-S15.
15. Osaili T, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):214-20. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006>].
16. Platte CS. *Cronobacter* spp. e outras bactérias patogênicas: avaliação da presença e sensibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas em produtos lácteos [dissertação de mestrado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2014.