



Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Marcelo Soares de Moraes

Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis e caracterização de outras bactérias Gram-negativas isoladas desses alimentos e de utensílios utilizados em seu preparo

Rio de Janeiro, RJ
2015

Marcelo Soares de Moraes

Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis e caracterização de outras bactérias Gram-negativas isoladas desses alimentos e de utensílios utilizados em seu preparo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Janaína dos Santos Nascimento
Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Emanuel de Oliveira Costa

Rio de Janeiro, RJ
2015

Moraes, Marcelo Soares de

Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis e caracterização de outras bactérias Gram-negativas isoladas desses alimentos e de utensílios utilizados em seu preparo/ Marcelo Soares de Moraes – Rio de Janeiro: IFRJ, 2015.

ix, 89 f.(número de folhas): 15 il.; 29,7 cm.

Orientadora: Janaína dos Santos Nascimento

Dissertação [Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2015.

Referências bibliográficas: f 42-52.

1. *Salmonella enterica* 2. fórmulas lácteas infantis 3. bactérias Gram-negativas 4. utensílios 5. lactário I. Nascimento, Janaína dos Santos Nascimento II. IFRJ, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos III. Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis e caracterização de outras bactérias Gram-negativas isoladas desses alimentos e de utensílios utilizados em seu preparo.

Marcelo Soares de Moraes

Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis e caracterização de outras bactérias Gram-negativas isoladas desses alimentos e de utensílios utilizados em seu preparo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data de aprovação: ____/____/____

Prof. Dra. Janaína dos Santos Nascimento
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Leonardo Emanuel de Oliveira Costa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Lívia Cristina Liporagi Lopes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Marcia Cristina da Silva
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – RJ

2015

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito".

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo todos os dias. Por permitir ter o que quis e o que não queria ter e assim me tornar um pouquinho melhor a cada dia.

À minha mãe por seu apoio incondicional, por valorizar e incentivar os meus desejos.

Às colegas de turma do Mestrado 2013, pelos momentos de alegria e companheirismo.

Aos professores do curso da Pós Graduação pelos ensinamentos transmitidos, em especial ao Prof^o. Leonardo Costa e a Prof^a Barbara de Oliveira.

Ao Brendon Chaves Araújo, bolsista do Laboratório de Microbiologia, pelo apoio, disponibilidade, vontade e comprometimento em todas as etapas deste estudo.

À nutricionista Adriana Ilá Granja de Souza pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho.

A todos da Pós-Graduação pelo seu trabalho, orientação, por permitir que este curso aconteça.

À banca examinadora pela disposição em participar do aprimoramento deste estudo com seus conhecimentos e sugestões.

Finalmente, dedico este trabalho a minha estimada orientadora Prof.^a Dra. Janaína Nascimento, minha MESTRA. Sem você nada teria acontecido! Obrigada pelo incentivo, ensinamentos, confiança e por estar sempre presente e disposta a me ajudar. Agradeço por sua amizade, dedicação, pelo profissionalismo ímpar e por sua generosidade. Você foi uma das bênçãos que Deus colocou na minha vida. Mais uma vez, muito obrigada!

MORAES, M. S. **Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis e caracterização de outras bactérias Gram-negativas isoladas desses alimentos e de utensílios utilizados em seu preparo.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós Graduação Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2014.

RESUMO

Salmonella enterica é um dos mais importantes patógenos, associados a fórmulas lácteas. Na primeira parte deste trabalho, duas fórmulas lácteas infantis (FLI) reconstituídas foram contaminadas artificialmente com a estirpe de *Salmonella enterica* sub sp. *enterica* ATCC 19214 até a concentração de $8,0 \times 10^4$ ufc/ml e foram incubadas sob temperatura ambiente e de refrigeração. Sob temperatura ambiente, em ambas as FLI, houve um aumento de 3,3 log na população de *S. enterica* logo nas primeiras 24 h de incubação e de, aproximadamente, 3,8 log após 48 h. Ao término de 72 h, foi observado, em ambas as FLI, aumento superior a 4,5 log da concentração celular. Enquanto que sob temperatura de refrigeração, nas primeiras 48 h de incubação, foi detectado leve crescimento populacional (inferior a 1 log) e após 72 h, observou-se crescimento similar ao das fórmulas incubadas à temperatura ambiente. Para avaliar a sobrevivência de *S. enterica* após o aquecimento, recipientes contendo as FLI reconstituídas foram inoculados com essa bactéria de modo a atingir a concentração inicial de 10^6 ufc/ml e foram submetidos ao aquecimento em banho-maria e em forno de micro-ondas convencional. O aquecimento em banho-maria a 60°C por 5 min resultou na redução de cerca de 1 log ufc/ml em ambas as fórmulas. Já o aquecimento a 60°C por 10 min resultou em uma queda de 2,3 e 2,8 log ufc/ml nas fórmulas Aptamil1 e Aptamil2, respectivamente. Quando submetidas ao aquecimento a 70°C por 5 min, observou-se, em ambas as fórmulas, uma redução de 3 log ufc/ml e, mediante o aquecimento por 10 min, a redução foi de 3,7 e 4,0 log ufc/ml para as fórmulas Aptamil1 e Aptamil2, respectivamente. O aquecimento em forno de micro-ondas mostrou ser a forma mais eficiente de redução da população de *Salmonella* nas FLI, uma vez que não foi detectada contagem celular após o aquecimento por 30, 45, 60 e 90 segundos. Esses resultados sugerem que FLI

contaminadas durante a etapa de preparo podem apresentar um crescimento bacteriano elevado já nas primeiras 24 h se mantidas em temperatura ambiente e que, mesmo sob refrigeração adequada e algumas formas de aquecimento podem não ser suficientes para inibição completa de *S. enterica*. Na segunda etapa do trabalho, quarenta e cinco isolados distintos foram obtidos de fórmulas infantis reconstituídas, de superfícies e de utensílios utilizados em seu preparo oriundos do lactário de um hospital público da cidade do Rio de Janeiro. Os microorganismos pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii/ calcoaceticus* (ABC) foram as bactérias Gram-negativas mais isoladas (37,8%), seguidas de *Enterobacter cloacae* (26,7%) e, surpreendentemente, de *Shigella dysenteriae* (11,1%). Os isolados obtidos foram testados quanto à resistência a diferentes antibióticos e, com exceção do isolado JE1, todos os demais foram resistentes a pelo menos um antibiótico, sendo que 40 estirpes (88,9%) exibiram um fenótipo típico de multirresistência. Investigações preliminares no lactário mostraram alguns procedimentos inadequados na sanitização dos utensílios utilizados no preparo e distribuição das FLI. De modo a minimizar a contaminação bacteriana no lactário do hospital, foi elaborada uma cartilha que será utilizada em cursos rápidos de treinamento dos lactaristas sobre as principais normas de higiene e de preparo de FLI.

Palavras-chave: fórmulas lácteas infantis, utensílios, *Salmonella enterica*, *Acinetobacter* sp., multirresistência a antibióticos.

MORAES, M. S. **Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis e caracterização de outras bactérias Gram-negativas isoladas desses alimentos e de utensílios utilizados em seu preparo.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós Graduação Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2014.

ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the most important pathogens related to infant milk formulas. On the first part of this work, two infant milk formulas (IMF) were reconstructed and artificially contaminated with the strain *Salmonella enterica* sub sp. *enterica* ATCC 19214 up to a concentration of 8.0×10^4 cfu/ml and incubated at room and refrigerated temperatures. At room temperature, both IMF presented an increase of 3.3 log in the population of *S. enterica* at the first 24 h of incubation and about 3.8 log after 48 h. At the end of 72 h was observed in both IMF, an increase greater than 4.5 log in cell concentration. Under refrigeration, in the first 48 h of incubation, a light population growth (less than 1 log) was detected, and after 72 h, we observed a growth similar to that presented by formulas incubated at room temperature. To assess the survival of *S. enterica* after heating, containers containing the reconstructed IMF were inoculated with this micro-organism to achieve the initial concentration of 10^6 cfu / ml and were subjected to heating in a water bath and a conventional microwave. The heating bath at 60°C for 5 min resulted in a reduction of about 1 log cfu/ml in both formulas. The heating at 60°C for 10 min resulted in a decrease of 2.3 and 2.8 log cfu/ml in the formulas Aptamil1 and Aptamil2, respectively. When subjected to heating at 70°C for 5 min, both formulas presented a reduction of 3 log cfu/mL and by heating for 10 min, the reduction was 3.7 to 4.0 log cfu ml for Aptamil1 and Aptamil2, respectively. The heating in the microwave has proved to be the most efficient way of reducing populations of *Salmonella* in the IMF, since no cell count was detected after heating for 30, 45, 60 and 90 seconds. These results suggest that IMF contaminated during preparation step may have a high bacterial growth within the first 24 h if kept at room temperature and even proper cooling and that some forms of heating may not be sufficient for the complete inhibition of *S. enterica*. In the second part of the work, forty-five distinct isolates were obtained from

reconstituted infant formula, surfaces and utensils used in their preparation derived from the lactary of a public hospital in the city of Rio de Janeiro. Microorganisms belonging to *Acinetobacter baumannii* / *calcoaceticus* complex were the most isolated Gram-negative bacteria (37.8%), followed by *Enterobacter cloacae* (26.7%) and surprisingly, *Shigella dysenteriae* (11.1%). The isolates were tested for resistance to different antibiotics and, except for isolate JE1, all other showed resistance to at least one antibiotic, and 40 (88.9%) exhibited a typical phenotype of multidrug resistance. Preliminary investigations at the lactation center showed some inadequate procedures for the sanitization of utensils used in the preparation and distribution of FLI. In order to minimize bacterial contamination in hospital lactation center, a guidebook was elaborated to be used in short courses of training of the staff on the main rules of hygiene and preparation of FLI.

Keywords: infant milk formulas, utensils, *Salmonella enterica*, *Acinetobacter* sp., multidrug resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplos de fórmulas lácteas infantis amplamente consumidas no Brasil. **2**
- Figura 2:** Curva de crescimento da estirpe *Salmonella enterica* ATCC19214, durante 72 horas, na fórmula láctea infantil Aptamil 1 armazenada sob temperatura ambiente e sob temperatura de refrigeração (4°C) **24**
- Figura 3:** Curva de crescimento da estirpe *Salmonella enterica* ATCC19214, durante 72 horas, na fórmula láctea infantil Aptamil 2 armazenada sob temperatura ambiente e sob temperatura de refrigeração (4°C). **24**
- Figura 4:** Concentração de *Salmonella enterica* em FLI artificialmente contaminadas submetidas a aquecimento em banho-maria **26**
- Figura 5:** Porcentagem de espécies identificadas neste trabalho **30**
- Figura 6:** Atividade hemolítica apresentada pelas estirpes estudadas neste trabalho. **38**
- Figura 7:** Atividade proteolítica em placas de ágar leite apresentada pelas estirpes. **37**
- Figura 8:** Atividade da enzima DNase apresentada pela estirpe. **38**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de micro-organismos com base na causalidade.	9
Tabela 2: Estirpes de referência utilizadas neste trabalho	16
Tabela 3: Concentração celular de <i>S. enterica</i> nas fórmulas lácteas após o aquecimento em forno micro-ondas convencional.	27
Tabela 4: Micro-organismos isolados a partir de amostras coletadas no lactário de um hospital público do Rio de Janeiro.	29
Tabela 5: Perfil de resistência a antibióticos apresentada pelas bactérias Gram-negativas estudadas neste trabalho.	33
Tabela 6: Identificação de estirpes de <i>Acinetobacter</i> multirresistentes a antibióticos	34
Tabela 7: Detecção da produção de biofilme através do método do vermelho Congo.	36
Tabela 8: Fatores de virulência apresentados pelos isolados obtidos neste trabalho	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

D O: Densidade Óptica

ESBL: Betalactamases de Espectro Ampliado

FAO: *Food and Agricultural Organization*

FLI: Fórmula láctea infantil

IFRJ: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Rio de Janeiro

HIV: *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

LIA: Agar ferro lisina

MDR: *Multi-drug resistance* (multirresistência a drogas)

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde

RDC: Recomendação Diretoria Colegiada

SAM: Substância Antimicrobiana

TSI: *Triple sugar iron* (Agar Tríplice açúcar ferro)

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UTI: Unidade de Tratamento Intensivo

WHO: *World Health Organization*

XLD: Xilose Lisina Dextrose

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1. Fórmulas lácteas infantis (FLI)	2
2.2. Comorbidades associadas ao FLI	3
2.3. Contaminação da FLI	7
2.4. <i>Salmonella</i> sp em FLI	8
2.5. A Problemática da resistência a antibióticos	11
2.6. A Produção de Biofilme em utensílios utilizados no preparo das FLI	12
3. Justificativa	13
4. Objetivos	15
4.1. Objetivo geral	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. Materiais e Métodos	16
5.1. Estirpes	16
5.2. Fórmulas lácteas infantis	17
5.3. Avaliação do crescimento de <i>S. enterica</i> em FLI sob diferentes formas de preparo	17
5.4. Enumeração de <i>S. enterica</i>	18
5.5. Sobrevivência de <i>S. enterica</i> em FLI sob temperatura ambiente e de refrigeração	18
5.6. Análises estatísticas	18
5.7. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. E de outras enterobactérias em amostras de FLI reconstituídas e de utensílios e superfícies utilizados em seu preparo	19
5.8. Avaliação da produção de fatores de virulência	20
5.9. Perfil de resistência a antibióticos	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 .1. Avaliação da sobrevivência de <i>Salmonella enterica</i> em formulas lácteas infantis sob temperatura ambiente e de refrigeração	25
6 .2 Avaliação da sobrevivência de <i>Salmonella enterica</i> em formulas lácteas infantis após aquecimento	25

6.3 Caracterização de estirpes de enterobactérias isoladas de fórmulas lácteas infantis reconstituídas e utensílios utilizados em seu preparo	28
6.3.1. Identificação dos isolados	28
6.3.2. Resistência a antibióticos	31
6.3.3. Produção de biofilme	35
6.3.4. Produção de outros fatores de virulência	37
7. ELABORAÇÃO DA CARTILHA PARA UM CURSO RÁPIDO DE TREINAMENTO DAS LACTARISTAS	40
8. CONCLUSÕES	41
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
11. ANEXOS	54

1. INTRODUÇÃO

Neonatos e outros grupos de alto risco, como imunossuprimidos, indivíduos HIV positivos e idosos, são os mais susceptíveis a desencadear doenças de origem alimentar por patógenos oportunistas. No caso dos bebês, o baixo peso ao nascer e a permanência em unidades de cuidados intensivos neonatais os tornam mais suscetíveis a diferentes infecções hospitalares (MARDANEH & SOLTAN-DALLAL, 2014).

Embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomende que os bebês devam ser alimentados exclusivamente por leite materno nos primeiros seis meses de vida (WHO, 2007), sabe-se que nem sempre isso é possível e, dessa forma, faz-se necessário buscar um alimento adequado e seguro em substituição ao leite materno, que é o caso das fórmulas lácteas infantis (FLI).

Há evidências de que *Cronobacter* spp. (antigamente descrito como *Enterobacter sakazakii*) e *Salmonella enterica* sejam os mais preocupantes patógenos associados às fórmulas lácteas, uma vez que são capazes de ocasionar diversas doenças na população de risco que consome esse alimento. Vários trabalhos relatam que, mesmo em FLI reconstituídas que passaram por algum processo de aquecimento ou reaquecimento, é possível a detecção desses patógenos viáveis (ARSALAN *et al.*, 2013a; BEJARANO-RONCANCIO & CASTILLO-QUIROGA, 2013; CORCORAN *et al.*, 2014; HA & KANG, 2014).

Após a emissão de orientações sobre a preparação de fórmulas lácteas infantis pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007), vários métodos de detecção foram desenvolvidos para apoiar e melhorar as medidas de controle na produção desses alimentos através dos critérios microbiológicos internacionais (CAC, 2008; OSAILI & FORSYTHE, 2009). Entretanto, vale ressaltar de que no Brasil, embora a RDC12 (BRASIL, 2001) preconize a pesquisa de diferentes patógenos em fórmulas infantis, tais como coliformes, estafilococos coagulase-positiva e *Salmonella sp.*, nem todo lactário realiza, com frequência o controle microbiológico de suas FLI.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fórmulas lácteas infantis (FLI)

A amamentação é uma ação materna que visa alimentar a criança logo após o nascimento, e envolve fatores biológicos, socioeconômicos, psicológicos e culturais, enfatizando os laços afetivos entre a mãe e o bebê (BEJARANO-RONCANCIO, 2013).

Quando a amamentação não é possível, devido a doenças (herpes simplex, varicela, HIV, tuberculose), cirurgias na mama ou outros fatores, as FLI podem ser utilizadas na alimentação e suplementação da criança, principalmente nos seis primeiros meses de vida (SILVA, VENANCIO & MARCHIONI, 2010; ARSALAN *et al.*, 2013a).

As fórmulas lácteas são produtos alimentícios desenvolvidos na forma líquida ou em pó para suprir as necessidades de alimentação de crianças e recém-nascidos que por diferentes motivos não possam utilizar o leite materno. Na indústria alimentícia, atualmente estão disponíveis diferentes tipos de FLI (**Figura 1**), elaboradas a partir de leite humano, leite de vaca e outros mamíferos contemplando os macro e micronutrientes necessários para o aporte nutricional das crianças, uma vez que é a única fonte de nutrientes (WEFFORT, 2012).



Figura 1: Exemplos de fórmulas lácteas infantis amplamente consumidas no Brasil. (Fonte: http://www.clinicalen.com.br/detalhes-pediatria-saude.php?cod_pediatria_saude=98&cod_pediatria_saude_categoria=9)

O uso das FLI deve ser específico para cada faixa etária, de forma que atenda

as necessidades nutricionais, sendo sua composição química com valores aproximados ao leite materno de macro e micronutrientes (SANTIAGO, 2006; ROSSI, 2010).

Na década de 50, foram reconhecidas as necessidades de nutrientes essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento infantil e as fórmulas lácteas eram a única alternativa de suprir essas necessidades. Neste mesmo período, com todos os avanços tecnológicos na produção de fórmulas lácteas, verificou-se que a mortalidade infantil era superior em crianças que utilizavam essas fórmulas quando comparadas as crianças com alimentação exclusiva ao leite materno (CAMINHA, 2010), reforçando a importância da amamentação.

De acordo com MORO e MESQUISTA (2011), diversas fórmulas lácteas são enriquecidas com nutrientes essenciais para a formação e o desenvolvimento do lactente como a taurina, que colabora na formação do tecido nervoso e atua no metabolismo dos ácidos biliares. As fórmulas infantis que apresentam uma relação de 60:40 de proteína do soro e caseína possuem maior digestibilidade ao lactente, sendo enriquecidas com vitaminas e minerais essenciais nessa fase de desenvolvimento.

A baixa concentração de eletrólitos como sódio, potássio e cloro na composição das fórmulas diminui a sobrecarga renal destes elementos. O ferro foi adicionado às fórmulas infantis para a prevenção da anemia ferropriva, reduzindo de forma significativa a ocorrência deste tipo de anemia em diversos países entre os anos 70 e 90. Outros nutrientes como o zinco e o cobre foram suplementados nas fórmulas devido às interações nutricionais (MORO & MESQUITA, 2011).

2.2. Comorbidades associadas ao FLI

Apesar das diversas vantagens das FLI, é indiscutível que o aleitamento materno oferece uma série de nutrientes e elementos de defesa para o organismo de recém-nascido evitando uma série de doenças.

Sabe-se claramente que a alimentação com FLI pode estar associada ao aumento do risco de doenças infecciosas, incluindo doenças gastrointestinais e respiratórias. Em países desenvolvidos, as crianças que são alimentadas exclusivamente com FLI têm até cinco vezes mais probabilidade de serem

hospitalizadas na infância do que crianças que são alimentadas apenas com aleitamento materno exclusivo (GRIBBLE & HAUSMAN, 2012).

Porém, a utilização da fórmula para lactentes em substituição ao aleitamento materno, está associada ao risco de aumento de doenças não infecciosas, como as doenças alérgicas e diabetes, descritas a seguir.

2.2.1. Obesidade infantil

As fórmulas infantis oferecem 1,6 a 1,8 vezes mais proteínas aos lactentes se comparado ao leite materno. A ingestão aumentada de proteínas colabora para uma melhor resposta imunológica frente a qualquer agressão microbiana sofrida pelo organismo, mas também aumenta a secreção de insulina, estimulando a captação de glicose pela célula, inibindo a lipólise, colaborando para o acúmulo de tecido adiposo nos primeiros meses de vida (HEINIG *et al.*, 1993; NOVAES *et al.*, 2009; ODDY, 2012).

Alguns trabalhos relatam que crianças alimentadas com fórmulas infantis não possuem uma alimentação equilibrada, ao contrário de crianças alimentadas exclusivamente pelo seio materno. HEINIG e COLS (1993), por exemplo, já haviam destacado que a ingestão de proteínas e energia ofertadas pelo leite materno é inferior quando comparada as fórmulas lácteas, e que crianças alimentadas nos seis primeiros meses com FLI aumentam a ingestão de proteínas em até 20% (e 70% de energia) quando comparado ao aleitamento materno exclusivo. Este fato se deve à diferença de elementos que compõem as fórmulas, ao volume ofertado e aceitação do lactente. Em relação ao peso no primeiro ano de vida, o mesmo estudo destaca que lactentes alimentados com fórmulas lácteas têm maior ganho de peso corporal quando comparadas alimentadas com seio materno.

2.2.2. Hipertensão Arterial

A elevação dos níveis pressóricos também tem destaque por diversos autores na avaliação de aleitamento materno versus fórmulas lácteas. O leite materno tem um efeito protetor sobre os lactentes quando comparados ao uso de fórmulas infantis, pois os níveis de sódio são inferiores no leite humano, além de elementos

como ácidos graxos, hormônios e outras substâncias tróficas presente no leite materno apresentam níveis muito baixo ou até mesmo ausente. Todos esses fatores colaboram para um melhor controle da pressão sanguínea no lactente ao longo do seu desenvolvimento.

HORTA e COLS (2007) descrevem um estudo com crianças alimentadas com FLI, cujas mesmas foram divididas em dois grupos: um grupo suplementado com ácido graxo poli-insaturado, presente no leite materno e em baixos níveis nas formulações infantis, e o outro grupo, não suplementado. O grupo suplementado apresentou valores médios menores tanto na pressão sistólica quanto na pressão diastólica, quando comparado ao outro grupo. Esses dados reforçam a importância do aleitamento materno, que possui elementos essenciais para a composição da membrana dos tecidos e, especialmente, o endotélio vascular que permitirá um adequado controle do nível de pressão arterial.

SINGHAL e COLS (2001) demonstraram que, em um estudo realizado com crianças prematuras, acompanhadas desde o nascimento até os 16 anos de idade, o grupo alimentado com fórmula infantil apresentou pressão arterial mais elevada se comparada ao grupo que recebeu aleitamento materno na primeira fase da vida. Estes dados reforçam a hipótese de efeito protetor do leite materno ao longo da vida e que a terapia nutricional a partir do nascimento previne uma série de doenças, inclusive as de origem cardiovasculares.

2.2.3. Dislipidemia

O perfil de lipídios é também um importante fator metabólico que inicia-se na primeira fase da vida estendendo-se a idade adulta. A alimentação é um dos fatores determinantes para um adequado nível de lipídios séricos na prevenção de doenças cardiovasculares e outras patologias metabólicas.

RAVELLI e COLS (2000) apontaram que adultos com idade entre 48 e 53 anos que utilizaram fórmula infantil nos primeiros meses de vida, apresentaram maiores concentrações séricas de LDL colesterol, aumento da apolipoproteína B e maior relação LDL/HDL colesterol quando comparados aos outros grupo alimentados exclusivamente ao seio materno. Esses dados reforçam estudos anteriores de que as altas concentrações de colesterol na primeira fase da vida

estimulam a redução da síntese orgânica em fase posterior de desenvolvimento, chegando à fase adulta com valores normais de lipídios séricos.

2.2.4. Diabetes *mellitus*

O diabetes é uma doença metabólica que pode ter origem na infância (diabetes *mellitus* tipo I) ou na fase adulta após os trinta anos (diabetes *mellitus* tipo II). A composição nutricional da fórmula láctea pode aumentar as chances de diabetes, segundo estudo realizado com animais (NOVAES *et al.*, 2009). Os lactentes são expostos a diversos agentes ambientais, no primeiro ano de vida, causando infecções do trato intestinal com destruição de células beta, diminuindo a produção de insulina e levando ao diabetes *mellitus*.

OWEN e COLS (2006) também destacam que a diferença da composição química e da densidade energética entre o leite materno e a fórmula láctea tem influência nos níveis de glicose e insulina nos primeiros anos de vida. Crianças alimentadas com fórmulas lácteas no primeiro ano de vida têm maiores possibilidades de desenvolvimento do diabetes na idade adulta.

2.2.5. Alergia e outros fatores

O uso de FLI em unidades hospitalares é uma prática cada vez mais comum devido a inúmeras situações decorrentes no pós-parto. Em um estudo realizado em um Hospital Público do Distrito Federal, referência em Materno Infantil, observou-se que 73,53% dos lactentes recebiam fórmulas lácteas associadas ao leite materno. Esses dados reforçam que as fórmulas lácteas são utilizadas em grande escala dentro das unidades de saúde e se faz necessário um controle adequado de todas as etapas de processamento para garantir a inocuidade do alimento para os lactentes (FRAGOSO & FORTES, 2011).

No mesmo estudo, a mesma porcentagem de crianças já havia recebido FLI nos primeiros dias de vida, aumentando às ocorrências de alergias, diarreias e vômitos. Diversos autores relatam que a introdução precoce de outro alimento além do leite materno pode ocasionar alterações nos hábitos alimentares, comprometer a funcionalidade do trato digestório, trazer complicações nas vias respiratórias e

alteração da função renal devido a superalimentação (FRAGOSO & FORTES, 2011).

2.3. Contaminação das FLI

Na Assembléia Mundial de Saúde, que ocorreu em maio de 2005, alertou-se sobre os altos níveis de contaminação em fórmulas lácteas, que elevam os riscos a saúde das crianças, principalmente as de baixo peso e com baixa imunidade, aumentando o risco de morte (SANTIAGO, 2006). No caso da contaminação química, esta pode ocorrer devido à presença de resíduos de detergente, principalmente em utensílios de uso constante e higienizados na área de manipulação das fórmulas, sendo recomendado o uso de áreas distintas e a diferenciação de momentos para sua correta manipulação (LINHARES, 2012).

De acordo com a OMS, a contaminação das FLI pode ocorrer intrinsecamente, ou a partir de fontes extrínsecas. A contaminação intrínseca ocorre em algum momento durante a sua fabricação (por exemplo, a partir do ambiente de produção, ou a partir de matérias-primas). A contaminação extrínseca, por sua vez, pode ocorrer quando utensílios contaminados são utilizados em algum momento do preparo, distribuição ou armazenamento das fórmulas (WHO, 2007).

Neste último caso, a higienização inadequada de equipamentos e utensílios (mamadeiras, colheres, liquidificadores e jarras plásticas, por exemplo) utilizados nas etapas de pré-preparo, preparo, cocção e distribuição das fórmulas lácteas, contribui para que se tornem intermediários na contaminação desses alimentos, podendo ser de forma isolada ou associada a outros fatores, aumentando o risco de contaminação e podendo vir a causar doenças de origem alimentar, trazendo riscos de morbidade para as crianças (SANTIAGO, 2006; LINHARES, 2012).

Dentre as estratégias estabelecidas pela FAO e pela OMS para a segurança dos alimentos, destaca-se a capacitação dos recursos humanos, em especial dos manipuladores de alimentos, uma vez que estes são potenciais fontes de contaminação, pois exercem sua função em diferentes etapas do processo produtivo, onde a higiene é fundamental para a produção de alimentos seguros do ponto de vista higiênico-sanitário (OLIVEIRA, BRASIL & TADDEI, 2008).

A presença de micro-organismos patogênicos nas fórmulas lácteas reforça a

necessidade das boas práticas de fabricação em um lactário e da melhoria na qualidade da matéria prima em uso, além de demonstrar um ponto crítico dentro do processo de elaboração das fórmulas que necessitam de atenção e correção (SANTOS & TONDO, 2000).

Uma das etapas que merece especial atenção é o preparo, que exige um rígido controle do tempo e da temperatura, para eliminação ou, pelo menos, diminuição significativa da quantidade de possíveis patógenos presentes, em especial, *Salmonella* sp. e *Cronobacter* spp.. Este binômio tempo/temperatura é o parâmetro fundamental para a inativação de micro-organismos, mas também para a manutenção das propriedades físico-químicas, tais como pH e compostos protéicos, garantindo a qualidade nutricional do produto (MARTINS *et al.*, 2008).

Os micro-organismos e/ou suas toxinas geram grande preocupação quanto à administração das fórmulas lácteas, uma vez que a sua presença pode causar doenças e, até mesmo, resultar na morte dos lactentes (ARSALAN *et al.*, 2013b; PINA-PÉREZ *et al.*, 2014). A **Tabela 1** ilustra as categorias de micro-organismos com base em sua causalidade, ou seja, nas evidências da associação causal entre sua presença em fórmulas infantis e as doenças em lactentes.

Enterobacter sakazakii (*Cronobacter* sp.) e *Salmonella enterica* foram classificados na primeira categoria, de evidência clara de causalidade, pois ambos são importantes causas de doenças em crianças (como por exemplo, enterocolite necrosante, infecções sistêmicas e diarreias graves). Fórmulas infantis em pó contaminadas com esses micro-organismos têm sido constantemente associadas como veículo e fonte de infecção de lactentes. Obviamente, a frequência de contaminação das FLI com outros membros da família *Enterobacteriaceae* é maior do que com *Cronobacter* sp. e *Salmonella* sp., e, embora hajam diferenças entre a ecologia microbiana desses micro-organismos e de outras enterobactérias, as estratégias de redução de risco que visam seu controle também são aplicáveis para os demais membros da família (FAO/WHO, 2006; ARSALAN *et al.*, 2013a).

Pantoea agglomerans, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella oxytoca*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* são classificados na categoria "B", que engloba micro-organismos de causalidade plausível, mas ainda não foi demonstrada. Por fim, os micro-organismos associados a causalidade menos plausível ou ainda não demonstrada são

englobados na categoria "C", e incluem *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, e *Listeria monocytogenes* (FAO/WHO, 2006; ARSALAN *et al.*, 2013a).

Tabela 1: Distribuição de micro-organismos com base na causalidade.

<p>Categoria A Evidência clara de causalidade</p>	<p><i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp.) <i>Salmonella enterica</i></p>
<p>Categoria B Causalidade plausível, mas ainda não demonstrada</p>	<p><i>Pantoea agglomerans</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Citrobacter koseri</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i></p>
<p>Categoria C Causalidade menos plausível ou não demonstrada ainda</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Listeria monocytogenes</i></p>

Fonte: FAO/WHO, 2006; .Arsalan *et al.*, 2013a; Arsalan *et al.*, 2013b.

2.4. *Salmonella* sp. em FLI

De acordo com FINN e COLS (2013), alguns membros da família *Enterobacteriaceae* possuem a capacidade de sobreviver em ambientes de baixa umidade por longos períodos de tempo. Muitos dos surtos de origem alimentar associados com alimentos de baixa umidade envolvem a contaminação por *Salmonella*, o que representa um desafio significativo para todos os fabricantes de alimentos.

A sobrevivência de *Salmonella* em alimentos com baixa umidade não depende apenas da atividade de água do ambiente ou alimento, mas também de outros fatores, como a composição da matriz e a temperatura de armazenamento (VAN DOREN, *et al.*, 2013; FINN *et al.*, 2013).

Este patógeno é uma das bactérias mais difíceis de controle para os fabricantes de alimentos, e constituem uma das principais causas de gastroenterite que, neste caso, é denominada de salmonelose (MAJOWICZ *et al.*, 2010).

Em termos gerais, a salmonelose se caracteriza pelo aumento do peristaltismo intestinal e, na maioria das vezes, é necessário que seja ingerida uma quantidade maior do que 10^5 células para se iniciar a infecção. No entanto, há estirpes extremamente virulentas que causam doenças com uma dose de infecção bem mais baixa. Além disso, quando o alimento consumido auxilia na neutralização do pH do estômago, um maior número de bactérias sobrevive a essa barreira e consegue alcançar o intestino, facilitando o estabelecimento da doença (RAY & BHUNIA, 2010; BEJARANO-RONCANCIO & CASTILLO-QUIROGA, 2013).

Estirpes patogênicas de *Salmonella enterica* não-tifóides iniciam a infecção no íleo e desencadeiam um desequilíbrio eletrolítico no intestino, resultando em diarreia (JAY, 2002). Os sintomas aparecem dentro de 8 a 42 horas após a ingestão do alimento contaminado e incluem náuseas, vômitos e cólicas abdominais. Em alguns casos, podem ocorrer arrepios, febre e prostração. A duração dos sintomas geralmente é de 2 a 3 dias, porém, de acordo com a agressividade do agente patogênico e da resposta imunológica do hospedeiro, este período pode variar, e a infecção pode complicar e se tornar fatal, especialmente em neonatos, idosos e imunocomprometidos (ROMERO, 2007; CDC, 2013).

O tratamento dos pacientes com diarreia severa é realizado por meio de re-hidratação com fluidos intravenosos. A antibioticoterapia nem sempre é indicada, pois pode prolongar a excreção de estirpes de *Salmonella* não-tifóides, e é recomendando apenas para pacientes com sintomas mais graves, que necessitam de internação, ou nas infecções causadas pelos sorotipos Typhi e Paratyphi (CARRASCO, MORALES-RUEDA & GARCÍA-GIMENO, 2012; BEJARANO-RONCANCIO & CASTILLO-QUIROGA, 2013; CDC, 2013).

A fórmula infantil pode tornar-se contaminada com *Salmonella* durante o seu preparo e manuseio no lactário ou na própria residência do consumidor. Além dos

fatores ambientais, os manipuladores constituem uma fonte potencial de contaminação e podem introduzir o patógeno no alimento caso as práticas de higiene não sejam seguidas (FAO/WHO, 2006).

De acordo com Ângulo e colaboradores (2008), uma característica comum nos surtos notificados de infecção por *Salmonella* são as baixas contagens deste patógeno nas FLI, que, como podem ser perdidas em alguns dos métodos convencionais de análise, acabam resultando na falta de dados disponíveis para que se descreva adequadamente um panorama da contaminação de FLI por salmonelas.

Nos últimos anos, vem sendo descrito um aumento significativo no número de casos envolvendo *Salmonella enterica* e também na taxa de resistência a antimicrobianos. Fatos como a ampla variedade de sorotipos de *Salmonella enterica* freqüentemente presentes em humanos e animais, o uso generalizado de antibióticos, a capacidade das bactérias de crescer nas fórmulas lácteas e os problemas na fabricação, transporte, distribuição e comercialização de fórmula infantil, acabam por se tornar fatores causadores do aumento da morbidade e da mortalidade associada a este patógeno (CARRASCO, MORALES-RUEDA & GARCÍA-GIMENO, 2012; BEJARANO-RONCANCIO & CASTILLO-QUIROGA, 2013).

Um importante fator que contribui para a contaminação por *Salmonella* é a capacidade que este patógeno tem de produzir biofilme em superfícies e utensílios utilizados na preparação dos alimentos. Recentemente, um trabalho demonstrou que agentes químicos como hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio e cloreto de benzalcônio falharam na erradicação de biofilme maduro formado por *Salmonella*, mesmo no tempo de contato de 90 minutos, evidenciando a dificuldade de erradicação de um biofilme de *Salmonella* já estabelecido (CORCORAN *et al.*, 2014).

Além disso, tem sido relatada em alguns trabalhos a resistência destas bactérias a sanitizantes, em especial, a desinfetantes e a quaternários de amônia, geralmente empregados na limpeza de equipamentos e utensílios utilizados no preparo de fórmulas infantis (KIM, RYU & BEUCHAT, 2007; BEUCHAT *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado por MACHADO e COLS (2010), utilizando três cepas de *Salmonella* para avaliar sua resistência a soluções de ácido peracético, hipoclorito de sódio e quaternário de amônio, verificou-se que o ácido peracético só

foi efetivo em solução a partir de 0,5% (750 ppm), enquanto que o hipoclorito de sódio alcançou resultados em soluções a 2% (800 ppm) e o quaternário de amônio em soluções a 1% (2000 ppm). Os resultados encontrados por esses autores ilustram que diluições inadequadas das soluções desinfetantes podem colaborar para a persistência de *Salmonella* nos utensílios e superfícies (MACHADO *et al* , 2010) .

2.5. A problemática da resistência a antibióticos

Bactérias resistentes a antibióticos foram descritas pela primeira vez na década de 1940. Embora a pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos tenha sido considerada o principal fator desencadeante do surgimento de resistência bacteriana, as preocupações sobre o papel da indústria de alimentos têm aumentado nos últimos anos. A pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos na produção primária e de biocidas (por exemplo, desinfetantes, alimentos e conservantes alimentares, ou descontaminantes) é a principal força motriz por trás da seleção e da propagação da resistência antimicrobiana em toda a cadeia alimentar (CAPITA & ALONSO-CALLEJA, 2013).

Assim como a indústria, os ambientes voltados aos cuidados com a saúde humana têm sido descritos como locais onde se desenvolvem micro-organismos multirresistentes. Na última década, têm sido relatados diversos estudos sobre enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido (ESBL) sendo isoladas estirpes a partir de produtos de origem animal em unidades hospitalares. Os utensílios e as superfícies de cozinhas hospitalares são veículos para propagação desses micro-organismos, requerendo uma maior atenção das equipes de manipuladores e do monitoramento pelas “Comissões de controle de infecção hospitalar” (MARDANEH & SOLTAN-DALLAL, 2014).

2.6. A produção de biofilme em utensílios utilizados no preparo das FLI

Os biofilmes são comunidades de micro-organismos embebidas em uma matriz de polímero extracelular (SAHA *et al.*, 2014). Os biofilmes podem levar a

importantes problemas clínicos, uma vez que proporcionam um nicho para a sobrevivência de micro-organismos, por conferir proteção contra a dessecação, contra danos mecânicos e contra outras influências externas, como o meio ambiente, o sistema imunológico humano e agentes antimicrobianos (STEWART & COSTERTON, 2001; SAHA *et al.*, 2014).

Um motivo de preocupação para a indústria de alimentos é a adesão de micro-organismos a superfícies nas áreas de processamento de alimentos, pois a formação de biofilme é um fator favorável na contaminação dos alimentos e alteração da qualidade do produto final. As FLI são produtos heterogêneos e os compostos sólidos presentes nesses alimentos têm facilidade de adesão às superfícies, o que permite, conseqüentemente, uma maior adesão microbiana caso o processo de limpeza não seja adequado (BERNARDES *et al* 2012).

Como exemplo, pode ser citada a produção de biofilme por *C. sakazakii*, que permite a esse patógeno a sua adesão tanto no intestino quando em superfícies feitas de plástico ou de silicone, como as mamadeiras e os bicos utilizados na alimentação de neonatos por meio de fórmulas lácteas (ARSALAN *et al.*, 2013a).

3. JUSTIFICATIVA

Existem diferentes situações de saúde em que ocorre a impossibilidade de amamentação natural, ou ainda, quando esta traz riscos para saúde da criança. Nestes casos a alternativa é a utilização das fórmulas lácteas infantis (FLI), que atenderão as necessidades nutricionais das crianças, sem comprometer seu crescimento e desenvolvimento (SANTIAGO, 2006; TOWNSEND & FORSYTHE, 2008; OSAILI & FORSYTHE, 2009; BEJARANO-RONCANCIO, 2013).

De acordo com ARSALAN *et al* (2013a), a fabricação de FLI comercialmente estéreis nem sempre é possível de ser realizada utilizando-se a metodologia de processamento manual. Com isso, existem riscos potenciais de infecção dos bebês através do consumo deste alimento. Estes riscos são maiores quando as fórmulas lácteas não são preparadas, manuseadas ou armazenadas de modo apropriado.

Não há, até o momento, uma legislação vigente que regulamente as Boas Práticas de Fabricação em lactário, assim como os parâmetros referentes ao armazenamento, preparo, envase, distribuição e controle de qualidade das FLI. Geralmente, os profissionais que trabalham em um lactário carecem de treinamento, acompanhamento e avaliação de desempenho de suas equipes. Com essas falhas, ocorre uma maior possibilidade de que micro-organismos associados à FLI possam ser veiculados por esses alimentos e acabem gerando danos a saúde dos lactentes que, muitas das vezes, têm os sintomas confundidos com outras doenças e, por isso, não são tratados de forma adequada, podendo ocasionar um quadro de piora ou, até mesmo, de óbito.

Como evidenciado em muitos trabalhos, *Cronobacter* spp. e *Salmonella enterica* são os mais preocupantes patógenos associados às fórmulas lácteas, uma vez que existem claras evidências de que suas presenças podem resultar em graves doenças na população de risco que consome esse alimento. Muitos trabalhos relatam a sobrevivência de *Cronobacter* spp. nas fórmulas lácteas, mas um número muito reduzido trata desses aspectos quando o patógeno é *Salmonella* (BEUCHAT *et al.*, 2009; ARSALAN *et al.*, 2013a; ARSALAN *et al.*, 2013b).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa avaliar a sobrevivência de uma estirpe padrão de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi em FLI sob diferentes condições de aquecimento e armazenamento e, ainda, investigar a presença e a produção de fatores de virulência por estirpes de *Salmonella* sp. e outras bactérias Gram-negativas isoladas de FLI reconstituídas e de utensílios e superfícies utilizados em seu preparo, oriundos do lactário de um hospital do Rio de Janeiro.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Avaliar o crescimento de *S. enterica* em FLI reconstituídas submetidas a aquecimento em banho-maria e em forno de micro-ondas convencional;
- ▶ Determinar a capacidade de sobrevivência de *S. enterica* em FLI reconstituídas sob temperatura ambiente e de refrigeração;
- ▶ Investigar a presença de *Salmonella* sp. e outras bactérias Gram-negativas em FLI reconstituídas e em utensílios utilizados no preparo destas no lactário de um hospital do Rio de Janeiro;
 - ▶ Estudar o perfil de resistência a antibióticos das estirpes isoladas;
 - ▶ Investigar a produção de biofilme e de outros fatores de virulência (atividade proteolítica, lipolítica, hemolítica, nucleásica) pelas estirpes isoladas;
 - ▶ Elaborar uma cartilha para um curso rápido de treinamento aos lactaristas sobre as principais normas de higiene e de preparo de FLI, de modo a minimizar a contaminação bacteriana no lactário do hospital.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Estirpes

As estirpes de referência utilizadas neste trabalho estão descritas na **Tabela 2**. Já as demais bactérias Gram-negativas empregadas neste trabalho foram obtidas a partir da coleta de amostras de fórmulas lácteas infantis reconstituídas preparadas no lactário de um hospital público do Rio de Janeiro e de “swabs” de superfícies e de utensílios utilizados no preparo e/ou armazenamento das mesmas.

Todas as culturas foram estocadas em caldo Casoy com 40 % (p/v) de glicerol a - 20°C.

Tabela 2: Estirpes de referência utilizadas neste trabalho.

Estirpe	Origem	Utilização
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC	Controle nos testes de resistência a antimicrobianos
<i>Salmonella enterica</i> ATCC19214	ATCC	Estudos de sobrevivência em FLI sob diferentes condições
<i>Salmonella enterica</i> ATCC14028	ATCC	Controle positivo dos testes de produção de biofilme

ATCC, American Type Culture Collection; LMIFRJ.

5.2. Fórmulas lácteas infantis

As latas de fórmulas comerciais infantis desidratadas, das marcas Aptamil 1 e Aptamil 2 (Danone®), foram compradas em farmácias locais. Para todos os experimentos, as fórmulas foram reidratadas com água destilada estéril de acordo com as instruções dos fabricantes encontradas no rótulo. As marcas utilizadas foram escolhidas uma vez que constituem aquelas mais comumente empregadas nos lactários de hospitais públicos.

5.3. Avaliação do crescimento de *S. enterica* em FLI sob diferentes formas de preparo

5.3.1. Aquecimento em banho-maria

As fórmulas lácteas infantis (FLI) foram reconstituídas, em condições de assepsia, de acordo com as instruções do fabricante em água destilada estéril. As FLI foram distribuídas em frascos estéreis (50 mL) e inoculadas de modo a se obter a concentração final de 10^6 UFC/ml da estirpe de *S. enterica*. O tratamento térmico foi realizado em banho-maria (marca Quimis, modelo Q304M-2105, 160 W) a 60°C e 70°C por 10 e 5 minutos respectivamente. Após esse tempo, a amostra foi removida do banho-maria e imersa em banho de gelo por 5 min. O número de unidades formadoras de colônias após o tratamento térmico foi quantificado conforme o item 5.4.

5.3.2. Através de forno de micro-ondas

A fim de se reproduzir o que acontece normalmente em um lactário, foi seguida a metodologia descrita por AL-HOLY e COLS (2009), com pequenas modificações. A FLI foi reconstituída em água destilada estéril de acordo com as instruções do fabricante. Porções de 50 ml foram dispensadas em frascos estéreis, que foram, em seguida, esterilizados a 121° C por 5 min. Os frascos foram inoculados com 100 µL da cultura de *S. enterica*, isoladamente, de modo a se obter a concentração inicial de células de aproximadamente 10^6 UFC/ ml. Um forno de

microondas caseiro (marca Midea, modelo MM30EL1VW, tensão 127 V, potência 1000 W) foi utilizado para aquecer os frascos durante 30, 45, 60 e 90 segundos (sendo, este último tempo, dividido em dois períodos de aquecimento de 45 segundos interrompidos por um intervalo de 30 segundos). Um frasco de FLI reconstituída e inoculada, porém sem aquecimento, serviu como controle. Após o aquecimento, os frascos foram agitados vigorosamente e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a quantificação das unidades formadoras de colônias sobreviventes de *S. enterica* utilizando o método descrito no item seguinte.

5.4. Enumeração de *S. enterica*

As unidades formadoras de colônias de *S. enterica* foram enumeradas pela técnica de “spread plate”. As amostras foram diluídas e plaqueadas em ágar Casoy, em duplicata, e incubadas durante 18-24h h a 37°C.

5.5. Sobrevivência de *S. enterica* em FLI sob temperatura ambiente e de refrigeração

Mais uma vez a fim de se mimetizar as condições de armazenamento que ocorrem na rotina de um lactário, investigou-se a capacidade de sobrevivência das estirpes de *S. enterica* em FLI reconstituídas armazenadas à temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) e sob refrigeração (4°C). A estirpe de *S. enterica* foi inoculada, separadamente, em tubos contendo 10 mL de FLI reconstituída estéril de modo a atingir a concentração inicial de 10^6 ufc/ml. Os tubos foram agitados vigorosamente em um vórtex (marca Biomatic modelo 1005) e o crescimento das bactérias foi monitorado por plaqueamento (após 24, 48 e 72h) em ágar Casoy (Micromed).

5.6. Análises estatísticas

Para todos os testes de significância, valores $p > 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. One-way ANOVA foi utilizado para avaliar as diferenças nos parâmetros estudados. As análises estatísticas foram realizadas

utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

5.7. Pesquisa de *Salmonella* sp. e de outras enterobactérias em amostras de FLI reconstituídas e de utensílios e superfícies utilizados em seu preparo

Amostras de fórmulas lácteas infantis reconstituídas, de superfícies e de utensílios utilizados em seu preparo ou distribuição (tais como jarra, colher, mamadeira, bandeja, entre outros), provenientes do lactário de um hospital público situado na cidade do Rio de Janeiro, foram coletadas a fim de se detectar a presença de *Salmonella* sp. e de outras enterobactérias com potencial patogênico. As amostras de FLI reconstituídas foram coletadas em frascos estéreis e as amostras provenientes de utensílios e superfícies foram obtidas por meio de *swabs*. Todas as amostras foram acondicionadas sob refrigeração e conduzidas ao laboratório de Microbiologia em um intervalo inferior a 2h após a sua coleta.

5.7.1. Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para as amostras de FLI reconstituídas, as análises foram realizadas conforme descrito pela Instrução Normativa 62, de 2003 (BRASIL, 2003). Vinte e cinco mililitros de cada amostra de FLI reconstituída foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada 1% e incubados por 18 a 24 horas a 37°C. Alíquotas de 1 mL dessa cultura pré-enriquecida foram transferidas para três tubos, contendo, cada um, 10mL de caldo de enriquecimento seletivo (tetracionato, Rappaport-Vassiliadis e selenito-cistina) e incubadas a 41°C por 24h. A partir desses caldos, uma alíquota de cada tubo foi semeada em ágar bismuto-sulfito, ágar XLD e ágar Rambach. Já os *swabs* coletados de utensílios foram umedecidos em água peptonada a 0,1% e as amostras foram semeadas diretamente nesses meios de cultura.

Colônias típicas sugestivas de *Salmonella* sp. foram selecionadas e transferidas para uma placa contendo ágar nutriente, para obtenção de massa celular. Todos os isolados foram semeados em placa ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar ferro lisina (LIA) e incubados a 37°C por 24h. As culturas que apresentarem

base ácida, produção de gás e bisel alcalino e com/sem produção de H₂S foram inoculadas em caldo uréia e aquelas que se apresentaram urease-negativas foram, então, submetidas aos testes de aglutinação com soros polivalentes contra os antígenos somáticos e flagelares (Probac do Brasil) de *Salmonella* sp e tiveram a identificação confirmada através do painel de identificação Bactray® I e II (Laborclin, Brasil).

5.7.2. Pesquisa de outras bactérias Gram-negativas

Alíquotas das fórmulas lácteas reconstituídas foram inoculadas em ágar EMB, assim como os *swabs* coletados dos utensílios previamente umedecidos em água peptonada a 0,1%. Foram coletadas tanto as colônias crescidas no ágar EMB quanto as colônias crescidas nos meios bismuto-sulfito, XLD e Rambach, (obtidas como descrito no item 4.8.1) que não apresentaram características sugestivas de *Salmonella*. Esses isolados foram cultivados e mantidos conforme descrito no item 4.1 e foram submetidos à identificação através do painel de identificação Bactray® e à avaliação da produção de fatores de virulência e de substâncias antimicrobianas.

5.8. Avaliação da produção de fatores de virulência

5.8.1. Detecção qualitativa da produção de biofilme

Os isolados foram inoculados sobre a superfície de placas de ágar Vermelho Congo (ágar nutriente acrescido de 0,8 g/l de vermelho congo e 36 g/l de sacarose) como descrito previamente por FREEMAN e COLS (1989). As placas foram incubadas durante 24h a 37°C sob condições aeróbicas. Isolados produtores de biofilme apresentam-se como colônias de coloração preta, enquanto que os não-produtores apresentam-se despigmentados ou avermelhados. *Salmonella enterica* ATCC14028 foi utilizado como controlo positivo.

5.8.2. Detecção de atividade proteolítica

A avaliação da atividade proteolítica foi verificada utilizando-se ágar leite com substrato. Este meio sólido foi preparado através da mistura em igual volume de

uma solução de leite em pó integral a 20% (p/v, preparada em água destilada estéril) e autoclavada a 115°C por 5 minutos com uma solução estéril de ágar (Himedia) a 4% (p/v, preparada em água destilada). O meio foi distribuído em placas de Petri e as placas foram, então, semeadas com uma única estria a partir de cada cultura bacteriana e incubadas a 37°C por até 7 dias. Uma zona de clareamento ao redor do crescimento bacteriano indica a atividade proteolítica.

5.8.3. Detecção de atividade hemolítica

A atividade hemolítica das estirpes isoladas foi verificada através de crescimento em estria única em placas contendo ágar sangue (base para ágar sangue adicionada de 5% de sangue desfibrinado de carneiro). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e após este período, as culturas foram avaliadas quanto à formação de zona de hemólise.

5.8.4. Detecção de atividade lipolítica

Culturas lipase-positivas foram detectadas pela formação de halo claro em ágar nutriente acrescido de 1% (v/v) de azeite de oliva e 1% (v/v) de Tween 20, após 48 h de incubação a 37°C.

5.8.5. Detecção da atividade nucleásica (produção de DNase)

Os isolados bacterianos foram crescidos em agar DNase base acrescido de verde de metila. As placas foram incubadas a 37°C por 48h e a produção de DNase foi verificada pela formação de halos amarelados (clarificação) ao redor do crescimento dos isolados.

5.9. Perfil de resistência a antibióticos

O perfil de resistência a antibióticos das estirpes isoladas foi determinado por difusão a partir de disco (Sensifar), em ágar Müller-Hinton, de acordo com o

“Clinical and Laboratory Standards Institute” – CLSI (2013). Os seguintes antibióticos foram utilizados: amicacina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 µg), ampicilina (10 µg), aztreonam (30 µg), cefalotina (30µg); ceftazidima (30µg) cefotaxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), norfloxacina (10 µg), tetraciclina (30 µg), tobramicina (10 µg) e trimetoprim (5 µg). O diâmetro do halo de inibição foi interpretado segundo os índices estabelecidos pelo CLSI, após 24 h de incubação a 37°C.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação da sobrevivência de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis sob temperatura ambiente e de refrigeração

O armazenamento por refrigeração pode promover a segurança de alimentos ou, ainda, aumentar a vida de prateleira de diversos alimentos, evitando ou retardando o crescimento de patógenos (SILVA & GIBBS, 2012). No entanto, *Salmonella* pode ser um problema para alimentos refrigerados, pois alguns estudos relatam o crescimento de estirpes de diversos sorotipos como Enteritidis, Typhimurium e Heidelberg durante o armazenamento a 10°C, e em alguns casos, o crescimento até mesmo sob a temperatura de 4°C (SCHOENI *et al.*, 1995; SILVA & GIBBS, 2012).

Neste trabalho, o crescimento de *Salmonella enterica* em FLI armazenada sob temperatura ambiente e sob refrigeração foi avaliado em duas fórmulas comerciais: Aptamil 1 e Aptamil 2 (Danone®). A quantificação celular foi realizada em intervalos de 24h por 72 horas consecutivas, partindo-se de um inóculo inicial de $8,0 \times 10^4$ ufc/ml da estirpe ATCC 19214 na fórmula Aptamil 1 e de $7,9 \times 10^4$ ufc/ml na fórmula Aptamil 2. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos resultados encontrados para a fórmula láctea Aptamil 1 e Aptamil 2 (**Figuras 2 e 3**).

Quando as fórmulas foram armazenadas à temperatura ambiente, houve um aumento de 3,3 log na população de *Salmonella* presente nas primeiras 24 h de incubação e de, aproximadamente, 3,8 log após 48h. Ao término de 72h de incubação, foi observado, para ambas as fórmulas lácteas, aumento superior a 4,5 log da concentração celular (com a contagem de ufc/ml superior a $3,0 \times 10^9$). Esses resultados sugerem que fórmulas lácteas contaminadas durante a etapa de preparo podem apresentar um crescimento bacteriano elevado, já nas primeiras 24 horas, se mantidas em temperatura ambiente.

Já sob temperatura de refrigeração, nas primeiras 48 horas de incubação, foi detectado leve crescimento populacional (inferior a 1 log). Entretanto, ao final de 72 horas, observou-se crescimento similar ao das fórmulas incubadas à temperatura ambiente, o que corresponde a um aumento de 4,5 log em relação ao inóculo inicial. Dessa forma, é possível concluir que a temperatura de refrigeração, que geralmente

é um fator inibidor de crescimento bacteriano, não impede o crescimento de *Salmonella enterica* nas FLI avaliadas.

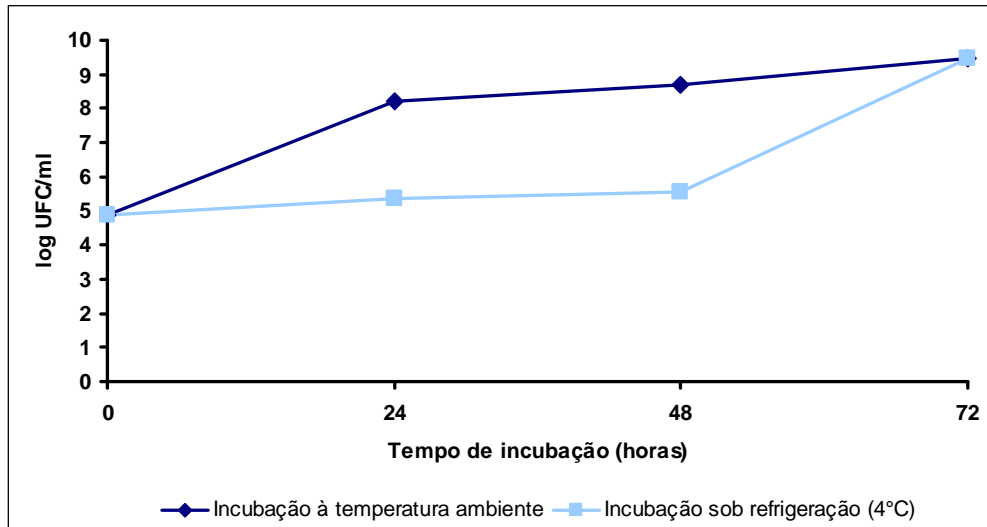


Figura 2: Curva de crescimento da estirpe *Salmonella enterica* ATCC19214, durante 72 horas, na fórmula láctea infantil Aptamil 1 armazenada sob temperatura ambiente e sob temperatura de refrigeração (4°C).

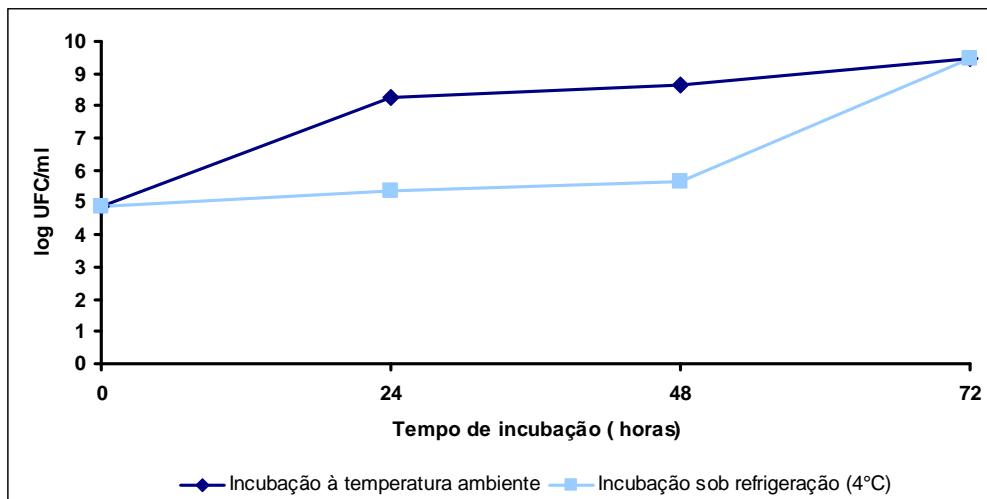


Figura 3: Curva de crescimento da estirpe *Salmonella enterica* ATCC19214, durante 72 horas, na fórmula láctea infantil Aptamil 2 armazenada sob temperatura ambiente e sob temperatura de refrigeração (4°C).

Estudos similares realizados com *Cronobacter* sp, o outro patógeno mais associado à contaminação de fórmulas lácteas, mostraram que quando fórmulas reconstituídas eram contaminadas artificialmente com cepas de *Cronobacter* sp., e

incubadas a 30°C, havia um crescimento de 2,5 a 3,14 log na concentração populacional logo nas oito primeiras horas de incubação (BEUCHAT *et al.*, 2009). No entanto, quando as fórmulas contaminadas eram incubadas sob temperatura de refrigeração, os autores não detectaram crescimento microbiano, provavelmente devido ao baixo inóculo inicial utilizado no referido trabalho.

6.2. Avaliação da sobrevivência de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis após aquecimento

O potencial de crescimento de patógenos como a *Salmonella* e *Cronobacter* nas fórmulas lácteas infantis depende de vários fatores, como a temperatura utilizada no preparo e a temperatura de armazenamento.

Neste trabalho, a avaliação do crescimento de *Salmonella enterica*, após o aquecimento das fórmulas lácteas em banho-maria e em forno de micro-ondas, foi realizada utilizando-se recipientes plásticos contendo 50 mL de cada fórmula láctea utilizada, simulando as condições de aquecimento empregadas em lactários. Os recipientes foram inoculados com uma cultura de *Salmonella enterica* de modo a obter a concentração celular de aproximadamente 10⁶ ufc/ml. Pequenas diferenças foram observadas nos resultados provenientes da utilização da fórmula Aptamil 1 e da fórmula Aptamil 2 (**Figura 4**).

O aquecimento em banho-maria a 60°C por 5 minutos não resultou em queda considerável da contagem de *Salmonella*, houve redução de um pouco mais de 1 log ufc/ml em ambas as fórmulas. O aquecimento à mesma temperatura por 10 minutos resultou em uma queda do crescimento microbiano variando de 2,3 a 2,8. Quando as fórmulas inoculadas foram submetidas ao aquecimento a 70°C por 5 minutos, observou-se, para ambas, uma redução de cerca de 3 log ufc/ml e, mediante o aquecimento por 10 min, essa redução foi de 3,7 log ufc/ml para a fórmula Aptamil 1 e de 4,0 log ufc/ml para a fórmula Aptamil 2.

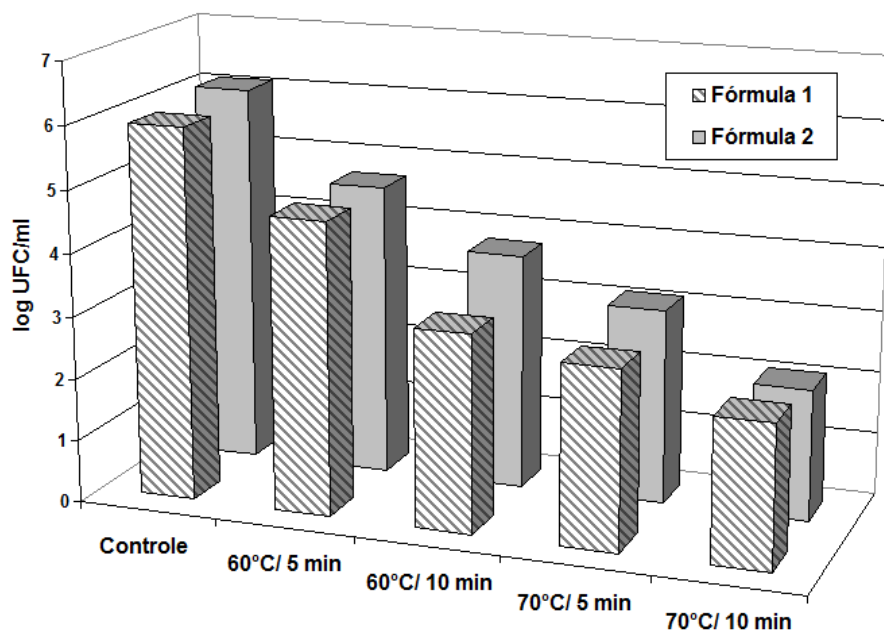


Figura 4: Concentração de *Salmonella enterica* em FLI artificialmente contaminadas submetidas a aquecimento em banho-maria. O controle não foi submetido a nenhum tratamento térmico.

Assim como os resultados encontrados no presente trabalho, ROWLANDS e COLS (2006) também descrevem a redução da população de três sorotipos diferentes - Enteritidis, Panama e Infantis - em fórmulas lácteas infantis reconstituídas, experimentalmente contaminadas e submetidas às temperaturas de 60°C, 70°C e 80°C, por 5 minutos. As reduções obtidas variaram entre 4 e 6 ciclos logarítmicos a 60°C e 70°C e, a 80°C, os autores não mais detectaram o crescimento de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas.

É possível, portanto, verificar que os tratamentos térmicos a 60 e 70°C por 5 ou 10 minutos não são suficientes para eliminar toda a população de *Salmonella* spp. inoculada nas fórmulas lácteas, demonstrando, assim, a importância dos cuidados nas etapas de preparo e manipulação desses alimentos, considerados pontos críticos de controle. Essa importância é enfatizada pelo fato de que alguns sorotipos de *Salmonella* têm o potencial de causar doenças em doses muito baixas, vindo a se tornar, assim, uma preocupação específica para os lactentes, particularmente aqueles na categoria de alta suscetibilidade, como os de baixo peso, os prematuros e os imunocomprometidos (CAHILL *et al.*, 2008; BEJARANO-RONCANCIO & CASTILLO-QUIROGA, 2013).

O uso do aparelho de micro-ondas é uma prática corrente para aquecimento de fórmulas lácteas reconstituídas, tanto em domicílios quanto em hospitais. Neste trabalho, o aquecimento em forno de micro-ondas convencional pareceu ser a forma mais rápida e eficiente de redução da população de *Salmonella* nas FLI reconstituídas. Não foi observado crescimento bacteriano nas fórmulas aquecidas por 30, 45, 60 e 90 segundos, apresentando assim, uma redução superior a 4,0 log na concentração celular (**Tabela 3**).

Tabela 3: Concentração celular de *S. enterica* nas fórmulas lácteas após o aquecimento em forno micro-ondas convencional

	Log UFC/ml de <i>Salmonella enterica</i>	
	Fórmula Aptamil 1	Fórmula 2
Controle (sem tratamento)	6,04	6,04
Aquecimento por 30s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 45s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 60s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 90s	< 2,00	< 2,00

A eficiência da inativação de *Cronobacter sakazakii* em FLI por meio de aquecimento em forno de micro-ondas foi recentemente relatada por PINA-PÉREZ e COLS (2014). Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos citando a sobrevivência de *Salmonella* nas FLI mediante o aquecimento utilizando este equipamento.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que FLI contaminadas durante a etapa de preparo podem apresentar crescimento bacteriano mesmo sob temperatura de refrigeração se mantidos por tempo prolongado, e que determinados métodos de tratamento térmico não são suficientes para inibição completa de *S. enterica*.

Tendo em vista essa resistência térmica de *Salmonella*, é possível afirmar que a reconstituição das FLI a uma temperatura superior a 70°C por um tempo de exposição mínimo de 10 minutos e o aquecimento de pequenas porções em forno de micro-ondas convencional por pelo menos 30 segundos, pode proporcionar um nível mais alto de proteção contra a infecção por *Salmonella* adquirida por este tipo de alimento.

6.3. Caracterização de estirpes de enterobactérias isoladas de fórmulas lácteas infantis reconstituídas e utensílios utilizados em seu preparo

A segurança microbiológica de FLI é um item de suma importância, uma vez que os neonatos carecem de um sistema imunológico desenvolvido e de uma microbiota intestinal competitiva, principalmente aqueles que dependem dos serviços de um lactário (TOWNSEND & FORSYTHE, 2008; OSAILI & FORSYTHE, 2009).

Geralmente, um lactário hospitalar funciona 24 horas por dia, sendo que as equipes de profissionais atuam em uma escala de revezamento em plantões diurnos e noturnos. Tomando por base dados coletados no lactário de um hospital público da cidade do Rio de Janeiro, os manipuladores do horário diurno diluem, envasam e armazenam as FLI, para que no horário noturno seja realizado o fracionamento, reaquecimento e distribuição das fórmulas pelos setores solicitantes. Quando estas atividades não seguem as normas de BPF ou quando o reaquecimento não é realizado corretamente, as FLI podem vir a constituir um risco à saúde dos lactentes.

Neste trabalho, isolados de bactérias Gram-negativas foram obtidos de fórmulas infantis reconstituídas, de superfícies e de utensílios utilizados em seu preparo no lactário de um hospital público situado na cidade do Rio de Janeiro. Estes isolados foram identificados e caracterizados quanto à resistência a antibióticos e produção de fatores de virulência, aspectos importantes que podem vir a agravar o quadro de pacientes que, por ventura, possam ser contaminados com estas estirpes por meio do consumo das FLI.

6.3.1. Identificação dos isolados

Quarenta e cinco isolados distintos foram obtidos de FLI reconstituídas, de superfícies e de utensílios utilizados em seu preparo no lactário de um hospital público situado na cidade do Rio de Janeiro (**Tabela 4**).

Tabela 4: Identificação das bactérias Gram-negativas isoladas neste trabalho.

Origem	Código do isolado	Oxidase	Identificação
Jarra de preparo de fórmulas lácteas, previamente lavadas em água corrente	JE1	-	<i>Hafnia alvei</i>
	JE2	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JE3	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JE4	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JE5	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JE6	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JE7	-	<i>Hafnia alvei</i>
	JE8	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JR1	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JR2	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JR3	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JR4	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JR5	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	JR6	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
Bandeja	BA1	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BA2	-	<i>Escherichia vulneris</i>
	BA3	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BA4	-	<i>Escherichia vulneris</i>
	BA5	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BA6	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BA7	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BA8	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Mamadeiras	MR1	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	ME1	-	<i>Shigella dysenteriae</i>
	ME2	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	ME3	-	<i>Shigella dysenteriae</i>
	ME4	-	<i>Shigella dysenteriae</i>
Bicos de Mamadeira	ME5	-	<i>Shigella dysenteriae</i>
	BIE1	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BIE2	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BIE3	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BIE4	+	<i>Chromobacterium violaceum</i>
	BIE5	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BIE7	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BIE8	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
	BIR1	-	<i>Hafnia alvei</i>
	BIR3	-	<i>Shigella dysenteriae</i>
BIR4	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	
Fórmula "Aptamil 1" reconstituída	ALE2	-	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
	ALE3	-	<i>Proteus mirabilis</i>
	ALR1	+	<i>Ochrobacterium anthropi</i>
Fórmula "Aptamil 2" reconstituída	AE1	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
Fórmula "Pregestimil" reconstituída	PR1	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	PR2	-	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>
	PR3	+	<i>Chromobacterium violaceum</i>

+, oxidase-positiva; -, oxidase-negativa

Os isolados foram identificados utilizando-se os sistemas de identificação Bac tray I e II (Laborclin, Brasil) para as bactérias oxidase negativas e o sistema Bac tray III para as bactérias oxidase-positivas.

Os micro-organismos pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (ABC) foram as bactérias Gram-negativas mais isoladas (37,8%), seguidas de *Enterobacter cloacae* (26,7%) e de *Shigella dysenteriae* (11,1%). A porcentagem de espécies identificadas está apresentada na **Figura 5**.

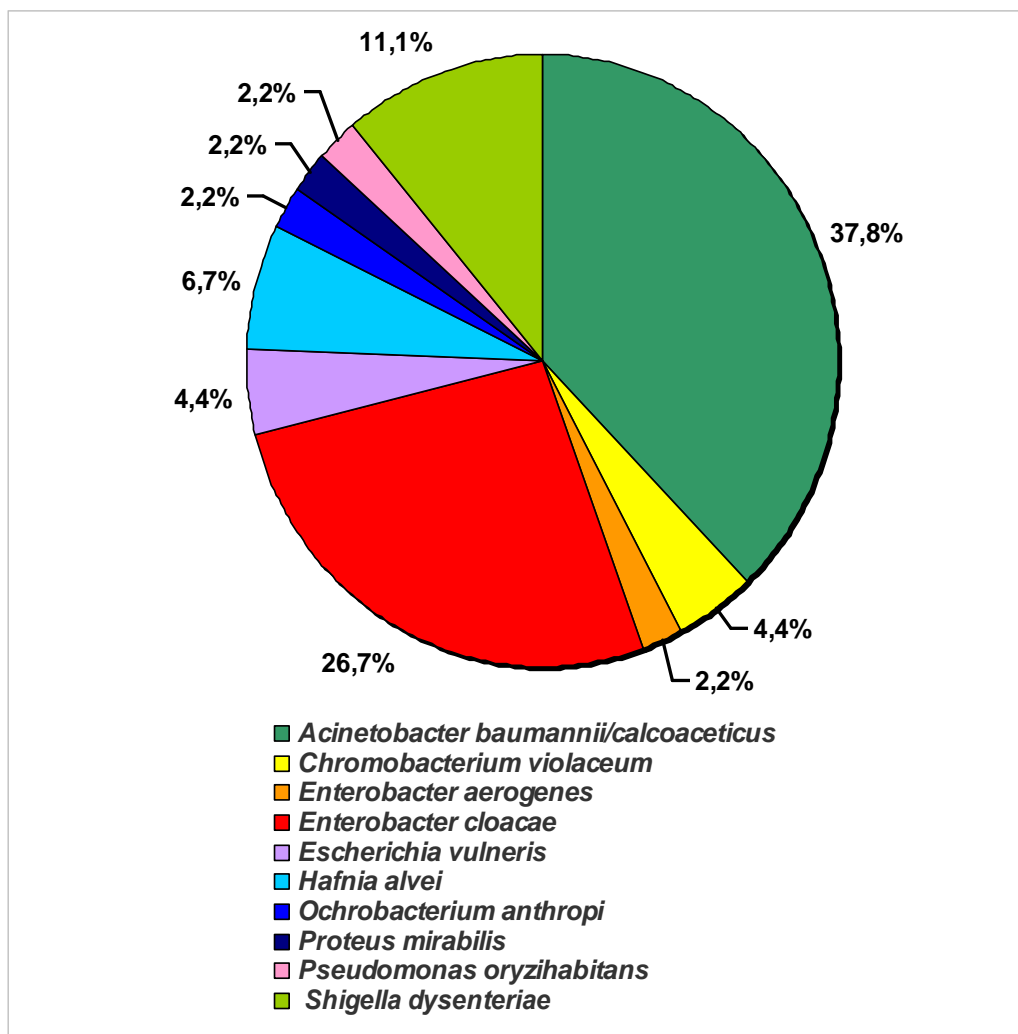


Figura 5: Porcentagem de espécies identificadas neste trabalho isoladas de utensílios e FLI reconstituídas no lactário de um hospital público do Rio de Janeiro.

Os dados encontrados no presente trabalho, foram condizentes com um estudo mais abrangente envolvendo dados de sete países a respeito dos micro-

organismos isolados a partir de formulas lácteas e utensílios utilizados em seu preparo. Neste estudo, verificou-se que *Acinetobacter baumannii* e *E. cloacae* foram os micro-organismos mais encontrados (CHAP *et al.* 2009).

As bactérias do complexo *Acinetobacter baumannii/ calcoaceticus* (ABC) são encontradas, geralmente, na água e no solo. Entretanto, esses micro-organismos podem causar infecções como pneumonias associadas à ventilação mecânica, infecções do trato urinário, de feridas cirúrgicas e da corrente sanguínea. Ao longo da última década, o desafio de gerenciar as infecções causadas por ABC foi agravado pelo aumento da resistência antimicrobiana, especialmente pelo surgimento de estirpes multirresistentes (BLOSSOM & SRINIVASAN, 2008).

Em nosso estudo, a bactéria *Shigella* foi encontrada em amostras provenientes de mamadeiras (interior e bico), o que foi um dado surpreendente, uma vez que esse micro-organismo pode causar sérias consequências, especialmente em neonatos (DAY *et al.*, 2011). Este resultado, porém, não foi um fato isolado, uma vez que nos estudos realizados por FAZIAH e COLS (2008), a presença de *Shigella* sp. foi detectada em formulas infantis preparadas em enfermarias e unidades neonatais de tratamento intensivo.

De acordo com JAIN e COLS (2014), a shigelose ainda é um importante problema de saúde pública em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento e mamadeiras podem ser consideradas uma potencial via de transmissão de *Shigella* sp. e um fator importante na epidemiologia desta doença (ISLAM *et al.*, 2001; DAY *et al.*, 2011).

Estes resultados reforçam que a falta de higiene dos utensílios ou mesmo a *Shigella* spp tem a capacidade de resistir aos produtos químicos utilizados no processo de limpeza no lactário e pode constituir um fator significativo na transmissão de estirpes multirresistentes relacionados com o consumo de FLI.

6.3.2. Resistência a antibióticos

Bacilos Gram-negativos multirresistentes são uma importante causa de infecções em unidades de terapia intensiva (UTI) neonatal e já foi verificado que a alimentação exclusiva por fórmulas infantis está significativamente associada com a

transmissão cruzada dessas estirpes resistentes (MAMMINA *et al.*, 2007).

Neste trabalho, os isolados obtidos foram testados quanto à resistência a diferentes antibióticos. Surpreendentemente, com exceção do isolado JE1, todos os demais apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, sendo que 40 estirpes (88,9%) mostraram um fenótipo típico de multi-resistência, uma vez que foram resistentes a pelo menos 3 antibióticos de diferentes classes (MAGIORAKOS *et al.*, 2012; HEIZMANN *et al.*, 2013). Os resultados estão apresentados na **Tabela 5**.

Nos últimos anos, o aumento da prevalência de infecções causadas por bactérias multirresistentes tornou-se um motivo de preocupação em todo o mundo, especialmente quando envolve o grupo de bactérias conhecidas como ESKAPE: *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ou de resistência intermediária à vancomicina (hVISA), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. resistentes ao carbapenem (BOUCHER *et al.*, 2009; HEIZMANN *et al.*, 2013).

Como verificado na **Tabela 5**, dos 17 isolados de *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* isolados neste trabalho, 15 foram multirresistentes, sendo um deles - JE4 - resistente ao imipenem, um antibiótico da classe dos carbapenens. Vale ressaltar que imipenem e meropenem são considerados os antibióticos mais eficazes para o tratamento de infecções causadas por este agente patogênico e, quando a resistência a esta classe de antibióticos ocorre, as opções de tratamento tornam-se limitadas (KARAGEORGOPOULOS & FALAGAS, 2008; JOSHI & LITAKE, 2013).

O aumento da resistência aos carbapenêmicos tem gerado novos desafios terapêuticos, especialmente considerando que a maioria das cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos também são resistentes a muitos outros antibióticos (FISHBAIN & PELEG, 2010).

Tabela 5: Resistência a antibióticos apresentada pelas bactérias Gram-negativas estudadas neste trabalho.

Estirpes	Classes de antibióticos												
	Penicilina AMP	inibidor de β-lactâmicos AMC	Cefens CTX CFL		Aminoglicosídeos AMI GEN TOB			Quinolonas CIP	Inibidor da via dos folatos TRI	Tetraciclina TET	Carbapenems IPM	Monobactams ATM	Fenicóis CLO
JE1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
JE2	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R
JE3	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R
JE4	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R
JE5	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R
JE6	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R
JE7	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R
JE8	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R
JR1	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R
JR2	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R
JR3	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R
JR4	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R
JR5	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R
JR6	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R
BA1	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
BA2	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
BA3	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
BA4	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
BA5	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
BA6	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
BA7	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
BA8	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
MR1	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R
ME1	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
ME2	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
ME3	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
ME4	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
ME5	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
BIE1	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S
BIE2	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S
BIE3	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S
BIE4	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R
BIE5	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
BIE7	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
BIE8	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
BIR1	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
BIR3	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
BIR4	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R
ALE2	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
ALE3	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
ALR1	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
AE1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
PR1	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
PR2	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
PR3	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R

Legenda: AMI, amicacina; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; AMP, ampicilina; ATM, aztreonam; CFL, cefalotina; CTX, cefotaxima; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; TET, tetraciclina; TOB, tobramicina; TRI, trimetoprim.

Para confirmar a multirresistência expressa pelos isolados de *Acinetobacter*, o meio seletivo cromogênico MDR *Acinetobacter*, Chromagar® também foi utilizado. Dentre os 15 isolados resistentes a múltiplas drogas detectados no ensaio de difusão em disco, 14 (93,3%) também foram identificados como MDR pelo crescimento neste meio (**Tabela 6**).

Tabela 6: Identificação de estirpes de *Acinetobacter* multirresistentes a antibióticos pelo meio seletivo Chromagar® MDR *Acinetobacter*

Isolados	Crescimento em Chromagar® MDR <i>Acinetobacter</i>
JE2	+
JE3	+
JE4	+
JE5	+
JE6	+
JE8	+
JR1	+
JR2	+
JR3	+
JR4	+
JR5	+
JR6	+
MR1	+
ME2	+
AE1	+
PR1	-
PR2	-

+, crescimento no meio seletivo; -, ausência de crescimento.

Um dos isolados, AE1, classificado como não-MDR no teste de difusão em disco, também foi capaz de crescer, o que sugere que este isolado é, provavelmente, resistente a outro antibiótico não testado neste trabalho. BARSOUMIAN E COLS (2013) também referiram que este agar cromogênico permite a detecção rápida de MDR *Acinetobacter* sp., porém é incapaz de distinguir estirpes resistentes ao carbepenem daquelas que são suscetíveis.

6.3.3 Produção de biofilme

Uma vez que boa parte dos isolados bacterianos estudados neste trabalho foram provenientes de utensílios presumidamente higienizados, a capacidade de formação de biofilme foi investigada pela metodologia do vermelho congo.

A detecção da produção de biofilme por este método é baseada no aumento da produção de exopolissacárideo. Embora existam outros métodos para a detecção de biofilme, tais como a aderência em tubo e placa de microtitulação, ambos envolvendo coloração com violeta de cristal, vários estudos relatam que o vermelho congo é um método rápido, menos dispendioso, mais sensível e reproduzível, e que pode ser realizado facilmente (NIVEDITHA *et al*, 2012, SUBRAMARIAN *et al*, 2012; HEDAYATI, EFTEKHAR & HOSSEINI, 2014).

Dos 45 isolados, 14 (31,1%) mostraram ser produtores de biofilme, sendo 10 produtoras da espécie *Enterobacter cloacae* (BA1, BA5, BA6, BA7, BIE1, BIE2, BIE3, BIE5, BIE7 e BIE8), 1 (BA8) da espécie *E. aerogenes*, 2 (BA2 e BA4) da espécie *Escherichia vulneris*, e 1 (AE1) do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*. Os resultados estão apresentados na **Tabela 7**.

Já foi relatado em outros trabalhos que os gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, and *Escherichia* são as causas mais comuns de infecções em ambientes hospitalares e que a produção de biofilme por esses patógenos é a causa mais comum de colonização de superfícies, dificultando ainda mais o controle das infecções (REVDIWALA, RAJDEV & MULLA, 2012).

Em relação aos utensílios utilizados no preparo e distribuição das FLI, tem sido observado que o processo de higienização pode ser comprometido pela aderência dos componentes lácteos nas superfícies de processamento e a existência de fissuras e sulcos nesses ambientes, inclusive de aço inoxidável, facilita a entrada de componentes como proteínas e gorduras e dificulta o processo de limpeza favorecendo a adesão e formação de biofilme (BERNARDES *et al.*, 2012). Em nosso estudo, essas fissuras puderam ser observadas nas mamadeiras e bicos em uso no lactário.

Tabela 7: Detecção da produção de biofilme através do método do vermelho Congo.

Isolados	Produção de biofilme
JE1	-
JE2	-
JE3	-
JE4	-
JE5	-
JE6	-
JE7	-
JE8	-
JR1	-
JR2	-
JR3	-
JR4	-
JR5	-
JR6	-
BA1	+
BA2	+
BA3	-
BA4	+
BA5	+
BA6	+
BA7	+
BA8	+
MR1	-
ME1	-
ME2	-
ME3	-
ME4	-
ME5	-
BIE1	+
BIE2	+
BIE3	+
BIE4	-
BIE5	+
BIE7	+
BIE8	+
BIR1	-
BIR3	-
BIR4	-
ALE2	-
ALE3	-
ALR1	-
AE1	+
PR1	-
PR2	-
PR3	-

+, produção de biofilme; -, ausência da produção de biofilme

6.3.4. Produção de outros fatores de virulência

Atividades proteolíticas, lipolíticas, hemolíticas, nucleásicas, assim como a produção de biofilme, têm sido relatadas como fatores associados à virulência e tem sido verificado que o nível de virulência está correlacionado com a quantidade de enzimas e toxinas produzidas (SREEDHARAN, PHILIP & SINGH, 2012).

Os resultados da produção de protease, lipase, hemólise e DNase pelos isolados estudados neste trabalho estão apresentados na **Tabela 8** e exemplificados nas **Figuras 6, 7 e 8**.

Tabela 8: Fatores de virulência apresentados pelos isolados obtidos neste trabalho.

Bactérias	Produção de fatores de virulência *			
	DNase	Protease	Lipase	Hemólise
JR6	-	+	-	-
BA4	+	-	-	-
ME1	+	+	-	+
ME2	+	+	-	+
ME3	+	+	-	+
ME4	+	+	-	+
ME5	+	+	-	+
BIR4	+	-	-	-
ALE2	-	+	-	+
ALE3	-	+	-	+
ALR1	+	+	-	+
AE1	-	+	-	-

* Apenas os isolados que produziram um ou mais fatores de virulência estão apresentados nesta tabela.

Oito (17,8%) isolados apresentaram atividade proteolítica. As proteases extracelulares auxiliam o micro-organismo a driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, algumas delas, como a caseinase, estão relacionadas à deterioração de alimentos, em especial, o leite e derivados (PARKASH, RAJASEKAR & KARMEGAM, 2007).

Já as lipases, desempenham um papel importante na capacidade de invasão e estabelecimento de infecções, além de também contribuírem com a hidrólise de gorduras presentes em alimentos (CEMPIRKOVA & MIKULOVA, 2009; SREEDHARAN, PHILIP & SINGH, 2012; GUNDOGAN & ATAOL, 2013). Nenhum

dos isolados deste trabalho apresentou atividade lipolítica através do método utilizado.

Oito (17,8%) isolados foram capazes de produzir DNase. Embora a associação entre a produção de DNase e a patogenicidade ainda não tenha sido confirmada, alguns trabalhos relatam a sua participação no desenvolvimento de infecções no hospedeiro (SREEDHARAN, PHILIP & SINGH, 2012).

A expressão de hemolisinas, por sua vez, está geralmente associada a estirpes patogênicas, uma vez que essas proteínas causam lise dos eritrócitos pela formação de poros. Oito (17,8%) isolados apresentaram atividade hemolítica, dentre eles, 4 dos 5 isolados de *Shigella dysenteriae*.



Figura 6: Atividade hemolítica apresentada pelas estirpes ALE3 e ALR1 estudadas neste trabalho.

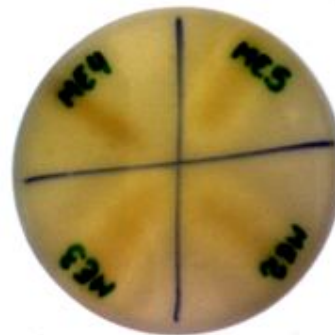


Figura 7: Atividade proteolítica em placas de ágar leite apresentada pelas estirpes ME2, ME3, ME4 e ME5.

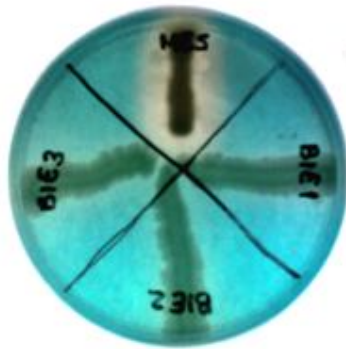


Figura 8: Atividade da enzima DNase apresentada pela estirpe ME5. O meio de cultura utilizado foi o ágar DNase base acrescido de verde de metila.

7. Elaboração da cartilha para um curso rápido de treinamento dos lactaristas

Os resultados das análises microbiológicas e as investigações preliminares no lactário apontaram diversas falhas relacionadas à higienização correta dos utensílios. Outros erros cruciais também foram detectados, associados à temperatura de reconstituição das fórmulas. Observações similares foram descritas por USAI e COLS (2013) e sugerem que esses procedimentos incorretos comprometem a segurança das FLI, deixando o lactente mais susceptível a doenças.

Minimizar os riscos é essencial para evitar possíveis doenças transmissíveis por alimentos e o estabelecimento de métodos de controle regulares assim como de higienização adequada de utensílios pode facilitar a obtenção da qualidade sanitária necessária.

Assim sendo, foi elaborada uma cartilha que descreve, de maneira básica e com linguagem acessível, os principais procedimentos necessários para evitar a contaminação microbiana no lactário (**ANEXO 4**). Esta cartilha foi utilizada em um curso rápido de treinamento dos lactaristas do hospital.

8. CONCLUSÕES

- ▶ Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que FLI contaminadas durante a etapa de preparo podem apresentar um crescimento bacteriano mesmo sob temperatura de refrigeração se mantidos por tempo prolongado;
- ▶ Os tratamentos térmicos a 60 e 70°C por 5 ou 10 minutos mostraram não ser suficientes para eliminar toda a população de *Salmonella* spp. inoculada nas fórmulas lácteas;
- ▶ O aquecimento em forno de micro-ondas convencional a partir de 30 segundos pareceu ser a forma mais rápida e eficiente de redução da população de *Salmonella* nas FLI reconstituídas;
- ▶ Os micro-organismos pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae* e *Shigella dysenteriae* foram as bactérias Gram-negativas mais isoladas em FLI reconstituídas, superfícies e utensílios utilizados no seu preparo provenientes do lactário de um hospital público do Rio de Janeiro;
- ▶ A bactéria *Shigella* foi encontrada em cinco amostras, provenientes de mamadeiras (interior e bico), o que constitui um dado preocupante, uma vez que esse micro-organismo pode causar doenças gastrintestinais com sérias conseqüências, especialmente em neonatos
- ▶ Dentre os 45 isolados, 40 (88,9%) apresentaram um perfil típico de multirresistência, uma vez que foram resistentes a antibióticos pertencentes a, pelo menos, três classes diferentes.
- ▶ A detecção de isolados de *Acinetobacter* e *Shigella* multirresistentes a antibióticos neste trabalho demonstra que a falta de higiene dos utensílios continua sendo um fator importante na transmissão de bactérias multirresistentes associada ao consumo de FLI, refletindo procedimentos inadequados no processo de controle de infecções
- ▶ De modo a minimizar a contaminação bacteriana no lactário do hospital, foi elaborada uma cartilha (em anexo) para um curso rápido de treinamento dos lactaristas sobre as principais normas de higiene e de preparo de FLI.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento desta dissertação proveu não somente o aumento de meu conhecimento científico e a minha qualificação profissional, mas também permitiu que eu pudesse proporcionar melhorias para o lactário do hospital público, onde trabalho, atendendo assim, o objetivo de um curso de Mestrado Profissional. A aplicação direta dos resultados da dissertação em meu ambiente profissional está resumida nos tópicos abaixo:

- ▶ Os resultados obtidos na primeira etapa do trabalho, contribuíram para a elaboração de novos procedimentos de higienização de ambiente e utensílios, adequando-os às boas práticas de fabricação.

- ▶ Devido aos micro-organismos isolados e identificados nos utensílios e fórmulas prontas para distribuição, foram realizados treinamentos com as equipes envolvidas em todas as etapas de preparo, manipulação e distribuição de fórmulas lácteas.

- ▶ A partir da evidência da presença de biofilmes bacterianos, os utensílios porosos foram substituídos por utensílios de vidro, reafirmando-se a correta higienização de todas os utensílios utilizados no processamento das fórmulas lácteas.

- ▶ Com os resultados obtidos no aquecimento em forno micro-ondas convencional, foi estabelecida a aquisição de um novo equipamento que já se encontra em uso para o aquecimento das fórmulas lácteas antes da sua distribuição;

- ▶ Para o melhor controle da temperatura ambiente e de refrigeração foram instalados termômetros no ambiente de produção de fórmulas lácteas e no interior do refrigerador que armazena as fórmulas prontas, com aferição de temperatura três vezes ao dia em planilha própria;

- ▶ A partir do presente trabalho, todas as fórmulas lácteas prontas são identificadas com o nome do paciente, tipo de fórmula, data de fabricação e data de validade, permitindo melhor controle de qualidade no processo produtivo das fórmulas até o consumidor final.

- ▶ Todas as fórmulas em pó são transferidas de suas latas originais para potes plásticos identificados com as informações dos fabricantes permanecendo em uso por até 30 dias depois da sua abertura, sendo descartadas após esse prazo

independente de seu uso.

▶ Para todas as fórmulas em uso foram elaboradas fichas técnicas de preparo, ressaltando os cuidados na higiene em todas as etapas.

▶ Foi desenvolvido e aplicado um treinamento para toda a equipe do lactário ressaltando a importância e os cuidados nos processo de higienização de utensílios e bancadas. Destacamos a importância da manutenção da temperatura de refrigeração imediata ao preparo e o aquecimento em micro-ondas de todas as fórmulas lácteas, anterior a sua distribuição. No mesmo treinamento, foram utilizadas as imagens dos meios de cultura que evidenciaram a contaminação de utensílios, superfícies e fórmulas para reforçar o empenho da equipe na obtenção de bons resultados em futuras coletas. A cartilha elaborada neste trabalho será extremamente útil para futuros treinamentos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HOLY, M. A., LIN, M., ABU-GHOUSH, M. M., AL-QADIRI, H. M., RASCO, B. A. Thermal resistance, survival and inactivation of *Cronobacter spp.* (*Cronobacter spp.*) in powdered and reconstituted infant formula. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 287 – 301, 2009.

ANGULO, F. J., CAHILL, S. M., WACHSMUTH, I. K., COSTARRICA, M. L., EMBAREK, P. K. B. Powdered Infant Formula as a Source of *Salmonella* Infection in Infants. **Clinical Infectious Diseases** v. 46, p. 268-273, 2008.

ARSALAN, A., BAGIR, S., NAQVI, S., ALI, S. I., ANWAR, Z. **Contamination of microorganisms in pediatric infant formula marketed in Karachi. Annals of Food Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 90-99, 2013a.

ARSALAN, A., ANWAR, Z., AHMAD, I., SABA, A., BAQAR, S., NAQVI, S. Microbes in pediatric infant formula. **Science and Nature**, v. 2, n. 4, p. 116-122, 2013b.

BARSOUMIAN, A., CALVANO, T., MARKELZ, A. E., CASSIDY, R., MURRAY, C. K., BECKIUS, M. L., MENDE, K., AKERS, K. S. Variations of CHROMagar Acinetobacter to detect imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, v. 45, n. 6, p. 446-452, 2013.

BEJARANO-RONCANCIO, J.J. El banco de leche humana y el lactario hospitalari. **Revista Gastrohnutp**, v. 15, n. 1, p. S30-S40, 2013.

BEJARANO-RONCANCIO, J. J. & CASTILLO-QUIROGA, Y. M. Principales contaminantes microbiológicos en fórmulas lácteas infantiles. **Ciência UAT**, v. 25, n.1, p. 42-48, 2013.

BERNARDES, P. C., ANDRADE, A. E., PIRES, A. C. S., FIALHO JÚNIOR, J. F. Q., LELIS, C. A., ANDRADE, N. J. Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. , p. 1261-1268, 2012.

BEUCHAT, L. R., KIM, H., GURTLER, J. B., LIN, L. C., RYU, J. H., RICHARDS, G. M. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 2, p. 204–213, 2009.

BLOSSOM, D. B., SRINIVASAN, A. Drug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex: an emerging nosocomial pathogen with few treatment options. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 16, n.1, p. 1-3, 2008.

BOUCHER HW, TALBOT GH, BRADLEY JS, EDWARDS JE, GILBERT D, RICE LB, SCHELD M, SPELLBERG B, BARTLETT J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Disease**, v. 48, p. 1-12, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, n.12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial - República Federativa do Brasil**. 12 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 18 de Setembro de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. Seção 1, p. 14, 2003.

CAC - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children. **CAC/RCP 66-2008**, 2008. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/11026/cxp_066e.pdf Acesso em 07 mar 2014.

CAHILL, S. M., WACHSMUTH, I. K., COSTARRICA, M. L, EMBAREK, P. K. B. Powdered infant formula as a source of *Salmonella* infection in infants. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 268-273, 2008.

CAMINHA, M.F.C., SERVA, V. B., ARRUDA, I. K. G., BATISTA FILHO, M. Aspectos históricos, científicos, socioeconômicos e institucionais do aleitamento materno. **Revista Brasileira de Saúde Materna e infantil.** , v. 10, n. 1, p. 25-37, 2010.

CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-resistant bacteria: A challenge for the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.53, n.1, p. 11-48, 2013.

CARRASCO, E., MORALES-RUEDA, A., GARCÍA-GIMENO, M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 545-556, 2012.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of *Salmonella* Montevideo and *Salmonella* Mbandaka infections linked to tahini sesame paste. 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-tahini-05-13> Acesso em 07 mar 2014.

CEMPIRKOVA, R. & MIKULOVA, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 65-73, 2009.

CHAP, J., JACKSON, P., SIQUEIRA, R., GASPAR, N., QUINTAS, C., PARK, J., OSAILI, T., SHAKER, R., JARADAT, Z., HARTANTYO, S. H. P., ABDULLAH SANI, N., ESTUNINGSIH, S. & FORSYTHE, S. J. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. International. **Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 185-188, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: **Twenty-third Informational Supplement M100-S23**. CLSI, Wayne, PA, USA.

CORCORAN, M., MORRIS, D., DE LAPPE, N., O'CONNOR, J., LALOR, P., DOCKERY, P., CORMICAN, M. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. **Applied and**

Environmental Microbiology, v. 80, n. 4, p. 1507-1514, 2014.

DAY, J. B., SHARMA, D., SIDDIQUE, N., HAO, Y.-Y. D., STRAIN, E. A., BLODGETT, R. J. AL-KHALDI, S. F. Survival of *Salmonella* Typhi and *Shigella dysenteriae* in Dehydrated Infant Formula. **Journal of Food Science**, v. 76, p. M324–M328, 2011.

FAO/WHO - **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION**. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report. **Microbiological risk Assessment Series**, n. 10, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10.pdf?ua=1>. Acesso em 07 mar 2014.

FAUZIAH, T., NORRAKIAH, A.S., UMA PRIYA, K. & NORIZAN, J. Detection of *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* and *Enterobacteriaceae* in Powdered Infant Formula and Children's Milk. **Proceeding of the Seminar on Food Biotechnology: Perspectives, Challenges and Opportunities**, pp. 352-360, 2008.

FINN, S., CONDELL, L., MCCLURE, P., AMÉZQUITA, A., FANNING, S. Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 331, 2013.

FISHBAIN, J., PELEG, A. Y. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clinical and Infectious Disease*, v. 5, n. 1, p. 79-84, 2010.

FRAGOSO, A.P.R., FORTES, R.C. Fatores associados à prática do aleitamento materno entre nutrízes de um hospital público do Distrito Federal. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 29, n. 2, p. 114-118, 2011.

GRIBBLE, K. D., HAUSMAN, B. L. Milk sharing and formula feeding: Infant feeding risks in comparative perspective? **Australasian Medical Journal**, v. 5, n. 5, p. 275-283, 2012.

GUNDOGAN, N., ATAOL, O. Biofilm, protease and lipase properties and antibiotic resistance profiles of staphylococci isolated from various foods. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 28, p. 3582-3588, 2013.

HA, J. W., KANG, D. H. Synergistic bactericidal effect of simultaneous near-infrared radiant heating and UV radiation against *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. **Applied and Environmental Microbiology**, Epub ahead of print, 2014.

HEDAYATI, S., EFTEKHAR, F., HOSSEINI, S. N. Biofilm formation by bacteria isolated from intravenous catheters. **Journal of Medical Bacteriology**, v.. 3, n. 3, p. 26-31, 2014.

HEINIG, M. J., NOMMSEN, L. A., PEERSON, J. M., LONNERDAL, B., DEWEY, K. G. Energy and protein intakes of breast-fed and formulafed infants during the first year of life and their association with growth velocity: the DARLING Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 152-161, 1993.

HEIZMANN, W. R., DUPONT, H., MONTRAVERS, P., GUIRAO, X., ECKMANN, C., BASSETTI, M., GARCIA, M. S., CAPPARELLA, M. R., SIMONEAU, D., BODMANN, K. F. Resistance mechanisms and epidemiology of multiresistant pathogens in Europe and efficacy of tigecycline in observational studies. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 45-55, 2013.

HORTA, B. L., BAHL, R., MARTINES, J. C., VICTORA, C. G. Evidence on the long-term effects of breastfeeding - Sytematic reviews and metaanalyses. Geneve: **World Health Organization**, p. 1-52, 2007.

ISLAM, M. S., HOSSAIN, M. A., KHAN, S. I., KHAN, M. N. H., SACK, R. B., ALBERT, M. J., HUQ, A., COLWELL, R. R. Survival of *Shigella dysenteriae* type 1 on fomites. **Journal of Health Population and Nutrition**, v. 19, n. 3, p. 177-182. 2001.

KARAGEORGOPOULOS, D. E., FALAGAS, M. E. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *The Lancet Infectious Disease*, v. 8, n. 12, p. 751-762, 2008.

KIM, H., RYU, J.-H., BEUCHAT, L.R. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. ***Applied and Environmental Microbiology***, v.73, p. 1256–1265, 2007.

JAIN, S., SHRAMA, M. F., GUPTA, R., SHRE, N, KUMAR, M. Multidrug resistant *Shigella flexneri*: A rare case of septicemia in an Infant. ***Journal of Clinical Diagnostic Research***, v. 8, n. 6, p. 3-4, 2014.

JAY, J.M. ***Modern food microbiology***. 7.ed. Maryland: Aspen, 2002. 679p.

JOSHI, S. G., LITAKE, G. M. *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogenic threat to public health. *World Journal of Clinical and Infectious Disease*, v. 25, n. 3, p. 25-36, 2013.

LINHARES, I. W. ***Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias no Preparo de Fórmulas Infantis em Lactário Hospitalar***. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2012.

MACHADO, T. R. M., MALHEIROS, P. S., BRANDELLI, A., TONDO, E.C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. ***Revista do Instituto Adolfo Lutz.***, v. 69, n. 4, p. 475-81, 2010.

MAGIORAKOS, A. P., SRINIVASAN, A., CAREY, R. B., CARMELI, Y., FALAGAS, M. E., GISKE, C. G., HARBARTH, S., HINDLER, J. F., KAHLMETER, G., OLSSON-LILJEQUIST, B., PATERSON, D. L., RICE, L. B., STELLING, J., STRUELENS, M. J., VATOPOULOS, A., WEBER, J. T., MONNET, D. L. Multidrug-

resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 268–281, 2012.

MAJOWICZ, S.E., MUSTO, J., SCALLAN, E., ANGULO, F. J., KIRK, M., O'BRIEN, S. J. , JONES, T. F., FAZIL, A., HOEKSTRA, R. M. International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Disease**, v. 50, p. 882-889, 2010.

MAMMINA, C., DI CARLO, P., CIPOLLA, D., GIUFFRÈ, M., CASUCCIO, A., DI GAETANO, V., PLANO, M. R., D'ANGELO, E., TITONE, L., CORSELLO, G. Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. **American Journal of Infection Control**, n. 35, p. 222–230, 2007.

MARDANEH, J. & SOLTAN-DALLAL, M. M. Isolation and Identification of *E. cowanii* from Powdered Infant Formula in NICU and Determination of Antimicrobial Susceptibility of Isolates. **Iranian Journal of Pediatrics**, v. 24, n. 3, p. 261-266, 2014.

MARTINS, A. M. C. V.; JUNIOR, O. D. R.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CORTEZ, L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.2, pp. 295-298, 2008.

MORO, G.M.B., MESQUITA, M. O. Leite materno e seus substitutos ao longo da história. **Revista Digital**. Buenos Aires, v 15, n. 153, 2011.

NIVEDITHA, S., PRAMODHINI, S., UMADEVI, S., KUMAR, S., STEPHEN, S. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 6, n. 9, p. 1478-1482, 2012.

NOVAES, J. F., LAMOUNIER, J.A., FRANCESCHINI, S. C. C., PRIORE, S. E. Efeitos a curto e longo prazo do aleitamento materno na saúde infantil. **Journal of Brazilian Society for Food and Nutrition**, v. 34, n. 2, p. 139-160, 2009.

ODDY, W. H. Infant feeding and obesity risk in the child. **Breastfeed Reviews**, v. 20, n. 2, p. 7-12, 2012.

OLIVEIRA, M. N.; BRASIL, A. L. D.; TADDEI, J.A.A. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das cozinhas de creches públicas e filantrópicas. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, n.3, p. 1051-1060, 2008.

OSAILI, T., S. FORSYTHE, S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 214–220, 2009.

OWEN, C. G., MARTIN, R. M., WHINCUP, P. H., DAVEY SMITH, G., COOK, D. G. Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 5, p. 1043-1054, 2006.

PARKASH, M., RAJASEKAR, K., KARMEGAM, N. Bacterial population of raw milk and their proteolytic and lipolytic activities. **Research Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 6, p. 848-851, 2007.

PINA-PÉREZ, M. C., BENHOCH-TINOCO, M., RODRIGO, D., MARTINEZ, A. *Cronobacter sakazakii* inactivation by microwave processing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 821-828, 2014.

RAVELLI, A.C.J., MEULEN J.H.P., OSMOND, C., BARKER, D.J.P., BLEKER, O.P. Infant feeding and adult glucose tolerance, lipid profile, blood pressure, and obesity. **Archives of Disease in Childhood**, v. 82, p.248-252, 2000.

RAY, B., BHUNIA, A. **Fundamentos de microbiología de los alimentos**. México D.F: Editorial Mc Graw Hill.352 p., 2010.

REVDIWALA, S., RAJDEV, B. M., MULLA, S. Characterization of Bacterial Etiologic Agents of Biofilm Formation in Medical Devices in Critical Care Setup. **Critical Care Research and Practice**, article ID 945805, 2012.

ROMERO, C. **Microbiología y Parasitología Humana**. México D.F: Editorial Médica Panamericana. 965 p., 2007.

ROSSI, P, Kabuki DY, Kuaye AY. Avaliação microbiológica do preparo de formula láctea infantil em lactário hospitalar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 503-509, 2010.

ROWLANDS R.E.G., PAPASIDERO, A.A.S., PAULA, A. M. R., CANO, C. B., GELLI, D. S. Resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis, S. Panama e S. Infantis em fórmula láctea infantil reconstituída. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 11, p. 36-39, 2006.

SAHA, R., ARORA ,S., DAS, S.,GUPTA, C., MAROOF, K. A.,SINGH, N. P., KAUR, I. R. Detection of biofilm formation in urinary isolates: need of the hour. **Journal of Research in Biology**, v. 4, n. 1, p. 1174-1181, 2014.

SANTIAGO, M. C. **Avaliação da implantação do programa de distribuição de fórmula láctea infantil na cidade de Belo Horizonte, MG: estratégia de redução da transmissão vertical do vírus HIV através do aleitamento artificial**. 2006. 170 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, 2006.

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

SCHOENI, J. L., GLASS, K. A., MCDERMOTT, J. L., WONG, A. C. L. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 385-396, 1995.

SILVA F. V. M., GIBBS, P. A. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. **Food Research International**, v. 45, p. 695-699, 2012.

SILVA, L. M. P., VENÂNCIO, S. I., MARCHIONI, D. M. L. Práticas de alimentação complementar no primeiro ano de vida e fatores associados. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 983-992, 2010.

SINGHAL, A., COLE, T. J., LUCAS, A. Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials. **Lancet**, v. 357, n. 9254, p. 413-419, 2001.

SREEDHARAN, K., PHILIP, R., SINGH, I.S.B. Virulence potential and antibiotic susceptibility pattern of motile aeromonads associated with freshwater ornamental fish culture systems: a possible threat to public health. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 754-765, 2012.

STEWART, P. S., COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.

SUBRAMANIAN, P., SHANMUGAM, N., SIVARAMAN, U., KUMAR, S., SELVARAJ, S. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. **The Australasian Medical Journal**, v. 5, n. 7, p. 344-348, 2012.

TOWNSEND, S., FORSYTHE, S.J.. The neonatal intestinal microbial flora, immunity, and infections. In: Farber, J., Forsythe, S.J. (Eds.), ***Enterobacter sakazakii***. ASM Press, Washington, DC, 2008.

USAI, T., MUTONHODZA, B., MAKAMURE, C., TSHALIBE, R.S., CHINOFUNGA, D. Hygiene for preparation of infant formulas in a developing country. **International Journal of Scientific and Technology Research**, v. 2, n. 9, p. 1-5, 2013.

VAN DOREN, J. M., NEIL, K. P., PARISH, M., GIERALTOWSKI, L., GOULD, L. H., GOMBAS, K. L. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973–2010. **Food Microbiology**, v. 36, p. 456–464, 2013.

WEFFORT, V. R. S. Avanços nutricionais em fórmulas infantis. **Pediatria moderna**, v. 48, n. 4, p.115-120, 2012.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula guidelines. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif2007/en/index.html>. Acesso em 07 mar 2014.

ANEXO 1

**Artigo ACEITO para publicação na Revista
Vigilância Sanitária em Debate
ISSN 2317-269X**

1
2 **Avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis sob**
3 **diferentes condições de preparo e armazenamento**

4
5 **[*Salmonella enterica* em fórmulas lácteas infantis]**
6

7 **Resumo**

8 *Salmonella enterica* é um dos mais importantes patógenos associados a fórmulas lácteas infantis
9 (FLI). Neste trabalho, foi avaliada a sobrevivência e crescimento de uma estirpe padrão de
10 *Salmonella enterica* sorotipo Typhi em duas FLI reconstituídas (F1 e F2) sob diferentes condições
11 de preparo e armazenamento similares às utilizadas em lactários hospitalares. Para ambas as FLI
12 inoculadas e incubadas à temperatura ambiente, observou-se um aumento de 3,3 log na
13 população de *S. enterica* logo nas primeiras 24 h de incubação e um aumento superior a 4,5 log
14 ao término de 72 h. A 4°C, nas primeiras 48 h de incubação, houve leve aumento populacional (<
15 1,0 log) e após 72 h, o crescimento foi similar ao observado sob temperatura ambiente. Em
16 relação ao aquecimento em banho-maria, verificou-se que a 60°C/ 5 min houve uma redução de
17 um pouco mais de 1 log UFC/ml, entretanto, a 60°C/ 10 min, a queda observada foi de 2,8 log em
18 F1 e de 2,3 log em F2. Já a 70°C/ 5 min, ocorreu redução de cerca de 3 log UFC/ml para F1 e F2,
19 enquanto que por 10 min, essa redução foi cerca de 1 log maior. O aquecimento em forno de
20 micro-ondas mostrou ser a forma mais rápida e eficiente de redução da população de *Salmonella*
21 nas FLI, uma vez que não foi detectada contagem celular após nenhum dos tratamentos
22 utilizados. Os resultados sugerem que FLI contaminadas durante a etapa de preparo podem
23 apresentar um crescimento bacteriano mesmo sob temperatura de refrigeração se mantidos por
24 tempo prolongado e que determinados métodos de tratamento térmico não são suficientes para
25 inibição completa de *S. enterica*.

26
27 **Palavras-chave:** *Salmonella enterica*, fórmulas lácteas infantis, tratamento térmico,
28 armazenamento.

29
30 **Abstract**

31 *Salmonella enterica* is one of the most important pathogen associated with infant milk formulas
32 (IMF). In this study, the survival and growth of a *Salmonella enterica* serotype Typhi strain in two
33 reconstituted IMF (F1 and F2) under different conditions of preparation and storage similar to those
34 used in hospital lactaries was evaluated. For both IMF, inoculated incubated at room temperature,
35 there was a 3.3 log increase in the population of *S. enterica* soon as the first 24 h incubation and a
36 greater than 4.5 log at the end of 72 h. At 4°C, in the first 48 h of incubation, there was a slight
37 increase in population (< 1.0 log) and after 72 h, growth was similar to that observed at room
38 temperature. Regarding the heating in a water bath, at 60°C/5 min there was a reduction of slightly
39 more than 1 log CFU/ml, however, at 60°C/10 min, the observed decrease was 2.8 log for F1 and

40 2.3 log for F2. At 70°C/5 min, there was a reduction of about 3 log CFU/ml for both IMF, and for 10
41 min, this reduction was about 1 log higher. The heating in the microwave oven has proved to be the
42 most efficient way of reducing populations of *Salmonella* in the IMF, since cell count was not
43 detected after any of the treatments used. Our results suggest that IMF contaminated during the
44 preparation step may have a bacterial growth even under refrigeration if kept for a long time, and
45 some thermal treatment methods are not sufficient for the complete inhibition of *S. enterica*.

46

47 **Keywords:** *Salmonella enterica*, infant milk formulas, heat treatment, storage.

48

49 **Introdução**

50 Diferentes situações de saúde podem resultar na impossibilidade de amamentação natural
51 ou ainda, trazer riscos para saúde dos lactentes. Nestes casos a alternativa é a utilização das
52 fórmulas lácteas infantis (FLI), que atenderão as necessidades nutricionais, sem comprometer o
53 crescimento e desenvolvimento dos lactentes^{1, 2, 3, 4}.

54 De acordo com Arsalan *et al.*⁵, a fabricação de FLI comercialmente estéreis nem sempre é
55 possível de ser realizada utilizando-se a tecnologia de processamento atual. Com isso, existem
56 riscos potenciais de infecção dos bebês através do consumo deste alimento. Estes riscos são
57 maiores quando as fórmulas lácteas não são preparadas, manuseadas ou armazenadas de modo
58 apropriado.

59 Os micro-organismos e/ou suas toxinas geram grande preocupação quanto à
60 administração das fórmulas lácteas, uma vez que a sua presença pode causar doenças e, até
61 mesmo, resultar na morte dos lactentes^{6,7}.

62 *Cronobacter* spp. (antigamente descrito como *Enterobacter sakazakii*) e *Salmonella*
63 *enterica* são os mais preocupantes patógenos associados às fórmulas lácteas, uma vez que
64 existem claras evidências de que suas presenças podem resultar em graves doenças na
65 população de risco que consome esse alimento^{5,6,8}.

66 Para os fabricantes de alimentos, a *Salmonella* sp. é uma das bactérias de mais difícil
67 controle, pois sua sobrevivência em alimentos não depende apenas da atividade de água do
68 ambiente ou alimento, mas também de outros fatores, como a composição da matriz e a
69 temperatura de preparo e armazenamento⁹.

70 Muitos trabalhos têm investigado a sobrevivência de *Cronobacter* spp. nas fórmulas
71 lácteas, mas pouca atenção tem sido dada quando o patógeno é *Salmonella*. Este trabalho,
72 portanto, visa avaliar a sobrevivência e o crescimento de uma estirpe padrão de *Salmonella*
73 *enterica* sorotipo Typhi em FLI sob diferentes condições de aquecimento e armazenamento,
74 simulando as formas de preparo das FLI na rotina de um lactário.

75

76 **Materiais e Métodos**

77

78 **1. Estirpes e condições de cultivo**

79 A estirpe de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi ATCC19214 foi utilizada
80 nos estudos de sobrevivência em FLI sob diferentes condições de preparo e armazenamento
81 comumente empregadas em lactários nos hospitais do Brasil. A cultura foi estocada em caldo
82 Casoy com 40 % (p/v) de glicerol a - 20°C até o momento do uso.

83

84 **2. Fórmulas lácteas infantis (FLI)**

85 As latas de duas marcas de FLI desidratadas mais comumente empregadas nos lactários
86 de hospitais públicos foram adquiridas em farmácias locais da cidade do Rio de Janeiro. Para
87 todos os experimentos, as fórmulas foram re-hidratadas com água destilada estéril de acordo com
88 as instruções dos fabricantes encontradas no rótulo.

89

90 **3. Avaliação do crescimento de *S. enterica* em FLI sob diferentes formas de preparo**

91

92 **3.1. Aquecimento em banho-maria**

93 As FLI foram reconstituídas, em condições de assepsia, em água destilada estéril. As FLI
94 foram distribuídas em frascos estéreis (50 ml) e inoculadas de modo a se obter a concentração
95 final de 10⁶ UFC/ml da estirpe de *S. enterica*. O tratamento térmico foi realizado em banho-maria
96 (marca Quimis, modelo Q304M-2105, 160 W) a 60°C e 70°C por 10 e 5 minutos. Após esse tempo,
97 a amostra foi removida do banho-maria e imersa em banho de gelo por 5 min. O número de UFC
98 após o tratamento térmico foi quantificado conforme o item 5.

99

100 **3.2. Aquecimento através de forno de micro-ondas**

101 A fim de se reproduzir o que acontece normalmente em um lactário, foi seguida a
102 metodologia descrita por Al-Holy *et al.*¹⁰, com pequenas modificações. A FLI foi reconstituída em
103 água destilada e porções de 50 ml foram dispensadas em frascos estéreis, que foram, em
104 seguida, esterilizados a 121° C por 5 min. Os frascos foram inoculados com 100 µL da cultura de
105 *S. enterica*, isoladamente, de modo a se obter a concentração inicial de células de
106 aproximadamente 10⁶ UFC/ ml. Um forno de micro-ondas caseiro (marca Midea, modelo
107 MM30EL1VW, tensão 127 V, potência 1000 W) foi utilizado para aquecer os frascos durante 30,
108 45, 60 e 90 segundos (sendo, este último tempo, dividido em dois períodos de aquecimento de 45
109 segundos interrompidos por um intervalo de 30 segundos). Um frasco de FLI reconstituída e
110 inoculada, porém sem aquecimento, serviu como controle. Após o aquecimento, os frascos foram
111 agitados vigorosamente e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a
112 quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) sobreviventes de *S. enterica* utilizando
113 o método descrito no item 5.

114

115 **4. Crescimento de *S. enterica* em FLI armazenadas sob temperatura ambiente e refrigeração**

116 Mais uma vez a fim de se mimetizar as condições de armazenamento que ocorrem na
117 rotina de um lactário, investigou-se a capacidade de sobrevivência das estirpes de *S. enterica* em
118 FLI reconstituídas armazenadas à temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) e sob

119 refrigeração (4°C). A estirpe de *S. enterica* foi inoculada, separadamente, em tubos contendo 10
120 ml de FLI reconstituída estéril de modo a atingir a concentração inicial de 10⁶ UFC/ml. Os tubos
121 foram agitados vigorosamente em um vórtex (marca Biomatic modelo 1005) e o crescimento da
122 bactéria foi monitorado por plaqueamento (após 24, 48 e 72h) em ágar Casoy (Micromed).

123

124 5. Enumeração de *S. enterica*

125 As UFC de *S. enterica* foram enumeradas pela técnica de “spread plate”. As amostras
126 foram diluídas e plaqueadas em ágar Casoy, em duplicata, e incubadas durante 18-24 h a 37°C.

127

128 6. Análises estatísticas

129 Para todos os testes de significância, valores $p > 0,05$ foram considerados
130 estatisticamente significativos. One-way ANOVA foi utilizado para avaliar as diferenças nos
131 parâmetros estudados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad
132 Prism, versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

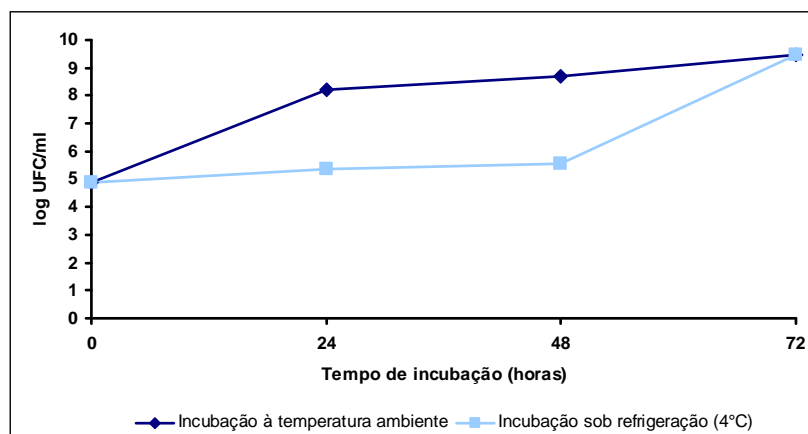
133

134 Resultados e Discussão

135

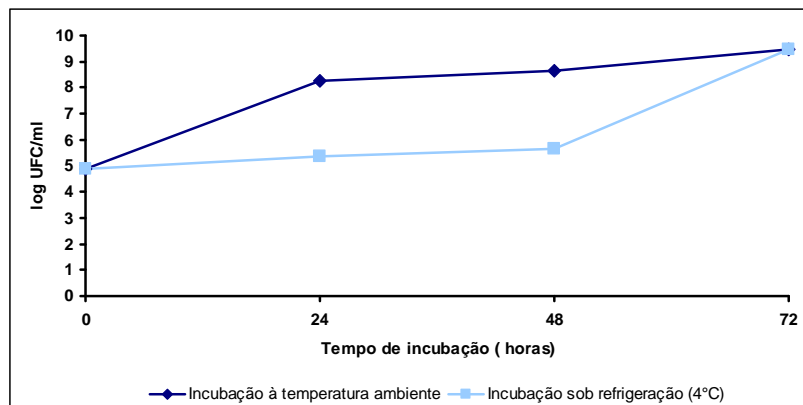
136 O armazenamento sob refrigeração pode auxiliar na segurança do alimento ou, ainda,
137 aumentar a vida de prateleira de diversos alimentos, evitando ou retardando o crescimento de
138 patógenos ¹¹. No entanto, *Salmonella* pode ser um problema em alimentos armazenados sob
139 refrigeração, pois alguns estudos relatam o crescimento de estirpes de diversos sorotipos como
140 Enteritidis, Typhimurium e Heidelberg durante o armazenamento a 10°C, e em alguns casos, o
141 crescimento até mesmo sob a temperatura de 4°C ^{11, 12}.

142 Neste trabalho, o crescimento de *Salmonella enterica* em duas FLI armazenadas sob
143 temperatura ambiente e sob refrigeração foi avaliado através da quantificação celular em
144 intervalos de 24h por um período de 72 horas, partindo-se de um inóculo inicial de 4,9 log UFC/ml.
145 Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos resultados encontrados para as
146 duas fórmulas empregadas (**Figuras 1 e 2**).



147

148 **Figura 1:** Curva de crescimento da estirpe *Salmonella enterica* ATCC19214, durante 72 horas, na
149 fórmula láctea infantil 1 armazenada sob temperatura ambiente e sob temperatura de refrigeração
150 (4°C).



151 **Figura 2:** Curva de crescimento da estirpe *Salmonella enterica* ATCC19214, durante 72 horas, na
152 fórmula láctea infantil 2 armazenada sob temperatura ambiente e sob temperatura de refrigeração
153 (4°C). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

154

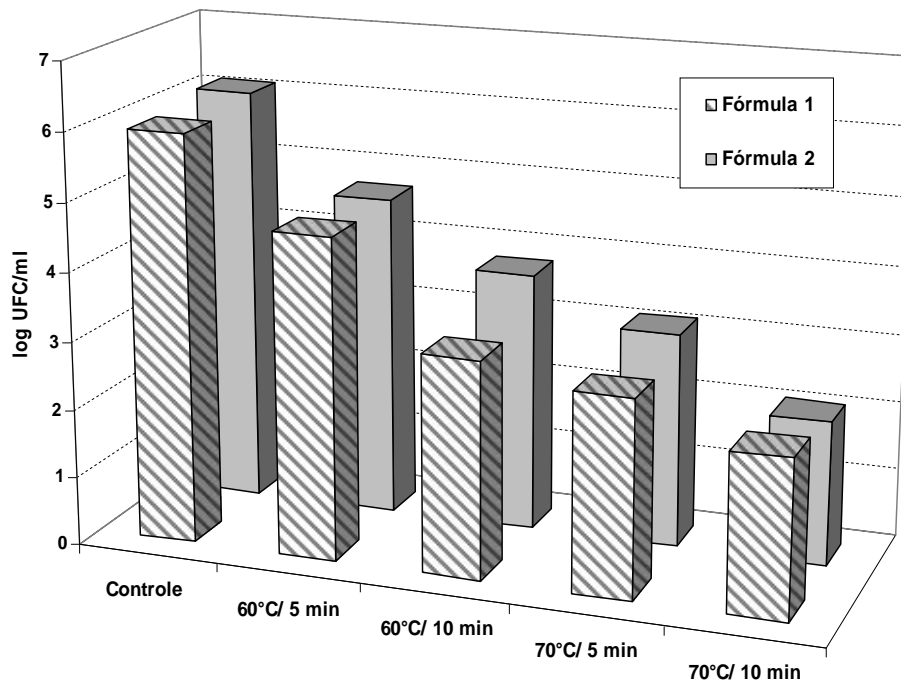
155 Quando as fórmulas foram armazenadas à temperatura ambiente, houve um aumento de
156 3,3 log na população de *Salmonella* presente nas primeiras 24 h de incubação e de
157 aproximadamente 3,8 log após 48h. Ao término de 72h de incubação, foi observado, para ambas
158 as fórmulas lácteas, aumento superior a 4,5 log da concentração celular. Esses resultados
159 sugerem que fórmulas lácteas contaminadas durante a etapa de preparo podem apresentar um
160 crescimento bacteriano elevado, já nas primeiras 24 horas, se mantidas em temperatura ambiente.

161 Sob temperatura de refrigeração, nas primeiras 48 horas de incubação, foi detectado leve
162 crescimento populacional (inferior a 1 log). Entretanto, ao final de 72 horas, observou-se
163 crescimento similar ao das fórmulas incubadas à temperatura ambiente, o que corresponde a um
164 aumento de 4,5 log em relação ao inóculo inicial. Dessa forma, é possível concluir que a
165 temperatura de refrigeração, que é um fator inibidor de crescimento bacteriano, não impede o
166 crescimento de *Salmonella enterica* nas FLI avaliadas.

167 Estudos similares realizados com *Cronobacter* sp, que é o outro patógeno comumente
168 associado à contaminação de fórmulas lácteas, mostraram que quando fórmulas reconstituídas
169 eram contaminadas artificialmente com cepas deste patógeno e incubadas a 30°C, havia um
170 crescimento de 2,5 a 3,14 log na concentração populacional logo nas oito primeiras horas de
171 incubação¹³. No entanto, quando as fórmulas contaminadas eram incubadas sob temperatura de
172 refrigeração, os autores não detectaram crescimento microbiano, provavelmente devido ao baixo
173 inóculo inicial utilizado.

174 A avaliação do crescimento de *Salmonella enterica* após o aquecimento das fórmulas
175 lácteas em banho-maria e em forno de micro-ondas foi realizado utilizando-se recipientes plásticos
176 contendo 50 ml de cada fórmula láctea utilizada, simulando as condições de aquecimento
177 empregadas em lactários. Pequenas diferenças ($p < 0,05$) foram observadas nos resultados
178 provenientes da utilização da fórmula 1 e da fórmula 2 (**Figura 3**).

179



180

181 **Figura 3:** Concentração de *Salmonella enterica* em FLI artificialmente contaminadas submetidas a
 182 aquecimento em banho-maria. O controle não foi submetido a nenhum tratamento térmico. Todos
 183 os experimentos foram realizados em triplicata.

184

185 O aquecimento em banho-maria a 60°C por 5 minutos não resultou em queda
 186 considerável da contagem de *Salmonella*, havendo redução de um pouco mais de 1 log UFC/ml
 187 em ambas as fórmulas. O aquecimento à mesma temperatura por 10 minutos resultou em uma
 188 queda do crescimento microbiano de 2,8 log na fórmula 1 e de 2,3 log na fórmula 2. Quando as
 189 fórmulas inoculadas foram submetidas ao aquecimento a 70°C por 5 minutos, observou-se, para
 190 ambas, uma redução de cerca de 3 log UFC/ml e, mediante o aquecimento por 10 min, essa
 191 redução foi de 3,7 log UFC/ml para a fórmula 1 e de 4,0 log UFC/ml para a fórmula 2.

192

193 Assim como os resultados encontrados no presente trabalho, Rowlands *et al.*¹⁴ também
 194 descrevem a redução da população de três sorotipos diferentes - Enteritidis, Panama e Infantis -
 195 em fórmulas lácteas infantis reconstituídas, experimentalmente contaminadas e submetidas às
 196 temperaturas de 60°C, 70°C e 80°C, por 5 minutos. As reduções obtidas variaram entre 4 e 6
 197 ciclos logarítmicos a 60°C. Já a 70°C e a 80°C, os autores não mais detectaram o crescimento de
 198 *Salmonella* spp. nas amostras analisadas.

198

199 É possível, portanto, verificar que os tratamentos térmicos a 60 e 70°C por 5 ou 10
 200 minutos não são suficientes para eliminar toda a população de *Salmonella* spp. inoculada nas
 201 fórmulas lácteas, demonstrando a importância dos cuidados nas etapas de preparo e manipulação
 202 desses alimentos. Essa importância é enfatizada pelo fato de que alguns sorotipos de *Salmonella*
 203 têm o potencial de causar doenças em doses muito baixas, vindo a se tornar, assim, uma

203 preocupação específica para os lactentes, particularmente aqueles na categoria de alta
204 suscetibilidade, como os de baixo peso, os prematuros e os imunocomprometidos^{15, 16}.

205 O uso do aparelho de micro-ondas é uma prática corrente para aquecimento de fórmulas
206 lácteas reconstituídas, tanto em domicílios quanto em hospitais. Neste trabalho, o aquecimento em
207 forno de micro-ondas convencional pareceu ser a forma mais rápida e eficiente de redução da
208 população de *Salmonella* nas FLI reconstituídas. Não foi observado crescimento bacteriano nas
209 fórmulas aquecidas por 30, 45, 60 e 90 segundos, apresentando assim, uma redução superior a
210 4,0 log na concentração celular (**Tabela 1**).

211

212 **Tabela 1:** Concentração celular de *S. enterica* nas fórmulas lácteas após o aquecimento em forno
213 micro-ondas convencional

	Log UFC/ml de <i>Salmonella enterica</i>	
	Fórmula 1	Fórmula 2
Controle (sem tratamento)	6,04	6,04
Aquecimento por 30s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 45s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 60s	< 2,00	< 2,00
Aquecimento por 90s	< 2,00	< 2,00

214 Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

215

216

217 A eficiência da inativação de *Cronobacter sakazakii* em FLI por meio de aquecimento em
218 forno de micro-ondas foi recentemente relatada por Pina-Pèrez *et al.*⁷. Entretanto, não foram
219 encontrados na literatura trabalhos citando a sobrevivência de *Salmonella* nas FLI mediante o
220 aquecimento utilizando este equipamento.

221

222 **Conclusão**

223 Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que FLI contaminadas durante a
224 etapa de preparo podem apresentar um crescimento bacteriano mesmo sob temperatura de
225 refrigeração se mantidos por tempo prolongado e que, na faixa de tempo estudada, determinados
226 métodos de tratamento térmico não são suficientes para inibição completa de *S. enterica*.

227 Tendo em vista essa resistência térmica de *Salmonella*, é possível afirmar que a
228 reconstituição das FLI a uma temperatura superior a 70°C por um tempo de exposição mínimo de
229 10 minutos e o aquecimento de pequenas porções em forno de micro-ondas convencional por pelo
230 menos 30 segundos, pode proporcionar um nível mais alto de proteção contra a infecção por
231 *Salmonella* adquirida por este tipo de alimento.

232

233

234

235

236 Referências

- 237 1. Santiago MC. Avaliação da implantação do programa de distribuição de fórmula láctea infantil
238 na cidade de Belo Horizonte, MG: estratégia de redução da transmissão vertical do vírus HIV
239 através do aleitamento artificial [Dissertação]. Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação
240 Oswaldo Cruz, 2006.
- 241
- 242 2. Townsend S, Forsythe SJ. The neonatal intestinal microbial flora, immunity, and infections. In:
243 Farber, J., Forsythe, S.J. (Eds.), *Enterobacter sakazakii*. ASM Press, Washington, DC, 2008.
- 244
- 245 3. Osaili TS, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant
246 formula. *Int J Food Microbiol* 2009; 136: 214–220.
- 247
- 248 4. Bejarano-Roncancio JJ. El banco de leche humana y el lactario hospitalari. *Rev Gastrohnutp*
249 2013; 15 [1]: S30-S40.
- 250
- 251 5. Arsalan A, Bagir S, Naqvi S, Ali Si, Anwar, Z. Contamination of microorganisms in pediatric
252 infant formula marketed in Karachi. *Ann F Sci Tech* 2013a; 14[1]: 90-99.
- 253
- 254 6. Arsalan A, Anwar Z, Ahmad I, Saba A, Baqar S, Naqvi S. Microbes in pediatric infant formula.
255 *Sci Nat* 2013b; 2 [4]: 116-122.
- 256
- 257 7. Pina-Pèrez MC, Benhoch-Tinoco M, Rodrigo D, Martinez A. *Cronobacter sakazakii* inactivation
258 by microwave processing. *Food Biopr Tech* 2014; 7 [3]: 821-828.
- 259
- 260 8. Ha JW, Kang DH. Synergistic bactericidal effect of simultaneous near-infrared radiant heating
261 and UV radiation against *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Appl Environ Microbiol*
262 2014; 80 [6]:1858-63.
- 263
- 264 9. Finn S, Condell L, McClure P, Amézquita A, Fanning S. Mechanisms of survival, responses, and
265 sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Front Microbiol* 2013; 4: 331.
- 266
- 267 10. Al-Holy MA, Lin M, Abu-Ghoush MM, Al-Qadiri HM, Rasco BA. Thermal resistance, survival
268 and inactivation of *Cronobacter spp.* (*Cronobacter spp. spp.*) in powdered and reconstituted infant
269 formula. *J Food Safety* 2009; 29: 287 – 301.
- 270
- 271 11. Silva FVM, Gibbs PA. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in
272 foods. *Food Res Int* 2012; 45: 695-699.
- 273

- 274 12. Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL, Wong ACL. Growth and penetration of *Salmonella*
275 Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *Int J Food Microbiol* 1995;
276 24: 385-396.
277
- 278 13. Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, Lin LC, Ryu JH, Richards, GM. *Cronobacter sakazakii* in foods
279 and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *Int J Food Microbiol* 2009; 136 [2]:n.
280 204–213.
281
- 282 14. Rowlands REG, Papisidero AAS, Paula AMR, Cano CB, Gelli DS. Resistência térmica de
283 *Salmonella* Enteritidis, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil reconstituída. *Rev Inst*
284 *Adolfo Lutz* 2006; 65 [1]: 36-39.
285
- 286 15. Cahill SM, Wachsmuth IK, Costarrica ML, Embarek PKB. Powdered infant formula as a source
287 of *Salmonella* infection in infants. *Clin Infect Dis* 2008; 46 [2]: 268-273.
288
- 289 16. Bejarano-Roncancio JJ, Castillo-Quiroga YM. Principales contaminantes microbiológicos en
290 fórmulas lácteas infantiles. *Ciênc UAT* 2013; 25 [1]: 42-48.

ANEXO 2

**Artigo ACEITO para publicação no periódico
Journal of Dairy Science
ISSN 0022-0302**

1 **Interpretive Summary**

2 Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolated from infant milk formula and
3 utensils in a nursery in Rio de Janeiro, Brazil. By Araújo *et al.* This work relates the detection of multi-drug
4 resistant *Acinetobacter* isolates in infant milk formula, which demonstrates inadequate hygiene on the
5 preparation or distribution of these foods, contributing to the transmission of this pathogens to neonates.

6

7

SHORT COMMUNICATION:

8

MDR *Acinetobacter* Associated to Infant Formula

9

10 **Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolated from infant milk formula**
11 **and utensils in a nursery in Rio de Janeiro, Brazil.**

12

13

B. C. Araújo, M. S. Moraes, L. E. O. Costa and J. S. Nascimento*

14

Laboratory of Microbiology, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de

15

Janeiro, Brazil, CEP 20270-021.

16

17

*corresponding author:

18

Janaína Nascimento

19

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rua

20

Senador Furtado nº 121 Laboratório de Microbiologia (Lab. 412), RJ, Brazil. CEP 20270-021

21

Phone: 55-21-2566-7792

22

E-mail: janaina.nascimento@ifrj.edu.br

23

24 **ABSTRACT**

25

Infant milk formulas (IMF) are not sterile products and pathogenic bacteria can survive and multiply in these

26

products. This study was performed, initially, to detect the presence of *Salmonella* sp. in reconstituted IMF

27

and utensils used in their preparation or distribution in a nursery of a public hospital in Rio de Janeiro. None

28

of the samples tested carried *Salmonella* sp. However, further identification of colonies growing on the

29

selective media revealed the presence of several other Gram-negative bacteria. Seventeen isolates were

30 identified as belonging to *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. Fifteen isolates presented a
31 multi-drug resistance (MDR) profile, by disc diffusion assays, and one of them - JE4 - was, inclusive,
32 resistant to imipenem. The detection of MDR *Acinetobacter* isolates in this work demonstrates inadequate
33 hygiene on the preparation or distribution of IMF, contributing to the transmission of this pathogen to the
34 neonates.

35 **Keywords:** *Acinetobacter* sp., multi-drug resistance, infant milk formula, utensil.

36

37 There is concern for the consumption of infant milk formulas (IMF), since the ingestion of
38 contaminated formula or not properly sanitized utensils used in their preparation can be mechanisms of
39 acquiring infections (Mammina *et al.*, 2007).

40 Multi-drug resistant Gram-negative bacteria represent a major cause of infections in neonatal
41 intensive care units and the feeding with infant formula is significantly associated with cross-transmission of
42 resistant strains (Mammina *et al.*, 2007; Mardaneh & Dallal, 2013).

43 Many studies report the presence of different Gram-negative bacteria in IMF, including
44 *Acinetobacter* sp., but the focus of attention given to this type of food was, in the most cases, returned only
45 for *Cronobacter* sp. and *Salmonella* sp. (Wrang *et al.*, 2009; Miled *et al.*, 2010; Sani *et al.*, 2012).

46 The initial objective of this study was to detect the presence and the antibiotic resistance profile of
47 *Salmonella* sp. and other Gram-negative bacteria, if any, in reconstituted IMF samples and utensils used in
48 their preparation or distribution from the nursery room of a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil.

49 Reconstituted IMF made for infants 0 to 6 months of age were collected in 50 ml sterile vials and
50 samples from utensils (jars, spoons, baby bottles, trays and rubber nipples) previously sanitized were
51 obtained by swabs. All samples were kept under refrigerated and immediately conducted at the laboratory.

52 For samples of reconstituted IMF, pre-enrichment, selective enrichment and plating were performed
53 as described by Normative Instruction 62 (Brazil, 2003). Twenty-five milliliters of the IMF were
54 homogenized with 225 mL buffered peptone water (1%, w/v) and incubated for 24h at 35°C. Selective
55 enrichment was done by transferring one milliliter of this culture to Rappaport-Vassiliadis, tetrathionate and
56 selenite cystine broths (Himedia) and incubated for 24h at 41°C. Broths were then streaked on Bismuth
57 sulfite (Himedia), XLD (Himedia) and Rambach (Merck) agar plates and incubated for 24h at 35°C.. EMB
58 agar (Himedia) was also included, aiming the isolation of other Gram-negative bacteria. Swabs collected

59 were incubated in 9 ml of 1% (w/v) buffered peptone water at 37°C for 18h before the selective enrichment
60 and plating procedures at the same agar media described.

61 Atypical and typical colonies suggestive of *Salmonella* sp. were selected and submitted to
62 conventional biochemical tests and slide agglutination with somatic polyvalent anti-*Salmonella* sera (Probac
63 do Brasil). The identification was confirmed by using the commercial panel Bactray® (Laborclin, São Paulo,
64 Brazil). *Salmonella enterica* ATCC 19214 was used as control.

65 Samples from spoons did not present colonies on the media used in this study. A total of forty-four
66 isolates were obtained from the other utensils analyzed. *Salmonella* sp. was not detected, however, different
67 Gram-negative species were identified. *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* was the most isolated specie
68 (17 isolates - 37.8%), followed by *Enterobacter cloacae* (12 isolates - 26.7%). Other species included *Hafnia*
69 *alvei*, *Escherichia vulneris*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis*.

70 These results were consistent with a study involving data from seven countries about
71 microorganisms isolated from IMF and utensils used in its preparation, which *A. baumannii-calcoaceticus*
72 and *E. cloacae* were the most found micro-organisms (Chap *et al.*, 2009).

73 *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (ABC) complex are found usually in water and soil.
74 However, these microorganisms can cause infections such as pneumonia, urinary tract, surgical wounds and
75 bloodstream infections (Blossom & Srinivasan, 2008; Barsoumian *et al.*, 2013).

76 This pathogen is gaining importance because the outbreaks reported and the infections caused in
77 neonates. These patients are, in general, vulnerable and the drug resistance presented by clinical isolates of
78 this organism constitutes a real threat (Zarrilli *et al.*, 2012).

79 Due to this fact, the 17 *Acinetobacter* isolates were submitted to antibiotic susceptibility testing by
80 disc diffusion, performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2013).
81 The following antibiotics (Sensifar, São Paulo, Brazil) were employed: amikacin (30 µg), amoxicilin-
82 clavulanic acid (20/10 µg), ampicillin (10 µg), aztreonam (30 µg), cephalotin (30µg); ceftazidime (30µg)
83 cefotaxime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloranphenicol (30 µg), streptomycin (10 µg), gentamicin (10 µg),
84 imipenem (10 µg), norfloxacin (10 µg), tetracycline (30 µg), tobramycin (10 µg) e trimethoprim (5 µg).

85 In addition, a selective chromogenic medium (MDR *Acinetobacter*, CHROMagar®) was also
86 employed to identify multi-drug resistant isolates by the growth in prominently red colonies, after overnight
87 incubation. Barsoumian and coworkers (2013) had also related that this chromogenic agar permits the rapid

88 detection of MDR *Acinetobacter* sp., though is unable to distinguish carbapenem-resistant from carbapenem-
89 susceptible strains.

90 All the 17 *Acinetobacter* isolates (100%) presented resistance to ampicillin (Table 1). Resistance to
91 aztreonam, cephalotin and cloramphenicol was observed in 15 (88.2%) isolates, while 14 isolates (82.3%)
92 were resistant to cefotaxime and trimethoprim, and 10 (58.8%) to amoxicilin-clavulanic acid. The other
93 tested antibiotics showed lower rates of resistance.

94 Fifteen isolates were resistant to antibiotics belonging to at least 3 different classes, which confer to
95 these bacteria, a multi-drug resistant (MDR) profile (Magiorakos *et al.*, 2012; Heizmann *et al.*, 2013).

96 One of the MDR isolates - JE4 - was also resistant to imipenem, an antibiotic from the carbapenems
97 class. Imipenem and meropenem are considered the most effective antibiotic for the treatment of infections
98 caused by this pathogen and, and when the resistance to this class of antibiotics occurs, the treatment options
99 become limited (Karageorgopoulos & Falagas, 2008; Josh and Litake, 2013).

100 Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* has emerged as a serious threat among ill neonates,
101 since the bacteremia in these cases has a very high mortality rate (Tharimontrichai *et al.*, 2014). The
102 increasing of the antimicrobial resistance is providing therapeutic challenges, especially considering that
103 most *A. baumannii* strains that are resistant to the carbapenems are also resistant to the many other antibiotics
104 (Fishbain & Peleg, 2010).

105 The selective chromogenic medium MDR *Acinetobacter* was also employed to confirm these
106 results. Amongst the 15 multi-drug resistant isolates detected in the disc diffusion assay, 14 (93.3 %) were
107 also identified as MDR by the growth in this medium (Table 1). One isolate, AE1, classified as non-MDR
108 was also able to grow, suggesting that this isolate is probably resistant to other antibiotic not tested in this
109 work.

110 The detection of MDR *Acinetobacter* isolates in this work demonstrates that inadequate hygiene of
111 the utensils could represent a significant risk on the transmission of this multidrug-resistant pathogen to the
112 neonates related to the consumption of IMF, reflecting poor infection control procedures. To solve this
113 problem, educational training emphasizing good manufacturing practices and food safety can be introduced
114 to the staff of the nurseries, aiming the identification and correction of the critical control points.

115

116

117

118 **ACKNOWLEDGMENTS**

119 This research was supported by grants from Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do
120 Rio de Janeiro (IFRJ) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

121

122 **REFERENCES**

- 123 Barsoumian, A., Calvano, T., Markelz, A. E., Cassidy, R., Murray, C. K., Beckius, M. L., Mende, K., and
124 Akers, K. S. 2013. Variations of CHROMagar Acinetobacter to detect imipenem-resistant
125 *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Scand. J. Infect. Dis.* 45(6): 446-452.
126 <http://dx.doi.org/10.3109/00365548.2013.759270>
- 127 Blossom, D. B. and Srinivasan, A. 2008. Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex: An
128 emerging nosocomial pathogen with few treatment options. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 16(1): 1-13.
129 <http://dx.doi.org/10.1097/ipc.0b013e3181635def>
- 130 Brasil. 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, n.12, de 2 de
131 janeiro de 2001. *Diário Oficial* – Federative Republic of Brazil.
- 132 Chap, J., Jackson, J., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park, Osaili, J. T., Shaker, R., Jaradat, Z.,
133 Hartantyo, S.H. P., Abdullah Sani, N., Estuningsih, S., and Forsythe, S.J. 2009. International survey of
134 *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int. J. Food*
135 *Microbiol* 136:185-188.
- 136 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance Standards for Antimicrobial
137 Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA.
- 138 Fishbain, J., and Peleg, A. Y. 2010. Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin. Infect. Dis.* 51 (1): 79-84.
- 139 Heizmann, W. R., Dupont, H., Montravers, P., Guirao, X., Eckmann, C., Bassetti, M., Garcia, M. S.,
140 Capparella, M. R., Simoneau, D., and Bodmann, K. F. 2013. Resistance mechanisms and
141 epidemiology of multiresistant pathogens in Europe and efficacy of tigecycline in observational
142 studies. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(2): 45-55.
- 143 Joshi, S. G., and Litake, G. M. 2013. *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogenic threat to public
144 health. *World J. Clin. Infect. Dis.* 25; 3(3): 25-36.
- 145 Karageorgopoulos, D. E., and Falagas, M. E. 2008. Current control and treatment of multidrug-resistant
146 *Acinetobacter baumannii* infections. *The Lancet Infect. Dis.* 8 (12): 751-762.
147 [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70279-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70279-2)

148 Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S.,
149 Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens,
150 M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., and Monnet, D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-
151 resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard
152 definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 268–281.

153 Mammina, C., Di Carlo, P., Cipolla, D., Giuffrè, M., Casuccio, A., Di Gaetano, V., Plano, M. R., D'angelo,
154 E., Titone, and L., Corsello, G. 2007. Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a
155 neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. *Am. J. Infect. Control* 35: 222–230.
156 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2006.04.210>

157 Manchanda, V., Sanchaita, S., and Singh, N. P. 2010. Multidrug Resistant *Acinetobacter*. *J. Glob. Infect. Dis.*
158 2(3): 291–304. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-777X.68538>

159 Mardaneh, J., and Dallal, M. M. S. 2013. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea*
160 (*Enterobacter*) *agglomerans* isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU
161 ward: First report from Iran. *Iran. J. Microbiol.* 5(3): 263–267.

162 Miled, R. B., Neves, S., Baudouin, N., Lombard, B., Deperrois, V., Colin, P., and Besse, N. G. 2010. Impact
163 of pooling powdered infant formula samples on bacterial evolution and *Cronobacter* detection. *Int. J.*
164 *Food Microbiol.* 138: 250-259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.014>

165 Sani, N. A., Hartantyo, S. H. P., and Forsythe, S. J. 2012. Microbiological assessment and evaluation of
166 rehydration instructions on powdered infant formulas, follow-up formulas, and infant foods in
167 Malaysia. *J. Dairy Sci.* 96(1): 1-8. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5409>

168 Thatrimontrichai, A., Apisarnthanarak, A., Chanvitan, P., Janjindamai, W., Dissaneevate, S., and Maneenil,
169 G. 2013. Risk factors and outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in
170 neonatal intensive care unit: A case-case-control study. *Ped. Infect. Dis. J.* 32(2): 140-145.

171 Wrang, M., Cao, B., Gao, Q., Sun, Y., Liu, P., Feng, L., and Wang, L. 2009. Detection of *Enterobacter*
172 *sakazakii* and other pathogens associated with infant formula powder by use of a DNA microarray. *J.*
173 *Clin. Microbiol.* 47(10):3178-3184.

174 Zarrilli, R., Di Popolo, A., Bagattini, M., Giannouli, M., Martino, D., Barchitta, M., Quattrocchi, A., Iula, V.
175 D., Luca, C., Scarcella, A., Triassi, M., Agodi, A. 2012. Clonal spread and patient risk factors for
176 acquisition of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit in
177 Italy. *J. Hosp. Infect.* 82(4): 260-265.

178

179 **Table 1:** Source and antimicrobial resistance profile of the *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex

180 isolates studied in this work.

Source	Isolates	Resistance profile	Growth on MDR <i>Acinetobacter</i> agar (CHROMagar®) ²
Jars	JE2	Amc, Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Tri	+
	JE3	Amc, Ami, Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Tri	+
	JE4	Amc, Amp, Ctx, Cfl, Clo, Imp, Tri	+
	JE5	Amc, Ami, Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Gen, Tri	+
	JE6	Ami, Amp, Atm, Cfl, Cip, Clo, Ctx, Gen, Tet, Tri	+
	JE8	Amc, Amp, Atm, Cfl, Cip, Clo, Ctx, Gen, Tob, Tri	+
	JR1	Amp, Cfl, Clo, Ctx, Gen, Tri	+
	JR2	Amc, Amp, Atm, Cfl, Cip, Clo, Ctx, Gen, Tob, Tri	+
	JR3	Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Tob, Tri	+
	JR4	Amc, Ami, Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Gen, Tri	+
	JR5	Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Tri	+
	JR6	Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Tri	+
Baby bottles	MR1	Amc, Ami, Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Tri	+
	ME2	Amc, Amp, Atm, Cfl, Clo, Ctx, Tri	+
IMF 1	AE1 ¹	Amp, Atm	+
IMF 2	PR1 ¹	Amp, Atm	-
	PR2	Amc, Amp, Atm, Cfl, Clo, Tet	-

181 AMI, amikacin; AMC, amoxicilin-clavulanic acid; AMP, ampicillin, ATM, aztreonam; CFL, cephalotin;

182 CTX, cefotaxime; CIP, ciprofloxacin; CLO, cloramphenicol; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; TET,

183 tetracycline; TOB, tobramycin; TRI, trimethoprim

184 ¹ non-MDR isolate

185 ² +, growth on selective agar; -, absence of growth

186 All the experiments were repeated at least twice.

ANEXO 3

Apresentação de resumo no XII Congresso Brasileiro de Microbiologia e Higiene de Alimentos, de 12 a 15 de outubro de 2014, em Foz do Iguaçu, PR.

XII Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos | IV IAFP Latin America
13º Simpósio Internacional ABRAPA de Segurança de Alimentos | Symposium of the International Commission on Food Mycology

MICRONL 2014
12 - 15 DE OUTUBRO
FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ / BRASIL

Certificada

We certify that the paper entitled SOBREVIVÊNCIA DE SALMONELLA ENTERICA EM FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E AQUECIMENTO. of the author MARCELO SOARES DE MORAES, BRENDON CHAVES ARAUJO, LEONARDO EMANUEL DE OLIVEIRA COSTA, JANAINA DOS SANTOS NASCIMENTO was presented as a poster during the MICRONL at Raitan Palace Hotel & Convention Center, 12th - 15th October 2014, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.

Marta H. Tanikawa
Profª Dra. Marta Hiroshi Tanikawa
Coordenadora do MICRONL

Mariza Landgraf
Profª Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do MICRONL

Organização:
ABRAPA Associação Brasileira de Microbiologia e Higiene de Alimentos
International Commission on Food Mycology
ICFM International Commission on Food Mycology

Apoio:
FAPESP
CNPq
SBM Sociedade Brasileira de Microbiologia

ANEXO 4

Cartilha

Prevenção da Contaminação bacteriana no lactário

Cadastro da cartilha no ISBN:

ISBN

978-85-918444-0-1

Título

Prevenção da contaminação bacteriana no lactário

Edição

1

Ano Edição

2015

Tipo de Suporte

PAPEL

Páginas

16

Editor(a)

Janaína dos Santos Nascimento

Participações

Janaína Nascimento (AUTOR)
Brendon Chaves Araújo (AUTOR)
Marcelo Soares de Moraes (AUTOR)

ANEXO 5

Trabalho apresentado no III Seminário em Inovação e Tecnologia na Área de Alimentos do IFRJ, ocorrido em 23 de outubro de 2014, no *Campus Maracanã* do IFRJ.

CRESCIMENTO DE *SALMONELLA ENTERICA* SOROTIPO TYPHI EM FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS RECONSTITUÍDAS SUBMETIDAS À AQUECIMENTO E REFRIGERAÇÃO.

MORAES, M. S., ARAÚJO, B. C., COSTA, L. E. O., NASCIMENTO, J. S.

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Rio de Janeiro, Laboratório de Microbiologia. e-mail: janaina.nascimento@ifrj.edu.br

Salmonella enterica é um dos patógenos mais preocupantes associados às fórmulas lácteas infantis (FLI). Neste trabalho, avaliou-se a capacidade de crescimento de uma estirpe de *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi em FLI sob diferentes condições de aquecimento e armazenamento. Duas FLI reconstituídas (F1 e F2) foram contaminadas com a estirpe alvo até a concentração de $8,0 \times 10^4$ ufc/ml e incubadas sob temperatura ambiente e de refrigeração (4°C). À temperatura ambiente, em ambas as FLI, houve um aumento de 3,3 log na população de *S. enterica* logo nas primeiras 24 h e, após 72 h, o aumento foi superior a 4,5 log. A 4°C, após 48 h de incubação, detectou-se crescimento populacional inferior a 1 log, porém, após 72 h, houve um aumento superior a 4,5 log. Para avaliar a sobrevivência de *S. enterica* após o aquecimento, as FLI foram inoculadas com *S. enterica* até 10^6 ufc/ml. O aquecimento em banho-maria a 60°C por 5 min ocasionou a redução de cerca de 1 log ufc/ml em ambas as fórmulas e por 10 min houve redução de 2,3 e 2,8 log ufc/ml em F1 e F2, respectivamente. Já o aquecimento a 70°C por 5 min, resultou em redução de 3 log ufc/ml em ambas as fórmulas enquanto que por 10 min, a redução foi de 3,7 e 4,0 log ufc/ml para F1 e F2, respectivamente. O aquecimento em forno de micro-ondas foi a forma mais eficiente de redução da população de *Salmonella*, uma vez que não foi detectada contagem celular após o aquecimento por 30 s. Os resultados sugerem que FLI contaminadas durante o preparo, se mantidas à temperatura ambiente, podem apresentar crescimento bacteriano elevado já nas primeiras 24 h e que mesmo a refrigeração e algumas formas de aquecimento podem não ser suficientes para inibição completa de *S. enterica*.

Palavras-chave: *Salmonella enterica*, fórmulas lácteas infantis, aquecimento, refrigeração.