

PESQUISA DE *ENTEROBACTER SAKAZAKII* EM LEITE PASTEURIZADO E QUEIJO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS EM JUIZ DE FORA, MG**Search for *Enterobacter sakazakii* in pasteurized milk and Minas frescal cheese sold in Juiz de Fora, MG, Brazil**Edna Froeder Arcuri^{1*}Wannessa Martins Gomes²José Renaldi Feitosa Brito¹Carla Christine Lange¹Emília Maricato Pedro dos Santos³**RESUMO**

Enterobacter sakazakii é considerado um patógeno emergente de origem alimentar que pode causar infecções sistêmicas severas especialmente em recém-nascidos. Este microrganismo já foi isolado de vários alimentos, mas os surtos de infecção foram, em geral, associados a formulas lácteas infantis. Neste estudo foram analisadas 45 amostras de leite pasteurizado tipo C pertencentes a nove marcas (5 amostras por marca) no inverno de 2005 e 125 amostras de queijo Minas frescal pertencentes a 19 marcas, no inverno de 2005 e verão de 2006. A presença de *E. sakazakii* foi verificada através do método: enriquecimento em Caldo EC contendo novobiocina; isolamento em agar VRB, seguido de avaliação das colônias suspeitas em agar EC-MUG e agar TSA e identificação dos isolados bacterianos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados primers descritos na literatura, específicos para amplificação de um fragmento de 929 pares de bases do gene 16S rRNA. Em todas as reações, as estirpes *E. sakazakii* CDC 7006 e *E. sakazakii* CDC 7008 foram utilizadas como controle positivo e *E. cloacae* CDC 3430 como controle negativo. Verificou-se a presença de *E. sakazakii* em duas (22,22%) das nove marcas de leite pasteurizado tipo C e em seis (31,58%) das 19 marcas de queijo Minas frescal comercializadas em Juiz de Fora, MG.

Palavras-chave: PCR, patógeno emergente, patógeno oportunista.

1 INTRODUÇÃO

Enterobacter sakazakii é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Até 1980 era conhecido como "*Enterobacter cloacae* produtor de pigmento amarelo", quando foi reconhecido como uma espécie distinta do gênero *Enterobacter* baseado na hibridização de DNA-DNA, em características bioquímicas, produção de colônias amarelas e susceptibilidade a antibióticos, que o diferenciam do *E. cloacae* (Izard *et al.*, 1983; Nazarowec-White & Farber, 1997).

Este microrganismo é reconhecido como um patógeno emergente de origem alimentar e já foi relacionado a diversos surtos e casos esporádicos de doenças. Em 1961 foi publicado o primeiro relato de meningite em dois recém-nascidos, causada por uma variante de *Enterobacter cloacae* formadora de colônias de coloração amarela (Urmenyi & Franklin, 1961). Desde então, casos de meningite, septicemia e enterocolite, causados por *E. sakazakii*, têm sido registrados em vários países. A maioria dos casos documentados envolve bebês incluindo prematuros, nascidos a termo com até 6 semanas de idade, imunocomprometidos ou os que

1 Pesquisador(a) da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

1* E-mail: edna@cnpqi.embrapa.br.

2 Estagiária Embrapa Gado de Leite, graduanda do Curso de Ciências Biológicas – CES/JF.

3 Professora da Universidade Presidente Antônio Carlos – Campus VI – Juiz de Fora, MG.

SP 3912
P. 136

SP 3912
P. 136

necessitam de cuidados especiais (UTI neonatal). De modo geral, a taxa de casos fatais varia consideravelmente, sendo registrado, em alguns casos, até 80% de mortalidade. Casos de infecção em adultos têm também sido documentados (Hawkins *et al.*, 1991; Gurtler *et al.*, 2005).

O ICMSF – International Commission for Microbiological Specifications for Foods, citado por Iversen *et al.* (2006), classifica *E. sakazakii* como “Perigo severo para populações restritas, risco à vida ou causa de seqüelas crônicas ou de longa duração”.

Apesar de vários estudos, o reservatório e modo de transmissão de *E. sakazakii* não são claramente conhecidos. Porém, relatos mostram que fórmulas lácteas em pó, tanto em latas fechadas como no leite reconstituído, foram a causa de infecções para os bebês em vários surtos (Biering *et al.*, 1989; Simmons *et al.*, 1989; van Acker *et al.*, 2001). Ainda que o número de *E. sakazakii* seja pequeno na fórmula recém-preparada, a manutenção em temperatura ambiente, em aquecedores ou refrigeradores por tempo prolongado, pode propiciar o crescimento bacteriano (Biering *et al.*, 1989).

No Brasil há apenas um relato de caso de meningite causada por *E. sakazakii*, envolvendo um recém-nascido de 14 dias, que evoluiu a óbito no 15º dia de internação (Barreira *et al.*, 2003). Neste estudo não foi investigada a fonte de contaminação.

Exceto para fórmulas lácteas infantis, a presença de *E. sakazakii* tem sido pouco investigada em outros alimentos, (Friedemann, 2007). São escassas as informações sobre a sua ocorrência em produtos lácteos no Brasil.

Gillio *et al.* (2005) avaliaram 80 amostras de fórmulas lácteas infantis desidratadas comercializadas na cidade de São Paulo, e encontraram, para todas as amostras examinadas, população de *E. sakazakii* <0,0003 NMP/g e de *Enterobacteriaceae* <5 UFC/g.

Este estudo objetivou avaliar a ocorrência de *E. sakazakii* em leite pasteurizado e queijo Minas frescal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras – Amostras de leite pasteurizado e queijo Minas frescal foram adquiridas em padarias e supermercados (escolhidas ao acaso), num total de cinco amostras por marca do produto durante o inverno de 2005 e verão de 2006. Estas amostras foram mantidas a 4°C até o momento de análise no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG.

2.2 Isolamento bacteriano – 25 ml de leite ou 25 g de queijo foram adicionados a 225 ml de caldo de enriquecimento (Caldo EC, Difco, com 20 µg de novobiocina/mL = 20 mg/L). Após homogeneização, os frascos foram incubados a 35°C durante 24 horas. A seguir, uma alíquota do caldo de enriquecimento foi espalhada na superfície de agar VRB (Difco) e após incubação a 35°C/24h foram selecionadas cinco colônias por placa. Essas colônias foram transferidas para agar EC-MUG e agar TSA (Tryptic soy agar, Difco). Após incubação, as colônias que apresentaram fluorescência em agar EC-MUG e coloração amarelo/amarelo claro em agar TSA foram analisadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) específica para *E. sakazakii*.

2.3 PCR – Foram utilizados os primers citados por Lehner *et al.* (2004), descritos na Tabela 1. Para avaliar a especificidade dos primers e definir as condições ótimas da reação foram utilizadas as estirpes padrão *Enterobacter sakazakii* CDC 7006 e *E. sakazakii* CDC 7008. Como controles negativos usou-se *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterobacter cloacae* CDC 3430, *Salmonella* Typhimurium IAL 1472, *Shigella sonnei* IAL 1585, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117.

Tabela 1 - Primers usados neste estudo.

Gene	Primer	Seqüência (5' – 3')	Localização no gene	Produto (pb)	Tm
16 S rRNA	Esakf	GCT YTG CTG ACG AGT GGC GG	88 - 107	929	64,5°C
	Esakr	ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG	1017 - 998		57,3°C

A extração de DNA bacteriano foi realizada após cultivo em caldo BHI (Difco) com incubação a 35°C por 18 horas, utilizando-se o reagente PrepMan™ Ultra da Applied Biosystems (Foster City, Calif., USA), conforme descrito pelo fabricante (PrepMan™ Ultra Protocol – Sample Preparation reagents 2001, Applied Biosystems), ou por lise térmica, segundo Hu *et al.* (1999).

No estabelecimento das condições da reação foram testadas diferentes temperaturas de anelamento, número de ciclos, concentrações de $MgCl_2$ e concentrações dos primers. As amplificações foram feitas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corados com solução de brometo de etídio (0,005 %, p/v) e fotografados em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi feita a otimização das condições da PCR para identificação de *E. sakazakii*, testando diferentes temperaturas de anelamento, número de ciclos, concentrações de $MgCl_2$, concentrações dos primers e de DNA das estirpes padrão. Amplificações específicas e reproduzíveis foram obtidas em um volume de 50 μ l contendo 1X PCR buffer, 1 mM de cada dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2,0 U de enzima AmpliTaq DNA polimerase, 20 pmol de cada primer, 100 ng de DNA bacteriano e água bi-distilada completando o volume de 50 μ l, em termociclador programado para um ciclo inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 10 ciclos - Touch-Down (70°C/1min - diminuindo 1°C/ciclo) e 20 ciclos (desnaturação a 94°C/30seg. - anelamento a 60°C/1 min. - extensão a 72°C/1:30min.), com o término da reação a 72°C/10 minutos.

Foram analisadas 45 amostras de leite pasteurizado tipo C pertencentes a nove marcas e 125 amostras de queijo Minas frescal pertencentes a 19 marcas. De 85 isolados bacterianos que apresentaram fluorescência no meio EC-MUG e pigmentação amarela em TSA, 17 foram confirmados como *E. sakazakii* por PCR do gene 16S rRNA. Estes resultados indicaram a presença de *E. sakazakii* em duas (22,22%) das nove marcas de leite pasteurizado tipo C e em seis (31,58%) das 19 marcas de queijo Minas frescal analisadas.

E. sakazakii não sobrevive à pasteurização (Breeuwer et al., 2003; Iversen et al., 2004), portanto a contaminação verificada neste estudo indica que houve falha na pasteurização ou contaminação pós-pasteurização.

E. sakazakii tem sido considerado um contaminante ambiental. Para leite em pó a contaminação ocorre geralmente a partir do ambiente nos estágios de pós-pasteurização durante secagem ou envase (Mullane et al., 2006; Proudly et al., 2008).

Lehner et al. (2005) verificaram que *E. sakazakii* pode formar biofilme, aderir a superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, produzir polissacarídeos extracelulares e moléculas sinalizadoras célula-célula. Estas características podem torná-lo persistente no ambiente industrial e protegê-lo da falta de nutrientes, da ação de luz UV, calor, detergentes, ácidos e bacteriófagos. Assim, medidas devem ser adotadas para evitar sua presença no ambiente industrial, equipamentos, ingredientes e, portanto, no produto final.

4 CONCLUSÃO

O método de PCR utilizado permitiu a identificação rápida de *E. sakazakii* dentre os isolados bacterianos.

Os resultados mostraram a ocorrência de *E. sakazakii* em leite pasteurizado e queijo Minas frescal e enfatizam a necessidade de mais estudos sobre a presença/prevalência deste microrganismo em produtos lácteos, fontes de contaminação, determinação de fatores que influenciam o seu crescimento e sobrevivência, características de resistência a sanitizantes, fatores de virulência e patogenicidade, dentre outros.

ABSTRACT

Enterobacter sakazakii is considered an emerging food-borne pathogen that may cause severe systemic infection in neonates. This bacterium has been found in several types of foods but outbreaks of infection were associated primarily with infant formula. In this study we analyzed 45 samples of pasteurized milk from nine brands (five sample/brand) during the winter of 2005, and 125 samples of Minas frescal cheese from 19 brands in the winter of 2005 and the summer of 2006. The presence of *E. sakazakii* was verified by the method: enrichment in EC broth (with 20 μ g of novobiocin/ml), isolation on VRE agar, evaluation of the colonies on EC-MUG agar and TSA agar, and identification of the bacterial isolates by the Polymerase chain reaction (PCR). The primers used were from the literature and they amplify a fragment of 529 bp from the 16S rRNA gene. In all PCR reactions, the strains *E. sakazakii* CDC 7006 and *E. sakazakii* CDC 7008 were used as positive control and *E. cloacae* CDC 3430 as negative control. We found *E. sakazakii* in two (22.22%) of the nine pasteurized milk brands and in six (31.58 %) of the nineteen Minas frescal cheese brands sold in Juiz de Fora, MG.

Key words: PCR, emerging food-borne pathogen, opportunistic pathogen

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARREIRA, E.R.; SOUZA, D.C.; GÓIS, P.F.; FERNANDES, J.C. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. *Pediatria*, v. 25, p. 65-70, 2003.
- BREEUWER, A.; LARDEAU, A.; PETERZ, M.; JOOSTEN, H.M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 95, p. 967-973, 2003.
- BIERING, G.; KARLSSON, S.; CLARK, N. C.; JONDOTTIR, K. E.; LUDVIGSSON, P.; STEINGRIMSSON, O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p. 2054-2056, 1989.
- FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int. J. Food Microbiol.*, v. 116, p. 1-10, 2007.
- GILLIO, C.M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. *Enterobacter sakazakii* em fórmulas lácteas infantis desidratadas, para bebês de 0 a 6 meses. *Anais. XXIII Cong. Bras. Microbiol.* Santos/SP. SBM. CD. 2005.
- GURTLE, J. B.; KORNACKI, J. L.; BEUCHAT, L. R. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Internat. J. Food Microbiol.*, v. 104: 1-34, 2005.
- HAWKINS, R.E.; LISSNER, C.R.; SANFORD, J.P. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South Med J.*, v. 84, p. 793-795, 1991.
- HU, Y.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J.C. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.*, v. 87, p. 867-876, 1999.
- IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters Appl. Microbiol.*, v. 38, p. 378-382, 2004.
- IVERSEN, C.; LACASHIRE, L.; WADDINGTON, M.; FORSYTHE, S.; BALL, G. Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: the use of Artificial Neural networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. *JBMC Microbiol.*, v. 6, 2006.
- IZARD, D.; RICHARD, C.; LECLERC, H. DNA relatedness between *Enterobacter sakazakii* and other members of the genus *Enterobacter*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, v. 134 A, p. 241-245, 1983.
- LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPHAN, R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.*, 2004. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/4/43>
- LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *J. Food Protec.*, v. 68, p. 2287-2294, 2005.
- MULLANE, N.R.; DRUDY, D.; WHYTE, P.; O'MAHONY, M.; SCANNELL, A.G.M.; WALL, P.G.; FANNING, S. *Enterobacter sakazakii*: biological properties and significance in dried infant milk formula (IMF) powder. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 59, p. 102-111, 2006.
- NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J. M. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 34, p. 103-113, 1997.
- PROUDY, I.; BOUGLÉ, D.; LECLERCQ, R.; VERGNAUD, M. Tracing of *Enterobacter sakazakii* isolates in infant milk formula processing by BOX-PCR genotyping. *J. Appl. Microbiol.*, 2008. <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.2008.03775.x>.
- PrepMan™Ultra Sample Preparation Reagent Protocol. Applied Biosystems, 2001. <http://www.appliedbiosystems.com>
- SIMMONS, B.P.; GELFAND, M.S.; HAAS, M.; METTS, L.; FERGUSON, J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 10, p. 398-401, 1989.
- URMENYI, A.M.C.; FRANKLIN, A.W. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet*, v. 1, p. 313-315, 1961.
- Van ACKER, J.; DE SMET, F.; MUYLDERMANS, G.; BOUGATEF, A.; NAESSENS, A.; LAUWERS, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 293-97, 2001.

Anais do
**25º Congresso Nacional
de Laticínios**

36ª Expomaq
*Exposição de Máquinas, Equipamentos, Embalagens
e Insumos para a Indústria Laticínista*

**35º Concurso Nacional
de Produtos Lácteos**

35ª Expolac
Exposição de Produtos Lácteos

14 a 17 de julho de 2008

Expominas - Instituto de Laticínios Cândido Tostes
Juiz de Fora - Minas Gerais



ISBN 978-85-99764-11-4