



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

*Enterobacter sakazakii* EM FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS EM PÓ:  
IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETECÇÃO E  
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS COMERCIALIZADAS  
NO DISTRITO DE LISBOA

RICARDO MANUEL ABREU DE ASSUNÇÃO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela  
Doutor António Salvador Ferreira Henriques  
Barreto  
Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira  
Eng<sup>a</sup>. Cristina Maria da Fonseca Henriques  
Oliveira Belo Correia

ORIENTADORA

Eng<sup>a</sup>. Cristina Maria da Fonseca Henriques  
Oliveira Belo Correia

CO-ORIENTADORA

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

2008

LISBOA





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

*Enterobacter sakazakii* EM FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTIS EM PÓ:  
IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETECÇÃO E  
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS COMERCIALIZADAS  
NO DISTRITO DE LISBOA

RICARDO MANUEL ABREU DE ASSUNÇÃO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Doutor António Salvador Ferreira Henriques

Barreto

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

Eng<sup>a</sup>. Cristina Maria da Fonseca Henriques

Oliveira Belo Correia

ORIENTADORA

Eng<sup>a</sup>. Cristina Maria da Fonseca Henriques

Oliveira Belo Correia

CO-ORIENTADORA

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

2008

LISBOA

A todos quantos passaram na minha vida e me deixaram  
tanto de si...

À minha família materna, por me permitirem ser a pessoa  
que sou hoje, em especial, ao avô Zé e avó Alice



*“Cada um que passa na nossa vida passa sozinho... Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa na nossa vida passa sozinho, mas não vai só... Levam um pouco de nós mesmos e deixam-nos um pouco de si mesmos. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada. Esta é a mais bela realidade da vida... A prova tremenda de que cada um é importante e que ninguém se aproxima do outro por acaso...”*

Antoine de Saint-Exupéry

Este pensamento de Saint-Exupéry espelha bem o que sinto, que todas as pessoas que foram passando na minha vida, me deixaram sempre algo, que construiu a pessoa que sou hoje. A todos, a minha sincera e profunda gratidão. Neste momento especial quero expressar o meu reconhecido agradecimento:

À Professora Doutora Marília Ferreira, por todo o apoio, incentivo e amizade manifestados desde o primeiro momento, por me ter encaminhado e por ter aceite co-orientar a realização desta dissertação;

À Engenheira Cristina Correia, pela amizade sincera, pela sempre carinhosa compreensão, pelos sábios ensinamentos, pelo estímulo e pela orientação desta dissertação;

À Dra. Rosália Furtado, pela inesgotável amizade, pelo apoio técnico, e sempre disponível ajuda;

A todos os elementos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Dra. Rosário Novais, Dra. Isabel Santos, Loreto Campos, Isilda Ferreira, Nuno Rosa, D. Madalena, Helena, Eng. José Amorim, Eng. Carla Maia pelo acolhimento, por todo o carinho, amizade, simpatia e por terem contribuído para a minha formação enquanto pessoa e profissional;

A toda a minha família, porque sem cada um de vós a minha existência seria neutra, sem sabor, por serem responsáveis por tudo o que conquistei até hoje e por toda a sabedoria que me passam a cada dia. Um agradecimento especial à Dra. Maria João Bação, Médica Veterinária fantástica, pelo apoio de há anos, pelos raspanetes também, mas acima de tudo por seres minha “prima-irmã”;

A todos os meus amigos, que são grande parte do que sou! A todos aqueles amigos que comigo partilharam momentos, sonhos e desabafos, a todos aqueles amigos que me ajudaram e ajudam a enfrentar as adversidades e a todos aqueles amigos que me dão a mão e seguimos a viagem;

A todos quantos colaboraram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A todos vós, com a certeza de que “me deixam tanto”, muito, muito obrigado!!!



## Resumo

### ***Enterobacter sakazakii* em fórmulas lácteas infantis em pó: implementação da metodologia de detecção e avaliação microbiológica de amostras comercializadas no distrito de Lisboa**

*Enterobacter sakazakii* é um bacilo Gram negativo móvel, pertencente à família *Enterobacteriaceae*; considerado um microrganismo emergente, tem sido recentemente classificado como um perigo severo para populações restritas, podendo causar a morte, sequelas crónicas graves ou estados mórbidos de longa duração. A população de risco é essencialmente o grupo das crianças com idade inferior a 1 ano, apresentando os imunocomprometidos e os recém-nascidos com baixo peso à nascença um risco agravado, cuja taxa de mortalidade apresenta valores compreendidos entre 20 e 80%. As fórmulas infantis em pó têm sido identificadas como o veículo deste agente em algumas situações em que este microrganismo tem sido implicado. Assim, o presente trabalho teve como objectivos a implementação da metodologia de pesquisa do *E. sakazakii* em fórmulas lácteas em pó, de acordo com a norma ISO/TS 22964:2006, bem como a comparação da eficiência dos meios cromogénicos ESIA, DFI e ChromoCult, na detecção do *E. sakazakii*, e avaliar, quer a ocorrência de *E. sakazakii*, quer a qualidade microbiológica, em algumas amostras comercializadas no distrito de Lisboa. Foram analisadas 15 amostras desidratadas, verificando-se que a técnica de detecção apresentou melhores percentagens de recuperação quando foram utilizados os meios DFI e ChromoCult, em comparação com o meio ESIA; não foi detectado *E. sakazakii* em nenhuma das amostras analisadas. A avaliação da qualidade microbiológica confirma a ideia de que as fórmulas lácteas infantis em pó não são produtos estéreis, dado que todas as amostras apresentaram contagem de microrganismos aeróbios a 30 °C superiores a  $1.0 \times 10^1$  ufc/g, com excepção de 5 amostras que, no entanto, evidenciaram também a presença de outros microrganismos. Apenas 13% das amostras apresentaram contagens de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, mas somente quando utilizada a contagem pela técnica do NMP, o que revela níveis de contaminação reduzidos. O único microrganismo patogénico encontrado foi *Bacillus cereus*, em 40% das amostras, com uma contagem inferior a  $1.0 \times 10^2$  ufc/g, sendo que, dos 6 isolados de *B. cereus*, apenas uma estirpe se revelou produtora de toxina diarreica. Assim, pode concluir-se que, se não forem tomadas as medidas preventivas correctas, a ocorrência de contaminação pode resultar em graves consequências, principalmente para os grupos de risco referidos.

**Palavras chave:** *Enterobacter sakazakii*, fórmula infantil em pó, detecção, avaliação microbiológica, prevenção.



## Abstract

### ***Enterobacter sakazakii* on milk powder formula for children: implementation of the detection method and microbiologic evaluation of samples trade in Lisbon district**

*Enterobacter sakazakii* is a mobile Gram negative rod, from the *Enterobacteriaceae* family; an emerging microorganism, recently classified as a serious danger to restricted populations, able to cause death, chronic sequels or prolonged morbid states. The risk population is mainly the group of children with less than 1 year of age, presenting an increased risk those with immune system deficiencies or newborns with under-weight, whose mortality rates stands between 20 and 80%. In some cases, in which this microorganism has been implicated, powder milk formulas seem to be the vehicle. The main goals of this work are the implementation of a research method for *E. sakazakii* in powder milk formulas, according to the standard ISO/TS 22964:2006, and the comparison of the efficiency of the chromogenic medium ESIA, DFI and ChromoCult, for its detection, as well the evaluation of the occurrence of *E. sakazakii* and the microbiologic quality of the children milk powder formulas samples available on the market in Lisbon district, through hygiene markers and identification of pathogenic elements. Fifteen dehydrated samples have been analysed, being the DFI and ChromoCult the medium which gave the most reliable results, compared with the ESIA medium. *E. sakazakii* has not been identified on any of the samples. The evaluation of the microbiologic quality reinforces the idea that children milk powder formulas are not sterile products, since all the samples presented aerobic microorganisms counts above  $1.0 \times 10^1$  cfu/g, at 30 °C, with the exception of five of them, in wich was demonstrated and proven the presence of other microorganisms when searching pathogenic elements; only 13% of the samples presented bacteria from the *Enterobacteriaceae* family, using the MPN technique, revealing reduced count levels. The only pathogen detected, in 40% of the samples, was *Bacillus cereus*, with a count less than  $1.0 \times 10^2$  cfu/g, with only one of the isolates presenting the ability to produce diarrheagenic toxin. In conclusion, if the appropriated preventive measures are not taken, serious consequences may be produced, especially at the risks groups.

**Key words:** *Enterobacter sakazakii*, powdered infant formula, detection, microbiologic evaluation, prevention.



## Índice

Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Breve Descrição das Actividades Desenvolvidas no Período do Estágio Curricular .....	xvii
I. Revisão Bibliográfica .....	1
1. Introdução.....	1
2. Caracterização do <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	4
2.1. Taxonomia e caracterização bioquímica do <i>E. sakazakii</i> .....	4
2.2. Isolamento, identificação e tipificação do <i>E. sakazakii</i> .....	6
2.3. Apresentação clínica e patogenicidade associadas a infecções por <i>E. sakazakii</i> ..	10
2.4. Surtos e casos de infecções por <i>E. sakazakii</i> .....	14
2.5. Fontes de Contaminação.....	19
3. <i>Enterobacter sakazakii</i> e as fórmulas lácteas infantis em pó .....	22
3.1. Inactivação do <i>E. sakazakii</i> presente em fórmulas infantis em pó.....	22
3.2. Reconstituição, armazenamento e utilização das fórmulas infantis em pó.....	25
3.3. Presença e comportamento do <i>E. sakazakii</i> e de outros microrganismos nas fórmulas infantis .....	28
3.3.1. Microrganismos indicadores nas fórmulas infantis em pó .....	29
3.3.1.1. Microrganismos aeróbios mesófilos .....	29
3.3.1.2. Bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	29
3.3.1.3. <i>Escherichia coli</i> .....	30
3.3.2. Microrganismos patogénicos nas fórmulas infantis em pó .....	30
3.3.2.1. <i>Salmonella</i> spp. ....	30
3.3.2.2. <i>Bacillus cereus</i> .....	32
3.3.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
3.3.2.4. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	35
3.4. Processamento industrial das fórmulas infantis em pó .....	35
3.5. Análise de perigos e controlo dos pontos críticos e análise de risco.....	37
3.6. Critérios Microbiológicos aplicáveis às fórmulas infantis em pó .....	39
II. Objectivos .....	45

III.	Material e métodos .....	47
1.	Material.....	47
1.1.	Estirpes bacterianas .....	47
1.2.	Fórmulas Infantis .....	47
1.3.	Meios de cultura utilizados.....	47
1.3.1.	Implementação da técnica de pesquisa de <i>Enterobacter sakazakii</i> e pesquisa de <i>E. sakazakii</i> .....	47
1.3.2.	Contagem de microrganismos aeróbios a 30 °C .....	48
1.3.3.	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em placa .....	48
1.3.4.	Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> pelo Número Mais Provável (NMP) .....	48
1.3.5.	Contagem de <i>Escherichia coli</i> .....	48
1.3.6.	Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> a 37° C .....	48
1.3.7.	Contagem de bactérias sulfito-redutoras crescidas em condições de anaerobiose .....	49
1.3.8.	Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	49
1.3.9.	Contagem e pesquisa de <i>Bacillus cereus</i> .....	49
1.3.10.	Contagem e pesquisa de Estafilococos coagulase positiva .....	49
1.3.11.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	50
1.3.12.	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	50
1.3.13.	Pesquisa de toxina diarreica do <i>Bacillus cereus</i> .....	50
1.4.	Reagentes e kits para caracterização bioquímica .....	50
2.	Métodos.....	51
2.1.	Colheita de Amostras.....	51
2.2.	Diluição das Amostras .....	51
2.3.	Implementação da técnica ISO e comparação dos meios ESIA, DFI e ChromoCult.....	51
2.3.1.	Determinação das diluições a utilizar nos ensaios de contaminação artificial .....	52
2.3.2.	Avaliação do desempenho dos diferentes meios de cultura cromogénicos para a detecção de <i>E. sakazakii</i> seguindo a metodologia ISO/TS 22964:2006 .....	52
2.4.	Pesquisa de <i>Enterobacter sakazakii</i> em fórmulas infantis para lactentes, fórmulas de transição e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes.....	54
2.5.	Avaliação microbiológica das condições higiénicas e de agentes patogénicos em amostras de fórmulas infantis para lactentes, fórmulas de transição e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes.....	55

2.5.1. Contagem de Microrganismos a 30 °C .....	56
2.5.2. Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	56
2.5.3. Contagem de <i>Escherichia coli</i> .....	56
2.5.4. Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> a 37 °C .....	56
2.5.5. Contagem de bactérias sulfito-redutoras crescidas em condições de anaerobiose 57	
2.5.6. Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	57
2.5.7. Contagem e pesquisa de <i>Bacillus cereus</i> .....	57
2.5.8. Contagem e pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva .....	57
2.5.9. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. e de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	58
2.5.10. Pesquisa de toxina diarreica do <i>Bacillus cereus</i> .....	58
IV. Resultados e Discussão .....	61
1. Determinação das diluições a utilizar nos ensaios de contaminação artificial .....	61
2. Avaliação do desempenho dos diferentes meios de cultura cromogénicos para a detecção de <i>E. sakazakii</i> .....	61
3. Pesquisa de <i>Enterobacter sakazakii</i> em fórmulas lácteas infantis em pó.....	63
4. Avaliação microbiológica dos indicadores das condições higiénicas das fórmulas lácteas infantis em pó.....	65
5. Avaliação microbiológica da presença de microrganismos patogénicos em fórmulas lácteas infantis em pó .....	68
V. Conclusão .....	73
VI. Recomendações e Perspectivas futuras.....	75
VII. Bibliografia.....	77

## Lista de Figuras

Figura 1. Meio de cultura TSI inoculado com <i>Salmonella</i> – não fermentação da lactose/sacarose; glucose e sulfureto de hidrogénio positivo.....	31
Figura 2. Avaliação da recuperação da metodologia ISO/TS 22964:2006.....	52
Figura 3. Representação esquemática da metodologia de detecção de <i>E. sakazakii</i> pela norma ISO/TS 22964:2006 utilizando três meios cromogénicos em paralelo .....	54
Figura 4. Resumo dos ensaios realizados para a avaliação microbiológica das fórmulas lácteas infantis em pó.....	55
Figura 5. Avaliação da recuperação dos meios cromogénicos em paralelo utilizando a metodologia constante da norma ISO/TS 22964:2006 .....	62
Figura 6. Comparação do crescimento da estirpe de <i>E. sakazakii</i> ATCC 51329 nos três meios cromogénicos (plano superior - ESIA, esquerda: incubação a 44 °C, direita: incubação a 37 °C; plano inferior esquerda – DFI, direita - ChromoCult).....	62
Figura 7. Três colónias em meio <i>Bacillus cereus</i> Agar: colónias do plano superior – <i>B. cereus</i> (amostras 5 e 13) (colónias rosa – não fermentadoras do manitol – e rodeadas por halo de precipitação devido à produção de lecitinase).....	70
Figura 8. Resultado do teste de produção de toxina diarreica por isolado de <i>B. cereus</i> (kit de detecção de toxinas BCET-RPLA, Oxoid™).....	71
Figura 9. Controlos positivo (fila de cima) e negativo (fila de baixo) do teste de produção de toxina diarreica (kit de detecção de toxinas BCET-RPLA, Oxoid™).....	71

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Perfil bioquímico de <i>E. sakazakii</i> e outras bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> que podem produzir pigmento amarelo e $\alpha$ -glucosidase – percentagem de estirpes positivas .....	5
Tabela 2. Métodos para detecção de <i>E. sakazakii</i> em fórmulas infantis em pó .....	8
Tabela 3. Características das crianças que desenvolveram infecção por <i>E. sakazakii</i> .....	11
Tabela 4. Surtos e casos reportados de infecções por <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	16
Tabela 5. Presença de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>E. sakazakii</i> em ingredientes usados em formulações infantis em pó .....	20
Tabela 6. Surtos de salmonelose associados à ingestão de fórmulas infantis em pó.....	31
Tabela 7. Espécies do género <i>Salmonella</i> .....	32
Tabela 8. Especificações microbiológicas do Codex Alimentarius relativas aos alimentos em pó.....	40
Tabela 9. Critérios de segurança dos géneros alimentícios, segundo o Regulamento n.º 2073/2005 .....	41
Tabela 10. Critérios de higiene dos processos, segundo o Regulamento n.º 2073/2005.....	41
Tabela 11. Critérios de segurança dos géneros alimentícios, segundo o Regulamento n.º 1441/2007 .....	42
Tabela 12. Critérios de higiene dos processos, segundo o Regulamento n.º 1441/2007.....	43
Tabela 13. Avaliação das contagens obtidas em meio de cultura COH após o período de incubação.....	61
Tabela 14. Pesquisa de <i>E. sakazakii</i> em fórmulas lácteas em pó .....	63
Tabela 15. Determinações microbiológicas dos indicadores das condições higiénicas das fórmulas infantis em pó .....	65
Tabela 16. Identificação das estirpes isoladas de duas amostras, através de API20E.....	67
Tabela 17. Contagem de microrganismos em fórmulas lácteas infantis em pó .....	68
Tabela 18. Pesquisa de microrganismos em fórmulas lácteas infantis em pó.....	69



## Lista de Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ALOA:	Agar <i>Listeria</i> segundo Ottaviani & Agosti
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
$a_w$ :	Actividade de água
BHI:	Caldo <i>brain heart infusion</i>
BP:	Meio gelosado Baird Parker
BPW:	Água peptonada tamponada
°C:	Grau Celsius
Ca/P:	Razão cálcio fósforo
Caldo EE:	Caldo de enriquecimento para enterobacteriáceas
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
COH:	<i>Columbia Agar + 5% Horse Blood</i>
COS:	<i>Columbia Agar + 5% Sheep Blood</i>
DFI:	Oxoid Chromogenic <i>Enterobacter sakazakii</i> Agar (Oxoid™)
EFSA:	European Food Safety Authority
EIEC:	Grupo patogénico de <i>Escherichia coli</i> – enteroinvasivo
ELFA:	<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
EPEC:	Grupo patogénico de <i>Escherichia coli</i> – enteropatogénico
ESIA:	<i>Enterobacter sakazakii</i> isolation agar (Laboratoires AES™)
ETEC:	Grupo patogénico de <i>Escherichia coli</i> – enterotoxigénico
EUA:	Estados Unidos da América
FAO:	Food and Agriculture Organization
FAO/WHO:	Food and Agriculture Organization/World Health Organization
FDA:	Food and Drug Administration
g:	Gramma
h:	Hora
H <sub>2</sub> S:	Sulfureto de hidrogénio
HACCP:	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
HEPA:	Filtros <i>high efficiency particulate air</i>
ICMSF:	International Commission on Microbiological Specification for Foods
<i>infB</i> :	<i>Translation initiation factor</i>
INFOSAN:	International Food Safety Authorities Network
ISO:	International Organization for Standardization
ITS:	<i>Internal transcribed spacer</i>
Kg:	Quilograma
kGy:	Kilogray

MKTTn-T:	Caldo Muller-Kauffmann
mL:	Mililitro
mLST:	Caldo de lauril triptose sulfato modificado
NMP:	Número mais provável
ONPG:	O-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
PAB:	<i>Perfringens Agar Base</i>
PCA:	<i>Standard Methods Agar</i>
PCC:	Pontos críticos de controlo
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i>
rADN:	ADN ribossómico
RVS-T:	Caldo Rappaport Vassiliadis Soja
TBX:	<i>Tryptone Bile X-Glucuronide</i>
TSA:	Agar tripticase de soja
TSC:	<i>Tryptone Sulfite Cycloserine Agar</i>
TSI:	<i>Triple sugar iron agar</i>
ufc:	Unidades formadoras de colónias
Valor D:	Redução decimal
valor D <sub>10</sub> :	Dose de irradiação necessária para inactivar 90% da população bacteriana
VIH:	Vírus da Imunodeficiência Humana
VM:	Vermelho de metilo
VP:	Voges Proskauer
VRBG:	<i>Violet Red Bile Glucose Agar</i>
VTEC:	Grupo patogénico de <i>Escherichia coli</i> – produtor de vero-citotoxina
WHO:	<i>World Health Organization</i>
μL:	Microlitro

## **Breve Descrição das Actividades Desenvolvidas no Período do Estágio Curricular**

O estágio curricular que serviu de base à realização desta Dissertação foi realizado na área científica da segurança alimentar. Com a duração aproximada de 730 horas, este estágio decorreu no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, no período compreendido entre 3 de Setembro de 2007 e 1 de Fevereiro de 2008. Este laboratório encontra-se actualmente inserido no Departamento de Alimentação e Nutrição, desenvolvendo actividades na área da segurança alimentar, nomeadamente, a prevenção de doenças de origem alimentar, através da investigação e desenvolvimento, vigilância e prestação de serviços diferenciados, sobretudo no que se refere à contaminação microbiológica dos alimentos prontos a consumir e à identificação dos factores potencialmente responsáveis por essa contaminação. Com efeito, são realizadas visitas periódicas a estabelecimentos de restauração colectiva, efectuando-se a verificação do cumprimento de pré-requisitos por estes estabelecimentos, bem como a colheita de amostras quer de alimentos, refeições prontas a comer, quer de esfregaços em loiças e utensílios higienizados, que são posteriormente sujeitas a análise microbiológica. Além disso, o laboratório é também solicitado para a análise de amostras suspeitas em casos e surtos de toxinfecções alimentares.

Durante o período de estágio foi possível acompanhar e integrar todas estas actividades de rotina do laboratório, acompanhando o técnico no decurso das visitas aos estabelecimentos de restauração colectiva, e no laboratório, a realização das análises microbiológicas às amostras colhidas, em todas as etapas analíticas, desde a diluição inicial das amostras, à realização dos ensaios, leituras de resultados, confirmação/identificação dos microrganismos suspeitos, expressão dos resultados e elaboração dos relatórios de ensaio, bem como a execução do inquérito epidemiológico, e das análises microbiológicas a produtos suspeitos de estarem envolvidos em situações de toxinfecções alimentares. Numa segunda fase, associado ao trabalho de rotina, foi desenvolvido um estudo que culminou com a elaboração desta Dissertação, nomeadamente, a pesquisa bibliográfica sobre o tema, o delineamento e execução de todo o trabalho experimental.

Dado que o Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge se encontra acreditado desde 2006, foi também acompanhado o trabalho relativo a todos os procedimentos relacionados com o sistema de gestão da qualidade instituído.



## I. Revisão Bibliográfica

### 1. Introdução

As doenças que são transmitidas por alimentos podem colocar em risco o bem estar e a vida de muitas pessoas todos os dias, sendo que aqueles cujo estado de saúde se encontra de alguma forma fragilizado, como se verifica no caso de crianças hospitalizadas, constituem uma população especialmente sob risco. Com efeito, para esta população, uma das principais fontes de perigos é a alimentação preparada nos hospitais, nomeadamente as fórmulas infantis em pó.

Assistiu-se nos últimos cinquenta anos a um grande desenvolvimento de produtos para a nutrição infantil, consequência dos profundos progressos resultantes da investigação nesta área. Desta forma, verifica-se a existência de uma vasta gama de leites infantis, encontrando-se actualmente várias opções: desde fórmulas preparadas com proteína de soja, fórmulas sem lactose, hidrolisados proteicos, fórmulas em que a maioria dos elementos gordos do leite foram substituídos por gorduras de origem vegetal, bem como fórmulas enriquecidas em ácidos gordos polinsaturados, nucleótidos, prebióticos e probióticos. Os progressos ao nível da nutrição infantil devem-se essencialmente ao conhecimento aprofundado da composição do leite materno, o que permitiu igualar, o mais possível, os alimentos desenvolvidos ao leite humano. Assim, os pediatras e nutricionistas podem, nos dias de hoje, escolher a fórmula que melhor satisfaça as necessidades do seu paciente, quer em termos nutricionais quer em termos terapêuticos, dado que muitos destes produtos são alimentos com fins medicinais (Ferraz, Adam, Furtado, & Ferraz, 2005).

Associado ao aumento da oferta destes produtos está também um incremento na procura, uma vez que em Portugal, se verifica que a taxa de abandono do aleitamento materno é muito significativa logo nos primeiros meses de vida do bebé, apesar das recomendações da Organização Mundial de Saúde, para que a alimentação dos bebés nos primeiros 6 meses de vida seja feita exclusivamente através da amamentação, de forma a serem atingidos um crescimento, desenvolvimento e saúde óptimos. Após este período, e de forma a satisfazer as necessidades nutricionais, os bebés poderão receber alimentos complementares seguros e adequados enquanto a amamentação deveria, idealmente, continuar até aos 2 anos de idade. Nas situações em que a amamentação não é possível, é necessário encontrar um substituto do leite materno, de que são exemplo as fórmulas infantis (International Food Safety Authorities Network [INFOSAN], 2005; Sandes *et al.*, 2007; World Health Organization [WHO], 2003). Não deve ser negligenciado que a alimentação durante o primeiro ano de vida é determinante para o crescimento e o desenvolvimento da criança, para a sua susceptibilidade a doenças gastrointestinais, respiratórias e alérgicas e, muito provavelmente, influencia o metabolismo e saúde enquanto adultos (Merck, 2008; Rea,

2003). Assim, a segurança das fórmulas utilizadas na alimentação dos bebés deve garantir quer a satisfação de todas as necessidades nutritivas, quer a segurança enquanto alimento.

As autoridades e organizações internacionais assumem, actualmente, que as fórmulas infantis em pó para recém-nascidos e de transição, cereais, papas infantis e outros géneros alimentícios para lactentes que se encontram prontos a consumir, apesar de apresentarem estabilidade microbiológica, não são produtos estéreis. Este facto ainda não está perfeitamente difundido pelos pais e educadores das crianças que utilizam estes produtos (INFOSAN, 2005; Randerson, 2004). E se a isto se associar que as alterações na microbiota que coloniza o tracto gastrointestinal apresentam uma relação directa com as variações alimentares a que o lactente é sujeito, bem como com a funcionalidade do tracto gastrointestinal, e que estas modificações podem convergir para situações patológicas, que constituem uma das causas de elevação dos índices de morbilidade e mortalidade nesta faixa etária, é perceptível que a alimentação, e em particular as fórmulas infantis, possam assumir um papel de destaque a este nível.

De acordo com a Directiva 2006/141/CE, de 22 de Dezembro, as fórmulas para lactentes são os “únicos géneros alimentícios transformados, com indicações nutricionais que satisfazem de forma integral as necessidades nutritivas dos lactentes durante os primeiros meses de vida e até à introdução de uma alimentação complementar adequada”. A referida directiva define ainda os lactentes, como as “crianças com idade inferior a 12 meses”. A definição de fórmulas de transição, que consta do mesmo regulamento, descreve-as como os “géneros alimentícios com indicações nutricionais específicas, destinados a lactentes quando é introduzida uma alimentação complementar adequada, e que constituam o componente líquido principal de uma dieta progressivamente diversificada”.

Quanto aos alimentos lácteos destinados a fins medicinais, a directiva 1999/21/CE de 25 de Março, define-os como uma “categoria de géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial, sujeitos a processamento ou formulações especiais, indicados para satisfazer as necessidades nutricionais de pacientes e para consumo sob supervisão médica”. Estes alimentos, e segundo a mesma directiva, destinam-se à alimentação “exclusiva ou parcial de pacientes com capacidade limitada, diminuída ou alterada para ingerir, digerir, absorver, metabolizar ou excretar géneros alimentícios correntes ou alguns dos nutrientes neles contidos ou seus metabolitos, ou cujo estado de saúde determina necessidades nutricionais específicas que não podem ser satisfeitas por uma modificação do regime alimentar normal, por outros géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial ou por uma combinação de ambos”.

A elevada escala de produção de fórmulas infantis e de leites em pó, distribuídos a nível mundial, e o relativamente baixo número de infecções em lactentes, fomentam a ideia de que normalmente os produtos são seguros (European Food Safety Authority [EFSA], 2004). Contudo, se associarmos a este cenário as limitações dos sistemas de vigilância

existentes na maioria dos países, a presença de determinados microrganismos nos produtos e os efeitos potenciais em lactentes e crianças poderá ser considerado um problema de saúde pública (INFOSAN, 2005).

A este respeito, em alguns estudos realizados a partir da década de 90 neste tipo de produtos, foi isolada uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, como agente envolvido em surtos e casos de infecções, afectando especialmente esta faixa etária e que é considerado um agente patogénico emergente, o *Enterobacter sakazakii* (Drudy, Mullane, Quinn, Wall, & Fanning, 2006; Farber, 2004; INFOSAN, 2005; Skovgaard, 2007). Duffy, Lynch, & Cagney (2008) descrevem os agentes patogénicos emergentes, como agentes infecciosos que surgem recentemente numa população, ou então que, embora bem conhecidos, apresentam um aumento rápido da incidência ou da localização geográfica, ou sugerem uma probabilidade significativa de aumentar no futuro.

A International Commission for Microbiological Specifications for Foods ([ICMSF] 2002) classificou o *E. sakazakii* como um perigo severo para populações restritas, podendo causar a morte, sequelas crónicas graves ou estados mórbidos de longa duração. No referido grupo figuram ainda outros microrganismos patogénicos, nomeadamente a *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* (tipo A e B), e *Cryptosporidium parvum*.

Nos surtos em que o *E. sakazakii* é referido como causa, os veículos implicados têm sido as fórmulas infantis, provavelmente porque as fórmulas reconstituídas se apresentam como um substrato muito favorável ao desenvolvimento de microrganismos (Gurtler, Kornacki & Beuchat, 2005). Em Portugal, pouco se sabe sobre a ocorrência deste microrganismo neste tipo de alimentos, bem como, de outros agentes, que igualmente possam ser veiculados pelas fórmulas infantis em pó e que sejam potencialmente prejudiciais para a saúde dos lactentes. Este panorama constituiu a força motriz para a implementação da metodologia de pesquisa de *E. sakazakii* e avaliação da ocorrência deste microrganismo e de outros agentes patogénicos frequentemente implicados em situações de toxinfecção alimentar, com o intuito de alertar para a imperativa necessidade de serem cumpridas as recomendações em termos de fabrico, armazenamento, preparação e utilização relativas às fórmulas lácteas infantis em pó.

## 2. Caracterização do *Enterobacter sakazakii*

### 2.1. Taxonomia e caracterização bioquímica do *E. sakazakii*

*Enterobacter sakazakii* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, género *Enterobacter*. Caracteriza-se por ser um bacilo Gram negativo, móvel (através de flagelos peritricos), não produtor de esporos, anaeróbio facultativo, fermentador da glucose e oxidase negativa. Utiliza como fontes únicas de carbono e energia a glucose e o citrato, não necessitando de vitaminas, aminoácidos ou de outros factores orgânicos de crescimento. Este microrganismo apresenta cápsula, formada por material polissacarídico (nomeadamente, ácido glucurónico, glucose, galactose, frutose e manose). Esta espécie não faz parte da microbiota normal do tracto gastrointestinal humano ou animal e é reconhecida como sendo um agente patogénico emergente de origem alimentar (Farber, 2004; Gurtler *et al.*, 2005).

Até aos anos 80 do século XX, o *E. sakazakii* era conhecido como “*Enterobacter cloacae* pigmentado de amarelo”. Contudo, com base em tecnologias genéticas, nomeadamente hibridação ADN-ADN, verificou-se que as estirpes pigmentadas de amarelo apresentam uma homologia inferior a 50% com as estirpes não pigmentadas, sugerindo que a designação atribuída não é suficiente (Gurtler *et al.*, 2005), nomeadamente para as estirpes que posteriormente integraram o grupo do *E. sakazakii*, que apresenta diferenças também ao nível das características bioquímicas, designadamente a incapacidade para fermentar o D-sorbitol, aptidão para produzir pigmento amarelo e principalmente, a actividade da  $\alpha$ -glucosidase (Nazarowec-White & Farber, 1997b).

O perfil bioquímico do *E. sakazakii* encontra-se resumido na Tabela 1, sendo também apresentadas algumas características que são típicas de todas as espécies do género *Enterobacter*, nomeadamente a positividade para os testes de citrato, Voges Proskauer (VP) e O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) e os testes negativos de produção de H<sub>2</sub>S (sulfureto de hidrogénio) e de vermelho de metilo (VM). Como membro da família *Enterobacteriaceae*, o *E. sakazakii* fermenta a glicose com a produção de gás a 35-37 °C mas pode não produzir gás a 44,5 °C (Richard, 1984).

**Tabela 1. Perfil bioquímico de *E. sakazakii* e outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* que podem produzir pigmento amarelo e  $\alpha$ -glucosidase – percentagem de estirpes positivas (Richard, 1984)**

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

NR = Não relatado

Para além do *E. sakazakii* outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* podem formar colónias que produzam pigmento amarelo, nomeadamente *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Enterobacter cowanii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea stewartii*, *Photobacterium luminescens*, *Photobacterium* Grupo 5, *Xenorhabdus nematophilus* e 1% das estirpes de *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella planticola*. O facto de o *E. sakazakii* produzir  $\alpha$ -glucosidase permite diferenciá-lo destas enterobactérias uma vez que, no conjunto das espécies que produzem pigmento amarelo, apenas cinco apresentam  $\alpha$ -glucosidase e são referidas na Tabela 1 (Richard, 1984).

A caracterização de um género dentro da família *Enterobacteriaceae* é baseada nas diferenças verificadas nos testes de serologia, na morfologia, nas respostas bioquímicas e nas características genéticas. Existem 14 espécies ou biogrupos no género *Enterobacter*. As

maiores diferenças tradicionalmente consideradas entre *E. sakazakii* e outras espécies do género *Enterobacter* consistem na incapacidade do *E. sakazakii* para fermentar o D-sorbitol e na sua aptidão para produzir uma desoxirribonuclease extracelular, embora actualmente se reconheçam algumas estirpes de *E. sakazakii* fermentadoras do D-sorbitol. Outras características que permitem uma distinção deste grupo de bactérias incluem a produção de pigmento, aumentada a temperaturas inferiores a 36 °C, com um óptimo a 25 °C, utilização do citrato como fonte de carbono, 31 a 49% de homologia ADN-ADN com o *E. cloacae* e 57% de *ratio* guanina+citosina (Gurtler *et al.*, 2005).

A análise filogenética deste microrganismo, efectuada por Iversen, Waddington, On, & Forsythe (2004d) usando ADN 16S ribossomático e sequenciação *hsp60*, revelou uma heterogeneidade taxonómica. Neste sentido, Iversen *et al.* (2007) clarificaram a taxonomia do *E. sakazakii* e propuseram uma reclassificação deste microrganismo, baseando-se em estudos relacionando as características genotípicas e fenotípicas de 210 estirpes identificadas como *E. sakazakii*, nomeadamente recolocando-o num novo género, *Cronobacter*, e considerando as novas espécies *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis* e *Cronobacter turicensis*. Estes autores reconhecem que a taxonomia destes microrganismos ainda não se encontra totalmente esclarecida, e reiteram que as metodologias desenvolvidas para a identificação do *E. sakazakii* mantêm a sua aplicabilidade em relação ao sugerido género *Cronobacter*.

## **2.2. Isolamento, identificação e tipificação do *E. sakazakii***

Como membro da família *Enterobacteriaceae*, o *E. sakazakii* desenvolve-se em todos os meios selectivos utilizados para o isolamento e contagem destes microrganismos, nomeadamente o agar MacConkey, o agar bÍlis vermelho violeta, agar eosina azul de metileno (Iversen & Forsythe, 2003). Como foi referido, todas as estirpes de *E. sakazakii* se caracterizam pela produção de pigmento amarelo brilhante quando cultivadas em agar tripticase de soja (TSA) a 25 °C (característica que lhe conferiu o nome pelo qual foi inicialmente designado).

Quando são avaliadas a partir de cultura recente, as estirpes apresentam colónias com dois tipos morfológicos: colónias secas ou mucóides, com periferia imperfeita, elásticas e difíceis de remover com a ansa e colónias lisas e fáceis de remover. Estas diferenças morfológicas macroscópicas são explicadas pela diferença na produção dos polissacáridos (Gurtler *et al.*, 2005).

O primeiro método desenvolvido para isolamento e quantificação de *E. sakazakii* em fórmulas infantis foi apresentado por Muytjens, Roelofs e Jaspar (1988), que identificaram pela primeira vez a actividade da enzima  $\alpha$ -glucosidase em 129 isolados (100%) de *E. sakazakii*; esse método foi modificado por Nazarowec-White e Farber (1997c) e

posteriormente adaptado pela *Food and Drug Administration* (FDA). A técnica de isolamento e contagem de *E. sakazakii* em fórmulas infantis em pó desenvolvida pela FDA, difere dos métodos anteriores na reconstituição fazendo uso de água destilada estéril, ao invés da utilização de água peptonada tamponada – BPW, e na sementeira, a partir do enriquecimento, em duas placas de *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG), uma por esgotamento com ansa e outra por espalhamento à superfície (de 0.1 mL). Esta metodologia tem por base o método padrão de isolamento das enterobactérias, com uma selecção adicional das colónias com pigmentação amarela e posterior identificação bioquímica. Este protocolo é selectivo para as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, mas não é específico para o *E. sakazakii*, necessitando de 5 dias para obtenção de resultados conclusivos (Food and Drug Administration [FDA], 2002b).

Em comparação com os laboriosos métodos convencionais, o desenvolvimento recente dos meios diferenciais cromogénicos diminuiu o tempo necessário para o isolamento de *E. sakazakii*. Estes meios de cultura foram formulados de forma a que as principais características bioquímicas sejam detectadas, nomeadamente a enzima  $\alpha$ -glucosidase. Contudo, a presença desta enzima não se encontra restrita ao *E. sakazakii*, como referem Lehner, Tasara e Stephan (2004).

Iversen, Druggan e Forsythe (2004b) desenvolveram um meio cromogénico designado Oxoid Chromogenic *Enterobacter sakazakii* Agar – DFI que faz a detecção selectiva do *E. sakazakii*. Este meio, que se baseia na detecção da presença da enzima  $\alpha$ -glucosidase, utiliza o substrato 5-bromo-4-cloro-indol- $\alpha$ -D-glucopiranosido, comercializado pela marca Oxoid™. Outras empresas desenvolveram meios cromogénicos cujo princípio é semelhante ao descrito para o DFI. Um desses meios é o ESIA (*Enterobacter sakazakii* isolation agar – Laboratoires AES™), e que é o meio preconizado pela norma ISO/TS 22964:2006, ou então o meio ChromoCult *Enterobacter sakazakii* Agar (ChromoCult) (Merck™). A Tabela 2 resume alguns dos métodos de detecção de *E. sakazakii* em fórmulas infantis em pó.

**Tabela 2. Métodos para detecção de *E. sakazakii* em fórmulas infantis em pó (Food and Agriculture Organization/World Health Organization [FAO/WHO], 2006)**

Método	Pré-enriquecimento (37°C)	Enriquecimento	Isolamento	Identificação presuntiva
FDA	Água estéril	Caldo EE (36 °C)	VRBG agar (36 °C)	Colónias arroxeadas rodeadas por halo de ácidos biliares precipitados. Isolado em TSA (25 °C por 48-72horas) – colónias pigmentadas de amarelo
DFI	BPW	Caldo EE (37 °C)	DFI agar (37 °C)	Colónias azul-esverdeadas
ISO	BPW	mLST/vancomicina (45 °C)	ESIA (44 °C)	Colónias azul-esverdeadas

Apesar de existirem vários métodos propostos para o enriquecimento e isolamento de *E. sakazakii*, uma parte integrante de todos estes métodos assenta no teste  $\alpha$ -glucosidase. No entanto, como foi referido, outras bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são positivas para a  $\alpha$ -glucosidase o que reduz a eficiência e especificidade destes meios cromogénicos para o isolamento de *E. sakazakii*. Uma vez que a recuperação de teores microbianos muito baixos é importante, dada a relação destes níveis de contaminação com situações de patologia, é necessário desenvolver métodos de enriquecimento e isolamento sensíveis e específicos para o referido microrganismo (Iversen & Forsythe, 2007).

Apesar da utilização dos meios cromogénicos, há a necessidade de confirmar posteriormente os isolados presuntivos de *E. sakazakii*. Esta confirmação pode ser efectuada através das características bioquímicas dos isolados, utilizando kits miniaturizados, nomeadamente o API 20E e o API 32E (bioMérieux™). Contudo, nem sempre os resultados apresentados por estes dispositivos são concordantes, tal como evidenciaram Iversen, Caubilla-Baron e Forsythe (2004a), que relataram que três estirpes identificadas pelo API 20E como *E. sakazakii* foram posteriormente identificadas como *E. cloacae*, *E. amnigenus* e *E. cloacae/gergoviae* pelo API 32E, enquanto que dez estirpes identificadas como *E. sakazakii* pelo API 32E apresentaram resultados consistentes como sendo espécies do género *Pantoea* pelo API 20E. Para além destes kits existem outros, nomeadamente o sistema API ZYM (bioMérieux™), que pode ser utilizado para confirmar isolados de *E. sakazakii*. Este sistema consiste numa base plástica e 20 cúpulas, 19 das quais contêm substratos e tampões, e 1 cúpula serve como controlo negativo. Este teste inclui ensaios para avaliar a fosfatase alcalina, butirato esterase, caprilato-esterase lipase, miristato lipase, arilamidase leucina, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina,

quimotripsina, fosfatase ácida, fosfoamidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -Manosidase, e  $\alpha$ -fucosidase. Após incubação em ambiente aeróbio, ao abrigo da luz, a 36 °C durante 4 horas, avalia-se a presença e o grau de actividade enzimática, sendo posteriormente classificada de acordo com a intensidade de cor (escala de 0 a 5), de acordo com um esquema gráfico fornecido pelo fabricante (Erickson & Kornacki, 2002).

Para além dos métodos convencionais descritos, e como forma de melhorar a detecção do *E. sakazakii*, têm sido desenvolvidos métodos moleculares. Os métodos que utilizam a tecnologia PCR (*polymerase chain reaction*) apresentam-se como sensíveis, específicos e permitem uma detecção rápida de *E. sakazakii* nas fórmulas infantis (Lehner *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006b).

Liu *et al.* (2006b) desenvolveram dois métodos de detecção das sequências 16S-23S rADN *internal transcribed spacer* (ITS) do *E. sakazakii* (uma vez que estas sequências têm sido as mais utilizadas em taxonomia bacteriana), através de PCR e do espectro oligonucleotídico, em fórmulas infantis depois de enriquecimento selectivo em caldo de lauril triptose sulfato modificado (mLST) e caldo *brain heart infusion* (BHI). Estas metodologias apresentam um limite de detecção de 1.3 ufc (unidades formadoras de colónias) em 100 g de fórmula infantil, uma vez que este procedimento permite a multiplicação de um nível de 1.3 ufc para  $5 \times 10^6$  ufc.

Além destes métodos, também a metodologia de PCR em tempo real tem sido utilizada para a detecção de *E. sakazakii*, tal como exemplifica o trabalho desenvolvido por Liu *et al.* (2006a) que desenvolveram 2 metodologias, utilizando a TaqMan e a tecnologia SYBR green. Ambos os ensaios permitiram um grau de detecção de 1.1 ufc de *E. sakazakii* por 100 g de fórmula infantil após 25 horas de enriquecimento. Com efeito, este estudo apresenta duas metodologias que demonstram elevada especificidade, sensibilidade e eficiência na detecção de *E. sakazakii* nas fórmulas infantis, características que se encontram associadas à maior celeridade do processo.

A indústria farmacêutica também acompanhou os desenvolvimentos ao nível molecular, disponibilizando alguns equipamentos com este fim, nomeadamente o sistema BAX da DuPont Qualicon™, que utiliza a tecnologia PCR para rapidamente amplificar milhões de cópias de um único fragmento específico de ADN para uma detecção fiável. O teste consiste num enriquecimento inicial da amostra, segundo um protocolo padronizado para cada tipo de alimento, sendo de seguida as amostras combinadas com a solução de lise de forma a libertarem o ADN. Este sistema combina todos os reagentes necessários em tubos de reacção que são rehidratados com a amostra lisada. Posteriormente, os tubos são transferidos para o aparelho, onde ocorre a amplificação do fragmento de ADN específico do microrganismo. O ADN amplificado apresenta um sinal fluorescente que é interpretado, e

baseando-se nesse sinal é apresentado o resultado, presente ou ausente (DuPont Qualicon, 2008).

Outro sistema desenvolvido é o Pathatrix, patenteado pela empresa Matrix MicroScience™ e que tem como princípio a utilização de partículas magnéticas catiónicas que se encontram revestidas por anticorpos específicos para determinado agente patogénico alvo. O procedimento baseia-se na diluição da amostra do alimento (diluição 1:10), que posteriormente é submetida a circulação pelo equipamento, por um período de tempo estabelecido, de modo a permitir o contacto entre o antígeno e o anticorpo. Depois deste período, realiza-se a concentração das partículas carregadas magneticamente e após lavagem, estas partículas podem ser utilizadas para identificação através de PCR ou por sementeira directa. Mullane *et al.* (2006) desenvolveram um estudo utilizando esta metodologia Pathatrix para a detecção de *E. sakazakii* em fórmulas infantis em pó, sendo associada a um período curto de enriquecimento (6 horas) e com identificação posterior em meio DFI (Oxoid™) e através de metodologia PCR. Os autores concluíram que este protocolo permite obter resultados em menos de 24 horas, não sendo afectado por contaminação simultânea por outras bactérias, permitindo ainda recuperar níveis baixos de *E. sakazakii* (entre 1 e 5 ufc/500 g de fórmula em pó) e a recuperação de células deste microrganismo que se encontrem fragilizadas pela dessecação.

As ferramentas moleculares permitem ainda a detecção da relação entre um isolado clínico, o lote de uma fórmula infantil em pó contaminada e/ou o ambiente de fabrico, de modo a facilitar acções correctivas e melhorias dos protocolos de controlo, em situações de surtos. Desta forma, o perfil de ADN facilita a comparação directa de isolados, uma vez que estas técnicas se baseiam no facto de isolados idênticos apresentarem perfis de ADN muito semelhantes ou indistinguíveis o que permite implicá-los ou não nos estudos epidemiológicos (Drudy *et al.*, 2006).

### **2.3. Apresentação clínica e patogenicidade associadas a infecções por *E. sakazakii***

Apesar de *E. sakazakii* ter sido considerado como causa de doença em todas as faixas etárias, a observação dos casos reportados, permite deduzir que o grupo das crianças com idade inferior a 1 ano, se apresenta como o grupo de risco (INFOSAN, 2005). Dentro deste grupo, os imunocomprometidos e os recém-nascidos (com menos de 28 dias) apresentam um risco agravado, principalmente quando se apresentam com baixo peso à nascença (< 2.5 Kg) (Food and Agriculture Organization/World Health Organization [FAO/WHO], 2004).

Permanece ainda pouco claro, se a maior incidência ao nível dos neonatos é devida à virulência intrínseca do agente ou se é resultado da oportunidade para colonizar os indivíduos desta faixa etária (Erickson & Kornacki, 2002).

As infecções por *E. sakazakii* em lactentes, adultos e pacientes idosos podem apresentar uma multiplicidade de sintomas. Nos lactentes, as infecções estão habitualmente associadas a meningite, conjuntivites, enterocolite necrosante, bacteriemia e/ou sépsis, abscessos cerebrais, compartimentalização ventricular devida à necrose do tecido cerebral e liquefacção da substância branca. A enterocolite necrosante, é o estado patológico gastrointestinal mais frequente nos recém nascidos prematuros, podendo ser causada por uma variedade de agentes patogénicos. Esta alteração deve-se essencialmente a isquémia intestinal, à colonização bacteriana do intestino e a um excesso de substrato proteico no lúmen intestinal. Assim, esta patologia caracteriza-se por distensão abdominal, necrose intestinal, vômitos biliares, e hematoquémia, capaz de evoluir para peritonite e choque (Forsythe, 2005).

A FAO/WHO (2006) efectuaram uma avaliação de 45 casos de infecções por *E. sakazakii* encontradas na literatura disponível (n = 32) e a partir de casos descritos pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) (n = 13). A análise indica que os bebés prematuros tendem a desenvolver infecções mais tarde – a idade média encontra-se nos 35 dias de vida – que as crianças que desenvolvem meningite (Tabela 3). Em contrapartida, a meningite parece ocorrer com maior frequência em crianças nascidas na sequência de gestações de termo e com o peso aproximadamente normal, as quais geralmente desenvolvem sintomas antes de 1 semana de idade. Proporções semelhantes de crianças com bacteriemia (27%) e meningite (33%) desenvolvem sintomas fora do estabelecimento hospitalar.

**Tabela 3. Características das crianças que desenvolveram infecção por *E. sakazakii* (FAO/WHO, 2006)**

Características das crianças	Bacteriemia		Meningite	
	N=12		N=33	
	Média	Intervalo	Média	Intervalo
Peso à nascença (g)	850	[540-2600]	2454	[850-3401]
Idade gestacional estimada (semanas)	27.8	[23.5-40]	37	[30-40]
Idade ao início dos sintomas (dias)	35	[7-300]	6	[2-35]

Os lactentes são particularmente susceptíveis ao desenvolvimento de meningite durante as primeiras semanas de vida. Por conseguinte, embora pareçam ser dois grupos diferentes de risco – ou seja, os prematuros em que há um desenvolvimento isolado de bacteriemia após 1 mês de idade e os bebés em que o período de gestação foi completo e

em que há desenvolvimento de meningite durante o período neonatal – a diferença no momento da infecção pode estar relacionada com diferenças no momento de exposição ao *E. sakazakii*, ao invés, de diferenças na susceptibilidade. Embora, em alguns casos, as fórmulas infantis em pó tenham sido implicadas como fonte de *E. sakazakii*, em muitos casos, não foram envolvidas nem epidemiologicamente nem microbiologicamente como fonte de infecção. No entanto, de referir que em tais casos, nenhuma outra fonte de infecção foi epidemiologicamente ou microbiologicamente implicada.

No caso dos adultos, as manifestações clínicas associadas a infecções por *E. sakazakii* podem incluir sépsis, apendicite e por vezes este microrganismo é implicado como agente co-infectante. Nos pacientes idosos o quadro pode incluir, para além das referidas manifestações clínicas, pneumonia (Gurtler *et al.*, 2005; INFOSAN, 2005). As infecções por *E. sakazakii* em adultos têm sido reportadas num baixo número, pelo que são considerados um grupo de baixo risco.

A morbidade associada à infecção por *E. sakazakii* é muito baixa, tendo sido sugerida por Stoll, Hansen, Fanaroff e Lemons (2004) como sendo de 1:10660 bebés que nascem com peso muito baixo. Por outro lado, a *United States FoodNet 2002* estimou que a taxa de infecção por *E. sakazakii* nos bebés ronda 1:100000, sendo que no caso de recém-nascidos com baixo peso à nascença seria de 8.7 por 100000. No que respeita à taxa de mortalidade, esta apresenta valores elevados, que variam, dependendo da fonte de informação, entre 20 e 80% (FAO/WHO, 2004; Farber, 2004; Nazarowec-White & Farber, 1997a).

Alguns factores que podem aumentar o risco de infecção nos neonatos incluem a imunossupressão, os nascimentos prematuros e o baixo peso à nascença. Um facto adicional a ter em conta, é o número crescente de crianças que nascem de mães portadoras de VIH. Estas crianças apresentam um risco elevado uma vez que podem estar exclusivamente dependentes das fórmulas como forma de alimentação e por outro lado, porque se podem encontrar mais susceptíveis à infecção. Assim, este grupo e o dos neonatos com baixo peso à nascença constituem um motivo de preocupação para os países em desenvolvimento, dado que a proporção destes nascimentos é superior à dos países desenvolvidos, o que associado às deficiências em termos estruturais e higiénicos que se encontram na maioria destes países faz aumentar consideravelmente o risco de infecção (FAO/WHO, 2004).

Os mecanismos de patogenia que o *E. sakazakii* utiliza ainda não estão completamente esclarecidos.

Iversen e Forsythe (2003), sugerem que a patogénese das meningites neonatais por *E. sakazakii* passa pela translocação da bactéria através do plexo coróide e consequente invasão celular através da secreção de factores patogénicos (por exemplo, elastases, glicopéptidos, endotoxinas, colagenases e proteases) usados para aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, conseguindo atingir o tecido cerebral rico em nutrientes.

No que diz respeito aos factores de virulência específicos do *E. sakazakii*, também estes se mantêm indefinidos. Pagotto, Nazarowec-White, Bidawid e Farber (2003) desenvolveram um trabalho experimental de forma a avaliar a dose infecciosa, a dose letal e a virulência do *E. sakazakii*. Neste ensaio, utilizaram ratinhos como modelo, os quais foram inoculados intraperitoneal e oralmente com o objectivo de avaliar a produção de enterotoxina por nove isolados clínicos, oito isolados de alimentos e uma estirpe de referência (ATCC 29544), num total de 18 estirpes. Depois da inoculação, os ratinhos foram eutanasiados e os seus intestinos examinados para avaliar a distensão e a acumulação de fluido. Foram também usadas culturas de células (CHO, Vero e linhas Y-1) para testar o efeito citopático causado pelas bactérias. Concluiu-se que 4 das 18 estirpes foram positivas para a produção de enterotoxina, e 1 estirpe revelou-se tóxica para as três linhas celulares. Outra estirpe foi positiva para a produção de enterotoxina mas negativa para a citopaticidade relativamente às culturas celulares. Todas as 18 estirpes foram letais para os ratinhos a doses orais de  $10^8$  ufc/ratinho; a estirpe de referência ATCC 29544 revelou-se negativa para a produção de enterotoxina. Um isolado clínico e um isolado de um alimento apresentaram-se letais por via oral a  $10^7$  ufc, e um isolado clínico e um alimentar revelaram-se letais por injeção intraperitoneal para populações tão baixas quanto  $10^5$  ufc. Contudo, Drudy *et al.* (2006) indicam que a capacidade do *E. sakazakii* para a produção de enterotoxina continua a ser pouco clara, porque nem os genes que codificam a toxina nem a própria proteína foram ainda identificados.

Lenati, Lin, Farber e Pagotto (2006, citado por FAO/WHO, 2006) estudaram a patogénese deste microrganismo em modelos animais não-primatas, a fim de obter uma melhor compreensão dos mecanismos e da dose-resposta do *E. sakazakii*. Assim, utilizaram animais jovens de várias espécies, nomeadamente, porcos, galinhas, coelhos, cobaios e gerbilos, aos quais administraram por via oral  $10^9$  ufc de três estirpes diferentes de *E. sakazakii*, isoladas de fontes diferentes. Apesar de se ter verificado que em todos os casos ocorreu colonização – uma vez que o *E. sakazakii* foi isolado das fezes dos animais por períodos de tempo diversos e a partir de vários órgãos – não se verificou qualquer mortalidade.

Iversen e Forsythe (2003) propuseram que uma boa estimativa de aproximação à infecção por *E. sakazakii* seria semelhante às infecções por *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, ou *Neisseria meningitidis*, isto é, cerca de  $10^3$  ufc. Estes autores sugeriram

que *E. sakazakii* não encontrará um pH muito adverso no tracto gastrointestinal superior dos recém-nascidos e poderá passar rapidamente para o intestino delgado. Baseando-se num nível de contaminação de cerca de 0.36-66 ufc/100g, e 18g de fórmula reconstituída apenas numa refeição, seriam necessárias apenas 14 gerações para produzir 6000 ufc/refeição. Isto requereria cerca de 7 h a 37 °C ou 17.9 h a 21 °C, 1.7 dias a 18 °C, 7.9 dias a 10 °C, e aproximadamente 9 dias a 8 °C. Contudo, estes cálculos fazem uma abordagem teórica, uma vez que uma fracção de célula bacteriana não pode ocorrer, dado que, a fórmula ou se apresenta contaminada ou não.

Os mecanismos que o *E. sakazakii* utiliza para invadir e atravessar a barreira intestinal foram estudados por Kim e Loessner (2008) usando células epiteliais Caco-2 que conseguiram demonstrar a penetração do *E. sakazakii* e determinar as propriedades de invasão a ele associadas. Assim, verificaram que a entrada e invasão estão dependentes do tempo de exposição e da multiplicidade da infecção bacteriana, bem como da síntese proteica, mas verificaram ser independente da polaridade da célula na presença de *tight junctions* (junções ocludentes). Além disso, constataram que é necessária a presença de filamentos de actina e de estruturas microtubulares, e que alterações ao nível das *tight junctions* reforçam de forma significativa a associação inicial às células Caco-2, assim como a eficiência da invasão, que fornece uma possível explicação para a ocorrência preferencial desta infecção em bebés e neonatos. Esta é a primeira descrição da invasão das células intestinais pelo *E. sakazakii* e os resultados do trabalho desenvolvido por Kim e Loessner (2008) sugerem que este agente patogénico emergente utiliza um mecanismo de invasão novo como forma de desenvolvimento de infecção sistémica.

Assim, é talvez possível concluir-se que a níveis baixos de contaminação a relação dose-resposta é linear, contudo estes dados não apresentam fundamentos suficientemente sólidos que permitam concluir sobre um valor relevante para recém-nascidos. Mas é importante lembrar que a resposta do organismo humano às diferentes quantidades de agente patogénico é variável, e que vários são os factores que influenciam esta resposta, nomeadamente, a virulência do agente, a quantidade de microrganismo a que o indivíduo é exposto, o estado imunológico do consumidor e as características individuais do alimento que podem influenciar o comportamento do consumidor (ICMSF, 2002).

#### **2.4. Surtos e casos de infecções por *E. sakazakii***

De maneira geral, os membros do género *Enterobacter* são considerados agentes patogénicos oportunistas que raramente causam doença em indivíduos saudáveis. O *E. sakazakii*, no entanto, tem sido implicado em alguns casos esporádicos e surtos envolvendo

essencialmente neonatos debilitados. Dado este facto, as autoridades de saúde pública de diversos países têm progressivamente dispensado maior atenção a este microrganismo.

Iversen e Forsythe (2003) referem a existência de, pelo menos, 76 casos de infecções neonatais por *E. sakazakii*, documentados em todo o mundo entre 1958 e 2003. Pensa-se que este número esteja, provavelmente, subestimado, por um lado devido ao facto de muitos laboratórios não pesquisarem este microrganismo e por outro lado devido às falhas que ocorrem no relato das situações de doença, permanecendo desta forma, a verdadeira magnitude da situação desconhecida (FAO/WHO, 2004; Nestlé, comunicação pessoal, Janeiro 7, 2003). A Tabela 4 apresenta de forma resumida surtos e casos descritos de infecções por *E. sakazakii*.

Gurtler *et al.* (2005), apresentam de forma sumária, as infecções reportadas cujo agente implicado revelou ser o *E. sakazakii*. Os dois primeiros casos documentados de meningite causada por *E. sakazakii* ocorreram em 1958 em St. Albans, Inglaterra. Nesta altura, a bactéria ainda era descrita como uma estirpe pigmentada incomum do grupo *E. cloacae*. As duas crianças nasceram com uma semana de diferença e morreram com dois dias de intervalo. A primeira criança nasceu de uma mãe com toxémia ligeira e veio a falecer 48 horas depois do tratamento com antibiótico. A segunda criança nasceu de um parto gemelar e veio a morrer poucos dias após o internamento. O relato, publicado em 1961, referia que esta situação tinha sido causada por uma variante de *E. cloacae*, formadora de colónias amarelas. Em 1965, na Dinamarca, foi descrito um caso de meningite neonatal causada por *E. sakazakii* de um paciente que nasceu após 27 horas de trabalho de parto. Não é referida a forma como o recém-nascido foi alimentado, se com leite materno ou com fórmulas em pó reconstituídas. Nos Estados Unidos da América (EUA) vários têm sido os casos reportados, o primeiro dos quais em 1979 na Georgia. Este caso foi o primeiro descrito em que não existia meningite, mas sim bacteriémia, situação que ocorreu num indivíduo do sexo masculino de termo e de peso à nascença de 2.6 Kg, sendo diagnosticada a bacteriémia aos 7 dias de vida.

Em 1981, em Indiana, EUA, foi reportada uma situação envolvendo uma criança com 5 semanas em que o *E. sakazakii* foi identificado, a qual, apesar de ter recuperado da situação aguda após terapia antimicrobiana, desenvolveu um atraso severo.

Na Holanda, durante 6 anos, até 1983, foram referidos 8 casos de meningite neonatal envolvendo o *E. sakazakii*, sendo que 2 dos pacientes desenvolveram também enterocolite necrosante. As estirpes de *E. sakazakii* isoladas das amostras clínicas eram indistinguíveis dos isolados das amostras de fórmulas infantis reconstituídas, bem como dos utensílios usados para a preparação das fórmulas.

**Tabela 4. Surtos e casos reportados de infecções por *Enterobacter sakazakii* (Gurtler et al., 2005; Drudy et al., 2006)**

Localização (ano)	Nº de indivíduos afectados	Nº de mortes	Fonte
Inglaterra (1958)	2	2	Desconhecida
Dinamarca (1965)	1	0	Desconhecida
Georgia (1979)	1	0	Desconhecida
Indiana (1981)	1	0	Desconhecida
Holanda (1983)	8	6	Suspeita: Fórmulas Infantis em Pó
Grécia (1985)	1	1	Desconhecida
Islândia (1986-1987)	3	1	Fórmulas Infantis em Pó
Massachusetts, Louisiana (1987)	2	1	Desconhecida
Tennessee (1988)	4	0	Fórmulas Infantis em Pó; Liquidificador
Maryland (1990)	1	0	Fórmulas Infantis em Pó; Liquidificador
Ohio (1990)	1	0	Desconhecida
Massachusetts (1995/1996)	5	3	Desconhecida
Bélgica (1998)	12	2	Fórmulas Infantis em Pó
Carolina do Norte (2000)	1	0	Desconhecida
Israel (1993, 1995, 1997-2000)	6	0	Fórmulas Infantis em Pó; Liquidificador
Tennessee (2001)	10	1	Fórmulas Infantis em Pó
Bélgica (2002)	1	1	Fórmulas Infantis em Pó
Nova Zelândia (2004)	5	1	Fórmulas Infantis em Pó
França (2004)	9	2	Fórmulas Infantis em Pó

Na Europa também existem casos reportados. Na Grécia, em Atenas, em 1985, foi detectado um caso de septicémia neonatal causada por *E. sakazakii* associado a *Klebsiella pneumoniae* numa unidade de cuidados intensivos de um hospital pediátrico. Neste paciente, que tivera um nascimento prematuro, foi-lhe detectada a septicémia 3 dias após o nascimento.

Na Islândia, entre 1986-1987, foram diagnosticados 3 casos de meningite por *E. sakazakii* em recém-nascidos de termo do sexo masculino. Uma das crianças, apesar do tratamento antimicrobiano, revelou, após recuperação da infecção, um atraso mental severo e quadriplegia. À segunda criança foi-lhe diagnosticado Síndrome de Down e faleceu 5 dias após o nascimento devido às complicações decorrentes da infecção por *E. sakazakii*. Ao terceiro paciente foi feita antibioterapia no final da qual ele apresentou atraso mental moderado em todas as áreas de desenvolvimento. Todas as crianças foram alimentadas

com fórmulas infantis em pó administradas duas horas após a preparação. O *E. sakazakii* não foi encontrado nem nos utensílios de preparação das fórmulas, nem na sala de preparação, nem nas amostras ambientais. As fórmulas de todos os lotes testados foram positivas para o referido agente. Dos 23 isolados das fórmulas avaliadas, 22 eram idênticas no biótipo, perfil de antibiograma e plasmídico aos 4 isolados clínicos. Desta forma, concluiu-se que as fórmulas infantis deveriam estar relacionadas com a infecção, contudo esta deveria estar associada a outros factores desconhecidos mas que terão contribuído para o desenvolvimento da doença. Um dos factores causais poderá ter sido o facto de os recipientes com a fórmula reconstituída serem deixados em estufas por períodos de tempo indeterminado.

Em locais geograficamente distantes, como Boston (Massachusetts, EUA) e New Orleans (Louisiana, EUA), em 1987 foram referidos dois casos de meningite induzida por *E. sakazakii*. Em ambos os casos, um com 4 semanas e o outro com 8 dias de idade, desenvolveram complicações neurológicas severas. Nenhuma informação em termos de possíveis fontes de contaminação, foi fornecida em ambos os casos.

Em 1988 no Tennessee, EUA, foi reportado um surto de septicémia e meningite por *E. sakazakii* envolvendo 4 recém-nascidos, que surgiu claramente relacionado com as fórmulas infantis em pó, as quais continham *E. sakazakii* e *E. cloacae* em populações de 8 ufc/100g e 48 ufc/100g, respectivamente. A liquidificadora foi indicada como possível fonte de contaminação depois de se ter revelado positiva para *E. sakazakii*, *E. cloacae*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas maltophilia*. Este utensílio era por rotina enxaguado com água potável e limpo manualmente com hexaclorofeno e clorhexidina. A presença de *E. sakazakii* deixou de ser verificada após a descontinuação da utilização da liquidificadora contaminada e adopção de liquidificadoras com componentes esterilizáveis.

Também nos EUA (em Maryland, no ano de 1990) uma criança do sexo feminino desenvolveu septicémia associada a complicações ao nível do intestino delgado. Foram isoladas das amostras clínicas *E. sakazakii* e *Leuconostoc mesenteroides*, bem como da liquidificadora utilizada para a reconstituição da fórmula. Após este caso, o Hospital implementou medidas de controlo da qualidade, nomeadamente a lavagem da liquidificadora e esterilização diária após cada utilização e antes da administração, a fórmula reconstituída passou a ser também pasteurizada. No mesmo ano, no Ohio, EUA, está reportado um caso de uma criança que dois dias após o nascimento apresentou complicações que revelaram, na análise de amostras clínicas o *E. sakazakii*, sendo sujeita a antibioterapia. Depois de 28 dias de tratamento foi-lhe diagnosticado um abscesso intracraniano, tendo sido isolado do líquido drenado *Staphylococcus aureus*.

Nos anos de 1995 e 1996 em Boston, EUA foram descritos 5 casos de infecções causadas por *E. sakazakii*, envolvendo indivíduos de idades variadas, 3, 39, 73, 76 e 82 anos. Estes pacientes tinham em comum o facto de apresentarem um estado de

imunodepressão e estarem a realizar terapêutica apropriada. Apenas os dois pacientes mais jovens sobreviveram com terapia antimicrobiana.

Na Bélgica, em 1998, foi reportado um surto que incluiu 12 indivíduos que apresentavam enterocolite necrosante neonatal, sendo que 2 deles, gémeos e do sexo masculino, acabariam por falecer, apesar de serem assistidos numa unidade de cuidados intensivos. Todos os 12 pacientes haviam sido alimentados com fórmulas infantis reconstituídas. Uma avaliação das embalagens fechadas de fórmulas infantis em pó revelou 14 estirpes de *E. sakazakii*. A tipificação molecular indicou semelhança genética entre as estirpes isoladas dos pacientes e as obtidas das embalagens fechadas de fórmulas infantis. Ainda nos EUA, Carolina do Norte, em 2000 foi descrito um caso de uma menina recém-nascida com 3.3 Kg à nascença, com 35 semanas de gestação e que demonstrou sintomas típicos de infecção por *E. sakazakii*. Este caso foi o primeiro reportado em que o *E. sakazakii* foi isolado directamente do abscesso craniano drenado. Após cinco semanas foi dada alta à criança sem défices neurológicos ou de desenvolvimento aparentes.

Entre Dezembro de 1999 e Janeiro de 2000 foram reportados dois casos de meningite neonatal ocorrida numa unidade hospitalar de cuidados intensivos neonatais em Israel. Em ambos os casos, as crianças apresentavam baixo peso à nascença, 2.1 Kg e 0.6 Kg. A primeira criança, uma menina de termo, saudável e que foi alimentada com fórmulas infantis em pó, desenvolveu complicações 4 dias após o nascimento. A segunda criança nasceu prematura 9 semanas, foi alimentada com fórmulas infantis em pó através de tubo de alimentação entérica. Nove dias após o nascimento, foi-lhe diagnosticado uma hemorragia gastrointestinal e foi isolado *E. sakazakii*. Em ambos os casos, o parto ocorreu via cesariana, logo a contaminação atribuível à passagem pelo canal de nascimento foi excluída. Foram analisadas amostras da liquidificadora e de fórmulas reconstituídas da sala de preparação, as quais se revelaram positivas para *E. sakazakii*. Em Israel foram ainda descritos mais 4 casos, o primeiro em 1993 que envolvia um recém-nascido de termo alimentado com fórmulas; o segundo caso em 1995 numa menina que desenvolveu uma conjuntivite por *E. sakazakii* e cujo parto foi feito via cesareana; o terceiro caso envolveu um menino de 6 anos que havia sido sujeito aos 3 dias a um transplante de medula óssea e tendo sido isolado *E. sakazakii* do catéter de Broviac; o quarto caso, em 1998, envolveu uma menina de 6 dias que após o nascimento desenvolveu meningite por *E. sakazakii*.

Em 2001, no Tennessee, EUA, ocorreu um surto numa unidade de cuidados intensivos neonatais, em que 10 crianças foram positivas para a bactéria e uma morreu vítima de meningite após 9 dias de tratamento antibacteriano. A fonte da bactéria foi uma fórmula infantil em pó especificamente direccionada para indivíduos com problemas nutricionais e de má absorção.

Na Nova Zelândia em 2004, numa unidade de cuidados intensivos neonatais, foi descrita uma infecção fatal afectando um recém-nascido prematuro, que mesmo após

tratamento com antibióticos, veio a falecer ao 18º dia de vida. Este caso foi associado à alimentação do bebé com uma fórmula infantil em pó (Jarvis, 2005). Esta situação levou a que a Nova Zelândia incluísse os casos de infecções invasivas por *E. sakazakii* na lista de doenças notificáveis, alertando para a importância deste agente patogénico oportunista e para o risco a que as crianças vulneráveis se encontram expostas. Em Dezembro do mesmo ano, em França, foram descritos 9 casos de infecções por *E. sakazakii*, tendo ocorrido 2 mortes. Todas as crianças eram prematuras, com excepção de uma que apresentou colite e que tinha 3250 g e tinha nascido com 37 semanas de gestação. Todos estavam a ser alimentados por uma fórmula infantil em pó hipoalergénica, que foi reconhecida como veículo da infecção (Coignard *et al.*, 2006; FAO/WHO, 2006; Ministère des Solidarités, de la Santé et de la Famille, 2004).

## 2.5. Fontes de Contaminação

Apesar de o *E. sakazakii* ter sido isolado em diferentes tipos de alimentos, apenas as fórmulas infantis em pó têm sido implicadas em toxinfecções alimentares (INFOSAN, 2005).

Muytjens *et al.* (1988) analisaram 141 substitutos em pó do leite materno, obtidos de 35 países, e verificaram que 52.5% dos produtos revelavam a presença de microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, tendo o *E. sakazakii* sido detectado em 20 das 141 amostras.

Iversen *et al.* (2004a) analisaram 82 amostras de fórmulas infantis em pó e 404 amostras de outros produtos alimentares para a presença de *E. sakazakii*, *Salmonella* e outras *Enterobacteriaceae*. O *E. sakazakii* foi isolado nas fórmulas (em 2 das 82), em alimentos infantis desidratados (em 5 de 49), no leite em pó (em 3 de 72), em queijos (em 2 de 62) e em vários ingredientes alimentares desidratados, nomeadamente ervas e especiarias (em 40 de 122). Em nenhuma das amostras de fórmulas infantis em pó, alimentos infantis desidratados ou amostras de leite foi detectada *Salmonella*, pelo que Iversen *et al.* (2004a) concluíram que a higiene da produção de fórmulas infantis e de leite em pó quando monitorizada para o controlo da *Salmonella* e a contagem de *Enterobacteriaceae*, pode não permitir o controlo do *E. sakazakii*.

Shaker, Osaili, Al-Omary, Jaradat e Al-Zuby (2007) investigaram a prevalência de *E. sakazakii* e outras espécies pertencentes ao género *Enterobacter* em produtos disponibilizados comercialmente, nomeadamente em alimentos infantis (fórmulas lácteas e não lácteas), cereais, especiarias e açúcar. No que diz respeito às fórmulas infantis, foram identificados, respectivamente, *E. sakazakii*, *E. cloacae* e *E. agglomerans* em 17.4%, 20% e 17.4% das amostras (num total de 23 amostras avaliadas).

Nos ingredientes e matérias-primas utilizados na constituição das fórmulas infantis em pó é passível de se encontrarem bactérias da família *Enterobacteriaceae*, o que é muitas das vezes devido a uma recontaminação após o tratamento térmico, sendo o amido a

principal fonte de contaminação detectada após este tratamento (FAO/WHO, 2004). A Tabela 5 resume a avaliação microbiológica de vários ingredientes utilizados na produção das fórmulas infantis em pó, quer no que respeita a coliformes/enterobactérias, quer *E. sakazakii*.

**Tabela 5. Presença de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *E. sakazakii* em ingredientes usados em formulações infantis em pó (FAO/WHO, 2004)**

Ingrediente	n (10g)	Coliformes ou <i>Enterobacteriaceae</i> positivos	<i>E. sakazakii</i> positivos
Vitaminas	793	8 (1.0%)	0
Leite em pó	835	1 (0.1%)	1 (0.1%)
Sacarose	1691	28 (1.65%)	0
Lactose	2219	70 (3.15%)	2 (0.09%)
Lecitina	136	1 (0.7%)	1 (0.7%)
Amido	1389	155 (11.16%)	40 (2.88%)
Total	7063	263 (3.7%)	44 (0.6%)

As fórmulas infantis em pó reconstituídas têm sido indicadas como fonte de *E. sakazakii* em infecções neonatais. Assim, estes produtos podem ser considerados fontes directas ou indirectas de infecção, dado que podem contribuir como reservatório do *E. sakazakii* no ambiente, e/ou como veículo de infecção. Tendo em conta as linhas orientadoras disponíveis actualmente, estima-se que em 50 a 80% das infecções por *E. sakazakii*, as fórmulas infantis estão envolvidas quer como o veículo quer como fonte de infecção (FAO/WHO, 2004). Segundo a INFOSAN (2005), as fórmulas reconstituídas podem apresentar-se contaminadas através da contaminação intrínseca ou através de contaminação extrínseca. A contaminação intrínseca pode ocorrer pela adição de ingredientes após a desidratação ou então a partir do ambiente de produção após a desidratação – o microrganismo é introduzido durante o processo de produção; a contaminação extrínseca pode ocorrer durante a reconstituição ou pelo manuseamento, por exemplo através de utensílios higienizados deficientemente.

Segundo Iversen e Forsythe (2003), é plausível supor que o *E. sakazakii* ocorra numa grande variedade de alimentos, porém, até ao momento, não há estudos detalhados que o possam comprovar. Destacam que os levantamentos existentes provavelmente subestimam a prevalência e a concentração de *E. sakazakii* nos alimentos. Neste sentido, existem relatos do isolamento de *E. sakazakii* em leite, queijo, pão fermentado, tofu, chá azedo, carnes curadas, carne moída, pescado e pão do tipo Khamir (o organismo faz parte da microbiota superficial da semente de sorgo e também da semente de arroz) e também em cereais, frutos e produtos hortícolas, leguminosas, especiarias (Gurtler *et al.*, 2005).

Com efeito, quer alimentos crus, como processados (alimentos frescos, congelados, prontos-a-comer, fermentados e cozinhados, bem como bebidas e água utilizadas na preparação dos alimentos), podem estar contaminados com *E. sakazakii* (Friedemann, 2007).

É conhecida a presença de *Enterobacter* no ambiente, tendo algumas espécies sido isoladas frequentemente a partir do solo, água, animais e amostras de fezes humanas (Sakazaki citado por Gurtler *et al.*, 2005). No que concerne especificamente ao *E. sakazakii*, Iversen e Forsythe (2003) relataram ainda outras fontes ambientais das quais este microrganismo tem sido isolado, e que incluem, o ar e o material hospitalar. Estes autores referem que além destas fontes ambientais principais, pode ocorrer contaminação secundária a partir de vectores, tais como roedores e insectos. A este respeito, Hamilton, Lehane e Braig (2003) isolaram o *E. sakazakii* a partir do intestino da larva da mosca do estábulo, *Stomoxys calcitrans*, sugerindo que poderá ser um reservatório para a bactéria. A mosca dos estábulos alimenta-se de sangue dos animais, domésticos e selvagens, bem como do Homem, mas é mais frequentemente encontrada nas proximidades das vacarias, tornando a contaminação do leite uma possibilidade. A *S. calcitrans* apresenta uma distribuição global, podendo ser encontrada em todos os países em que houve registo de infecções por *E. sakazakii*.

Kandhai, Reij, Gorris, Guillaume-Gentil e van Schothorst (2004) analisaram um total de 147 amostras do ambiente de fábricas produtoras de leite em pó, cereais, chocolate e massas, para a presença de *E. sakazakii* e outras bactérias do género *Enterobacter*. O *E. sakazakii* foi isolado a partir de 35 das amostras avaliadas. A presença deste microrganismo em unidades produtoras de leite em pó, cereais, chocolate, massas, bem como ambientes domésticos e hospitalares, reforçam a ideia da larga disseminação deste agente (Iversen & Forsythe, 2003). É sugerido, que a dispersão do *E. sakazakii* seja tida em conta na elaboração de medidas preventivas de controlo (Kandhai *et al.*, 2004).

Iversen e Forsythe (2003) sugeriram que a produção de cápsula pelo *E. sakazakii* poderá aumentar a sua capacidade para aderir às superfícies e formar biofilmes. Estes autores estudaram a formação de biofilmes pelo *E. sakazakii* encontrado em fórmulas lácteas infantis e verificaram que a bactéria aderiu e desenvolvia-se de forma mais acentuada no silicone, látex e policarbonato do que no aço inoxidável; uma estirpe encapsulada formou biofilmes mais densos que uma não encapsulada. Assim, a formação de biofilmes poderá originar um aumento na resistência aos agentes de limpeza e desinfectantes, conferindo ao *E. sakazakii* a capacidade de se manter nos ambientes de produção.

Da mesma forma que ocorre na indústria ou nas unidades hospitalares na reconstituição das fórmulas, os biofilmes de *E. sakazakii* também podem formar-se no ambiente doméstico. Daí que Iversen, Lane e Forsythe (2004c) recomendem que todos os utensílios e recipientes utilizados na preparação e administração das fórmulas sejam limpos logo após a sua utilização, eliminando ou minimizando a formação de biofilmes.

### 3. *Enterobacter sakazakii* e as fórmulas lácteas infantis em pó

#### 3.1. Inativação do *E. sakazakii* presente em fórmulas infantis em pó

O número relativamente elevado de espécies de *Enterobacter* em fórmulas infantis em pó foi explicado por alguns autores como resultado da resistência térmica apresentada por algumas espécies deste género (Gurtler *et al.*, 2005). Isto implica que a termotolerância do *E. sakazakii* seja um importante factor de risco para a infecção em humanos, com implicações importantes para a higiene alimentar (Asakura, Morita-Ishihara, Yamamoto, & Igimi, 2007).

Nazarowec-White & Farber (1997c) determinaram a resistência térmica a 52, 54, 56, 58 e 60 °C de um conjunto de 10 estirpes de *E. sakazakii* (5 isolados clínicos e 5 de alimentos) em fórmulas infantis em pó reconstituídas. Os valores D (tempo de redução decimal) para cada temperatura foram respectivamente, 54.8, 23.7, 10.3, 4.2 e 2.5 minutos. Tendo em conta estes resultados, foi possível concluir que o *E. sakazakii* é um dos membros mais termotolerantes da família *Enterobacteriaceae* encontrados nos produtos lácteos.

Segundo Breeuwer, Lardeau, Peterz e Joosten (2003), a capacidade de sobrevivência das células de *E. sakazakii* a temperaturas da ordem dos 45 °C, bem como a sua capacidade de crescimento a 47 °C é sinónimo de que nos ambientes quentes e secos, como o que se verifica nos secadores industriais, o *E. sakazakii* assume uma vantagem competitiva sobre os restantes membros da família *Enterobacteriaceae*, tendo a trealose um papel fundamental, dado que estabiliza a membrana dos fosfolípidos e proteínas, conferindo uma resistência especial perante o stress osmótico e hidrostático. Os mesmos autores testaram “in vitro” a resistência osmótica do *E. sakazakii* a uma actividade de água ( $a_w$ ) igual a 0.934 (em caldo BHI suplementado com 40% de sorbitol) e a 45 °C e constataram que o microrganismo é mais resistente que a *Salmonella* Senftenberg, a *Salmonella* Typhimurium e a *Salmonella* Enteritidis. Desta forma, os autores, sugeriram que a resistência osmótica do *E. sakazakii* poderá aumentar o risco do microrganismo se tornar dominante no ambiente, aumentando assim a probabilidade de contaminação pós-processamento. Com efeito, o *E. sakazakii* parece ter uma capacidade invulgar de sobrevivência quando exposto a condições de desidratação. Iversen e Forsythe (2003) especularam que a sua sobrevivência nestas

condições por períodos de até 2 anos pode ser atribuída à formação de cápsula. Breeuwer *et al.* (2003) descreveram a resistência do *E. sakazakii* sob condições de osmolaridade elevada e avaliaram os mecanismos que as bactérias utilizam para alcançarem essa condição. É conhecido que as bactérias evitam a desidratação intercelular através do acumulação interna de iões (por exemplo, K<sup>+</sup>) bem como de solutos (por exemplo, a trealose e a prolina) que podem contribuir para aumentar a osmolaridade intracelular e uma quantidade de água em torno das macromoléculas (Gurtler *et al.*, 2005).

Asakura *et al.* (2007) avaliaram ao nível da expressão molecular a tolerância térmica do *E. sakazakii*, verificando que a expressão do gene *infB* (*translation initiation factor*) pode facilitar a detecção selectiva e a quantificação da tolerância térmica do *E. sakazakii* isolado de alimentos e do ambiente, o que pode ser uma ferramenta importante na identificação de fontes de contaminação nas indústrias das fórmulas infantis em pó. Contudo, e apesar das diferenças nos padrões de expressão génica associadas às desigualdades na resistência térmica, não conseguiram identificar uma relação clínica entre a magnitude da resistência térmica e a severidade da doença nos humanos.

Vários estudos avaliaram os efeitos do aquecimento através de microondas sobre a destruição de microrganismos no leite. Pensa-se que o mecanismo pelo qual as microondas causam a morte de células microbianas envolva efeitos térmicos, bem como efeitos decorrentes da acção da radiação electromagnética (Gurtler *et al.*, 2005). Kindle, Busse, Kampa, Meyer-Koenig e Daschner (1996), avaliaram os efeitos causados pelas microondas no *E. sakazakii*, através de uma estirpe de referência (ATCC 29544) e de duas outras estirpes. As células foram inoculadas numa população de 5 log ufc/mL, em cinco fórmulas infantis em pó reconstituídas. Estes produtos foram aquecidos até aos primeiros sinais de ebulição, em seguida arrefecidos e analisados quanto à população de células sobreviventes. Quatro das cinco amostras foram negativas para *E. sakazakii* depois da aplicação das microondas e uma fórmula continha 20 ufc/mL. Os autores sugerem que as desigualdades ao nível da composição da fórmula podem justificar as diferenças na taxa de inactivação do microrganismo. A eficácia do efeito bactericida das microondas no leite é a base para recomendar a sua utilização como método de aquecimento das fórmulas infantis em pó reconstituídas. Kindle *et al.* (1996) relataram que temperaturas de 82-93 °C durante 85-100 segundos aplicadas em fórmulas infantis, podem alcançar um efeito letal sobre o *E. sakazakii*. Contudo, devido ao perigo potencial de acidentes por queimaduras, foi sugerido que uma temperatura de 70 °C na rehidratação garantiria, virtualmente, a ausência de *E. sakazakii* (Edelson-Mammel & Buchanan, 2004).

A esterilização do produto final enquanto pó parece apenas possível utilizando a irradiação. No entanto, a tecnologia actualmente disponível não parece ser viável, relativamente às doses de irradiação que é provável serem necessárias para inactivar o *E. sakazakii* quando presente nas fórmulas em pó, uma vez que provocam a deterioração do produto no que diz respeito às suas características organolépticas.

Osaili, Shaker, Al-Hasan, Ayyash e Martin (2007) investigaram a viabilidade da utilização da radiação gama na inactivação de estirpes de *E. sakazakii* em fórmulas infantis desidratadas e reconstituídas. Estes autores verificaram que o valor  $D_{10}$  (dose de irradiação necessária para inactivar 90% da população bacteriana) variou de 0.21 kGy a 0.29, 0.24 a 0.37 kGy, e 1.06 a 1.71 kGy em caldo BHI, fórmulas reconstituídas, e fórmulas desidratadas, respectivamente. Embora a sensibilidade das estirpes de *E. sakazakii* à radiação ionizante no caldo BHI e nas fórmulas reconstituídas seja semelhante, todas as estirpes de *E. sakazakii* apresentaram valores mais elevados de valor  $D_{10}$  nas fórmulas reconstituídas que no caldo BHI. Esta situação pode ser justificada pelo efeito protector das proteínas, gorduras e carboidratos existentes nas fórmulas reconstituídas, estando esta situação relacionada com a concorrência entre os componentes alimentares e os microrganismos para a interacção com os radicais oxidativos formados durante a irradiação, reduzindo assim o efeito dos danos causados por esta e tornando os organismos mais resistentes às radiações ionizantes. O valor  $D_{10}$  nas fórmulas desidratadas foram superiores aos verificados no caldo BHI e nas fórmulas reconstituídas cerca de 3 a 7 vezes, o que é explicado pelos autores pelo facto de que o caldo BHI e as fórmulas reconstituídas conterem níveis elevados de água, que são causas indirectas de danos aos ácidos nucleicos das células microbianas através da formação de radicais oxidativos formados a partir da hidrólise da água. Sendo aceite que uma infecção por via oral requer uma dose de  $10^3$  células e que o nível de contaminação por *E. sakazakii* é inferior a  $10^2$  ufc/100 g de fórmula desidratada (Iversen & Forsythe, 2003), a utilização de radiação ionizante para reduzir o nível de *E. sakazakii* em 3 log nas fórmulas desidratadas é recomendada neste estudo, sendo sugerida uma dose de, pelo menos, 5.13 kGy. Assim, a radiação ionizante é capaz de inactivar o *E. sakazakii* quer nas fórmulas reconstituídas, quer nas desidratadas e pode servir como um ponto crítico de controlo enquadrado num sistema HACCP e desta forma garantir a segurança microbiológica destes produtos.

Uma série de outras tecnologias, como a utilização de ultra-pressão e campos magnéticos, podem ser potenciais candidatos para a inactivação deste agente patogénico, contudo estas novas metodologias estão numa fase inicial de desenvolvimento e actualmente nenhum destes equipamentos é adequado para alimentos secos. Assim, é peremptório que seja desenvolvida investigação neste domínio, a fim de se obter mecanismos que permitam um efeito letal sobre o *E. sakazakii* quando presente nas

fórmulas infantis, atendendo a que a maior dificuldade a considerar na avaliação do potencial dos tratamentos, para inactivar os agentes patogénicos nas fórmulas infantis em pó, é o comportamento das células vegetativas nos produtos secos (FAO/WHO, 2004).

### **3.2. Reconstituição, armazenamento e utilização das fórmulas infantis em pó**

Com o intuito de verificar as práticas de utilização das fórmulas infantis em pó, a FAO/WHO (2006) desenvolveu um questionário para hospitais e organizações consumidoras destes produtos. Da informação analisada, verificaram que existe uma grande variabilidade nos métodos usados na sua preparação, armazenamento e utilização.

No que diz respeito ao armazenamento de fórmulas em pó cujos recipientes se encontram abertos, Edelson-Mammel e Buchanan (citados por FAO/WHO, 2004) estudaram a sobrevivência a longo prazo do *E. sakazakii* em fórmulas infantis em pó. Assim, aproximadamente ao longo de ano e meio, periodicamente, amostras da fórmula armazenada, e inicialmente contaminadas com uma população de  $10^6$  ufc/mL de *E. sakazakii* (quando reconstituído) eram colhidas, hidratadas, e posteriormente determinado o nível de células viáveis. Durante esse período, a fórmula infantil não reconstituída foi armazenada à temperatura ambiente. Durante os primeiros 5 meses de armazenamento, o nível de *E. sakazakii* diminuiu aproximadamente 2.5 log (de 6.0 log ufc/mL para 3.5 log ufc/mL), a uma taxa de aproximadamente 0.5 log por mês. Ao longo do ano subsequente, o nível de viabilidade do *E. sakazakii* declinou adicionalmente 0.5 log para aproximadamente 3.0 log ufc/mL. Estes resultados demonstram claramente que o *E. sakazakii* pode sobreviver por longos períodos nas fórmulas infantis em pó.

Pouco se sabe sobre o que acontece às fórmulas lácteas em pó que apresentam uma contaminação intrínseca e uma vez abertas e armazenadas a elevada temperatura e humidade. A informação disponível actualmente indica que o teor de humidade a que as fórmulas podem ser submetidas não aumentará de forma tal que permita o crescimento intrínseco dos potenciais contaminantes (FAO/WHO, 2004).

A rotulagem das fórmulas infantis em pó é muito abrangente, por regra, com elementos de informação, aconselhamento e advertências. O Codex Alimentarius sugere que sejam incluídos na rotulagem destes produtos a lista completa de ingredientes e características nutricionais; conselhos sobre a alimentação de lactentes (por exemplo, "a amamentação é o melhor para o seu filho"); alertas sobre as consequências de uma alimentação inadequada dos lactentes; e recomendações para a preparação e armazenamento do produto tal como é vendido, aberto e após preparado. As recomendações para a preparação de fórmulas infantis, fórmulas especiais com fins médicos destinadas a lactentes e fórmulas de transição no ambiente doméstico, idealmente, deverão ser pormenorizadas e frequentemente acompanhadas de ilustrações. A rotulagem

das fórmulas para fins medicinais específicos tem de conter, além do que já foi referido, informações detalhadas sobre o produto, nomeadamente o que o torna especial, o que lhe confere a indicação para que é apresentado, para que doença, desordem ou condição médica é destinado, se existem interacções com fármacos e deve ser incluída uma advertência de que o produto não se destina a ser ingerido por pessoas saudáveis e que só deve ser utilizado sob supervisão médica (FAO/WHO, 2004).

Em casa, os fabricantes recomendam que a fórmula deva ser preparada antes de cada alimentação usando água fervida. Sugerem que depois de a água ter sido fervida se arrefeça antes da adição da quantidade do produto em pó indicada. As razões para a recomendação do arrefecimento da água prendem-se com vários aspectos, dos quais em primeiro lugar, ocorrerem perdas de alguns nutrientes termossensíveis, especialmente perda de vitamina C (num estudo realizado pela FAO/WHO (2006) verificou-se que a utilização de água fervente implica uma redução nos níveis de vitamina C entre 5.6 a 65.6%); em segundo lugar, em algumas fórmulas pode ocorrer a aglomeração do pó, após reconstituição com água quente; pode verificar-se também a activação de esporos de *Bacillus cereus* ou de outras bactérias eventualmente presentes nas fórmulas; e finalmente, existe a possibilidade de que a utilização da água a temperaturas elevadas possa levar ao aumento da incidência de queimaduras, tanto nas crianças como nos preparadores das fórmulas (principalmente quando o aquecimento é feito de forma inadequada em fornos microondas) (Baker, 2002; FAO/WHO, 2006).

Após a correcta reconstituição da fórmula, esta deve ser administrada imediatamente à criança. O reaquecimento deve ser desencorajado. Por razões práticas, os pais poderiam ser tentados a preparar todas as tomas necessárias para um dia. Neste caso, um arrefecimento rápido da fórmula preparada e o armazenamento a temperatura baixa são factores importantes no que se refere à segurança microbiológica da fórmula reconstituída.

No caso dos hospitais, as práticas variam de acordo com a disponibilidade de pessoal treinado, bem como de instalações e equipamentos. Quer para a utilização de fórmulas prontas-a-comer ou de fórmulas em pó, reconstituídas nas enfermarias, é essencial garantir a disponibilidade de água segura e condições assépticas para a preparação. O transporte sob refrigeração das fórmulas prontas-a-comer para as enfermarias e a refrigeração na enfermaria até ao momento da administração são factores importantes a controlar (FAO/WHO, 2004; Food and Drug Administration [FDA], 2002a).

As crianças que coordenam a sucção, a deglutição e a respiração recebem a fórmula do biberão. Dado que, o momento da alimentação pode, por vezes, prolongar-se, o reaquecimento deve ser evitado. Em todos os casos, a fórmula remanescente deve ser descartada. No caso dos bebés prematuros ou doentes e que não apresentem coordenação da sucção/deglutição, a alimentação é feita por meio de tubo naso ou orogástrico, ou por tubo de gastrotomia. Devem ser praticados determinados procedimentos de forma a garantir

a higiene destes tubos, que pode ser feita fazendo passar pelo tubo, depois de cada alimentação, soluções estéreis de forma a reduzir a contaminação microbiana e a formação de biofilmes no interior destes sistemas de distribuição (FAO/WHO, 2006).

No que concerne ao armazenamento e manuseamento de fórmulas preparadas, Nazarowec-White e Farber (1997b) relataram que o crescimento mínimo do *E. sakazakii* em BHI ocorre a temperaturas na ordem dos 5.5 a 8 °C; e verificaram que as células bacterianas começaram a morrer lentamente a temperaturas inferiores a 4 °C. Além disso, as temperaturas de crescimento máximo para isolados clínicos e de alimentos variaram de 41 a 45 °C. Estes resultados têm, também, implicações no enriquecimento de caldos que têm uma incubação recomendada a uma temperatura de 45 °C.

Iversen *et al.* (2004c) mediram a taxa de crescimento de *E. sakazakii* nas fórmulas infantis em pó. O tempo de geração para o *E. sakazakii* nas fórmulas foi de 13.7 horas, 1.7 horas e 19-21 minutos, respectivamente, a 6, 21 e 37 °C. Portanto, é evidente que um armazenamento inadequado das fórmulas em pó reconstituídas, e que estejam contaminadas pode conduzir a um rápido crescimento deste agente patogénico. É importante salientar que a adição – quer nos hospitais, quer em casa – de ingredientes como amidos ou açúcar às fórmulas, pode apresentar um risco de contaminação do produto, uma vez que, tal como já foi referido, tais produtos evidenciaram níveis de contaminação por *E. sakazakii*, pelo que é importante a exigência do cumprimento dos mesmos requisitos que para as fórmulas infantis em pó (FAO/WHO, 2004).

Muitos consumidores, incluindo aqueles directamente envolvidos no cuidado de crianças, não estão conscientes de que as fórmulas infantis em pó não são um produto estéril e que podem estar contaminadas com agentes patogénicos que podem causar doenças graves, e que a falta de informação sobre como manipular, armazenar e preparar estes produtos influencia o risco de doença. Assim, o desenvolvimento de esforços na comunicação eficaz dos riscos, tanto para a opinião pública como para os profissionais da saúde são imperativos.

### 3.3. Presença e comportamento do *E. sakazakii* e de outros microrganismos nas fórmulas infantis

O leite de vaca, bem como alguns produtos lácteos, são fontes potenciais de bactérias patogénicas para o Homem. Tendo em conta que a maioria das fórmulas disponíveis no mercado utilizam como base da sua produção o leite de vaca e de outros mamíferos, a fim de substituir o leite humano, torna-se importante perceber quais os principais microrganismos que podem ser encontrados no leite de vaca e em alguns dos seus derivados. Os microrganismos mais frequentemente encontrados no leite cru são coliformes e outras bactérias Gram negativas, que podem estar associadas a práticas de processamento não higiénicas; bactérias psicrotróficas e termodúricas, que podem sobreviver ao processo de pasteurização; bactérias formadoras de esporos; agentes patogénicos causadores de mastite e diversos fungos e leveduras (Hayes & Boor, 2001). O leite em pó e outros produtos lácteos que se encontrem sob a forma de pó são menos perecíveis que o leite cru. Contudo, alguns microrganismos patogénicos que conseguem sobreviver ao processo tecnológico de produção de leite em pó, podem estar presentes neste produto e vir a multiplicar-se quando reconstituído, ameaçando a saúde daqueles que o irão consumir (Clark, 2001). Entre os microrganismos que fazem parte da flora típica dos leites em pó podem referir-se os micrococcos, estreptococos e microrganismos aeróbios formadores de esporos, como o *Bacillus cereus*. Os microrganismos que habitualmente estão envolvidos em situações de doença cujo veículo é o leite em pó são a *Salmonella*, a *Listeria monocytogenes*, o *Staphylococcus aureus*, o *Bacillus cereus* e o *Enterobacter sakazakii* (ICMSF, 2002). Com efeito, as fórmulas infantis em pó são frequentemente avaliadas para a presença de *Salmonella*, de *Listeria monocytogenes*, de *Staphylococcus aureus*, de *Bacillus cereus*, assim como *Clostridium perfringens*, para a presença de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e a contagem de aeróbios mesófilos (Forsythe, 2005). Desta forma, o leite em pó, e nomeadamente as fórmulas infantis em pó, são considerados produtos com algum grau de risco para a saúde pública, essencialmente devido ao facto de que na maioria das vezes são consumidos após a reconstituição e sem nenhum tratamento térmico adicional, que garanta de alguma forma a segurança destes produtos ao nível microbiológico. Daí que tenham sido reportados alguns surtos incriminando estes géneros alimentícios (Ikeda, Tamate, Yamaguchi, & Makino, 2005).

### **3.3.1. Microrganismos indicadores nas fórmulas infantis em pó**

Os microrganismos indicadores são espécies ou grupos de microrganismos que quando presentes num alimento indicam a deterioração potencial do alimento, a possível ocorrência de microrganismos patogénicos (nos casos em que há uma relação entre a ocorrência de um organismo indicador e a provável presença de um agente patogénico ou toxina), ou conferem informações sobre as condições higiénico-sanitárias durante a preparação, armazenamento e distribuição dos alimentos. Os grupos de microrganismos que são mais utilizados como indicadores são os coliformes totais e fecais, *Enterococcus* fecais, *Escherichia coli* e *Enterobacteriaceae* (Griffiths, 2000), sendo além destes dois últimos também abordados os microrganismos aeróbios mesófilos.

#### **3.3.1.1. Microrganismos aeróbios mesófilos**

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, em placas, é frequentemente utilizada para determinar a carga microbiana total do alimento. Esta contagem engloba os microrganismos cujo intervalo de temperatura óptima de crescimento se situa entre 30 e 40 °C. A contagem destes microrganismos pode ser utilizada como um indicador da qualidade em termos de higiene de um alimento, da aplicação de boas práticas de manipulação e das condições de higiene dos equipamentos e utensílios. Contagens elevadas deste grupo de microrganismos podem indicar falhas nos procedimentos de higiene durante a manipulação, ou uso de ingredientes contaminados. A isto exclui-se alguns tipos de alimentos, como os fermentados, os quais, devido ao seu processo tecnológico, apresentam uma elevada contagem. Para alimentos não fermentados e que sofreram tratamento térmico, como as fórmulas infantis em pó, a avaliação deste parâmetro tem grande relevância quando nenhum resultado é encontrado para avaliações mais específicas de microrganismos patogénicos. Assim, em alimentos não perecíveis, como as fórmulas infantis em pó, a contagem elevada deste grupo de microrganismos indica o uso de matérias-primas contaminadas ou então, deve-se a um processamento inadequado do ponto de vista higiénico. Em alimentos perecíveis, como as fórmulas infantis reconstituídas, indica uma possível contaminação durante a preparação ou condições de tempo/temperatura de armazenamento inadequadas (Forsythe, 2005).

#### **3.3.1.2. Bactérias da família *Enterobacteriaceae***

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são bacilos Gram negativos e que podem ser encontrados numa diversidade de locais, fazendo parte da flora intestinal de animais e humanos, mas também do solo; nem sempre constituem uma ameaça, em termos de saúde pública. Alguns dos géneros incluídos neste grupo são *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, e *Enterobacter*. A presença de um número considerável de bactérias

pertencentes a esta família em produtos processados pode indicar um processamento inadequado e/ou que após o processamento tenha ocorrido uma recontaminação, ou então que o armazenamento tenha sido feito sob condições que favoreceram o crescimento dos microrganismos remanescentes (Forsythe, 2005).

### **3.3.1.3. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é considerada o melhor indicador de contaminação fecal, sendo utilizada para determinar a probabilidade de existência de microrganismos patogénicos com origem em material fecal animal ou humano, sendo também um agente responsável por toxinfecções alimentares. Assim, consideram-se quatro grupos patogénicos principais de bactérias da espécie *E. coli*, o enteropatogénico (EPEC), o enterotoxigénico (ETEC), o enteroinvasivo (EIEC) e o produtor de vero-citotoxina (VTEC). Este microrganismo caracteriza-se por ser uma bactéria Gram-negativa, com forma de bastonete, móvel, anaeróbia facultativa, fermentadora da glucose e lactose e produtora de indol. O seu crescimento ocorre entre os 15 °C e os 45 °C, sendo a 37 °C a temperatura óptima de desenvolvimento. Afecta, principalmente, crianças e quando encontrada em alimentos sugere falta de higiene (Willshaw, Cheasty, & Smith, 2000).

## **3.3.2. Microrganismos patogénicos nas fórmulas infantis em pó**

### **3.3.2.1. *Salmonella* spp.**

A *Salmonella* apresenta-se como o agente implicado como primeira causa nos casos de toxinfecções alimentares reportados na Europa, e como o segundo agente zoonótico causador de doença em humanos, apesar do decréscimo na sua incidência, nos últimos três anos (European Food Safety Authority [EFSA], 2007). Foram descritos pelo menos seis surtos de salmonelose associada à ingestão de fórmulas infantis em pó, com localizações tão díspares como, o Canadá, França, Coreia do Sul, Espanha, Reino Unido e Estados Unidos da América, como resume a Tabela 6 (FAO/WHO, 2004; FAO/WHO, 2006).

Os microrganismos pertencentes ao género *Salmonella* são bacilos Gram negativos, da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. São capazes de produzir ácido e em alguns casos gás a partir da glucose e a maioria tem como principal reservatório o tracto gastrointestinal de animais homeotérmicos.

**Tabela 6. Surtos de salmonelose associados à ingestão de fórmulas infantis em pó (FAO/WHO, 2006)**

<i>Salmonella</i> (serótipo)	Nº crianças afectadas	Veículo	Localização	Ano
Ealing	48	FIP	Reino Unido	1985
Tennessee	≥ 3	FIP	EUA, Canadá	1993
Virchow	48	FIP	Espanha	1994
Anatum	17	FIP	Reino Unido, França	1996-7
London	30	FIP	Coreia do Sul	2000
Total	146			

FIP = Fórmula infantil em pó

As bactérias pertencentes a este género apresentam oxidase negativa e catalase positiva, e utilizam o citrato como fonte de carbono, geralmente produzindo sulfureto de hidrogénio, descarboxilam a lisina e a ornitina, e não hidrolisam a ureia. Um isolado típico de *Salmonella* produz ácido e gás a partir da glucose no meio *triple sugar iron agar* (TSI) e não utiliza a lactose ou a sacarose no mesmo meio de cultura.

**Figura 1. Meio de cultura TSI inoculado com *Salmonella* – não fermentação da lactose/sacarose; glucose e sulfureto de hidrogénio positivo**



Contudo, surgem como uma ameaça à saúde pública a ocorrência de biótipos em que há a utilização da lactose e da sacarose, o que pode levar a que facilmente estas salmonelas atípicas em termos bioquímicos escapem aos meios de detecção em placa que habitualmente são utilizados. Verifica-se actualmente uma progressiva substituição dos métodos tradicionais de detecção de *Salmonella* por tecnologias moleculares, que se revelam mais eficientes. Relativamente à classificação taxonómica do género *Salmonella*, têm sido associados diversos esquemas taxonómicos baseados em características

bioquímicas e serológicas, bem como na homologia em termos de ADN. Desta forma, a nomenclatura actualmente mais usada sugere o género *Salmonella* apresentando duas espécies, a *Salmonella enterica* e a *S. bongori*, contendo cada uma delas vários serovares, como evidencia a Tabela 7 (D'Aoust & Maurer, 2007).

**Tabela 7. Espécies e sub-espécies do género *Salmonella* (D'Aoust & Maurer, 2007)**

Espécies de <i>Salmonella</i> e subespécies	Nº de serovares
<i>S. enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	1504
<i>S. enterica</i> subesp. <i>salamae</i> (II)	502
<i>S. enterica</i> subesp. <i>arizonae</i> (IIIa)	95
<i>S. enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	333
<i>S. enterica</i> subesp. <i>houtenae</i> (IV)	72
<i>S. enterica</i> subesp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i>	22
<b>Total</b>	<b>2541</b>

### 3.3.2.2. *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é um bacilo Gram positivo, produtor de esporos, e que pertence à família *Bacillaceae*; tem como reservatório natural o solo e apresenta uma distribuição ubiqüitária na natureza. Dada a sua presença ampla e generalizada no ambiente, pode ser isolado de uma grande variedade de matérias-primas e alimentos processados (Rajkowski & Bennett, 2003). Nos últimos anos tem-se assistido ao aumento da sua importância enquanto agente oportunista, nomeadamente em doentes críticos, imunocomprometidos e pacientes debilitados (Hilliard, Schelonka, & Waites, 2003).

O isolamento de níveis elevados de *B. cereus* tem sido relacionado com situações de intoxicação alimentar. Apesar de esta espécie ser a mais associada a toxinfecções alimentares, outras pertencentes ao mesmo género, como o *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, e *B. brevis* também foram relacionados com alguns surtos. O *B. cereus* pode causar duas formas distintas de gastroenterite: a síndrome diarreica e a síndrome emética (Jackson, 1993). A síndrome diarreica é causada por proteínas de elevado peso molecular, sensíveis a pH inferior a 4.0, sensíveis à tripsina e pronase, e termossensíveis, podendo ser inactivadas se submetidas a uma temperatura de 55 °C durante 20 minutos. Apesar das inúmeras pesquisas realizadas com o objectivo de isolar e caracterizar estas enterotoxinas diarreicas, são conhecidas actualmente, apenas quatro delas: a hemolisina BL (componentes B, L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>), a enterotoxina não-hemolítica, a enterotoxina K e a enterotoxina T. As três primeiras já foram identificadas em surtos alimentares. A toxina envolvida na síndrome emética apresenta diferenças relativamente às primeiras no que respeita ao tipo e

ao peso molecular. Esta toxina é altamente resistente ao calor (a sua actividade não cessa após aquecimento a 120 °C durante 1 hora). A síndrome emética está mais associada a alimentos amiláceos, principalmente arroz (Schoeni & Wong, 2005).

O controlo do *B. cereus* na indústria de produtos lácteos, pode envolver algumas dificuldades dada a sua capacidade de esporulação e por ser um contaminante potencial do leite e do ambiente. Dado que os esporos do *B. cereus* são hidrofóbicos, favorece a formação de biofilmes nas superfícies de contacto com alimentos, sendo a sua remoção difícil através dos procedimentos habituais de higienização. A pasteurização não é suficiente na eliminação deste agente patogénico uma vez que os esporos são termorresistentes. A presença de esporos de *B. cereus* no ambiente de manipulação de uma sala de reconstituição de fórmulas infantis é crítica, uma vez que quando inseridos nas fórmulas reconstituídas podem ser activados com o aquecimento realizado antes do consumo, e as células vegetativas podem atingir contagens elevadas caso o alimento não seja consumido logo após a reconstituição. O leite cru pode ser contaminado por diversas fontes de esporos de *B. cereus* incluindo o solo, o feno e os equipamentos da ordenha, podendo continuar presente nos produtos lácteos, como leite em pó e fórmulas infantis, quando o tratamento térmico não for suficiente para destruir os esporos (Hilliard *et al.*, 2003).

### **3.3.2.3. *Staphylococcus aureus***

O crescimento e a proliferação de *Staphylococcus aureus* nos alimentos constitui um perigo potencial para a saúde dos consumidores dado que muitas estirpes de *S. aureus* produzem enterotoxinas altamente resistentes ao calor, que são capazes de causar doença nos humanos (Bennett & Monday, 2003).

As bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, e quando visualizados ao microscópio, surgem com a forma de cachos, imóveis e não produzem esporos. A distribuição do *S. aureus* é ubiqüitária, tendo sido isolado a partir do ar, poeira, água e superfícies de equipamentos. O Homem, ao nível da cavidade nasal, cavidade orofaríngea, cabelo, pele e feridas, bem como os animais, constituem os reservatórios primários deste agente patogénico, razão pela qual os manipuladores são considerados a principal fonte de contaminação dos alimentos (Baird-Parker, 2000).

Dos diversos metabolitos produzidos por este microrganismo, as enterotoxinas representam o maior perigo para a saúde do consumidor. As enterotoxinas são proteínas produzidas por algumas estirpes de *S. aureus*, e no caso de estes microrganismos encontrarem condições propícias ao seu crescimento, podem produzir enterotoxina suficiente para causar a doença quando os alimentos consumidos se apresentam contaminados. São resistentes às enzimas proteolíticas, como a tripsina e pepsina, o que as torna resistentes e capazes de ultrapassar a barreira gástrica e migrar pelo tracto digestivo até ao local de acção. Acredita-se que são necessários níveis de *S. aureus* superiores a 10<sup>6</sup>

ufc em alimentos para que a enterotoxina seja formada em quantidade capaz de provocar intoxicação alimentar (Bennett & Monday, 2003).

As enterotoxinas estafilocócicas são identificadas através de reacções com anticorpos específicos e são denominadas por letras maiúsculas. Actualmente são conhecidas 18: A, B, C (subdividida em C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>), D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R e U. As enterotoxinas que mais frequentemente são implicadas em surtos são a A e a D (Jay, Loessner, & Golden, 2005).

Apesar das enterotoxinas serem produzidas principalmente pelas espécies de estafilococos coagulase positiva, como é o caso do *S. aureus*, algumas espécies coagulase negativa, envolvidas em diversas infecções no homem e nos animais, também têm mostrado a capacidade de produzir enterotoxinas. Apesar de essas espécies raramente estarem relacionadas com doenças de origem alimentar, podem facilmente contaminar um alimento, pois o Homem é portador desses microrganismos. Assim, proteínas semelhantes são produzidas pelo *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*. *S. aureus* é distinguido das outras espécies de estafilococos pela combinação das seguintes características: a morfologia das colónias e a sua pigmentação, a produção de coagulase, de termonuclease, acetona,  $\beta$ -galactosidase, fosfatase e  $\alpha$ -toxina (hemolisina), ácido a partir de manitol, maltose, xilose, sacarose, e trealose, resistência à novobiocina, a presença de ácido teicóico ribitol, proteína A, e factor agregante na parede celular. A identificação final de cada espécie pode ser estabelecida por hibridação ADN-ADN com estirpes de referência (Jay *et al.*, 2005).

Os alimentos que frequentemente estão associados a intoxicações alimentares por estafilococos incluem a carne e produtos à base de carne, saladas, produtos de panificação com cremes, e os produtos lácteos. O leite cru e os produtos lácteos não pasteurizados podem conter um grande número de *S. aureus*, geralmente como resultado de mastites. Assim, a falta de controlo da temperatura durante o armazenamento do leite cru ou durante o processo de desidratação, pode permitir a multiplicação de *S. aureus* e a produção de toxinas, as quais resistem ao processo subsequente de secagem, aumentando assim o potencial de, enquanto matéria prima das fórmulas infantis em pó, virem a causar doença (Forsythe, 2005).

#### **3.3.2.4. *Listeria monocytogenes***

A *Listeria monocytogenes* é uma de seis espécies do género *Listeria*, que inclui ainda a *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. Os microrganismos do género *Listeria*, são Gram-positivos, anaeróbios facultativos, em forma de bastonete e móveis por flagelos, ubiqüitários e psicrotróficos. Pensa-se que os casos de listeriose são subavaliados, sendo geralmente mais frequentes nos países industrializados. A maioria dos casos acontece, essencialmente, em indivíduos com algum grau de imunossupressão (Farber & Peterkin, 2000).

### **3.4. Processamento industrial das fórmulas infantis em pó**

A matéria-prima utilizada, geralmente, na preparação das fórmulas infantis em pó, é o leite de vaca, o qual é sujeito a algumas alterações de forma a assemelhar-se ao leite materno, nomeadamente a redução no conteúdo proteico e de minerais, aumento no conteúdo de carboidratos, aumento na relação Ca/P, adição de vitaminas e de gordura modificada (Nazarowec-White & Farber, 1999).

Na produção industrial das fórmulas infantis em pó podem ser utilizados vários processos. Apesar das diferentes marcas existentes, os métodos utilizados pelas empresas assemelham-se, e de acordo com a FAO/WHO (2004), estes produtos podem ser obtidos por três processos:

- Processo húmido: quando todos os ingredientes são misturados na fase líquida e posteriormente são submetidos à pasteurização e desidratados;
- Processo seco: quando os ingredientes são preparados individualmente, tratados termicamente, desidratados e só depois misturados (enquanto fase seca);
- Processo combinado: quando parte dos ingredientes é processada usando o processo húmido de forma a produzir uma base à qual os outros ingredientes são adicionados, em fase seca.

Zink (2003) apresenta de forma resumida uma descrição do processo tecnológico de fabrico das fórmulas infantis em pó. O processo seco, bem como o processo combinado, oferecem algumas vantagens quando comparados com o processo húmido, nomeadamente, envolvem um menor investimento financeiro e apresentam uma utilização energética mais eficiente. Além disso, uma vez que o processo seco não implica a utilização de água no fabrico, a linha de processamento pode ser mantida seca por longos períodos de tempo. Desta forma, ocorre uma redução na possibilidade de que bactérias nocivas se instalem no ambiente em número suficiente para causar a contaminação dos produtos. No entanto, a qualidade microbiológica de um produto proveniente de um processamento por via seca

está fortemente relacionada com a qualidade microbiológica dos ingredientes constituintes. Neste tipo de processamento, não existe qualquer tratamento térmico com poder letal sobre as bactérias potencialmente presentes no produto final. Assim, se um ou mais ingredientes de um produto misturado por via seca estiverem contaminados, mesmo que por um baixo teor bacteriano, essas bactérias, possivelmente, estarão no produto acabado. De forma resumida, o processamento por via seca compreende os procedimentos seguintes. Os ingredientes são recepcionados e normalmente guardados até se avaliar a sua conformidade de acordo com as especificações estabelecidas, incluindo a contaminação microbiológica. Desta forma, os fabricantes devem exigir o cumprimento de alguns requisitos aos seus fornecedores, tendo em vista a segurança do produto final. Isto é geralmente conseguido através da combinação de processos adequados, com o cumprimento rigoroso dos procedimentos de controlo e de boas práticas de fabrico. Os ingredientes são então misturados até que o lote fique homogéneo. A mistura é então passada através de um tamis para remover as partículas de tamanho superior e todo o material estranho. É posteriormente transferido para recipientes de armazenamento. Em alguns casos, o pó é transferido directamente para os recipientes finais, geralmente latas, e o espaço vazio é preenchido por gás inerte; as latas são seladas, etiquetadas e embaladas em caixas de cartão. Geralmente, o produto acabado é direccionado para a verificação da conformidade de acordo com as especificações estabelecidas, incluindo as avaliações microbiológicas para os contaminantes.

Zink (2003), apresenta também de forma resumida o processamento húmido. Neste processamento, os ingredientes são misturados em conjunto, homogeneizados, pasteurizados e desidratados para produzir um produto em pó. A pasteurização destrói bactérias patogénicas que possam estar presentes nos ingredientes. Por isso, este processo é menos dependente da qualidade microbiológica dos ingredientes. Este tipo de processamento envolve a aquisição de equipamento de transformação, o qual deve ser limpo regularmente através de métodos que utilizam água, o que proporciona um ambiente húmido favorável ao desenvolvimento bacteriano, permitindo que ocorra a sua instalação no ambiente de produção. Se não for controlada, esta população bacteriana pode ser uma fonte de contaminação dos produtos. Da mesma forma que o processamento seco, o processo húmido começa com a recepção dos ingredientes dos fornecedores. Estes são então armazenados, até serem testados para a conformidade com as especificações. Os ingredientes são misturados com água em grandes lotes e posteriormente bombeados para um permutador de calor para a pasteurização. Após esta operação, o líquido é homogeneizado, e uma vez que certos nutrientes são sensíveis ao calor (por exemplo, vitaminas, aminoácidos e ácidos gordos), são nesta fase adicionados ao produto. A qualidade microbiológica destes ingredientes é crítica, uma vez que o produto não é submetido a outro tratamento térmico com capacidade para destruir bactérias nocivas.

O produto é então submetido ao processo de atomização onde a temperatura do ar de admissão varia de 130 °C a 200 °C, dependendo das exigências do processo e do equipamento, o qual pode ser horizontal ou vertical. Quando as gotículas de produto entram na câmara de secagem, a água é evaporada e o pó, seco, cai para o fundo por gravidade. A temperatura de saída do ar na câmara de secagem é de, aproximadamente, 100 °C. A temperatura de saída do pó varia entre 40 e 80 °C. O produto já em pó é arrefecido por uma corrente de ar refrigerado, tendo no final a temperatura aproximada de 20 °C. Geralmente, o ar utilizado quer no processo de atomização quer no arrefecimento é filtrado através de filtros HEPA (*high efficiency particulate air*) para minimizar o risco de contaminação dos produtos. Após a secagem por atomização, o produto é armazenado ou transferido directamente para a linha de embalagem, sendo o procedimento semelhante ao do processo seco.

### **3.5. Análise de perigos e controlo dos pontos críticos e análise de risco**

Nos Estados Unidos da América e na Europa, há muitos anos que os fabricantes de fórmulas infantis reconheceram que a implementação de boas práticas de fabrico e dos planos baseados nos sistemas de auto-controlo, nomeadamente no sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point* – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo) pode desempenhar um papel primordial no controlo dos perigos microbiológicos, químicos e físicos, bem como de agentes alergénicos, e daí que, provavelmente, todas as empresas fabricantes de fórmulas infantis em pó disponham dos seus programas de controlo. Nestes, podem ser incluídas a avaliação da qualidade das matérias-primas, dos filtros de ar e líquidos, a existência de detectores de metais, a pasteurização e o controlo da temperatura de conservação, que devem ser adequados a cada caso específico. Assim, o HACCP, sendo um sistema preventivo de garantia da qualidade, é utilizado no sector alimentar como forma de gestão da segurança alimentar e da qualidade dos produtos alimentícios. Os tratamentos térmicos, considerados como pontos críticos de controlo (PCC), aplicados durante o fabrico das fórmulas lácteas em pó são teoricamente suficientes para assegurar a destruição de cerca de oito logaritmos de células de enterobactérias, incluindo *Salmonella* e *E. sakazakii*, bem como outros microrganismos na sua forma vegetativa, tais como *L. monocytogenes* ou *S. aureus*. Os microrganismos formadores de esporos, como o *B. cereus* e o *Clostridium botulinum*, são parcialmente inactivados através destes processos, dependendo das condições de processamento (FAO/WHO, 2004).

Nos sistemas HACCP implementados, é necessário incluir procedimentos que permitam a monitorização, incluindo a avaliação do ambiente de processamento, das superfícies de contacto com o produto e do próprio produto final. Desta forma, consegue-se uma verificação da eficácia das medidas tomadas, bem como a identificação de quaisquer

áreas que devam ser reforçadas de forma a satisfazer os objectivos estabelecidos ou cumprir critérios implementados (FAO/WHO, 2006).

No processo de produção actual, baseado na mistura de várias matérias-primas, não se afigura possível produzir fórmulas em pó comercialmente estéreis ou eliminar completamente o potencial de contaminação. Além disso, mesmo baixos níveis de *E. sakazakii* presentes nestes produtos têm a capacidade de se multiplicar durante a preparação bem como durante o tempo de espera. Portanto, a tomada de medidas eficazes na redução do risco, nomeadamente a inclusão de um passo bactericida na preparação e a diminuição do tempo que envolve a alimentação, devem ser considerados nos sistemas desenvolvidos pelas empresas fabricantes. No que diz respeito ao caso concreto do processamento húmido das fórmulas, são normalmente aplicados outros passos de aquecimento que incluem a termização ou pasteurização das matérias-primas (por exemplo, na recepção do leite cru), ou um pré-aquecimento do líquido antes da fórmula ser submetida ao processo de desidratação. Embora estas etapas possam ter algum efeito letal, são realizadas por razões tecnológicas e não são considerados PCC (FAO/WHO, 2004).

Desde 2004 que a FAO/WHO tem vindo a desenvolver esforços no sentido de congregar o conhecimento existente e a experiência de peritos conceituados neste assunto, de forma a avaliar o risco associado às fórmulas infantis em pó. A análise de risco é um processo que envolve três componentes interligadas: a avaliação do risco (constituída pela identificação e caracterização do perigo, a avaliação da exposição e caracterização do risco), a gestão do risco (que compreende a detecção do risco, a opção de avaliação e de implementação, bem como, a monitorização e revisão) e a comunicação do risco (World Health Organization [WHO], 2008). Neste exercício foram considerados os produtos que satisfaziam a definição de produtos vendidos em pó para posterior rehidratação e alimentação numa forma líquida, como um substituto completo ou parcial do leite humano, de que são exemplos as fórmulas infantis em pó, as fórmulas de transição, as fórmulas com fins médicos específicos destinadas a lactentes e os suplementos do leite humano.

A avaliação do risco pretendia ser global, no entanto os dados disponíveis provieram, em grande parte, de um pequeno número de países. As principais conclusões da análise de risco estão listadas abaixo:

- Os principais factores que afectam os perigos microbiológicos associados às fórmulas infantis em pó incluem: o nível de contaminação das fórmulas, o nível de higiene na preparação e distribuição da fórmula reconstituída, a inclusão de um tratamento bactericida no momento da preparação e a duração do período de alimentação e a respectiva temperatura;

- A magnitude da redução do risco atingida pela redução dos níveis de *E. sakazakii* e *S. enterica* nas fórmulas é dependente, em parte, da contaminação que é atribuível à presença dos agentes patogénicos no ambiente de preparação;
- As medidas de controlo devem ser combinadas de forma a atingir um maior grau de redução de risco do que o que seria obtido através do uso de uma única forma de controlo; e
- Existe uma considerável incerteza em todas as estimativas do risco devido à considerável falta de dados científicos especificamente relacionados com as fórmulas infantis em pó. Isto é particularmente importante em relação à informação sobre as fontes e sobre os factores que contribuem e que se encontram associados com os surtos e casos esporádicos de doença.

Em Portugal, não se encontra documentado qualquer tipo de análise de risco relativamente a este tipo de produtos. Ainda assim, esta análise comungaria da ideia de que a escassez de dados dificultaria a realização da mesma.

### **3.6. Critérios Microbiológicos aplicáveis às fórmulas infantis em pó**

Tradicionalmente, os países têm tentado melhorar a segurança dos alimentos através do estabelecimento de critérios microbiológicos quer para as matérias primas, quer para os produtos processados e acabados. Na última década, houve um crescente interesse e esforço para o desenvolvimento de ferramentas mais eficientes para correlacionar as exigências de programas de alimentos seguros com o impacto esperado na saúde pública (International Commission on Microbiological Specification for Foods [ICMSF], 2006). Assim, para contribuir para a protecção da saúde pública e evitar interpretações divergentes, é necessário estabelecer critérios de segurança harmonizados em matéria de aceitabilidade dos alimentos, designadamente no que se refere à presença de certos microrganismos patogénicos (Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de Novembro). Atendendo às repercussões reconhecidas decorrentes da presença de agentes patogénicos em alimentos para crianças, principalmente as que se encontrem em idade mais jovem ou as que de alguma forma se apresentem fragilizadas, tornou-se imperativo estabelecer limites que permitissem avaliar e classificar estes alimentos quanto à sua aceitabilidade em termos de segurança alimentar.

O Codex Alimentarius apresentou especificações microbiológicas relativamente às fórmulas infantis em pó, e que incluem as bactérias aeróbias mesófilas, coliformes e *Salmonella*, tal como evidencia a Tabela 8. Contudo, estes critérios foram estabelecidos há muitos anos e requerem uma revisão à luz dos novos conhecimentos, nomeadamente,

porque, apesar destas especificações microbiológicas terem permitido uma redução nos surtos associados a este tipo de alimentos, consentem que os coliformes estejam presentes nas fórmulas infantis, o que não garante um nível de segurança que evite as situações associadas ao *E. sakazakii*, mesmo que os limites sejam cumpridos (INFOSAN, 2005).

**Tabela 8. Especificações microbiológicas do Codex Alimentarius relativas aos alimentos em pó (FAO/WHO, 2004)**

	Plano de classes	n	C	Limites por g	
				m	M
Aeróbios mesófilos	3	5	2	$10^3$	$10^4$
Coliformes	3	5	1	<3	20
<i>Salmonella</i>	2	60	0	0	-

Neste sentido, em 2005, a Comissão Europeia apresentou o regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Este documento define critério microbiológico como “um critério que define a aceitabilidade de um produto, de um lote de géneros alimentícios ou de um processo, baseado na ausência ou na presença de microrganismos, ou no seu número, e/ou na quantidade das suas toxinas/metabolitos, por unidade(s) de massa, volume, área ou lote”. Divide, ainda, estes critérios em dois tipos: os critérios de segurança dos géneros alimentícios (que definem a aceitabilidade de um produto ou de um lote de géneros alimentícios aplicável aos produtos colocados no mercado) e os critérios de higiene dos processos (que indicam se o processo de produção funciona de modo aceitável, não sendo aplicável aos produtos colocados no mercado e que estabelece um valor de contaminação indicativo, acima do qual se tornam necessárias medidas correctivas para preservar a higiene do processo em conformidade com a legislação alimentar). O regulamento 2073/2005 apresenta a *Salmonella* e o *E. sakazakii* como os microrganismos mais preocupantes em fórmulas para lactentes, nas fórmulas destinadas a fins medicinais específicos e nas fórmulas de transição. A presença destes agentes patogénicos constitui um risco considerável se as condições após a reconstituição das fórmulas forem propícias para a sua multiplicação. O regulamento refere ainda que os operadores das empresas do sector alimentar que produzam fórmulas desidratadas para lactentes ou alimentos desidratados para fins medicinais específicos destinados a lactentes com menos de seis meses, susceptíveis de constituir um perigo para a saúde pública devido à presença de *E. sakazakii*, devem proceder à colheita e avaliação de amostras das zonas e do equipamento de transformação para a detecção de bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Os limites constantes do referido regulamento estão presentes nas Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9. Critérios de segurança dos géneros alimentícios, segundo o Regulamento n.º 2073/2005**

Alimento	Parâmetro avaliado	Amostragem		Limites
		n	c	
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes com menos de 6 meses	<i>Salmonella</i>	30	0	Ausência em 25 g
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes com menos de 6 meses	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	Ausência em 10 g

Para a interpretação dos resultados, o Regulamento 2073/2005 refere que, para ambos os microrganismos, *Salmonella* e *Enterobacter sakazakii*, o lote pode ser considerado satisfatório se todos os valores observados indicarem a ausência da bactéria e não satisfatório se a bactéria for detectada em qualquer uma das unidades da amostra.

**Tabela 10. Critérios de higiene dos processos, segundo o Regulamento n.º 2073/2005**

Alimento	Parâmetro avaliado	Amostragem		Limites	Medidas a tomar em caso de resultados insatisfatórios
		n	c		
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes com menos de seis meses	<i>Enterobacteriaceae</i>	10	0	Ausência em 10 g	Melhoria da higiene na produção de modo a minimizar a contaminação. Se se detectarem bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> em qualquer unidade da amostra, o lote deve ser testado relativamente à presença de <i>E. sakazakii</i> e <i>Salmonella</i>

No que diz respeito à interpretação dos resultados obtidos, para o parâmetro “*Enterobacteriaceae*” pode considerar-se a qualidade microbiológica de satisfatória (se todos os valores observados indicarem a ausência de bactérias pertencentes a esta família) ou não satisfatória (se bactérias pertencentes a esta família forem detectadas em qualquer uma das unidades da amostra).

Em Dezembro de 2007, a Comissão Europeia edita o Regulamento n.º 1441/2007 que vem alterar o Regulamento 2073/2005. Uma das alterações decorrentes desta nova regulamentação resultam do parecer do Painel Científico dos Riscos Biológicos da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, que concluiu que não é possível estabelecer uma correlação entre o grupo de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e a

*Salmonella* e que não existe uma correlação considerada universal entre o primeiro grupo e o *Enterobacter sakazakii*. O mesmo painel emitiu um parecer sobre o *Bacillus cereus* e outros *Bacillus* spp. em géneros alimentícios. Os alimentos desidratados, nos quais estão frequentemente presentes esporos de *Bacillus* spp. patogénicos, poderiam permitir o crescimento de *B. cereus*, após a reconstituição com água quente. Assim, tendo em conta que alguns alimentos desidratados, onde se incluem as fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados, são consumidos por indivíduos potencialmente fragilizados, o parecer do referido painel indica que o número de esporos de *B. cereus* presentes em fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados deve ser o mais baixo possível durante a transformação, pelo que é necessário estabelecer um critério de higiene dos processos para além de boas práticas, a fim de reduzir o prazo entre a preparação e o consumo. Desta forma, e a fim de satisfazer estas novas exigências, foram introduzidas alterações que estão resumidas nas Tabelas 11 e 12.

**Tabela 11. Critérios de segurança dos géneros alimentícios, segundo o Regulamento n.º 1441/2007**

Alimento	Parâmetro avaliado	Amostragem		Limites
		n	c	
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes com menos de 6 meses	<i>Salmonella</i>	30	0	Ausência em 25 g
Fórmulas de transição desidratadas	<i>Salmonella</i>	30	0	Ausência em 25 g
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes com menos de 6 meses	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	Ausência em 10 g

**Tabela 12. Critérios de higiene dos processos, segundo o Regulamento n.º 1441/2007**

Alimento	Parâmetro avaliado	Amostragem		Limites	Medidas a tomar em caso de resultados insatisfatórios
		n	c		
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes com menos de seis meses	<i>Enterobacteriaceae</i>	10	0	Ausência em 10 g	Melhoria da higiene na produção de modo a minimizar a contaminação. Devem realizar-se testes paralelos às <i>Enterobacteriaceae</i> e à <i>E. sakazakii</i> , a menos que tenha sido estabelecida uma correlação entre estes microrganismos numa determinada instalação.
Fórmulas de transição desidratadas	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	Ausência em 10 g	Melhoria da higiene na produção de modo a minimizar a contaminação
Fórmulas para lactentes desidratadas e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes com menos de 6 meses	<i>Bacillus cereus</i> presumível	5	1	m= 50 ufc/g M= 500 ufc/g	Melhoria da higiene na produção. Prevenção da recontaminação. Selecção de matérias-primas.

No que respeita à interpretação dos resultados, e em relação aos critérios de segurança dos géneros alimentícios e aos critérios de higiene dos processos, para as *Enterobacteriaceae*, mantém-se o considerado no Regulamento 2073/2005, e já referido anteriormente. Em relação ao *B. cereus*, consideram-se três classes de qualidade microbiológica: satisfatória (se todos os valores observados forem  $\leq m$ ), aceitável (se houver um máximo de  $c/n$  valores entre  $m$  e  $M$  e os restantes valores observados forem  $\leq m$ ) e insatisfatória (se um ou mais valores observados forem  $> M$  ou mais do que  $c/n$  valores estiverem entre  $m$  e  $M$ ).



## II. Objectivos

Foram objectivos deste trabalho:

- Implementar a metodologia de pesquisa do *E. sakazakii* em fórmulas lácteas em pó, de acordo com a norma ISO/TS 22964:2006;
- Comparar a eficiência dos meios cromogénicos *Enterobacter sakazakii* isolation agar (Laboratoires AES™), Oxoid Chromogenic *Enterobacter sakazakii* Agar (Oxoid™), e ChromoCult *Enterobacter sakazakii* Agar (Merck™), na detecção do *E. sakazakii* e de acordo com a norma ISO/TS 22964:2006;
- Avaliar a ocorrência do *E. sakazakii* em amostras de fórmulas infantis para lactentes, alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes e fórmulas de transição (avaliação do produto desidratado, e não dos produtos reconstituídos);
- Monitorizar a qualidade microbiológica, através de indicadores higiénicos e de pesquisa e contagem de agentes patogénicos, em amostras de fórmulas infantis para lactentes, alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes e fórmulas de transição (avaliação do produto desidratado, e não dos produtos reconstituídos).



### III. Material e métodos

#### 1. Material

##### 1.1. Estirpes bacterianas

Foi utilizada no estudo, uma estirpe de referência de *Enterobacter sakazakii* ATCC (*American Type Culture Collection*) 51329 (Culti-Loops®) pertencente à coleção de estirpes do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

##### 1.2. Fórmulas Infantis

Foram examinadas 15 amostras de fórmulas lácteas infantis desidratadas, de fabricantes e marcas diferentes, adquiridas em superfícies comerciais do distrito de Lisboa. Neste conjunto incluem-se 7 fórmulas infantis para lactentes, 2 alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes e 6 fórmulas de transição. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e armazenadas à temperatura ambiente e em local seco, até ao momento de serem analisadas.

Para a implementação da técnica foi utilizada como matriz uma amostra de fórmula infantil para lactentes subdividida em 60 aliquotas, na qual foi previamente verificada a ausência de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Estas aliquotas foram utilizadas para a contaminação artificial com três níveis diferentes de *E. sakazakii*.

##### 1.3. Meios de cultura utilizados

###### 1.3.1. Implementação da técnica de pesquisa de *Enterobacter sakazakii* e pesquisa de *E. sakazakii*

A pesquisa de *E. sakazakii* foi conduzida de acordo com a norma ISO/TS 22964:2006. Desta forma, quer na implementação da técnica quer na pesquisa nas fórmulas infantis, utilizaram-se os seguintes meios: água peptonada tamponada (BPW) (bioMérieux™), caldo de lauril triptose sulfato modificado/vancomicina (mLST/vancomicina, Laboratoires AES™), meio *Enterobacter sakazakii* isolation agar (ESIA) (Laboratoires AES™), Oxoid Chromogenic *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI) (Oxoid™), ChromoCult (Merck™), TSA (*Tryptone soya agar*, Biogerm™), *Columbia Agar + 5% Horse Blood* (COH) (bioMérieux™), *Brain Heart Infusion* (Oxoid™), Triptona Sal (bioMérieux™).

### **1.3.2. Contagem de microrganismos aeróbios a 30 °C**

Para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, foi utilizada a gelose nutritiva *Standard Methods Agar* (PCA) (bioMérieux™). Este meio de cultura apresenta um conjunto de nutrientes (fontes proteicas, de vitaminas e hidratos de carbono) que favorecem o crescimento da maior parte das bactérias.

### **1.3.3. Contagem de *Enterobacteriaceae* em placa**

Na contagem das bactérias da família *Enterobacteriaceae* foi utilizado o meio de cultura *Violet Red Bile Glucose Agar* (bioMérieux™). Este meio de cultura é composto por sais biliares e cristal violeta que inibem as bactérias Gram positivas, e por glucose e vermelho neutro, que permite a detecção da fermentação deste nutriente pelos microrganismos.

### **1.3.4. Contagem de *Enterobacteriaceae* pelo Número Mais Provável (NMP)**

O método de contagem de enterobactérias pelo número mais provável utilizou BPW (bioMérieux™), caldo de enriquecimento para enterobactérias (Caldo EE) (Biogerm™), VRBG (bioMérieux™) e TSA (Biogerm™). A BPW tem como objectivo ressuscitar os microrganismos lesados como consequência dos tratamentos a que os produtos foram submetidos. A composição do caldo EE promove o crescimento do grupo das *Enterobacteriaceae*, nomeadamente através de peptonas que fornecem azoto, vitaminas e aminoácidos, e de dextrose como fonte de carbono. O verde brilhante e sais biliares são utilizados como agentes selectivos, proporcionando a inibição dos microrganismos Gram positivos.

### **1.3.5. Contagem de *Escherichia coli***

A contagem de *E. coli* foi efectuada utilizando o meio de cultura *Tryptone Bile X-Glucuronide* (TBX) (Bio-Rad™). Este meio contém um substrato cromogénico (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucorónico), que pela acção da  $\beta$ -glucuronidase, produzida por grande parte das estirpes de *E. coli* (apenas 3 a 4 % de *E. coli* são  $\beta$ -glucuronidase negativas) é degradado, conduzindo à formação de colónias azuis. O meio TBX apresenta ainda sais biliares que inibem o crescimento das bactérias Gram positivas.

### **1.3.6. Contagem de *Clostridium perfringens* a 37° C**

O meio de cultura *Tryptone Sulfite Cycloserine Agar* (TSC) (Biokar™) foi utilizado na contagem de *Clostridium perfringens* a 37° C. A presença neste meio de cultura de sulfito de sódio permite aos microrganismos redutores de sulfito, reduzi-lo a sulfureto, que com o

citrato de ferro, forma um precipitado negro à volta das colónias (sulfureto de ferro). A D-cicloserina inibe a restante flora contaminante presente da amostra.

#### **1.3.7. Contagem de bactérias sulfito-redutoras crescidas em condições de anaerobiose**

O meio de cultura utilizado para a contagem de bactérias sulfito-redutoras desenvolvidas em condições de anaerobiose foi o *Perfringens Agar Base* (PAB) (Biokar™). O princípio deste meio de cultura é semelhante ao apresentado para o meio TSC, com a excepção da não utilização da D-cicloserina.

#### **1.3.8. Contagem de *Listeria monocytogenes***

Na contagem de *Listeria monocytogenes* utilizou-se o *Agar Listeria* segundo Ottaviani & Agosti (ALOA) (bioMérieux™). Este meio de cultura, dada a presença de substrato cromogénico, permite a detecção de  $\beta$ -glucosidase, fazendo desta forma a identificação presuntiva do género *Listeria*. As colónias características de *L. monocytogenes* apresentam um halo opaco, que as distingue das outras espécies pertencentes a este género, e cuja formação está relacionada com a actividade de uma fosfolipase. A selectividade do meio é obtida pela acção combinada do cloreto de lítio e dos antibióticos (ácido nalidíxico, ceftazidima e polimixina B).

#### **1.3.9. Contagem e pesquisa de *Bacillus cereus***

Os meios de cultura utilizados na contagem e pesquisa de *Bacillus cereus* foram o *Bacillus cereus Agar* (Mossel) (Laboratoires AES™), *Columbia Agar + 5% Sheep Blood* (COS) (bioMérieux™) e BPW (bioMérieux™). O meio de cultura *Bacillus cereus Agar* utiliza o extracto de carne e triptona para favorecer o crescimento deste microrganismo. A gema de ovo presente neste meio é usada para a detecção da presença de lecitinase, produzida pela maioria das estirpes. A BPW teve como objectivo a ressuscitação dos microrganismos potencialmente presentes e que pudessem estar lesados como consequência dos tratamentos térmicos a que o produto foi submetido.

#### **1.3.10. Contagem e pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva**

A contagem e pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva utilizou o meio gelado Baird Parker (BP) (bioMérieux™) e BPW (bioMérieux™). O meio de cultura BP contém uma base rica em peptonas, glicina e piruvato de sódio que estimulam o seu crescimento. O cloreto de lítio é o agente selectivo utilizado, bem como o telurito de potássio, sendo que a sua redução a telureto confere uma coloração negra à colónia. A gema de ovo presente permite a detecção da actividade da lecitinase produzida por algumas estirpes, pelo aparecimento de um halo envolvendo a colónia.

### **1.3.11. Pesquisa de *Salmonella* spp.**

A pesquisa de *Salmonella* spp. fez uso de BPW, caldo Rappaport Vassiliadis Soja (RVS-T), caldo Muller-Kauffmann (MKTTn-T), caldo M e kit VIDAS SLM (tudo produtos bioMérieux™). O caldo RVS-T contém, para além de fontes de carbono e compostos azotados, cloreto de magnésio (que aumenta a pressão osmótica do meio) e verde de malaquite (agente inibidor da maioria dos agentes bacterianos, com excepção para a *Salmonella*) que associados a um pH baixo, proporcionam a selectividade do meio para a *Salmonella*. O caldo MKTTn-T apresenta fontes de carbono, azoto, vitaminas e sais minerais. É constituído também por tetrionato que inibe bactérias que não possuam tetrionato-reductase (como são exemplo a maioria das bactérias Gram negativas, com excepção de *Salmonella* e *Proteus*). A inibição do *Proteus* é efectuada pela adição de novobiocina, e a das bactérias Gram positivas é conseguida pela acção do verde brilhante e de sais biliares. O caldo M contém uma base rica em nutrientes que permite o crescimento de *Salmonella*.

### **1.3.12. Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* utilizaram-se caldo Half-Fraser, caldo Fraser e kit VIDAS LMO2 (tudo produtos bioMérieux™). Os caldos Half-Fraser e Fraser apresentam uma constituição semelhante, com a única diferença de que o primeiro apresenta metade da concentração de antibióticos do segundo, de forma a permitir, durante o primeiro enriquecimento, um melhor crescimento das bactérias eventualmente lesadas. A selectividade destes meios é conseguida pelo cloreto de lítio, acriflavina e o ácido nalidíxico.

### **1.3.13. Pesquisa de toxina diarreica do *Bacillus cereus***

Para a pesquisa da toxina diarreica do *Bacillus cereus* foi utilizado o kit de detecção de toxinas BCET-RPLA, Oxoid™, que utiliza o método de aglutinação passiva de látex invertida.

## **1.4. Reagentes e kits para caracterização bioquímica**

Foram utilizados como reagentes e kits o reagente para detecção da oxidase (N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilediamina dihidroclorato) (bioMérieux™), API20E (bioMérieux™), Glucose (Biokar™) e kit gerador de atmosfera de anaerobiose – Anaerogen (Oxoid™).

## **2. Métodos**

Todos os procedimentos realizados no decorrer deste trabalho experimental fizeram uso das orientações relativas à análise microbiológica de alimentos, constantes da norma ISO 7218:2007.

### **2.1. Colheita de Amostras**

A colheita das amostras foi precedida pela lavagem e desinfecção exteriores das embalagens de origem. Este procedimento consistiu na sanificação das tampas plásticas com algodão embebido em álcool 70%, sendo feito perto da chama do bico de Bunsen. Posteriormente, e com o auxílio de uma pinça esterilizada, retirou-se a tampa de alumínio e a colher de medida existente no interior da lata.

### **2.2. Diluição das Amostras**

Foi efectuada, quer para a detecção de *E. sakazakii*, quer para a avaliação microbiológica das fórmulas lácteas infantis em pó em estudo, uma diluição inicial da amostra (suspensão inicial). O meio BPW foi utilizado como diluente, com excepção da pesquisa de *Listeria monocytogenes*, em que é feita a diluição da amostra com caldo Half-Fraser (no qual é feito o primeiro enriquecimento) (ISO 6887-1:1999).

### **2.3. Implementação da técnica ISO e comparação dos meios ESIA, DFI e ChromoCult**

Com o objectivo de avaliar a resposta obtida pela técnica constante da norma ISO/TS 22964:2006, no que respeita à detecção do *E. sakazakii*, foram realizados ensaios preliminares, tendo em conta a técnica e o respectivo grau de recuperação obtido a diferentes níveis de contaminação artificial com uma estirpe de referência (*Enterobacter sakazakii* ATCC 51329). Além da utilização do meio ESIA, preconizado na norma, foram igualmente utilizados em paralelo, os meios cromogénicos DFI e ChromoCult, de forma a avaliar qual apresentaria melhor resultado.

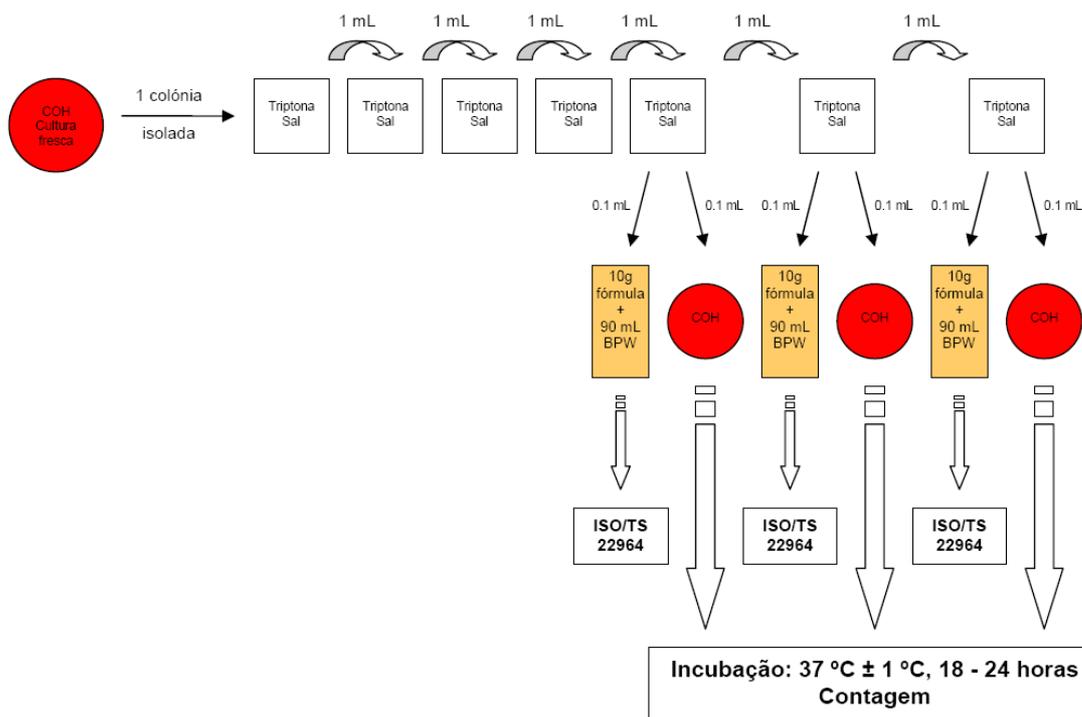
### 2.3.1. Determinação das diluições a utilizar nos ensaios de contaminação artificial

A estirpe de referência de *E. sakazakii* foi reconstituída em caldo BHI e incubada a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foi semeada com ansa em COH e incubada sob as mesmas condições. A partir da cultura assim obtida, foi suspensa uma colónia em 9 mL de triptona sal (considerando-se esta diluição como a  $10^{-1}$ ). A partir desta suspensão fizeram-se diluições decimais seriadas até à diluição  $10^{-7}$  e de cada uma das diluições foi semeado 0.1 mL em COH e incubadas a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 18 a 24 horas. O objectivo deste procedimento consistiu na quantificação das unidades formadoras de colónias obtidas em cada diluição para seleccionar a diluição a partir da qual seriam feitas as contaminações das alíquotas das amostras.

### 2.3.2. Avaliação do desempenho dos diferentes meios de cultura cromogénicos para a detecção de *E. sakazakii* seguindo a metodologia ISO/TS 22964:2006

Para avaliação da taxa de recuperação dos meios de cultura fazendo uso da técnica referida na norma ISO/TS 22964:2006 para a detecção de *E. sakazakii*, foram desenvolvidos vários ensaios, fazendo uso de contaminação artificial com estirpe de referência de *E. sakazakii*, como exemplifica a Figura 2.

Figura 2. Avaliação da recuperação da metodologia ISO/TS 22964:2006



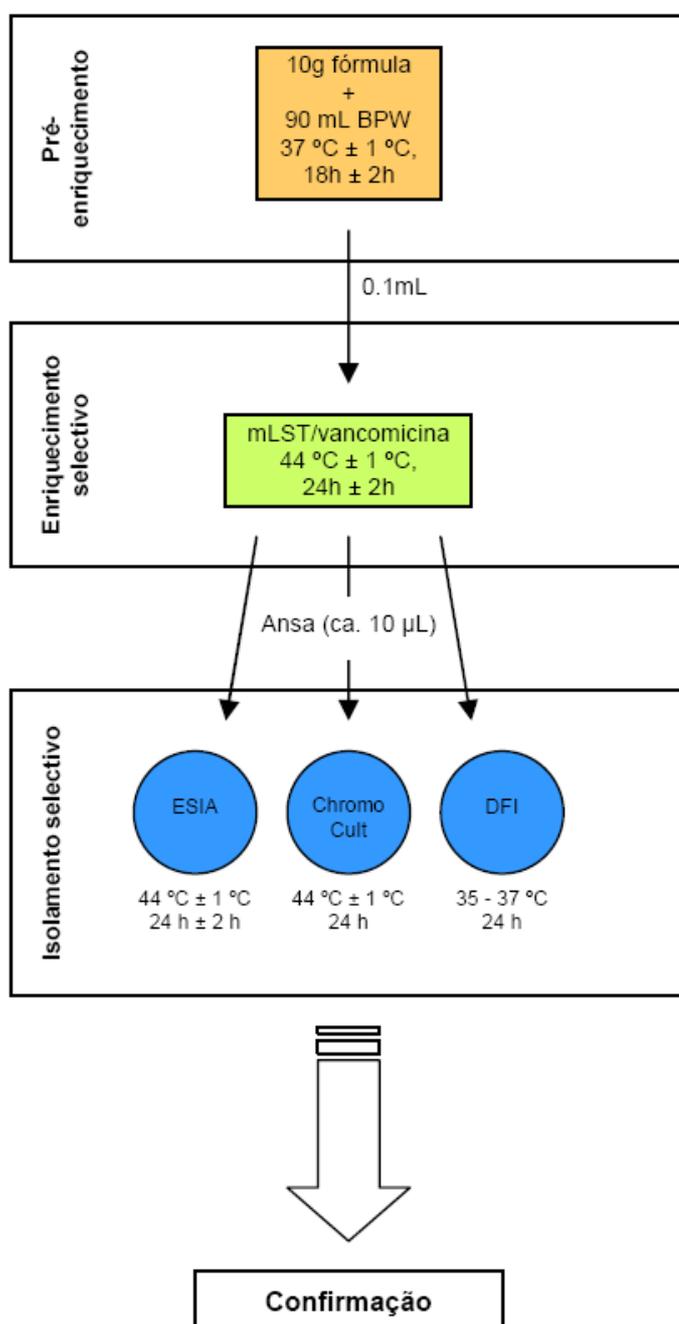
Desta forma, como descrito anteriormente, foram feitas diluições a partir de uma cultura pura e seleccionadas as últimas 3 diluições ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ ), de forma a obter o nível de contaminação pretendido e atendendo aos resultados decorrentes da determinação efectuada (ponto 2.3.1. – Determinação das diluições a utilizar nos ensaios de contaminação artificial). A partir destas diluições, procedeu-se à contaminação de uma porção de fórmula utilizada como matriz. Para a referida contaminação, foram previamente pesadas 3 tomas de 10 g de fórmula infantil, e feita uma diluição decimal com água peptonada tamponada, constituindo a suspensão inicial do ensaio. Das diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  foram retirados 2 x 0.1 mL que foram inoculados, 0.1 mL na suspensão da fórmula e 0.1 mL semeados numa placa de COH em superfície, com o auxílio de um espalhador estéril e descartável. A placa de COH permite, após incubação a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas, confirmar o teor microbiano inoculado na suspensão da fórmula. Esta suspensão foi sujeita aos procedimentos constantes da norma ISO e que estão ilustrados na Figura 3.

A metodologia ISO/TS 22964:2006 (2006) tem início com a pesagem de porções de fórmula em estudo e posterior diluição 1:10 com BPW e consequente incubação a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 18 horas  $\pm$  2 horas. Após o período de incubação, uma alíquota de 0.1 mL é transferida para tubo contendo 10 mL de meio mLST/vancomicina, o qual é incubado a  $44\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$  durante 24 horas  $\pm$  2 horas. Posteriormente, e com o auxílio de uma ansa, procede-se ao isolamento por estria em placa com agar selectivo cromogénico (ESIA), a qual é incubada a  $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 24 horas  $\pm$  2 horas. As colónias típicas observadas após a incubação, ou seja, aquelas que apresentem uma coloração verde a azul-esverdeada, são consideradas colónias presuntivas de *E. sakazakii*, sendo submetidas a confirmação. Esta confirmação baseia-se essencialmente em dois aspectos, a produção de pigmento amarelo e a confirmação bioquímica. Desta forma, da placa de agar cromogénico são seleccionadas entre uma e cinco colónias presuntivas de *E. sakazakii* que são semeadas à superfície de uma placa de TSA e incubadas a  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 44 a 48 horas. Se após incubação ocorrer crescimento de colónias produtoras de pigmento amarelo é feita a confirmação bioquímica. Para tal, as colónias produtoras de pigmento em TSA são sujeitas à avaliação da produção da oxidase e estudo bioquímico, podendo para isto ser utilizados kits miniaturizados de identificação bioquímica, nomeadamente o API20E, que permitem avaliar as características bioquímicas das estirpes em estudo e concluir acerca da identificação da bactéria em causa. A norma ISO/TS 22964 sugere a utilização do meio cromogénico ESIA, no entanto, refere que podem ser utilizados produtos equivalentes. Neste trabalho, e com o objectivo de avaliar qual apresentava melhores resultados, foram também utilizados, em paralelo, os meios de cultura DFI e ChromoCult. Foram seguidas as temperaturas de incubação recomendadas pelo fabricante, ou seja, para o meio DFI a incubação foi feita a  $35 - 37\text{ °C}$ , 24 horas e para o meio ChromoCult a incubação foi feita a  $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , 24 horas  $\pm$  2 horas.

#### 2.4. Pesquisa de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes, fórmulas de transição e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes

A pesquisa de *E. sakazakii* foi realizada de acordo com a metodologia da norma ISO/TS 22964:2006, representada na Figura 3, fazendo uso dos três meios cromogênicos em paralelo, ESIA, DFI e ChromoCult. Desta forma, foi avaliada a presença/ausência de *E. sakazakii* em 10 g de produto.

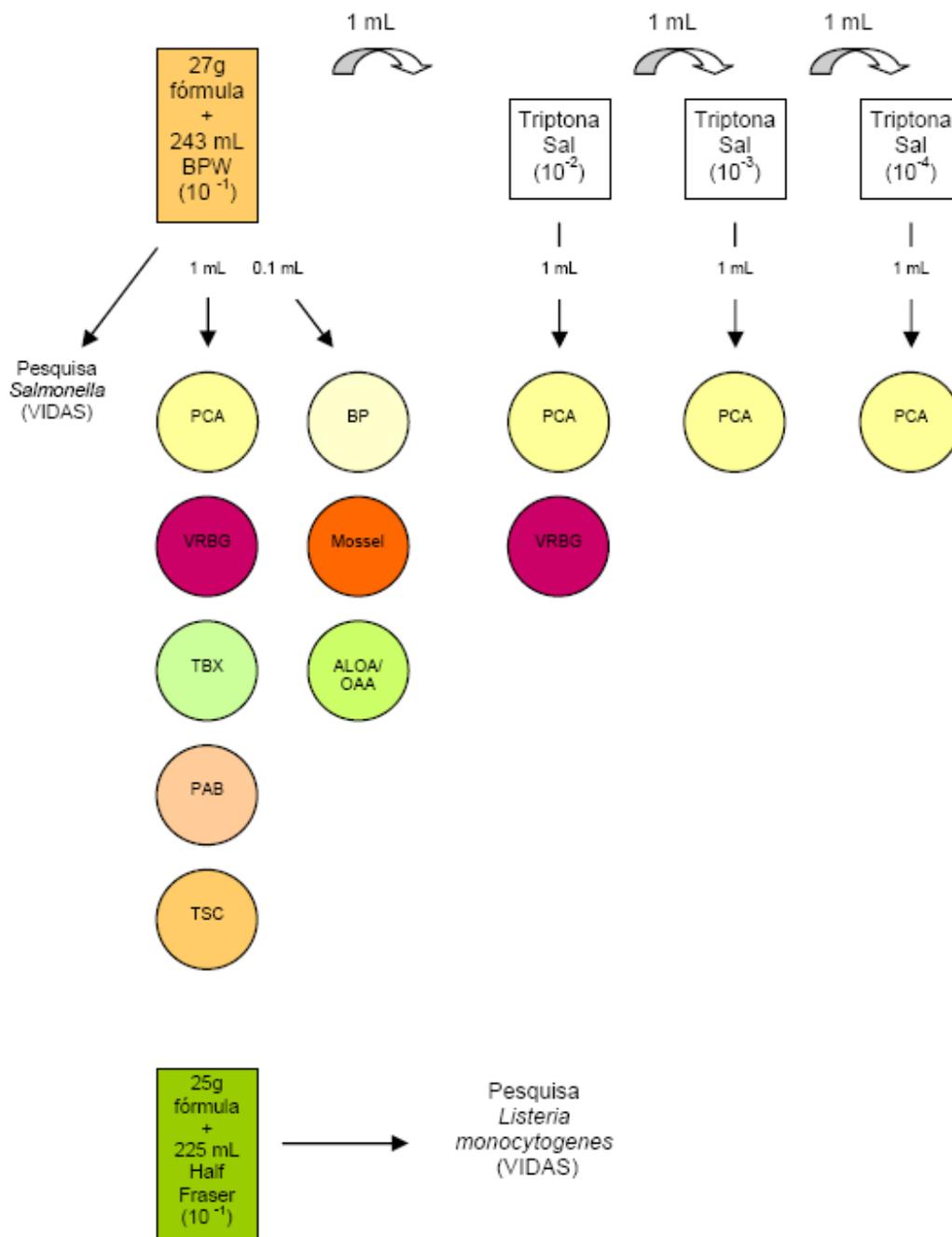
Figura 3. Representação esquemática da metodologia de detecção de *E. sakazakii* pela norma ISO/TS 22964:2006 utilizando três meios cromogênicos em paralelo



**2.5. Avaliação microbiológica das condições higiénicas e de agentes patogénicos em amostras de fórmulas infantis para lactentes, fórmulas de transição e alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes**

Para a avaliação microbiológica das fórmulas lácteas infantis em pó em estudo realizaram-se vários ensaios que se encontram resumidos na Figura 4.

**Figura 4. Resumo dos ensaios realizados para a avaliação microbiológica das fórmulas lácteas infantis em pó**



### **2.5.1. Contagem de Microrganismos a 30 °C**

Para a contagem total dos microrganismos aeróbios a 30 °C, foi seguida a metodologia constante da Norma Portuguesa NP 4405 (2002). Este método consiste em semear 1 mL das diluições consideradas convenientes (neste caso da suspensão inicial,  $10^{-1}$  até à diluição  $10^{-4}$ ) por incorporação, em meio PCA. As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C durante 72 horas.

### **2.5.2. Contagem de *Enterobacteriaceae***

Para a contagem em placa das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, foi seguida a norma ISO 21528-2:2004, que preconiza a utilização do meio VRBG, semeado por incorporação com 1 mL de inóculo e com camada dupla, incubando a 30 °C por 24 horas. Nestes ensaios foram semeados inóculos correspondentes às diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ .

Para além da técnica referida, foi também utilizada, de forma a recuperar as células que se encontrassem mais danificadas, dado o stresse provocado pelo processamento tecnológico das fórmulas, a técnica do número mais provável (NMP) baseado na norma ISO 21528-1:2004. Assim, fez-se um pré-enriquecimento em água peptonada tamponada a 37 °C durante 18 horas, seguido do enriquecimento em caldo EE, com incubação a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, foi feito o isolamento em placas de VRBG, inoculadas a partir dos tubos de caldo EE através de ansa e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Para confirmação das colónias, foi feita a avaliação quanto à fermentação da glucose e à produção da oxidase e identificação através de Kit miniaturizado API20E (bioMérieux™).

### **2.5.3. Contagem de *Escherichia coli***

Neste ensaio foi utilizada a metodologia constante da norma ISO 16649-2:2001. O procedimento consiste na inoculação de 1 mL das diluições consideradas necessárias (neste caso da diluição  $10^{-1}$ ), por incorporação, utilizando o meio TBX, com incubação até um máximo de 24 horas a 44 °C.

### **2.5.4. Contagem de *Clostridium perfringens* a 37 °C**

Na contagem de *Clostridium perfringens* a 37 °C foi seguida a norma ISO 7937:2004. Esta contagem é efectuada inoculando 1 mL das diluições consideradas necessárias (neste caso, da diluição  $10^{-1}$ ) em meio TSC, por incorporação e com camada dupla. A incubação é feita a 37 °C durante 24 horas, em atmosfera de anaerobiose.

### **2.5.5. Contagem de bactérias sulfito-redutoras crescidas em condições de anaerobiose**

Neste ensaio, a metodologia empregue foi a constante da norma ISO 15213:2003. À semelhança da contagem de *Clostridium perfringens* a 37 °C, este ensaio foi realizado em anaerobiose, com inoculação de 1 mL das diluições pertinentes (no caso, 10<sup>-1</sup>), por incorporação e em camada dupla. As condições de incubação são 37 °C por 24 horas.

### **2.5.6. Contagem de *Listeria monocytogenes***

A contagem de *Listeria monocytogenes* seguiu a técnica da norma ISO 11290-2:1998. O procedimento consiste na utilização do meio de cultura ALOA, em que foi semeado 0.1 mL das diluições consideradas (neste trabalho, apenas a diluição 10<sup>-1</sup>) – mantida durante 1 hora à temperatura ambiente – por espalhamento em superfície. A incubação foi feita a 37 °C durante 48 horas.

### **2.5.7. Contagem e pesquisa de *Bacillus cereus***

Para a contagem de *Bacillus cereus*, foi utilizada a metodologia preconizada pela norma ISO 7932:2004. Esta consiste em inocular 0.1 mL das diluições consideradas (neste caso, da suspensão inicial) à superfície de *Bacillus cereus Agar* em placa e por espalhamento, com uma incubação por 48 horas a 30 °C.

A pesquisa de *Bacillus cereus* foi feita a partir de um enriquecimento em BPW a 37 °C durante 18 horas. Posteriormente, foi feito o isolamento, com ansa à superfície, em meio COS incubado a 37 °C durante 24 horas. Sempre que surgiram colónias características de *B. cereus* foi feita a confirmação, fazendo uso da coloração de Gram, pesquisando a lecitinase em *Bacillus cereus Agar*, bem como as provas da catalase e oxidase.

### **2.5.8. Contagem e pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva**

A técnica de contagem de estafilococos coagulase positiva consta da Norma Portuguesa NP 4400-2 (2002). Esta metodologia consiste em inocular 0.1 mL das diluições pertinentes (no presente estudo, apenas a 10<sup>-1</sup>), à superfície de gelose BP, e por espalhamento. A incubação foi feita à temperatura de 37 °C durante 48 horas.

Para a pesquisa de Estafilococos Coagulase Positiva fez-se inicialmente um enriquecimento não selectivo em BPW por 18 horas a 37 °C, e de seguida foi feito o isolamento à superfície e com ansa, em meio agar BP, com um tempo de incubação de 48 horas a 37 °C.

### **2.5.9. Pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes***

As pesquisas de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* foram efectuadas utilizando o método imunoenzimático – VIDAS<sup>®</sup>. Este método automatizado baseia-se na tecnologia ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) para a identificação de microrganismos patogénicos presentes nas amostras sujeitas a ensaio. Assim, são utilizados cones, que funcionam como fase sólida, encontrando-se revestidos internamente por anticorpos monoclonais específicos para o agente em pesquisa, e como suporte de pipetagem para o teste. Se o microrganismo alvo estiver presente na amostra, ocorrerá reacção antigénio-anticorpo, e posteriormente, pela adição de um conjugado (anti-imunoglobulina humana ligada a fosfatase alcalina), bem como de um substrato, ocorrerá emissão de fluorescência, que é detectada pelo sistema VIDAS (bioMérieux, 2008).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. fez-se um pré-enriquecimento com BPW durante 16 a 20 horas, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, inocularam-se 0.1 mL em caldo Rappaport Vassiliadis Soja e 1 mL em Mueller Kaufman Tetrionato, os quais foram incubados, respectivamente, a  $41.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 6 a 8 horas. A este procedimento seguiu-se um pós-enriquecimento, retirando 1 mL do caldo Rappaport Vassiliadis Soja que se inoculou no meio M, e 0.1 mL do Mueller Kaufman Tetrionato que se inoculou no mesmo meio. A incubação de ambos os meios M foi feita a  $41.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 16 a 20 horas. Após o período de incubação, retirou-se 1 mL de cada tubo do meio M e colocou-se num tubo estéril, sujeitando-se à temperatura de 95 a 100 °C, durante 15 minutos ( $\pm 1$  minuto). Depois do tubo arrefecido (não ultrapassando os 30 minutos), colocou-se 500 µl na barrete contendo os reagentes do kit VIDAS SLM, a qual se colocou no aparelho mini VIDAS<sup>®</sup>.

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi feito inicialmente um primeiro enriquecimento durante 24 a 26 horas com caldo Fraser demi, à temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após incubação, é retirado 0.1 mL para caldo Fraser (segundo enriquecimento) e colocado na estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 26 horas, após o qual são retirados 500 µl e colocados na barrete contendo os reagentes do kit VIDAS LMO2 e posteriormente colocado no aparelho mini VIDAS<sup>®</sup> para execução do ensaio.

### **2.5.10. Pesquisa de toxina diarreica do *Bacillus cereus***

Para pesquisa da toxina diarreica do *Bacillus cereus* foi seguida a bula anexa ao kit de detecção de toxinas BCET-RPLA Oxoid<sup>™</sup>, sendo seguida a metodologia referente à pesquisa em fluidos de cultura. Desta forma, inoculou-se uma colónia isolada em BHI que se incubou a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. Depois disto, centrifugou-se a suspensão durante 20 minutos a uma velocidade de 900g. Organizou-se a placa de forma a que cada amostra apresentasse 2 filas e cada fila tivesse 8 poços. Distribuiu-se 25 µl de diluente em cada poço das 2 filas, excepto no primeiro poço de cada fila. Adicionou-se 25 µl de amostra aos 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> poços de ambas as filas. Posteriormente, iniciando no 2<sup>o</sup> poço de cada fila, fizeram-se

diluições sucessivas, e deixou-se o último poço apenas com diluente. A cada um dos poços da primeira fila adicionou-se 25 µl de látex sensibilizado e a cada um dos poços da segunda fila adicionou-se 25 µl de controlo de látex. Agitou-se manualmente a placa, cobriu-se para evitar a evaporação e incubou-se em local livre de vibrações, à temperatura ambiente e durante 24 horas.



## IV. Resultados e Discussão

### 1. Determinação das diluições a utilizar nos ensaios de contaminação artificial

Da quantificação das unidades formadoras de colónias nas várias diluições efectuadas, verificou-se que a estirpe de referência de *E. sakazakii* apresentou contagens inferiores a 150 ufc/placa nas diluições  $10^{-6}$  (23 ufc/placa) e  $10^{-7}$  (4 ufc/placa), como demonstra a tabela 13.

**Tabela 13. Avaliação das contagens obtidas em meio de cultura COH após o período de incubação**

Diluições seriadas	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
Contagem em COH	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	23	4

Inc=Incontável, ou seja, >150 ufc/placa

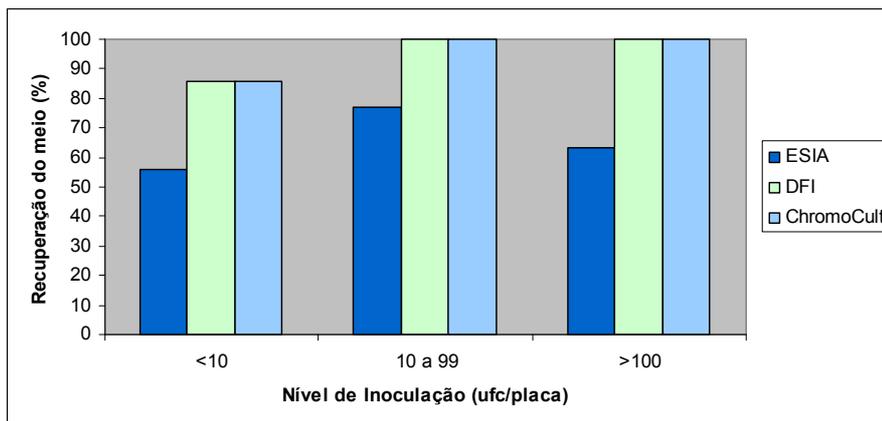
Da análise destes resultados, procedeu-se, na contaminação das matrizes, utilizando as diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ .

### 2. Avaliação do desempenho dos diferentes meios de cultura cromogénicos para a detecção de *E. sakazakii*

Para avaliar a eficiência dos diferentes meios de cultura cromogénicos, fazendo uso da metodologia constante da norma ISO/TS 22964:2006, inocularam-se as suspensões iniciais das fórmulas com três teores de inóculo de *E. sakazakii*, nomeadamente, 22 porções com um teor microbiano inferior a 10 ufc/placa; 22 porções com inóculo apresentando uma população entre 10 e 99 ufc/placa; e 16 porções com uma população superior a 100 ufc/placa.

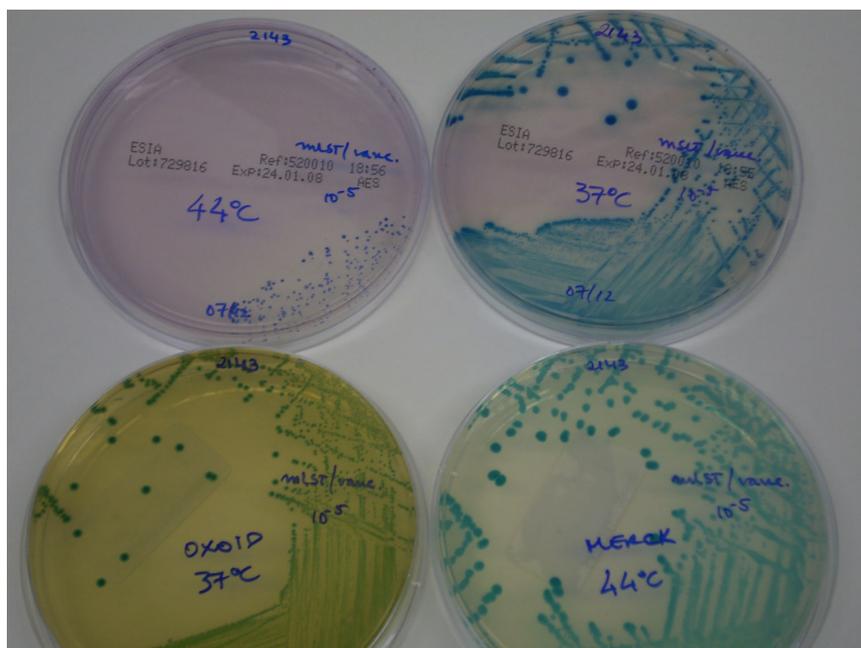
Os resultados obtidos permitem verificar que o meio ESIA apresentou as piores taxas de recuperação, nos níveis de inoculação utilizados, em comparação com os meios DFI e ChromoCult, que apresentaram resultados muito semelhantes. Um resumo desses resultados encontra-se na Figura 5. Pela análise do gráfico, verifica-se que com níveis de inoculação cujo teor se verificou inferior a 10 ufc/placa, o meio ESIA apresentou uma percentagem de recuperação de 56%, valor inferior ao demonstrado pelos meios DFI e ChromoCult (86%). Para teores de inoculação superiores a 10 ufc/placa, os meios DFI e ChromoCult apresentaram recuperação em todos os ensaios, enquanto que o meio ESIA evidenciou percentagens de recuperação de 77% e 63%, respectivamente com níveis de inoculação de 10 a 99 ufc/placa e superiores a 100 ufc/placa.

**Figura 5. Avaliação da recuperação dos meios cromogênicos em paralelo utilizando a metodologia constante da norma ISO/TS 22964:2006**



Além de uma menor taxa de recuperação, verificou-se também que o meio ESIA, quando existia crescimento de cultura bacteriana de *E. sakazakii*, este era muito reduzido ou escasso, quando comparado com o crescimento evidenciado pelos meios DFI e ChromoCult utilizados em paralelo. Avaliou-se, então, o comportamento do microrganismo em ESIA à temperatura de incubação de 37 °C, o que revelou um crescimento abundante da estirpe e semelhante ao evidenciado pelos outros meios utilizados a esta temperatura, como demonstra a Figura 6.

**Figura 6. Comparação do crescimento da estirpe de *E. sakazakii* ATCC 51329 nos três meios cromogênicos (plano superior - ESIA, esquerda: incubação a 44 °C, direita: incubação a 37 °C; plano inferior esquerda – DFI, direita - ChromoCult)**



Considerando que a estirpe de *E. sakazakii* no meio ChromoCult apresenta um crescimento abundante a 44 °C e com aspecto característico, pode concluir-se que a estirpe padrão não apresenta qualquer problema de crescimento a esta temperatura. Por outro lado, como há crescimento abundante e típico a 37 °C no meio ESIA, talvez o deficiente desenvolvimento da estirpe a 44 °C no mesmo meio se prenda com alguma característica ou alteração do meio a esta temperatura. Apesar dos vários contactos com o laboratório que produz o meio ESIA, no sentido de esclarecer o sucedido, não foi possível estabelecer uma causa concreta para este resultado.

Iversen e Forsythe (2007) avaliaram a recuperação de *E. sakazakii* em DFI e ESIA de acordo com as temperaturas recomendadas pelos respectivos fabricantes (37 °C e 44 °C, respectivamente) e verificaram uma maior percentagem de recuperação para o meio DFI (99%) que para o ESIA (96%). Estes autores indicam também que o método mais eficiente é o que utiliza o meio cromogénico DFI.

De referir que nesta avaliação da recuperação nos diferentes meios cromogénicos para *E. sakazakii*, seguindo a metodologia da norma ISO/TS 22964:2006, quando a contagem evidenciou 1 ufc/placa, considerou-se não ter ocorrido recuperação nos meios DFI e ChromoCult, enquanto que quando a contagem foi 2 ufc/placa ou mais, houve recuperação. Estes meios apresentaram uma percentagem de recuperação de 100% sempre que as contagens foram iguais ou superiores a 2 ufc/placa.

### 3. Pesquisa de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas lácteas infantis em pó

A Tabela 14 apresenta os resultados da pesquisa de *E. sakazakii* em fórmulas lácteas utilizando o método constante da norma ISO/TS 22964:2006, fazendo uso dos três meios cromogénicos em paralelo.

**Tabela 14. Pesquisa de *E. sakazakii* em fórmulas lácteas em pó**

	Nº de amostras analisadas	Pesquisa de <i>E. sakazakii</i>
Fórmulas infantis para lactentes	7	Ausente em 10g
Fórmulas de transição	6	
Alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes	2	
Total	15	

O resultado das análises revelou ausência de *E. sakazakii* em 10 g de amostra. Estes resultados não permitem inferir acerca da prevalência deste microrganismo nas fórmulas infantis comercializadas em Portugal, não podendo estes dados ser utilizados em avaliações de risco microbiológico dado que a amostragem é de pequena dimensão, até porque este aspecto não consistia um objectivo proposto. Além disso, o Regulamento 2073/2005 alterado pelo 1441/2007 indica que a amostra de cada lote deve ser constituída por 30 unidades, para a avaliação da segurança das fórmulas infantis para lactentes e dos alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes, situação que não se verificou. Contudo, e como referido pela FAO/WHO (2004), em muitas das investigações de surtos de infecções causadas por *E. sakazakii* ocorridos nas unidades de cuidados intensivos neonatais, os investigadores conseguiram demonstrar uma associação estatística e microbiológica entre a infecção e o consumo de uma fórmula infantil em pó, apesar da ocorrência ser reduzida. Por outro lado, os mesmos autores referem que o nível de contaminação das fórmulas infantis por *E. sakazakii* é baixo, mas mesmo assim considerado de alto risco. Desta forma, dada a reduzida amostragem, o facto de não ter sido isolado *E. sakazakii* nos produtos analisados não garante que este tipo de produtos, disponibilizados nas superfícies comerciais em Portugal, sejam completamente seguros do ponto de vista microbiológico, especialmente no que se refere ao *E. sakazakii*. Até porque, como já foi referido, as condições que ocorrem após a reconstituição das fórmulas infantis em pó proporcionam a proliferação bacteriana, pelo que as condições de temperatura, armazenagem, tempo de espera até à administração assim como os procedimentos a montante de garantia de segurança do produto acabado (ao nível da indústria) não devem ser negligenciados. Iversen e Forsythe (2004) analisaram 82 amostras de fórmulas lácteas infantis em pó, tendo isolado o *E. sakazakii* apenas a partir de 2 amostras. Este facto corrobora a ideia de que a prevalência deste microrganismo é baixa, mas ainda assim de risco não negligenciável.

#### 4. Avaliação microbiológica dos indicadores das condições higiénicas das fórmulas lácteas infantis em pó

Os resultados dos indicadores microbiológicos das condições higiénicas encontram-se expressos na Tabela 15.

**Tabela 15. Resultados das determinações microbiológicas dos indicadores das condições higiénicas das fórmulas infantis em pó**

Amostra (Nº)	Natureza da Amostra	Microrganismos a 30 °C (ufc/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (ufc/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> pelo NMP (NMP/g)	<i>E. coli</i> (ufc/g)	Bact. sulf-red. (ufc/g)
1	A	6.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
2	A	8.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
3	A	7.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
4	A	1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
5	A	4.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
6	A	2.7x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	4.3	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
7	A	1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
8	B	3.2x10 <sup>5</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
9	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
10	B	1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
11	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
12	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
13	B	1.9x10 <sup>4</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	0.92	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
14	C	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>
15	C	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<3.0x10 <sup>-1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>1</sup>

A= fórmulas infantis para lactentes, B=fórmulas de transição, C=alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes

Da análise dos resultados verifica-se que todas as amostras de fórmulas infantis para lactentes apresentaram contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, apresentando valores na mesma ordem de grandeza, com excepção da amostra 6, cuja contagem foi de 2.7x10<sup>2</sup> ufc/g. Assim, e tendo em conta os referenciais do Codex Alimentarius relativos às fórmulas infantis em pó para lactentes (referidos no capítulo “Critérios microbiológicos aplicáveis às fórmulas infantis em pó”), as contagens situam-se em níveis inferiores aos estabelecidos como limite nesse documento. Este resultado serve ainda para reiterar o facto de que as fórmulas infantis para lactentes não são produtos estéreis.

No que concerne às fórmulas de transição, apenas metade apresentaram contagens de microrganismos a 30 °C, contudo, os valores de duas delas (amostras 8 e 13) foram muito superiores aos encontrados nos produtos anteriores. Apesar de serem destinados, por

definição, como alimento complementar a uma alimentação principal introduzida e portanto estando direccionadas para lactentes com idades superiores, estas contagens elevadas não são de descurar. Revelam um nível bacteriano elevado que pode ser alargado se, e mais uma vez, não forem tidas em conta as boas práticas de manipulação, armazenamento e distribuição. E esta contagem, em alimentos não perecíveis, como é o caso das fórmulas de transição, sugere o uso de matérias-primas contaminadas ou um processamento inadequado no que respeita à higiene do processo (Forsythe, 2005).

As amostras 14 e 15 foram incluídas no grupo dos alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes. Estes produtos são dirigidos para a alimentação exclusiva ou parcial de pacientes com capacidade limitada, diminuída ou alterada para ingerir, digerir, absorver, metabolizar ou excretar géneros alimentícios, ou cujo estado de saúde determina necessidades nutricionais particulares (Directiva 1999/21/CE de 25 de Março). Assim, as crianças em que é necessário recorrer a estes alimentos apresentam-se debilitadas, daí que as condições e os perigos microbiológicos a que são expostas devem ser particularmente considerados. Neste caso, as amostras 14 e 15 não revelaram contagens, nem de microrganismos a 30 °C, nem de enterobactérias (em nenhum dos métodos), nem de *E. coli* ou de bactérias sulfito-redutoras desenvolvidas em condições de anaerobiose, o que denota provavelmente um maior cuidado na garantia da qualidade microbiológica destes alimentos.

Para além dos microrganismos a 30 °C, foram avaliados em todas as amostras os níveis de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e em especial de *E. coli*, bem como a contagem de bactérias sulfito-redutoras desenvolvidas em condições de anaerobiose. Para a contagem de *Enterobacteriaceae* foram utilizados dois métodos, um por contagem em placa e outro pelo número mais provável. Este último método foi usado porque se pretendia detectar estes microrganismos pela sua importância neste contexto, mesmo que os níveis de contaminação dos produtos fossem muito baixos, uma vez que o limite de detecção da técnica do número mais provável, neste caso, é 0.3 NMP/g, para além do facto de os regulamentos (CE) 2073/2005 e 1441/2007 indicarem esta metodologia para a contagem de enterobactérias. Com efeito, todas as amostras analisadas revelaram um teor de *Enterobacteriaceae* inferior ao limite de detecção por contagem directa em placa, ou seja, inferior a  $1.0 \times 10^1$  ufc/g. Já na contagem pelo NMP verificaram-se duas amostras com contagem, nomeadamente uma pertencente ao grupo das fórmulas infantis para lactentes (amostra 6) e a outra pertencente ao grupo das fórmulas de transição (amostra 13). De realçar que a amostra 6 foi a amostra do seu grupo que apresentou uma maior contagem de microrganismos a 30 °C.

As colónias que surgiram nas placas de VRBG foram sujeitas a confirmação e a identificação através do kit API20E. Foram analisadas seis colónias (três colónias provenientes da amostra 6 e três colónias provenientes da amostra 13). Todas as colónias

se revelaram oxidase negativa e glucose positiva, sendo confirmadas como *Enterobacteriaceae*. Os resultados obtidos pelo API20E indicaram sempre *Pantoea* spp, sendo a percentagem de identificação, em todas elas, superior a 90%, como resume a Tabela 16.

**Tabela 16. Identificação das estirpes isoladas de duas amostras, através de API20E**

Amostra 6	<i>Pantoea</i> spp	Muito boa identificação (99.3%)
	<i>Pantoea</i> spp	Excelente identificação (99.9%)
	<i>Pantoea</i> spp	Muito boa identificação (99.8%)
Amostra 13	<i>Pantoea</i> spp	Boa identificação (90.5%)
	<i>Pantoea</i> spp	Muito boa identificação (99.4%)
	<i>Pantoea</i> spp	Muito boa identificação (99.8%)

Os microrganismos pertencentes ao género *Pantoea* surgem normalmente como bactérias ambientais, sendo que infecções por estes microrganismos em humanos são raras. Contudo, surgem descritos alguns surtos causados por bactérias pertencentes ao género *Pantoea*, nomeadamente em unidades de cuidados intensivos neonatais, como em 2004 na Malásia, em que estiveram envolvidos 8 recém-nascidos e que foi sugerida como causa a nutrição parenteral contaminada (Habsah *et al.*, 2005).

Iversen e Forsythe (2004) avaliaram em 82 fórmulas lácteas infantis em pó, o nível de *Enterobacteriaceae* por dois métodos, pela contagem directa em placa de VRBG e por inoculação em caldo EE, e verificaram também que o método em placa, dado o seu limite de detecção, não revela todas as situações em que estes microrganismos estão presentes. Os autores verificaram a presença de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em 9 amostras das 82 analisadas (ou seja, em cerca de 11% das amostras) o que é um valor semelhante ao encontrado neste estudo, em que 2 das 15 amostras analisadas apresentaram *Enterobacteriaceae* (ou seja, cerca de 13% das amostras). Iversen e Forsythe (2004) concluíram ainda que as *Enterobacteriaceae* mais isoladas foram *Enterobacter cloacae* e bactérias pertencentes ao género *Pantoea* spp., o que mais uma vez se assemelha ao estudo aqui apresentado.

Outro facto a ter em conta é que, apesar do nível de contaminação dos dois produtos ser reduzido, não deve ser negligenciado, uma vez que, tal como foi referido para os microrganismos a 30 °C, também neste caso, as condições após reconstituição são muito propícias ao desenvolvimento destas bactérias, com todos os perigos a elas associados.

Em relação a *E. coli*, nenhuma das amostras analisadas revelou contagem, ou seja, o resultado (dado o limite de detecção da técnica), foi em todos os casos inferior a  $1.0 \times 10^1$  ufc/g. Este resultado está de acordo com o apresentado para as *Enterobacteriaceae*, dado que *E. coli* pertence a esta família, e nas fórmulas que apresentaram *Enterobacteriaceae*,

todas pertenciam ao género *Pantoea*. No que diz respeito à contagem de bactérias sulfitorredutoras desenvolvidas em condições de anaerobiose, todas as amostras analisadas apresentaram teores inferiores a  $1.0 \times 10^1$  ufc/g (limite de detecção).

## 5. Avaliação microbiológica da presença de microrganismos patogénicos em fórmulas lácteas infantis em pó

Para além dos microrganismos indicadores, foi também avaliada a presença de microrganismos conhecidos como agentes causadores de doença. Assim, foi efectuada a contagem de *Clostridium perfringens* a 37° C, contagem e pesquisa de Estafilococos coagulase positiva, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes* e pesquisa e contagem de *Bacillus cereus*. A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos nas contagens microbianas.

**Tabela 17. Contagem de microrganismos em fórmulas lácteas infantis em pó**

Amostra (Nº)	Natureza da Amostra	<i>C. perfringens</i> a 37 °C (ufc/g)	<i>L. monocytogenes</i> (ufc/g)	<i>B. cereus</i> (ufc/g)	Estaf. coag. + (ufc/g)
1	A	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
2	A	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
3	A	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
4	A	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
5	A	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
6	A	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
7	A	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
8	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
9	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
10	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
11	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
12	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
13	B	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
14	C	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>
15	C	<1.0x10 <sup>1</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>

A= fórmulas infantis para lactentes, B=fórmulas de transição, C=alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes

Os resultados da pesquisa de agentes patogénicos, apresentam-se na Tabela 18.

Como podemos verificar pela análise dos resultados, nenhuma das amostras apresentou contagem de *Clostridium perfringens* a 37° C, de Estafilococos coagulase positiva, de *Listeria monocytogenes* ou de *Bacillus cereus*.

As pesquisas de Estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp., e *L. monocytogenes* revelaram a ausência destes microrganismos. A pesquisa de *B. cereus* revelou-se positiva em 1 g em 6 amostras (Tabela 18).

**Tabela 18. Pesquisa de microrganismos em fórmulas lácteas infantis em pó**

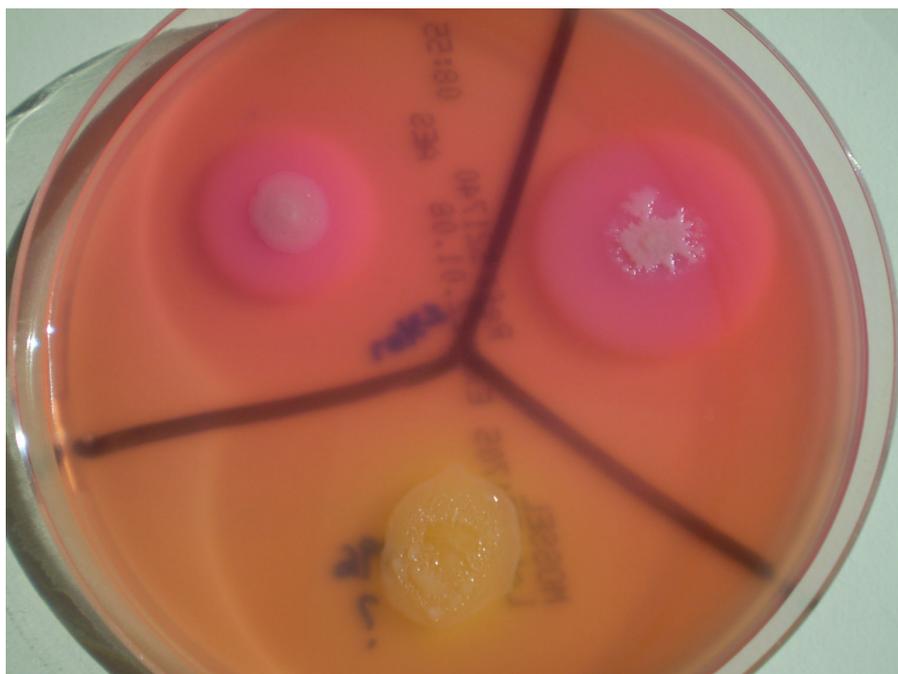
Amostra (N°)	Natureza da Amostra	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. (/25g)	Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> (/25g)	Pesquisa de <i>B. cereus</i> (/g)	Pesquisa de Estaf. coag.+ (/g)
1	A	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	A	Ausente	Ausente	<b>Presente</b>	Ausente
3	A	Ausente	Ausente	<b>Presente</b>	Ausente
4	A	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	A	Ausente	Ausente	<b>Presente</b>	Ausente
6	A	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
7	A	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
8	B	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9	B	Ausente	Ausente	<b>Presente</b>	Ausente
10	B	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
11	B	Ausente	Ausente	<b>Presente</b>	Ausente
12	B	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
13	B	Ausente	Ausente	<b>Presente</b>	Ausente
14	C	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
15	C	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

A= fórmulas infantis para lactentes, B=fórmulas de transição, C=alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes

A pesquisa de *Salmonella* indicou a sua ausência em 25 g de produto, em qualquer dos grupos pesquisados. Também no seu trabalho, Iversen e Forsythe (2004) não isolaram *Salmonella* a partir de 82 amostras de fórmulas infantis em pó. Tudela, Croizé, Lagier e Mallaret (2007), avaliaram a qualidade microbiológica de 156 fórmulas infantis em pó. Neste estudo, obtiveram apenas 3 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa, 1 isolado de *Clostridium bifermentans* e 40 isolados de bactérias pertencentes ao género *Bacillus* spp.. Com efeito, estes produtos apresentam um nível de contaminação relativamente baixo, o que pode justificar os resultados dos ensaios efectuados nas amostras em estudo.

A pesquisa de *Bacillus cereus* revelou-se positiva em 6 amostras das 15 analisadas (correspondente a uma percentagem de 40%). Destas, 3 pertenciam ao grupo das fórmulas infantis para lactentes (amostras 2, 3 e 5) e as restantes ao grupo das fórmulas de transição (amostras 9, 11 e 13). Constatou-se também, pela análise dos resultados, que este microrganismo está presente em número muito baixo, dado que quando se realizou a contagem, o *B. cereus* não foi detectado, o que indica que nos produtos em que esteve presente era sempre em número inferior ao limite de detecção da técnica, ou seja, inferior a  $1.0 \times 10^2$  ufc/g. Com efeito, a detecção deste microrganismo nas fórmulas infantis em pó deve incluir este factor optando-se, nestes produtos, por métodos que apresentem um limite de detecção de contaminação mais baixos. Procurando avaliar a incidência de *B. cereus* nas fórmulas infantis em pó, Becker, Schaller, von Wiese e Terplan (1994) analisaram um total de 261 amostras provenientes de 17 países e verificaram a presença deste microrganismo em 54% das amostras.

**Figura 7. Três colónias em meio *Bacillus cereus* Agar: colónias do plano superior – *B. cereus* (amostras 5 e 13) (colónias rosa – não fermentadoras do manitol – e rodeadas por halo de precipitação devido à produção de lecitinase)**



A partir dos seis isolados de *B. cereus* encontrados nas fórmulas infantis em pó analisadas, procedeu-se à avaliação do seu potencial para a produção da toxina diarreica. Verificou-se que apenas uma delas apresentou esta característica (amostra 5 – fórmula infantil para lactentes), ou seja, 1 isolado de *B. cereus* dos 6 detectados nos produtos analisados (aproximadamente 17%). As Figuras 8 e 9 mostram o resultado do ensaio da amostra 5 e do controlo positivo e negativo do teste, respectivamente.

Figura 8. Resultado do teste de produção de toxina diarreica por isolado de *B. cereus* (kit de detecção de toxinas BCET-RPLA, Oxoid™)

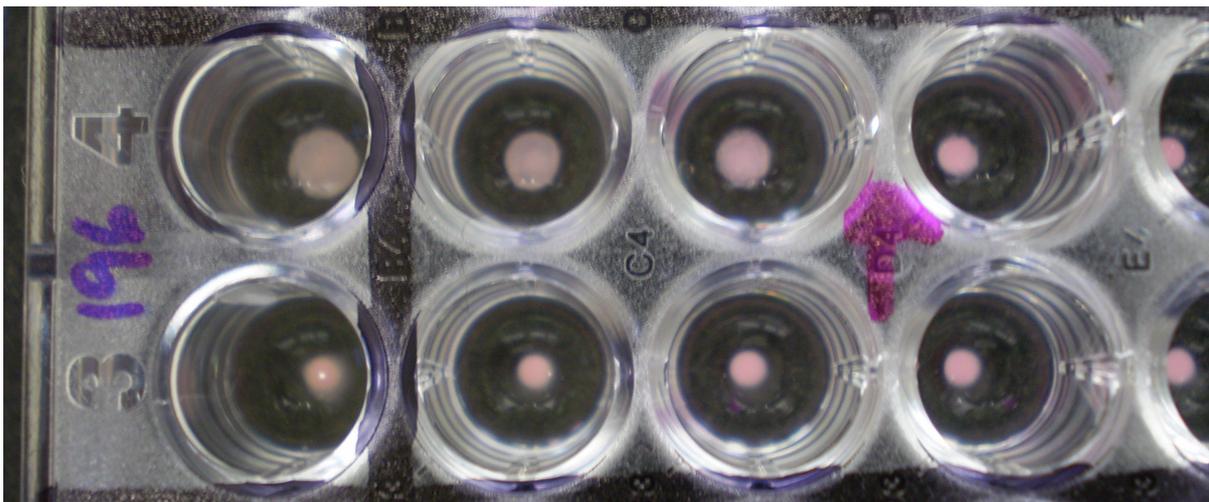
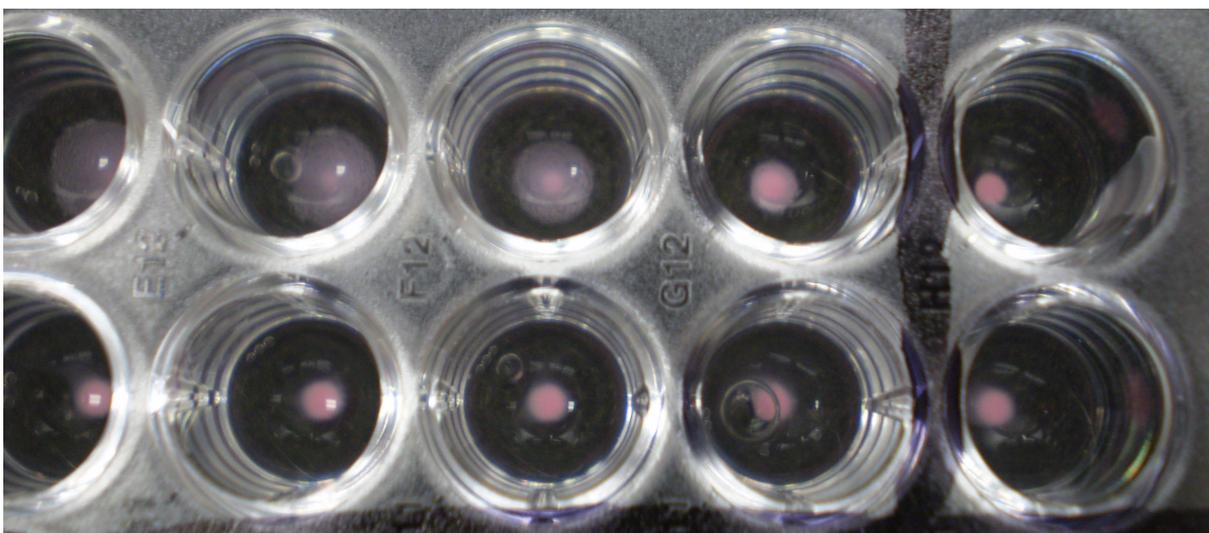


Figura 9. Controlos positivo (fila de cima) e negativo (fila de baixo) do teste de produção de toxina diarreica (kit de detecção de toxinas BCET-RPLA, Oxoid™)



Reyes, Bastías, Gutiérrez e Rodríguez (2007) analisaram a prevalência de *B. cereus* num conjunto de 381 amostras de produtos lácteos desidratados. Os autores isolaram 94 estirpes deste microrganismos e avaliaram o seu potencial quanto à produção da toxina diarreica, verificando que 28 destes isolados demonstraram ter essa capacidade, perfazendo uma percentagem de 29.8%. É reconhecido que os produtos lácteos desidratados se encontram frequentemente contaminados por *B. cereus*, principalmente devido à adição de componentes contaminados às formulações, e apesar do seu desenvolvimento nestes produtos ser diminuto, a presença de esporos permite que, nas condições após reconstituição, ocorra germinação e que células vegetativas proliferem e produzam toxinas, o que constitui um risco potencial para a segurança destes produtos (Becker *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 2007). É reiterada a importância das condições de preparação, manuseamento e armazenamento das fórmulas lácteas infantis em pó.

No estudo apresentado, a estirpe produtora de toxina foi isolada a partir de uma amostra de uma fórmula infantil em pó, o que tendo em conta a faixa etária para a qual é indicada, evidencia um risco associado mais agravado, dada a maior susceptibilidade das crianças com idade inferior a 1 ano.

De notar que apesar de as duas amostras 14 e 15 de alimentos dietéticos desidratados destinados a fins medicinais específicos para lactentes e a amostra 12 não terem apresentado nem contagem nem a presença de nenhum dos microrganismos pesquisados, também estas não estavam estéreis, pois na pesquisa de *B. cereus*, apesar de este microrganismo não ter sido detectado, surgiram na placa outras colónias, que não se caracterizavam como sendo *B. cereus* mas que contribuíram para a ideia de que, por um lado não são produtos estéreis, mas por outro os níveis de contaminação são muito reduzidos (contagem de microrganismos aeróbios a 30 °C inferior a  $1.0 \times 10^1$  ufc/g).

## V. Conclusão

Dada a susceptibilidade dos bebés a infecções, é exigido que as fórmulas infantis em pó apresentem um elevado nível de qualidade microbiológica durante a produção, distribuição e utilização. Ao realizar este trabalho, foi proposto, avaliar, ainda que de forma preliminar (principalmente em termos de amostragem), o nível de qualidade microbiológica de algumas das fórmulas infantis em pó comercializadas no distrito de Lisboa.

Com a execução deste trabalho obtiveram-se as seguintes conclusões:

- Na avaliação da metodologia ISO/TS 22964:2006 e dos diferentes meios de cultura cromogénicos, verificou-se que esta técnica apresentou melhores percentagens de recuperação quando foram utilizados os meios DFI e ChromoCult, em comparação com o meio ESIA;
- A pesquisa de *E. sakazakii* nas amostras de fórmulas lácteas infantis em pó, foi negativa em 10 g, ainda que não se possa extrapolar a prevalência deste microrganismo neste tipo de produtos, dadas as limitações do estudo (principalmente em termos de amostragem);
- Os resultados da avaliação da qualidade microbiológica confirmam a ideia de que as amostras de fórmulas lácteas infantis em pó não são produtos estéreis, uma vez que todas as amostras apresentaram contagem de microrganismos aeróbios a 30 °C superiores ou iguais a  $1.0 \times 10^1$  UFC/g com excepção de 5 amostras que evidenciaram a presença de carga microbiana (em níveis reduzidos) aquando da pesquisa dos agentes patogénicos;
- Apenas 13% das amostras apresentaram contagens de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e só quando se utilizou a técnica do NMP, o que revela níveis de contaminação reduzidos. Após identificação, verificou-se que os isolados pertenciam sempre ao género *Pantoea* (que apesar de ser uma bactéria ambiental, já esteve implicada em surtos associados a cuidados intensivos neonatais);
- Na avaliação de microrganismos patogénicos nas fórmulas lácteas infantis em pó, foi encontrado somente *B. cereus*, em 40% das amostras, e com uma contagem inferior a  $1.0 \times 10^2$  ufc/g;
- Dos 6 isolados de *B. cereus*, apenas uma estirpe se revelou produtora de toxina diarreica, tendo sido isolada de uma fórmula infantil para lactentes;
- Conforme proposto, a metodologia constante da norma ISO/TS 22964:2006, foi implementada no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.



## VI. Recomendações e Perspectivas futuras

Sendo conhecidos os efeitos potenciais resultantes das infecções por *E. sakazakii* e as suas repercussões em termos de saúde pública, nomeadamente em prematuros, recém-nascidos com baixo peso à nascença e imunodeprimidos, assume uma importância relevante a avaliação da presença de *E. sakazakii*, bem como de outros agentes patogénicos neste tipo de alimentos. Assim, o desenvolvimento de novas pesquisas nesta área apresenta-se de grande valência.

Conhecer algumas informações em determinadas áreas parece premente. Estudos com vista a determinar os mecanismos de virulência bem como a dose mínima infecciosa associada a infecções por *E. sakazakii* permanecem desconhecidos. Com efeito, correlações potenciais entre a patogenicidade e pigmentação, a forma e a textura das colónias, assim como a utilização de modelos e culturas de células para ensaios relacionados com este microrganismo carecem de investigação.

A investigação até agora desenvolvida não tem explorado totalmente a eficácia dos tratamentos tradicionais ou tecnologicamente avançados para a eliminação do agente patogénico a partir do leite em pó ou da fórmula infantil em pó, como a utilização da irradiação de fórmulas infantis em pó como abordagem ao controlo de *E. sakazakii*, ou a utilização de próbióticos e prébióticos com o objectivo de proteger os neonatos deste agente patogénico (Gurtler *et al.*, 2005).

No caso específico de Portugal, os estudos realizados neste tipo de produtos são nulos, ou pelo menos desconhecidos, o que vai de encontro à preocupação reconhecida pelos organismos internacionais, relativamente às limitações dos sistemas de vigilância existentes na maioria dos países, agravando o risco associado (INFOSAN, 2005). Neste sentido, e como resultado da análise de risco efectuada pela FAO/WHO (2004), surgiram um conjunto de recomendações para todas as entidades que tenham algum tipo de intervenção ou responsabilidade nesta área, nomeadamente:

- Incentivar os profissionais da saúde a investigar e reportar as fontes e os veículos de infecção por *E. sakazakii* e outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Os surtos em que sejam imputados estes agentes patogénicos são acontecimentos que deverão ser investigados com minúcia de forma a responder a questões como a ecologia destes microrganismos, e qual a respectiva dose-resposta.
- Em situações em que a mãe não possa amamentar ou no caso de optar por não o fazer, alertar – tanto no ambiente doméstico, como ao nível das unidades que prestam esses cuidados de saúde, especialmente aquelas em que são admitidos pacientes que sejam considerados de alto risco – para o facto de que as fórmulas infantis em pó não são produtos estéreis, e que determinados agentes podem ser responsáveis por situações graves de doença. Nestas mesmas situações, encorajar

para a utilização de fórmulas disponibilizadas comercialmente e que sejam estéreis (por exemplo, líquidas), especialmente para as crianças de alto risco, ou fórmulas que tenham sido submetidas a uma descontaminação efectiva (por exemplo, aquecimento da fórmula reconstituída).

- Desenvolver directrizes transversais para a preparação, o uso e a manipulação de fórmulas infantis com vista a minimizar os riscos.
- Incentivar a indústria a desenvolver uma gama maior de produtos que sejam alternativas estéreis para os grupos de risco, a reduzir a concentração e a prevalência de *E. sakazakii* no ambiente de fabrico e nas fórmulas infantis em pó e a utilizar um programa eficaz de monitorização ambiental como uma componente importante de um programa de gestão eficaz.
- Melhorar a comunicação do risco, a formação, a rotulagem e as actividades educativas bem como as abordagens, de forma a garantir a consciência para o problema e um adequado processo de preparação, armazenamento e utilização das fórmulas infantis.
- Promover a utilização de métodos de detecção e tipagem molecular para o *E. sakazakii* e outros microrganismos, validados internacionalmente, bem como estabelecer uma rede de laboratórios para alertar as autoridades de focos de *E. sakazakii* baseada em métodos de referência padronizados com o apoio de um laboratório central.

## VII. Bibliografia

- Asakura, H., Morita-Ishihara, T., Yamamoto, S., & Igimi, S. (2007). Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. *Microbiology and immunology*, 51(7), 671-677.
- Baird-Parker, T. C. (2000). *Staphylococcus aureus*. In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. (pp. 1317–1335). Maryland: Aspen Publishers Inc.
- Baker, R. D. (2002). Infant Formula Safety. *Pediatrics*, 110, 833-835. Acedido em Mar.12, 2008, disponível em: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/110/4/833>.
- Becker, H., Schaller, G., von Wiese, W., & Terplan, G. (1994). *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology*, 23(1), 1-15.
- Bennet, R. L., & Monday, S. R. (2003). *Staphylococcus aureus*. In M. D. Miliotis & J. W. Bier (Eds.), *International Handbook of Foodborne Pathogens*. (pp. 41-60). New York: Marcel Dekker Inc.
- bioMérieux (2008). *VIDAS Technology*. Acedido em Mar. 21, 2008, disponível em: [http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG\\_IND\\_FDA\\_PRD&doc=PTG\\_IND\\_FDA\\_PRD\\_G\\_PRD\\_NDY\\_5&pubparams.sform=4&lang=pt](http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_IND_FDA_PRD&doc=PTG_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_5&pubparams.sform=4&lang=pt).
- Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., & Joosten, H. M. (2003). Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 967-973.
- Clark, W. S. J. (2001). Concentrated and Dry Milks and Wheys. In E. H. Marth & J. L. Steele (Eds.), *Applied Dairy Microbiology*. (2nd ed.). (pp. 77-91). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Coignard, B., Vaillant, V., Vincent, J.-P., Leflèche, A., Mariani-Kurkdjian, P., Bernet, C., L'Héritau, F., Sénéchal, H., Grimont, P., Bingen, E., & Desenclos, J.-C. (2006). Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, 2-3, 10-13.
- D'Aoust, J., & Maurer, J. (2007). *Salmonella* species. In M. P. Doyle & L. R. Beuchat (Eds.), *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. (3rd ed.). (pp. 187-236). Virginia, USA: ASM Press.
- Directiva 1999/21/CE de 25 de Março de 1999. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias L 91/29*. Comissão Europeia. Bruxelas.
- Directiva 2006/141/CE de 22 de Dezembro de 2006. *Jornal Oficial da União Europeia L 401/1*. Comissão Europeia. Bruxelas.
- Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., & Fanning, S. (2006). *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 996-1002.
- Duffy, G., Lynch, O.A., & Cagney, C. (2008). Tracking emerging zoonotic pathogens from farm to fork. *Meat Science*, 78, 34–42.
- DuPont Qualicon (2008). *BAX system for detecting Enterobacter sakazakii*. Acedido em Mar. 21, 2008, disponível em: [http://www.dupont.com/Qualicon/en\\_US/products/BAX\\_System/bax\\_esak.html](http://www.dupont.com/Qualicon/en_US/products/BAX_System/bax_esak.html).

- Edelson-Mammel, S.G., & Buchanan, R.L. (2004). Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *Journal of Food Protection*, 67, 60– 63.
- Erickson, M. C., & Kornacki, J. L. (2002). *Enterobacter sakazakii: An Emerging Food Pathogen*. Acedido em Fev. 25, 2008, disponível em: <http://www.ugacfs.org/faculty/Erickson/EBWhitePaper.mpd.PDF>.
- European Food Safety Authority (2004). Opinion of the scientific panel on biological hazards on a request from the commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *The EFSA Journal* 113, 1-35.
- European Food Safety Authority (2007). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal* 130, 10-13.
- Farber, J.M. (2004). *Enterobacter sakazakii* – new foods from thought?. *Lancet*, 363, 5-6.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. L. (2000). *Listeria monocytogenes*. In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. (pp. 507–534). Maryland: Aspen Publishers Inc.
- Ferraz, F., Adam, S., Furtado, J., & Ferraz, M. (2005). *Índex de Nutrição Pediátrica*. Portugal: Egas Moniz – Cooperativa de Ensino Superior, CRL.
- Food and Drug Administration (2002a). *Health Professionals Letter on Enterobacter sakazakii Infections Associated With Use of Powdered (Dry) Infant Formulas in Neonatal Intensive Care Units*. Acedido em Mar. 12, 2008, disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>.
- Food and Drug Administration (2002b). *Isolation and enumeration of Enterobacter sakazakii from dehydrated powdered infant formula*. Acedido em Dez. 18, 2007, disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (2004). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula – Meeting report. *FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series*, 6. Acedido em Dez. 18, 2007, disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/index.html>.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (2006). *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula – Meeting Report. *FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series*, 10. Acedido em Fev. 8, 2008, disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/>.
- Forsythe, S. J. (2005). *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Maternal and Child Nutrition*, 1, 44-50.
- Friedemann, M. (2007). *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *International Journal of Food Microbiology*, 116, 1-10.
- Griffiths, M. W. (2000). Milk and Unfermented Milk Products. In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. (pp. 507–534). Maryland: Aspen Publishers Inc.
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., & Beuchat, L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 1-34.

- Hamilton, J. V., Lehane, M. J., & Braig, H. R. (2003). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 1355–1356.
- Habsah, H., Zeehaida, M., Van Rostenberghe, H., Noraida, R., Wan Pauzi, W. I., Fatimah, I., Rosliza, A. R., Nik Sharimah, N. Y., & Maimunah, H. (2005). An outbreak of *Pantoea* spp. in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition. *Journal of Hospital Infection*, 61, 213–218.
- Hayes, M. C., & Boor, K. (2001). Raw Milk and Fluid Milk Products. In E. H. Marth & J. L. Steele (Eds.), *Applied Dairy Microbiology*. (2nd ed.). (pp. 77-91). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hilliard, N. J., Schelonka, R. L., & Waites, K. B. (2003). *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3441-3444.
- Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., & Makino, S. (2005). Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2793-2795.
- International Commission on Microbiological Specification for Foods (2002). *Microorganisms in foods 7: microbiological testing in food safety management*. New York: Springer Science + Business Media LLC.
- International Commission on Microbiological Specification for Foods (2006). *A Simplified Guide to Understanding and Using Food Safety Objectives and Performance Objectives*. Acedido em Abr. 4, 2008, disponível em: [http://www.icmsf.iit.edu/main/articles\\_papers.html](http://www.icmsf.iit.edu/main/articles_papers.html).
- International Food Safety Authorities Network (2005). *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula. *International Food Safety Authorities Network Information n.º 1/2005*. Acedido em Dez. 18, 2007, disponível em [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_01\\_Esakazakii\\_Jan05\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_Esakazakii_Jan05_en.pdf).
- ISO 6887-1:1999 (1999). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*. International Organization for Standardization. Geneve.
- ISO 7218:2007 (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations*. International Organization for Standardization. Geneve.
- ISO 7932:2004 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony-count technique at 30 °C*. International Organization for Standardization. Geneve.
- ISO 7937:2004 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens – Colony-count technique*. International Organization for Standardization. Geneve.
- ISO 11290-2:1998 (1998). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 2: Enumeration method*. International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 15213:2003 (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions*. International Organization for Standardization. Geneve.

- ISO 16649-2:2001 (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli – Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide*. International Organization for Standardization. Geneve.
- ISO 21528-1:2004 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment*. International Organization for Standardization. Geneve.
- ISO 21528-2:2004 (2004). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method*. International Organization for Standardization. Geneve.
- ISO/TS 22964:2006 (2006) *Milk and milk products – Detection of Enterobacter sakazakii*. International Organization for Standardization. Geneve.
- Iversen, C., Caubilla-Baron, J., & Forsythe, S. (2004a). Isolation of *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacteriaceae*, and other microbial contaminants from powdered infant formula milk and related products [abstract]. In *Proceedings of the 104th General Meeting – American Society for Microbiology, New Orleans, LA, USA 23–27 May 2004*, p.4.
- Iversen, C., Druggan, P., & Forsythe, S. (2004b). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 96(2), 133-139.
- Iversen, C., & Forsythe, S. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 443-454.
- Iversen, C., & Forsythe, S. (2004). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology*, 21, 771–777.
- Iversen, C., & Forsythe, S.J. (2007). Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 48–52.
- Iversen, C., Lane, M., & Forsythe, S. J. (2004c). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 378– 382.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., & Joosten, H. (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. *BMC Evolutionary Biology*, 7(64). Acedido em Fev. 25, 2008, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/64>.
- Iversen, C., Waddington, M., On, S.L.W., & Forsythe, S. (2004d). Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5368-5370.
- Jackson, S. G. (1993). Rapid screening test for enterotoxin-producing *Bacillus cereus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(4), 972-974.

- Jarvis, C. (2005). Fatal *Enterobacter sakazakii* infection associated with powdered infant formula in neonatal intensive care unit in New Zealand. *American Journal of Infection Control*, 33(5), e19.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Staphylococcal Gastroenteritis. In *Modern Food Microbiology*. (7th ed.). (pp. 545-566). New York: Springer Science + Business Media Inc.
- Kandhai, M. C., Reij, M. W., Gorris, L. G. M., Guillaume-Gentil, O., & van Schothorst, M. (2004). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet*, 363, 39-40.
- Kim, K., & Loessner, M.J. (2008). *Enterobacter sakazakii* invasion in human intestinal caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction. *Infection and Immunity*, 76(2), 562-570.
- Kindle, G., Busse, A., Kampa, D., Meyer-Koenig, U., & Daschner, F.D. (1996). Killing activity of microwaves in milk. *Journal of Hospital Infection*, 33, 273– 278.
- Lehner, A., Tasara, T., & Stephan, R. (2004). 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiology*, 4(43), Acedido em Fev. 25, 2008, disponível em: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-4-43.pdf>.
- Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., Luo, M., & Huang, M. (2006a). Real time PCR using TaqMan and SYBR green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Microbiological Methods*, 65, 21-31.
- Liu, Y., Gao, Q., Zhang, X., Hou, Y., Yang, J., & Huang, X. (2006b). PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Molecular and Cellular Probes*, 20, 11–17.
- Merck (2008). *Manual Merck – biblioteca médica online: Problemas de saúde na infância*. Acedido em Fev. 25, 2008, disponível em <http://www.manualmerck.net/>.
- Ministère des Solidarités, de la Santé et de la Famille (2004). *Retrait des lots de Prégestimil suite à la survenue d'infections sévères à Enterobacter sakazakii chez des nouveau-nés prématurés hospitalisés ayant consommé ce produit*. Acedido em Fev. 12, 2008, disponível em: <http://www.cclinparisnord.org/Alertes&Avis/Pregestimil171204notecirc.pdf>.
- Mullane, N. R., Murray, J., Drudy, D., Prentice, N., Whyte, P., Wall, P. G., Parton, A., & Fanning, S. (2006). Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic-magnetic-bead capture. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6325–6330.
- Muytjens, H.L., Roelofs, W.H., & Jaspar, G.H.J. (1988). Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 743–746.
- Nazarowec-White, M., & Farber, J. M. (1997a). *Enterobacter sakazakii*: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 103-113.
- Nazarowec-White, M., & Farber, J.M. (1997b). Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Food Protection*, 60, 226–230.

- Nazarowec-White, M., & Farber, J.M. (1997c). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 9–13.
- Nazarowec-White, M., & Farber, J. M. (1999). Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Medical Microbiology*, 48, 559–567.
- NP 4400-2:2002 (2002). *Norma Portuguesa: Microbiologia alimentar - Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (Staphylococcus aureus e outras espécies) Parte 2: Técnica sem confirmação de colónias (Método corrente)*. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Economia e Inovação. Lisboa.
- NP 4405:2002 (2002). *Norma Portuguesa - Microbiologia alimentar: Regras gerais para a contagem de microrganismos, contagem de colónias a 30 °C*. Instituto Português da Qualidade, Ministério da Economia e Inovação. Lisboa.
- Osaili, T. M., Shaker, R. R., Abu Al-Hasan, A. S., Ayyash, M. M., & Martin, E.M. (2007). Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in Infant Milk Formula by Gamma Irradiation: Determination of D10-Value. *Journal of Food Science*, 72(3), 85-88.
- Pagotto, F. J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S., & Farber, J. M. (2003). *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *Journal of Food Protection*, 66, 370-377.
- Rajkowski, K. T., & Bennett, R. W. (2003). *Bacillus cereus*. In M. D. Miliotis & J. W. Bier (Eds.), *International Handbook of Foodborne Pathogens*. (pp. 27-40). New York: Marcel Dekker Inc.
- Randerson, J. (2004). Baby food could trigger meningitis. *New Scientist*, Magazine issue 2450. Acedido em Mar. 4, 2008, disponível em <http://www.newscientist.com/article/mg18224502.000-baby-food-could-trigger-meningitis.html>.
- Rea, M.F. (2003). O pediatra e a amamentação exclusiva. *Jornal de Pediatria*, 79(6), 479-480.
- Regulamento (CE) N.º 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia L 338/1*. Comissão Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007. *Jornal Oficial da União Europeia L 322/12*. Comissão Europeia. Bruxelas.
- Reyes, J. E., Bastías, J. M., Gutiérrez, M. R., & Rodríguez, M. O. (2007). Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, 24(1), 1-6.
- Richard, C. (1984). Genus VI *Enterobacter*. In Garrity, G. M., Boone, D. R., Castenholz, R. W. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (pp. 465-469). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Sandes, A. R., Nascimento, C., Figueira, J., Gouveia, R., Valente, S., Martins, S., Correia, S., Rocha, E., & Silva, L. J. (2007). Aleitamento materno: prevalência e factores condicionantes. *Acta Médica Portuguesa*, 20, 193-200.
- Schoeni, J. L., & Wong, A. C. L. (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, 68(3), 636-648.

- Shaker, R., Osaili, T., Al-Omary, W., Jaradat, Z., & Al-Zuby, M. (2007). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*, 18, 1241–1245.
- Skovgaard, N. (2007). New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 217–224.
- Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., & Lemons, J. A. (2004). *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *Journal of Pediatrics*, 144, 821–823.
- Tudela, E., Croizé, J., Lagier, A., & Mallaret, M. (2007). Surveillance microbiologique des échantillons de laits infantiles et des surfaces dans une biberonnerie hospitalière. *Pathologie Biologie*. Acedido em Mar. 12, 2008, disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleListURL&method=list&ArticleListID=743249368&sort=d&view=c&acct=C000050221&version=1&urlVersion=0&urlserid=10&md5=0300104b84a2271814cc333ac33bebec](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&method=list&ArticleListID=743249368&sort=d&view=c&acct=C000050221&version=1&urlVersion=0&urlserid=10&md5=0300104b84a2271814cc333ac33bebec).
- Willshaw, G. A., Cheasty, T., & Smith, H. R. (2000). *Escherichia coli*. In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. (pp. 1136–1177). Maryland: Aspen Publishers Inc.
- World Health Organization (2003). *The global strategy for infant and young child feeding*. Acedido em Fev. 25, 2008 disponível em [http://www.who.int/nutrition/publications/gi\\_infant\\_feeding\\_text\\_eng.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/gi_infant_feeding_text_eng.pdf).
- World Health Organization (2008). *About risk analysis in food*. Acedido em Abr. 3, 2008, disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/micro/riskanalysis/en/>.
- Zink, D. (2003). *Powdered infant formula: an overview of manufacturing processes*. Acedido em Mar. 4, 2008, disponível em: [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3939b1\\_tab4b.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/3939b1_tab4b.pdf).