

# AVALIAÇÃO DO SISTEMA BAX<sup>®</sup> FRENTE AO MÉTODO DA ISO PARA DETECÇÃO DE *ENTEROBACTER SAKAZAKII* EM ALIMENTOS

CAROLINA S. MOURA<sup>1</sup>; VALÉRIA A.C. JUNQUEIRA<sup>2</sup>; NEUSELY SILVA<sup>3</sup>; ROSANA F.S. SANTOS<sup>4</sup>

Nº0801027

## RESUMO

A bactéria patogênica *Enterobacter sakazakii* é um microorganismo emergente que provoca malefícios a saúde de bebês prematuros podendo causar surtos de sepse, meningite e enterocolite necrozante, sendo seu principal veículo de transmissão as fórmulas infantis. O presente estudo confirmou que os ingredientes usados na formulação de alimentos infantis, tais como leite em pó, amido e açúcar, entre outros, também apresentam contaminação por essa bactéria, como previamente alertado pela FAO/WHO. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho do método BAX<sup>®</sup> (DuPont) em comparação com o método ISO/TS 22964:2006 para detecção de *E. sakazakii* em alimentos. Os resultados sugerem que nenhum dos métodos alcançou prevalência de satisfação.

## ABSTRACT

The pathogenic bacterium *Enterobacter sakazakii* is an emergent microorganism that is prejudicial to the health of premature babies, being able to induce sepsis, meningitis and necrotizing enterocolitis. Infant formulas are currently considered the main vehicle of transmission of the *E. sakazakii*. In this study we confirmed that the ingredients used in the infant food preparation, such as powder milk, starch and sugar, also presents contamination for this bacterium, as previously alerted by FAO/WHO (2004). The objective of the present work was to evaluate the performance of the BAX<sup>®</sup> system (DuPont) in comparison with the ISO/TS 22964:2006 method for detection of *E. sakazakii* in foods. The results suggest that none of the methods reached the prevalence of satisfaction.

---

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Nutrição, METROCAMP, Campinas-SP, linanutricao@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Orientador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP

<sup>4</sup> Colaborador: Assistente de Laboratório, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

## 1. INTRODUÇÃO

A bactéria patogênica *Enterobacter sakazakii* é um microorganismo emergente que pertence à família Enterobacteriaceae, com as seguintes características: morfologia de bastonete, oxidase negativo, Gram negativo, flagelos peritríquios, não esporogênico e anaeróbio facultativo. Desenvolve-se basicamente utilizando glicose ou citrato como únicas fontes de carbono e energia.

O reservatório natural dessa bactéria ainda é desconhecido, porém outros membros do mesmo gênero são normalmente encontrados em fezes humanas e de animais, no esgoto, na água e no solo. (GILLIO, 2006).

A literatura descreve que *Enterobacter sakazakii* representa perigo severo principalmente em bebês prematuros, bebês com baixo peso ao nascer que necessitem de cuidados na UTI, e aquelas crianças de até um ano de idade com problemas de saúde, pois tem causado surtos de sepse, meningite neonatal e enterocolite necrozante em várias partes do mundo, porém pouco se sabe sobre os mecanismos específicos de virulência dessa bactéria.

O principal veículo de transmissão se faz em fórmulas infantis desidratadas, utilizadas em hospitais e maternidades para a preparação de mamadeiras justamente para a população de risco.

Segundo a FAO/WHO, 2004, os ingredientes usados para a formulação de alimentos infantis como: leite em pó, amido, lactose, sacarose, entre outros, também podem apresentar alto risco de conter *Enterobacter sakazakii*.

Métodos de análise vêm sendo estudados para a utilização na detecção de *Enterobacter sakazakii*. Basicamente todos seguem as mesmas etapas, com algumas variações como: meio de cultura, tempo e temperatura de incubação, entre outras. Os métodos utilizados nos últimos anos são: *Muytjens et.al.*(1988), *Nazarowec-White&Farber*(1997), *Food and Drug Administration*(FDA,2002), *ISO/TS 22964* (2006) e Sistema *BAX*<sup>®</sup> (DuPont).

O método *ISO/TS 22964* (2006) é recente e o primeiro efetivamente direcionado à bactéria estudada, pois utiliza meios de cultura diferenciados que permitem uma melhor seleção e diferenciação de *E. sakazakii* das enterobactérias acompanhantes,

criando desse modo condições favoráveis e mais competitivas para *E. sakazakii* em relação às outras enterobactérias.

O Sistema BAX<sup>®</sup> (DuPont) também é um método recente e rápido de ausência ou presença, totalmente automatizado e que identifica um fragmento genético, específico e único de *E. sakazakii*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRAGEM**

Foram analisadas 65 amostras coletadas no varejo ou fornecidas pela indústria, analisadas sem contaminação artificial.

### **2.2 MÉTODOS**

#### **2.2.1 MÉTODO ISO/TS 22964 (2006)**

A amostra foi homogeneizada em Água Peptonada Tamponada (BPW) na diluição 1:10 (100g da amostra em 900ml de BPW) e incubada a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $18\pm 2\text{h}$ .

Foi transferido 0,1ml do BPW para 10 ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (mLST-V) e incubado a  $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2\text{h}$ .

Plaqueamento diferencial: Foi estriado uma alçada do mLST-V em uma placa de ESIA e incubada a  $44\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2\text{h}$ . Foi verificada a presença de colônias típicas: verdes ou verde azuladas.

Havendo colônias típicas na placa de ESIA, foram selecionadas cinco colônias para a confirmação e, havendo menos de cinco, foram selecionadas todas. Cada colônia selecionada foi inoculada por estrias em uma placa de Ágar Tripticase de Soja (TSA) e incubada a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 44-48h. Foi verificada a presença de colônias típicas (amarelas). Nessa etapa do trabalho, não havendo colônias típicas no ESIA, ou

havendo menos de cinco, colônias atípicas foram isoladas em seu lugar. Da mesma forma, na triagem das culturas em TSA. As colônias atípicas também foram submetidas à confirmação, para avaliar com que frequência *E. sakazakii* apresenta características atípicas em ESIA ou TSA.

Em caso positivo, foi selecionada uma colônia amarela para a confirmação. Quando o resultado foi negativo, foram selecionadas outras colônias. A confirmação foi realizada em galeria API 20E, com incubação de  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24h.

### **2.2.2 MÉTODO SISTEMA BAX<sup>®</sup> (DuPont)**

A amostra foi homogeneizada em mLST-V na diluição 1:10 e incubada a  $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2$ h. Foi transferido 10 $\mu\text{l}$  do mLST-V para 500 $\mu\text{l}$  de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), e incubado por 3 horas a  $35-37^{\circ}\text{C}$ .

Reação de lise: foi transferido 5 $\mu\text{l}$  de cada amostra enriquecida (BHI) para os tubos de lise. Foi efetuada a reação lise da seguinte maneira: os tubos foram aquecidos a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos e, em seguida a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Em seguida foram transferidos para o bloco de resfriamento e mantidos resfriados por cerca de 5 minutos.

Reação de PCR: foi transferido 50 $\mu\text{l}$  da amostra lisada para os tubos de PCR. Os tubos de PCR foram levados até o termociclador e foi dado início ao processo do equipamento que leva cerca de três horas e meia para ser completado. Após o término do ciclo os resultados são dados como positivo (vermelho) ou negativo (verde) no monitor. Para as amostras positivas no método BAX<sup>®</sup>, uma alíquota de 250 $\mu\text{l}$  foi retirada do caldo mLST-V e inoculada em ESIA (plaqueamento em superfície). O ensaio foi continuado conforme o método ISO 22964, item: plaqueamento diferencial. Esse procedimento foi repetido também a partir dos tubos de BHI. Esse procedimento é feito para confirmação em ESIA do resultado positivo presuntivo do BAX.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No total, 191 cepas isoladas foram submetidas à confirmação nas galerias API 20E. Todas essas cepas foram identificadas como enterobactérias. Dessas 191 cepas, 24

foram identificadas como *E. sakazakii*, agrupadas em três perfis do API 20E. Dessas 24, 19 (79%) apresentaram característica típica em ESIA, enquanto 5 (21%) não. Em TSA, 19 (79%) apresentaram característica típica, enquanto 5 (21%) foram atípicas.

De 65 amostras analisadas, 23 (35%) apresentaram resultado positivo presuntivo no PCR do Sistema BAX<sup>®</sup>, dessas 23 apenas duas (8,6%) foram confirmadas culturalmente. Foi observada uma diferença significativa entre o número de amostras positivas presuntivas no PCR do BAX<sup>®</sup> e o número de amostras confirmadas culturalmente, no isolamento em ESIA, pois a Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) considera o resultado do PCR como presuntivo, valendo como final o resultado da confirmação cultural.

Na comparação entre os resultados positivos presuntivos do BAX<sup>®</sup> (PCR) e os resultados confirmados culturalmente em ESIA, houve 21 (91%) amostras com resultados discordantes. Em todas essas amostras, o presuntivo foi positivo, mas a confirmação cultural foi negativa, ou seja, das 23 amostras positivas presuntivas apenas duas foram confirmadas culturalmente. Esses resultados positivos presuntivos parecem indicar uma alta taxa de falsos positivos no PCR do método BAX<sup>®</sup>. Isso pode ser devido à possibilidade de que o PCR seja mais sensível que os métodos culturais, sinalizando *E. sakazakii* em concentrações que os demais métodos não conseguem detectar, ou que o microrganismo esteja injuriado e por isso não consiga crescer na confirmação cultural, ou até mesmo que o microrganismo esteja morto, mas mesmo assim o método BAX consegue detectá-lo pois identifica seguimentos de DNA porém o microrganismo não cresce na confirmação cultural. Outra hipótese é que por essa bactéria ser um microrganismo recente, o segmento de DNA que o Sistema BAX utiliza na identificação dessa bactéria seja conservado entre as enterobactérias e não exclusivo e único da *E. sakazakii*. Essas dúvidas ainda não foram esclarecidas.

Em relação à comparação entre os métodos ISO 22964 e BAX<sup>®</sup> confirmado em ESIA, de 65 amostras analisadas, 4 foram positivas com três resultados discordantes (75%): 2 amostras positivas na ISO e negativa no BAX e uma amostra positiva no BAX e negativa pelo método ISSO. A amostra positiva em ambos os métodos apresentou colônias atípicas nos ágar ESIA e TSA, a partir do método ISO, porém estas colônias atípicas foram confirmadas pelo “Kit” API 20E como pertencente a espécie *E. sakazakii*, como pode ser observado no quadro 1.

**Quadro 1** – Resultados de detecção de *Enterobacter sakazakii* entre os métodos ISO 22964 e Sistema BAX.

Amostra	Sistema BAX (Confirmado)	ISO 22964
2496/07	+	+
3890/07	-	+
5850/07	+	-
5851/07	-	+

Dentre as 4 amostras positivas, 3 delas são ingredientes utilizados na formulação de alimentos infantis: uma de soja, duas de leite em pó e apenas uma fórmula infantil para lactentes.

#### 4. CONCLUSÃO

O número de amostras analisadas ainda é baixo para conclusões definitivas, mas esses resultados sugerem que uma porcentagem significativa de colônias atípicas no método da ISO está sendo confirmada como *E. sakazakii*. Em função disso, é importante continuar isolando colônias atípicas para confirmação, na ausência de colônias típicas. Porém isso pode se tornar uma problemática do método em rotina de laboratório, demonstrando a necessidade de melhora na detecção do microrganismo.

É importante a confirmação do resultado presuntivo do PCR BAX<sup>®</sup> no meio de cultura ESIA, devido à frequência com que o resultado presuntivo do BAX<sup>®</sup> tem se mostrado positivo embora a confirmação cultural seja negativa ou sem crescimento.

Os resultados demonstram a importância de analisar também os ingredientes usados para a formulação de alimentos infantis, e também os ingredientes do produto final, ou seja, ampliar os tipos de alimentos analisados para detecção de *E. sakazakii* e não apenas as fórmulas infantis.

A comparação do desempenho entre os métodos torna-se um desafio, pois a discordância entre eles foi alta, e a única amostra que coincidiu com resultados positivos em ambos os métodos, o método da ISO foi a partir de colônia atípica. Nenhum dos métodos obteve prevalência de satisfação, das 4 amostras positivas, em

3 delas o método da ISO conseguiu identificar o microrganismo, enquanto o método BAX<sup>®</sup> conseguiu identificar em 2 amostras, sendo uma coincidente com o método da ISO e outra não. Como o número de amostras positivas foi baixo, ainda não podemos concluir qual método apresenta melhor desempenho na detecção de *E.sakazakii*, contudo o método da ISO parece superior ao do Sistema BAX.

Ainda são necessários muitos estudos e pesquisas sobre *E.sakazakii* e suas características a fim de desenvolver ou melhorar os métodos de detecção dessa bactéria.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAX<sup>®</sup> System PCR assay with automated detection for bacterial screening: **user guide**. Wilmington: Du Pont Qualicon, 2000.

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO 2004. **Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganism in powdered infant formula**, Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en>. Acesso em: 14/07/2007.

GILLIO, C, M. **Enterobacter sakazakii em fórmulas lácteas infantis desidratadas, para bebês de 0-6meses**, 2006.

ISO/TS 22964:2006(E). **Milk and Milk products – Detection of *Enterobacter Sakazakii***. The International Organization for Standardization, 2006.

MUYTJENS, H. L., ROELOFS – WILLEMSE, H., JASPAR, G.H.J. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**. v.26, p.743-746, 1988.

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