

## Investigação de um surto causado por *Cronobacter malonaticus* em um hospital maternidade em Teresina, Piauí: caracterização e tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado

### Investigation of an outbreak caused by *Cronobacter malonaticus* in a Maternity Hospital in Teresina, Piauí: Characterization and typing by pulsed-field gel electrophoresis

Marcelo Luiz Lima Brandão\*

Natália Scudeller Umeda

Karyne Rangel Carvalho

Ivano de Filippis

#### RESUMO

*Cronobacter* spp. são considerados patógenos oportunistas que causam infecções severas em neonatos devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas. Em 2013, três casos de infecção em neonatos associados à *Cronobacter* spp. foram relatados em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina, Piauí. O objetivo deste trabalho foi investigar o surto para elucidar o veículo de contaminação, identificar a espécie envolvida e avaliar a relação genética entre os isolados clínicos. As amostras de fórmulas infantis desidratadas e de leite humano pasteurizado ingeridas pelos neonatos foram analisadas por diferentes métodos de cultivo. As cepas clínicas foram caracterizadas fenotipicamente pelo sistema Vitek 2.0 e por provas bioquímicas convencionais. Para identificação do gênero e espécie, foi realizada a reação em cadeia pela polimerase (PCR) com alvo nos genes *gluA* e *rpoB*, respectivamente. Os isolados foram tipificados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) utilizando-se a enzima de restrição *SpeI*. Nenhuma amostra de alimento apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. Três isolados de hemocultura foram identificados como *C. malonaticus*, sendo duas classificadas no biogrupo 9 e uma no 5, e foram agrupados no mesmo genótipo. Os resultados sugerem que o mesmo clone foi responsável pela infecção nas três pacientes, porém não foi possível identificar a fonte de contaminação.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cronobacter* spp.; PFGE; Caracterização Fenotípica; Caracterização Genotípica; Fórmula Infantil

#### ABSTRACT

*Cronobacter* spp. are considered opportunistic pathogens that cause severe infections in newborns due to the consumption of powdered infant formulas. In 2013, three cases of infection in neonates caused by the *Cronobacter* spp. were reported in a Maternity Hospital at Teresina, Piauí. The objective of this study was to investigate the outbreak to elucidate the source of contamination, identify the species involved, and assess the genetic relatedness among the clinical isolates. The samples of powdered infant formulas and pasteurized human milk that were ingested by the neonates were analyzed by different cultivation methods. The clinical strains were phenotypically characterized by the Vitek 2.0 system and conventional biochemical tests. To identify the genus and species, polymerase chain reaction targeting *gluA* and *rpoB*, respectively, was performed. The isolates were typed by pulsed-field gel electrophoresis using the restriction enzyme *SpeI*. No food sample showed contamination by *Cronobacter* spp. Three blood isolates were identified as *C. malonaticus*, two classified as biogroup 9 and one as biogroup 5, and were grouped in the same genotype. Our results suggest that the same clone was responsible for infection in three patients, but the source of contamination could not be identified.

**KEYWORDS:** *Cronobacter* spp.; PFGE; Phenotypic Characterization; Genotypic Characterization; Infant Formulae

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br

Recebido: 10 jul 2014  
Aprovado: 07 abr 2015



## INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Cronobacter* são consideradas patógenos emergentes, tendo sido associadas a infecções em neonatos, principalmente devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas (FID) contaminadas<sup>1,2,3</sup>. Os primeiros casos de infecção em neonatos foram reportados em 1958 na Inglaterra<sup>4</sup>. Desde então, estas bactérias são consideradas patógenos oportunistas que causam infecções com sérias consequências em neonatos<sup>2</sup>. As síndromes clínicas das infecções incluem a meningite, enterocolite necrosante, além de infecções pulmonares, urinárias e bacteremia<sup>2,5,6</sup>. A taxa de mortalidade nos casos de meningite é de aproximadamente 40% e a maioria dos sobreviventes apresenta sequelas graves<sup>7</sup>. Já nos casos de bacteremia e enterocolite necrosante, a taxa de mortalidade é estimada em 10,0% e 19,0%, respectivamente<sup>8</sup>.

Cepas de *Cronobacter* spp. já foram isoladas de uma série de produtos alimentícios, incluindo cereais, farináceos, legumes, ervas e condimentos, bebidas, frutas, hortaliças, carne e produtos cárneos, leite e laticínios, ovos e pescado<sup>9,10,11</sup>. Contudo, apenas FID foram epidemiologicamente identificadas como veículo de contaminação em casos de infecções<sup>12</sup>. A presença destes patógenos em FID levou ao recolhimento destes produtos por diferentes produtores em diversos países, incluindo o Brasil<sup>13</sup>.

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), acredita-se que as infecções causadas por *Cronobacter* spp. não sejam muito frequentes, sendo reportados de quatro a seis casos em neonatos por ano no mundo. Contudo, esse dado é subestimado, uma vez que a maioria dos casos não é notificada<sup>7</sup>. Grande parte dos casos de infecções descritos na literatura é proveniente de países desenvolvidos, no entanto a situação parece ser muito diferente nos demais países<sup>3,14</sup>. Este fato pode estar relacionado à falta de um sistema de vigilância para notificação dos casos de infecções por *Cronobacter* spp.<sup>5</sup>. Além disso, muitos laboratórios clínicos, independentemente do país, não incluem a pesquisa de *Cronobacter* spp. em sua rotina e, na maioria dos casos, o relato das infecções por esses patógenos não é obrigatório. Desta forma, o conhecimento da epidemiologia das espécies de *Cronobacter* spp. se torna incompleto. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>1</sup>, existe um grande apelo para que se notifiquem os casos de infecções ocorridos, de forma a tentar elucidar a real incidência deste patógeno para que se possa traçar medidas de controle mais eficazes.

Em 2013, um surto causado por *Cronobacter* spp. ocorreu em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina no Estado do Piauí (PI), Brasil. Neste episódio, amostras de alimentos ingeridos pelos pacientes e isolados clínicos dos pacientes foram enviados ao INCQS/Fiocruz para análise. Este estudo teve por objetivo investigar um surto causado por *Cronobacter* spp. em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina-PI, para elucidar o veículo de contaminação e identificar as possíveis espécies envolvidas e suas relações genéticas.

## METODOLOGIA

### Amostras

Foram recebidas quatro amostras para análise: uma lata aberta contendo aproximadamente 343 g de fórmula infantil para recém-nascidos pré-termo e/ou de alto risco (amostra 1), uma lata aberta contendo aproximadamente 229 g de fórmula infantil para lactantes de 0 a 6 meses (amostra 2), e duas garrafas de borosilicato contendo em cada 300 mL de leite humano pasteurizado de lotes diferentes (amostras 3 e 4). As amostras foram coletadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública (Lacen) do Estado do Piauí (Lacen/PI) e enviadas ao INCQS/Fiocruz para análise. As amostras 1 e 2 foram mantidas em temperatura ambiente e as amostras 3 e 4 foram acondicionadas em freezer a temperatura de  $-20 \pm 4^\circ\text{C}$  até o momento das análises.

### Análises microbiológicas

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada pelo método de cultivo descrito no *Bacteriological Analytical Manual do Food and Drug Administration* (BAM-FDA)<sup>15</sup> e pela técnica de enriquecimento seletivo descrito na norma ISO/TS 22964:2006<sup>16</sup>. Nas amostras 1 e 2, foi analisado todo o conteúdo da lata, sendo a amostra 1 dividida em quatro alíquotas (três de 100 g e uma de 43 g) e a amostra 2 em três alíquotas (duas de 100 g e uma de 29 g). Nas amostras 3 e 4 foi analisada uma alíquota de 50 mL de cada amostra.

No ensaio realizado de acordo com a Metodologia BAM-FDA<sup>15</sup>, as alíquotas das amostras foram pesadas (amostras 1 e 2) ou aferidas em uma proveta estéril (amostras 3 e 4) e homogeneizadas com água peptonada tamponada (Merck, Inglaterra), na proporção 1:10, e incubadas a  $35^\circ\text{C}/24$  h. Posteriormente, o pré-enriquecimento foi homogeneizado e duas alíquotas de 40 mL foram centrifugadas a 3.000 g/10 min (Eppendorf 5810R, A-4-81, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de salina tamponada fosfatada. A partir de cada alíquota, foi realizada uma semeadura pela técnica de esgotamento e *spread plate* (100  $\mu\text{L}$  da suspensão) em "*Brilliance Enterobacter sakazakii agar*" (DFI formulation; Oxoid, Inglaterra) e "*Enterobacter sakazakii chromogenic plating agar*" (ESPM; R&F Products Inc., EUA). As placas foram incubadas a  $35^\circ\text{C}/24$  h.

No ensaio realizado de acordo com a norma ISO/TS 22964:2006<sup>16</sup>, a partir do pré-enriquecimento (descrito no texto acima), uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para 10 mL de caldo lauril sulfato de sódio modificado (mLST, Oxoid, CM1133, Inglaterra) contendo vancomicina (SR0247E, Oxoid, Inglaterra). O meio foi incubado a  $44^\circ\text{C}/24$  h. Posteriormente foi realizado o isolamento no "*Enterobacter sakazakii Isolation agar*" (ESIA; AES Chemunex, França) e as placas incubadas a  $44^\circ\text{C}/24$  h.

### Isolados bacterianos

Em 2013, três isolados clínicos (C89, C90 e C91) provenientes do Lacen-PI foram enviados ao INCQS/Fiocruz. Estes isolados foram



obtidos da hemocultura de três pacientes distintas do sexo feminino que apresentaram quadro de bacteremia durante o mesmo período em que estiveram internadas no hospital em 2013. Após o recebimento, as culturas foram avaliadas quanto a sua pureza em ágar Columbia contendo 5% de sangue de carneiro (Merck, Alemanha) incubado a 35°C/24 h e posteriormente foram estocadas em caldo infusão cérebro coração (BHI; Merck, Alemanha) contendo 20 % de glicerol (Merck, Alemanha) a temperatura inferior a -70°C (Thermo, EUA). Para realização dos experimentos, uma alçada desta cultura foi semeada em 3,0 mL de caldo BHI e ágar nutriente (Merck, Alemanha) e incubados a 35°C/24 h.

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

#### Caracterização fenotípica

As colônias suspeitas obtidas nas análises microbiológicas e as cepas clínicas foram cultivadas em ágar nutriente e submetidas à confirmação do gênero através do sistema semi-automatizado Vitek 2.0 com uso de cartões GN TEST KIT VTK2 (bioMérieux, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em adição, as cepas confirmadas como *Cronobacter* spp. foram submetidas às provas bioquímicas convencionais descritas por Farmer et al.<sup>17</sup> e complementadas por Iversen et al.<sup>18</sup> para identificação dos biogrupos.

#### Caracterização molecular

As culturas foram cultivadas em BHI e submetidas à extração de DNA com uso do kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, sendo eluído em volume final de 100 µL. Em seguida, realizou-se a PCR com alvo no gene *gluA*, responsável pela atividade 1,6 α-glicosidase, para amplificação de um fragmento de 105 pares de base (pb) para confirmação do gênero<sup>19</sup>. Posteriormente, as cepas confirmadas como *Cronobacter* spp. foram submetidas à PCR com alvo no gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da polimerase ribossomal bacteriana, para identificação da espécie, seguindo o protocolo descrito por Stoop et al.<sup>20</sup>.

O DNA extraído das cepas de *C. sakazakii* INCQS 00578 (ATCC 29544), *C. malonaticus* INCQS 619 (LMG 23826), *C. turicensis* INCQS 615 (LMG 23827), *C. muytjensii* INCQS 579 (ATCC 51329), *C. dublinensis* INCQS 618 (LMG 23823) e *C. universalis* INCQS 599 (NCTC 9529) foi utilizado como controle positivo para as reações da PCR. Água livre de DNA/RNA (BioBasic, Canadá) foi utilizada como controle negativo da reação.

#### Análise do polimorfismo do DNA genômico

Os isolados de *Cronobacter* spp. foram submetidos à avaliação do polimorfismo genético por PFGE de acordo com o protocolo *Pulsenet*<sup>21</sup>, com algumas modificações. O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose (1% *Seaken Gold Agarose*) com 1% dodecil sulfato de sódio). Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano em fase exponencial

foi suspensa em tampão para suspensão celular BSC (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8,0) para a obtenção da turvação correspondente a 3,0 da escala de McFarland. A 500 mL da suspensão de células, foi adicionado volume igual de agarose *low melting* a 1,1% (*Seaken Gold Agarose*) na temperatura de 50°C e 0,5 µL de proteinase K (Sigma, EUA). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos, contendo 2 mL de solução de lise (Tris-HCl 50 mM: 50 mM EDTA, pH 8,0 + sarcosil a 1%) e 0,5 µL de proteinase K e foram incubados a 50°C/2 h. Em seguida, o tampão foi retirado e os blocos lavados três vezes com 10 mL de água Milli-Q por 15 min a 50°C e uma vez com tampão TE nas mesmas condições. Os blocos foram incubados com 10 U da enzima de restrição *SpeI* (Sigma, EUA) durante 2 h a 37°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose à 1% preparado em tampão TE através da eletroforese de campo pulsado, usando o aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, EUA). A eletroforese foi realizada nas condições descritas por Bringi et al.<sup>22</sup>: tempo de pulso crescente de 1,8 a 25 s, por 18 h a 6V/cm, a 14°C, com ângulo de 120°. Após a corrida os géis foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL), observados e fotografados no Image Master VDS (Pharmacia Biotech). A análise dos genótipos foi realizada através de inspeção visual dos géis de agarose com base nos critérios estabelecidos por Tenover et al.<sup>23</sup>. Os resultados obtidos foram analisados através de dendrogramas confeccionados a partir da análise da foto do gel no *software* Gel Compar II versão 4.0.

## RESULTADOS

*Cronobacter* spp. não foi detectada em nenhuma amostra de alimento analisada (Tabela 1). Na análise pela metodologia ISO/TS 22964:2006<sup>16</sup> todas as amostras apresentaram turvação no caldo mLST, contudo não houve crescimento de colônias características no ESIA. Na metodologia descrita no BAM-FDA<sup>15</sup>, as amostras 1, 2 e 3 apresentaram crescimento de colônias suspeitas no ESPM, contudo as cepas não foram confirmadas pela PCR. Uma colônia de cada amostra foi selecionada e submetida à identificação no sistema Vitek 2.0. As cepas foram identificadas como pertencente ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *A. baumannii* (amostra 1 e 3) e como *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (amostra 2).

Os três isolados clínicos foram confirmados como *Cronobacter* spp. pela PCR com alvo no gene *gluA*<sup>19</sup> e pelo sistema semi-automatizado Vitek 2.0 (Tabela 2). As cepas 89 e 90 apresentaram o mesmo perfil bioquímico no sistema Vitek 2.0, enquanto que a cepa 91 divergiu em quatro provas, apresentando resultado positivo para alcalinização de L-lactato e produção de lipase, e resultado negativo para alcalinização de succinato e α-galactosidade. Esta diferença também foi observada na classificação dos biogrupos, uma vez que as cepas 89 e 90 foram classificadas no biogrupo 9, enquanto que a cepa C91 foi classificada como biogrupo 5, tendo como única diferença o resultado positivo para utilização do inositol.

As três cepas foram identificadas como *C. malonaticus* pela PCR com alvo no gene *rpoB*. A tipificação por PFGE classificou os três

Tabela 1. Resultado da análise das amostras de alimentos envolvidos no surto de toxinfecção alimentar causado por *Cronobacter malonaticus* em um Hospital Maternidade na cidade de Teresina, Piauí, em 2013.

N.º da amostra	Aliquota (massa ou volume)	BAM-FDA (2012)		ISO/TS 22964:2006			Identificação		Resultado
		ESPM <sup>1</sup>	DFI <sup>2</sup>	mLST <sup>3</sup>	ESIA <sup>4</sup>	PCR <sup>5</sup>	Vitek 2.0 (% de probabilidade)		
1 - Lata aberta de fórmula infantil para recém-nascidos pré-termo e/ou de alto risco amostra	1 (100 g)	Pos <sup>6</sup>	Aus <sup>7</sup>	Tur <sup>8</sup>	Aus	Neg <sup>9</sup>	NR <sup>10</sup>	Ausência em 343 g	
	2 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR		
	3 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i> (99)		
	4 (43 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR		
2 - Lata aberta contendo de fórmula infantil para lactantes de 0 a 6 meses	1 (100 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (99)	Ausência em 229 g	
	2 (100 g)	Aus	Aus	Tur	Aus	NR	NR		
	3 (29 g)	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	NR		
3 - Leite humano pasteurizado	50 mL	Pos	Aus	Tur	Aus	Neg	complexo <i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i> (99)	Ausência em 50 mL	
4 - Leite humano pasteurizado	50 mL	Aus	Aus	Tur	Aus	NR	NR	Ausência em 50 mL	

<sup>1</sup> Enterobacter sakazakii chromogenic plating agar, <sup>2</sup> Brilliance Enterobacter sakazakii agar, <sup>3</sup> Caldo lauril sulfato de sódio modificado, <sup>4</sup> Enterobacter sakazakii Isolation agar, <sup>5</sup> Reação em cadeia pela polimerase com alvo no gene *gluA* (Iversen et al., 2007), <sup>6</sup> Crescimento de colônias características, <sup>7</sup> Ausência de colônias características, <sup>8</sup> Presença de turvação, <sup>9</sup> Negativo, <sup>10</sup> Não realizado.

Tabela 2. Caracterização fenotípica e molecular dos isolados clínicos de *Cronobacter malonaticus* isolados de hemocultura de pacientes de um Hospital Maternidade na cidade de Teresina, Piauí, em 2013.

N.º da cepa	Caracterização fenotípica		Caracterização molecular		
	Vitek 2.0 (Bionúmero)	Biogrupo	PCR <i>gluA</i>	PCR <i>rpoB</i>	Perfil no PFGE <sup>1</sup>
C89	<i>Cronobacter</i> spp. (0625734053622010)	9	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. malonaticus</i>	1
C90	<i>Cronobacter</i> spp. (0625734053622010)	9	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. malonaticus</i>	1
C91	<i>Cronobacter</i> spp. (0625736053302010)	5	<i>Cronobacter</i> spp.	<i>C. malonaticus</i>	1

<sup>1</sup> Eletroforese em gel de campo pulsado.

isolados com o mesmo pulsotipo com 89,3% de similaridade entre a cepa C91 e as cepas C89 e C90 e 100,0% de similaridade entre as cepas C89 e C90 (Figura).

## DISCUSSÃO

Neste surto, não foi possível confirmar se o leite humano pasteurizado ou se as fórmulas infantis foram o veículo de contaminação do *Cronobacter* spp., uma vez que não foi detectado contaminação deste patógeno nestas amostras. Esse fato pode estar associado à ausência real do patógeno ou a concentração da bactéria nas amostras estar abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados. De acordo com o relatório emitido pela FAO/OMS<sup>1</sup>, a concentração média de *Cronobacter* spp. em lotes de FID contaminados foi estimada em 0,01 UFC/100g; demonstrando a importância de analisar uma quantidade representativa de amostras e de possuir um método com limite

de detecção suficiente para identificar a contaminação quando presente. Outra hipótese é que os micro-organismos poderiam se encontrar presentes no estado viável, mas não cultivável (VNC), uma vez que já foi descrito esse mecanismo em espécies do gênero *Cronobacter*<sup>24</sup>.

A FAO/OMS<sup>1</sup> recomenda a pesquisa de *Enterobacteriaceae* em FID. Estas enterobactérias não-*Cronobacter* foram classificadas como “categoria B - plausíveis de causarem infecções, mas sem o apoio de evidências epidemiológicas” pelas comissões de especialistas. Bactérias do gênero *Klebsiella* já foram associadas com infecções neonatais, mas nunca tendo FID identificadas como o veículo de contaminação. Neste estudo, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* foi detectada em uma das amostras de fórmulas infantis. Contudo, como a amostra analisada já estava aberta não é possível afirmar se esta bactéria é de origem do produto ou se a contaminação ocorreu no momento da manipulação da fórmula. Outros autores já relataram a identificação desta bactéria em amostras de FID comercializadas no Brasil<sup>25,26</sup>. Outras bactérias também listadas como categoria B já foram isoladas de amostras de FID, incluindo *A. baumannii*. Este patógeno oportunista foi isolado de amostras de fórmulas infantis de seguimento comercializadas no Brasil em 2009<sup>25</sup>. Logo, a contaminação pela cepa do complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* da fórmula analisada neste surto pode ter sido oriunda do próprio produto ou no momento da manipulação do produto. Outras fontes de



Figura. Polimorfismo genético dos três isolados de *Cronobacter malonaticus* determinado por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) após digestão do DNA com enzima de restrição *SpeI*.



contaminação, como o ambiente hospitalar, equipamentos de limpeza, utensílios para preparo da alimentação dos pacientes (ex: bicos de mamadeira, liquidificadores, etc), entre outros, podem ter sido o veículo de contaminação da cepa de *C. malonaticus*, uma vez que cepas de *Cronobacter* spp. já foram isoladas deste tipo de amostra em outros estudos<sup>8,26</sup>. Contudo, essa suposição não pôde ser investigada no surto descrito neste estudo, pois não foram coletadas amostras destes sítios para análise. Outros autores já relataram casos de infecções por *Cronobacter* spp. em neonatos em que não foi possível identificar nenhum alimento como veículo de contaminação, e o ambiente hospitalar foi sugerido como a possível fonte de contaminação<sup>27,28</sup>.

Casos de infecções causados por *Cronobacter* spp. em neonatos já foram relatados no Brasil<sup>29,30,31</sup>. Contudo, em alguns não houve uma investigação epidemiológica para determinar o veículo de contaminação destes pacientes<sup>29,31</sup>. Já em um dos casos ocorridos, o veículo de contaminação identificado foi a solução de nutrição parenteral, uma vez que *Cronobacter* spp. foi identificado em bolsas fechadas desta solução<sup>30</sup>.

Nem todas as espécies de *Cronobacter* spp. foram associadas a infecções, e a severidade da virulência varia entre as diferentes estirpes do gênero<sup>3,32</sup>. Até o momento, apenas três espécies foram isoladas em infecções neonatais: *C. sakazakii*, *C. malonaticus* e *C. turicensis*<sup>32</sup>. Neste estudo, uma cepa de *C. malonaticus* foi a responsável pelas infecções nas três pacientes. Mesmo sendo a espécie *C. sakazakii* a mais prevalente em casos de infecções, outros estudos já identificaram *C. malonaticus* causando infecções em neonatos. Na Argentina, foram relatados dois casos de

infecção por *C. malonaticus* em pacientes distintos sendo um caso em 2009 e outro em 2010<sup>33</sup>. Análises posteriores revelaram que as duas cepas apresentavam o mesmo perfil de PFGE, demonstrando que o mesmo clone estava presente no segundo caso após um ano.

A PFGE é considerada uma técnica padrão ouro na tipificação de bactérias, sendo uma importante ferramenta para investigações epidemiológicas<sup>22</sup>. Até a presente data, ainda não se encontra disponível no site do *PulseNet* do CDC<sup>34</sup> um protocolo de PFGE para *Cronobacter* spp. Contudo, este já se encontra em fase de desenvolvimento e validação, para posterior incorporação<sup>22</sup>. Neste estudo, mesmo a cepa C91 tendo apresentando um perfil fenotípico distinto das demais, os perfis obtidos na PFGE revelaram polimorfismo genético semelhante entre as três cepas o que sugere que as infecções foram provocadas pela mesma cepa ou por cepas fortemente relacionadas.

## CONCLUSÕES

Não foi possível identificar o veículo de contaminação do surto, uma vez que o patógeno não foi isolado nas amostras de alimentos suspeitas que foram ingeridas pelas pacientes do Hospital Maternidade. É importante a condução de uma investigação epidemiológica adequada nos casos de surtos. Dessa forma, recomenda-se também realizar a coleta de amostras ambientais, visando elucidar se estas poderiam ser a fonte de infecção. Mesmo com diferenças no fenótipo de um dos três isolados clínicos, a tipificação revelou que o mesmo clone foi responsável pela infecção nas três pacientes, sendo este identificado como *C. malonaticus*.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization - WHO. Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Meeting Report. Geneva: World Health Organization; 2006 [acessado 14 jun 2014]. (Microbiological risk assessment series, Vol. 10). Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/>
2. Jason J. Prevention of invasive Cronobacter infections in young infants fed powdered infant formulas. *Pediatrics*. 2012;130(5):e1076-84. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2011-3855>
3. Yan QQ, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S. Cronobacter species (formerly known as Enterobacter sakazakii) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *J Appl Microbiol*. 2012;113(1):1-15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05281.x>
4. Urmenyi AM, Franklin AW. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet*. 1961;1(7172):313-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(61\)91481-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(61)91481-7)
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cronobacter species isolated in two infants - New Mexico, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58(42):1179-83.
6. Strydom A, Cawthorn D, Cameron M, Witthuhn RC. Species of Cronobacter: a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *Int Dairy J*. 2012;27(1-2):3-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.06.005>
7. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Cronobacter. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2012 [citado 15 jun 2014]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cronobacter/>
8. Friedemann M. Epidemiology of invasive neonatal Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(11):1297-304. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-009-0779-4>
9. Turcocsik I, Kuniková K, Drahovská H, Kaclíková E. Biochemical and molecular characterization of Cronobacter spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011;99(2):257-69.
10. Ye Y, Wu Q, Zhang J, Jiang H, Hu W. Detection of viable Cronobacter spp. (*Enterobacter sakazakii*) by one-step RT-PCR in dry aquatic product. *J Food Sci*. 2012;77(11):M616-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02951.x>
11. Hochel I, Růžičková H, Krásný L, Demnerová K. Occurrence of Cronobacter spp. in retail foods. *J Appl Microbiol*. 2012;112(6):1257-65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05292.x>



12. Codex Alimentarius Commission - CAC. Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for powdered formulae for infants and young children. 2008 [acessado 8 maio 2015]. (CAC/RCP 66, 2008). Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP>
13. International Baby Food Action Network - IBFAN. Reports and briefings on contaminants in baby foods (and product recall list). 2013 [acessado 14 jul 2014]. Disponível em: <http://ibfan.org/fact-contaminants-reports-recall>
14. Bowen AB, Braden CR. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(8):1185-9.
15. Chen Y, Lampel K, Hammack T. Cronobacter. In: U. S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. Silver Spring: Food and Drug Administration; 2012 [acessado 14 jul 2014]. Chapter 29. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm>
16. International Organization for Standardization - ISO. ISO/TS 22964:2006. Milk and milk products: detection of *Enterobacter sakazakii*. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.
17. Farmer JJ 3rd, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1980;30(3):569-84. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-30-3-569>
18. Iversen C, Waddington M, Farmer JJ, Forsythe SJ. The biochemical differentiation of *Enterobacter sakazakii* genotypes. *BMC Microbiol*. 2006;6(94):1-7.
19. Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R et al. Identification of "Cronobacter" spp (*Enterobacter sakazakii*). *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3814-6. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-6-94>
20. Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):165-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.023>
21. National Center for Infectious Diseases, Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Subtipificación de patógenos bacterianos de transmisión alimentaria: manual de procedimientos laboratório. Buenos Aires: National Center for Infectious Diseases; 2004.
22. Brengi SP, O'Brien SB, Pichel M, Iversen C, Arduino M, Binsztein N et al. Development and validation of a PulseNet standardized protocol for subtyping isolates of *Cronobacter* species. *Foodborne Pathog Dis*. 2012;9(9):861-7. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1161>
23. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-9.
24. Nășcuțiu AM. [Viable non-culturable bacteria]. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol*. 2010;55(1):11-8. Romeno.
25. Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):185-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.005>
26. Palcich G, Gillio CM, Aragon-Alegro LC, Pagotto FJ, Farber JM, Landgraf M et al. *Enterobacter sakazakii* in dried infant formulas and milk kitchens of maternity wards in São Paulo, Brazil. *J Food Prot*. 2009;72(1):37-42.
27. Broge T, Lee A. A case of *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* bacteremia in a breastfed infant. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2013;2(4):1-2. <http://dx.doi.org/10.1093/jpids/pit021>
28. Ray P, Das A, Gautam V, Jain N, Narang A, Sharma M. *Enterobacter sakazakii* in infants: novel phenomenon in India. *Indian J Med Microbiol*. 2007;25(4):408-10. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.37351>
29. Oliveira AC, Martinho GH, Dias RR, Savassi LCM. Investigação de surto por *Enterobacter sakazakii* na Unidade de Neonatologia do HC/UFMG. In: Anais da 2a Bial de Extensão da Universidade Federal de Minas Gerais; 1999; Belo Horizonte. p. 103.
30. Santos M, Pessoa da Silva CL, Sampaio J, Marangoni DV, Pinto M, Moreira BM. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000;21(2):140.
31. Barreira ER, Souza DC, Gois PF, Fernandes JC. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. *Pediatria (São Paulo)*. 2003;25(1/2):65-70.
32. Joseph S, Sonbol H, Hariri S, Desai P, McClelland M, Forsythe SJ. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multi locus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):3031-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00905-12>
33. Asato VC, Vilches VE, Pineda MG, Casanueva E, Cane A, Moroni MP, et al. First clinical isolates of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Argentina: characterization and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45(3):160-4.
34. Centers for Disease Control and Prevention - CDC, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. PulseNet. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention - CDC; 2013 [acessado 15 jun 2014]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>

### Agradecimentos

Ao INCQS/Fiocruz, pelo financiamento deste estudo, e ao CNPq, por concessão de bolsa PIBIC a Natália Umeda. Ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz no qual Marcelo Brandão é aluno de doutorado. À Vigilância Sanitária e ao Lacen/PI pela coleta e envio das amostras.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).