

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLEITON MARGATTO ALOISIO

*Cronobacter spp.* EM INDÚSTRIA DE CONCENTRAÇÃO E SECAGEM DE SORO  
DE LEITE: PREVALÊNCIA, EPIDEMIOLOGIA E VIRULÊNCIA

PALOTINA

2024

CLEITON MARGATTO ALOISIO

*Cronobacter spp.* EM INDÚSTRIA DE CONCENTRAÇÃO E SECAGEM DE SORO  
DE LEITE: PREVALÊNCIA, EPIDEMIOLOGIA E VIRULÊNCIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, na área de concentração em Saúde  
Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada a  
Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal  
do Paraná, como requisito para a obtenção do título de  
Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2024

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

A453 Aloisio, Cleiton Margatto  
*Cronobacter spp.* em indústria de concentração e  
secagem de soro de leite: prevalência, epidemiologia  
e virulência / Cleiton Margatto Aloisio. – Palotina, PR, 2025.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.  
Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot.

1. Higienização industrial. 2. Perfil patogênico. 3. Soro de leite.  
I. Bersot, Prof. Dr. Luciano dos Santos. II. Universidade  
Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001016077P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CLEITON MARGATTO ALOISIO** intitulada: ***Cronobacter spp* em indústria de concentração e secagem de soro de leite: prevalência, epidemiologia e virulência**, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 13 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica

16/12/2024 15:56:19.0

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

13/12/2024 16:51:00.0

LEONARDO ERENO TADIELO

Avaliador Externo (UNESP)

Assinatura Eletrônica

17/12/2024 08:10:58.0

KAREN SIGNORI PEREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

Assinatura Eletrônica

16/12/2024 14:08:31.0

RICARDO SEITI YAMATOGLI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA)

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 417957

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 417957**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Cleiton Margatto Aloisio, filho de Cleusa Margatto Aloisio e Jair Aloisio, nascido em 16 de maio de 1994 no município de Francisco Alves, Paraná. Formado em Ciências Biológicas no ano de 2016 pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina. Mestrado em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais, 2018 pela UFPR - Setor Palotina. Especialização em Microbiologia e Controle de Qualidade em 2020, pela Universidade Paranaense (UNIPAR) e doutorando no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UFPR – Setor Palotina, na linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal. Desde a graduação, trabalha na área da Gestão da Qualidade em indústrias de alimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela saúde, discernimento e disciplina concedida durante todo o doutorado. Sem fé, eu não teria chegado até aqui.

Aos meus pais, Cleusa e Jair, meu irmão Rafael e meu cunhado Ronaldo. Obrigado por sempre me ouvir, me apoiar e nunca me deixar desistir.

A minha vó Santa, tia Nice, Tia Nenê e tia Rosana, obrigado pelos momentos de descontração, pelos cafés e pelas conversas de fim de semana.

Ao professor Luciano, por ter aberto as portas do LACOMA e aceitado me orientar. Com certeza com você aprendi muito e o seu apoio neste projeto e durante os quatro anos de doutorado foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os integrantes do LACOMA, sem exceções (residentes, mestrandos, doutorandos) foram tantas pessoas que passaram nesses últimos quatro anos. Em especial agradeço a Rosana, Layza, Vanessa, Izabela, Camila e Marcia, vocês foram fundamentais para eu concluir a minha pesquisa.

A empresa a qual trabalho que me permitiu realizar a pesquisa e forneceu parte do material utilizado no projeto. O desafio foi grande e o resultado também. Em especial, à Vanessa, Andréia, Nathane e Isabela pelas conversas, conselhos e explicações sobre os processos.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao professor Luis Nero, Rafaela, Caio e Amanda por me ajudarem com a análise de PFGE.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGCA) pelo auxílio na execução do projeto de pesquisa e ao corpo docente do PPGCA pelo conhecimento adquirido.

A Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, são 11 anos dedicados a este setor. Tenho muito orgulho de ser graduado, mestre e agora finalizar o meu doutorado nesta universidade.

A CAPES e a Fundação Araucária pela bolsa concedida em parte destes quatro anos.

Por fim, à todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para conclusão dessa etapa.

Com muito carinho, meu muito obrigado!

“A única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível.”

Lewis Carroll

## RESUMO

*Cronobacter* spp. é um microrganismo patogênico, capaz de sobreviver a condições adversas no ambiente. O microrganismo já foi isolado em diferentes tipos de alimentos, como especiarias, frutas e vegetais, cereais, sopas instantâneas e doces. Estudos realizados em fábricas de leite em pó e produção de fórmulas infantis, têm demonstrado a persistência desse microrganismo no ambiente. Atualmente no Brasil, o microrganismo é avaliado como requisito obrigatório apenas em fórmulas infantis. Sabendo que o soro de leite em suas diferentes concentrações de proteína, são utilizados como principal ingrediente de diferentes produtos prontos para o consumo, *Cronobacter* spp. podem ser considerados, um microrganismo de grande relevância para monitoramento na cadeia de produção. O objetivo do trabalho foi investigar a presença de *Cronobacter* spp. em uma indústria de concentração e secagem de soro de leite a partir de amostras de produto, água provenientes do processo CIP, superfícies de equipamentos e manipuladores. *Cronobacter* spp. foi avaliada a partir de *swabs* de equipamentos, filtros de ar e mãos e botas dos colaboradores foram realizados pós o processo de limpeza e sanitização. Água de enxágue final de CIP foram amostradas. Produtos como matéria prima, matéria prima pasteurizada, produto concentrado por tecnologia de membranas e produto em pó foram avaliados. Todas as amostras foram processadas a partir da metodologia de isolamento de *Cronobacter* spp. recomendadas pela ISO e a confirmação genotípica para o gênero *Cronobacter* foi realizada a partir do método *Molecular Detection System* (MDS, 3M). 40 isolados de *Cronobacter* spp. foram obtidos das 300 amostras coletadas no período amostral (dezembro de 2022 a outubro de 2023), representando 13,2% de positividade. 37 isolados foram identificados como *C. sakazakii* e 3 isolados como *C. muytjensii*. 68% dos isolados foram classificados como aderentes em superfície de aço inoxidável e 35% foram aderentes em superfície de poliestireno. 95% dos isolados foram classificados como multidroga resistentes (resistentes a três ou mais antibióticos). 14 grupos com similaridade genética foram identificados na análise de PFGE. Ao avaliar a sensibilidade frente dos isolados frente aos produtos químicos ácido peracético e alcalino clorado, o ácido peracético apresentou melhor eficiência para inibição do crescimento microbiano. Em estudos com *Cronobacter* spp. realizados em ambientes de produção de leite em pó, foi atribuído que os veículos de contaminação das instalações e produto eram provenientes de falhas higiênico sanitárias dos equipamentos, manipuladores e aditivos utilizados na formulação do produto. A potencial virulência de *Cronobacter* spp. foi constatada nesta pesquisa, trazendo informações para a indústria e órgãos regulamentares que possibilitam realizar avaliações de risco e definir estratégias de intervenção para controlar doenças relacionadas a *Cronobacter* spp. visto que o microrganismo apresenta grande relevância para a saúde pública.

Palavras-chave: *Cronobacter*; soro de leite; higienização industrial; perfil patogênico; PFGE.

## ABSTRACT

*Cronobacter* spp. is a pathogenic microorganism capable of surviving adverse environmental conditions. The microorganism has been isolated in different types of foods, such as spices, fruits and vegetables, cereals, instant soups and sweets. Studies carried out in powdered milk factories and infant formula production have demonstrated the persistence of this microorganism in the environment. Currently in Brazil, the microorganism is evaluated as a mandatory requirement only in infant formulas. Knowing that whey in its different protein concentrations is used as the main ingredient in different ready-to-eat products, *Cronobacter* spp. can be considered a microorganism of great relevance for monitoring in the production chain. The objective of the study was to investigate the presence of *Cronobacter* spp. in a whey concentration and drying industry from product samples, water from the CIP process, equipment surfaces and handlers. *Cronobacter* spp. was evaluated from swabs of equipment, air filters, and employees' hands and boots were performed after the cleaning and sanitization process. Final CIP rinse water was sampled. Products such as raw material, pasteurized raw material, concentrated product by membrane technology and powdered product were evaluated. All samples were processed using the *Cronobacter* spp. isolation methodology recommended by ISO and genotypic confirmation for the genus *Cronobacter* was performed using the Molecular Detection System (MDS, 3M) method. 40 isolates of *Cronobacter* spp. were obtained from the 300 samples collected in the sampling period (December 2022 to October 2023), representing 13.2% positivity. 37 isolates were identified as *C. sakazakii* and 3 isolates as *C. muytjensii*. 68% of the isolates were classified as adherent to stainless steel surfaces and 35% were adherent to polystyrene surfaces. 95% of the isolates were classified as multidrug resistant (resistant to three or more antibiotics). 14 groups with genetic similarity were identified in the PFGE analysis. When evaluating the sensitivity of the isolates to the chemicals peracetic acid and chlorinated alkali, peracetic acid showed the best efficiency in inhibiting microbial growth. In studies with *Cronobacter* spp. carried out in powdered milk production environments, it was attributed that the vehicles of contamination of the facilities and product came from hygienic and sanitary failures of the equipment, handlers and additives used in the product formulation. The potential virulence of *Cronobacter* spp. was confirmed in this research, providing information for the industry and regulatory agencies that allow for risk assessments and the definition of intervention strategies to control diseases related to *Cronobacter* spp. since the microorganism has great relevance to public health.

Keywords: *Cronobacter*; whey; industrial hygiene; pathogenic profile; PFGE.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Registros de consulta ao banco de dados do PubMLST para <i>Cronobacter</i> spp. (Fonte: PubMLST, 2024) ..... | 21 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### Capítulo I

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2. Diagrama conceitual da seção de material e métodos..... | 32 |
|-------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3. Dendrograma dos perfis de PFGE dos isolados de <i>Cronobacter</i> spp. .... | 53 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4. Sensibilidade das espécies de <i>Cronobacter</i> spp. frente aos produtos químicos testados..... | 60 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1. Classificação das membranas de acordo com as suas características.....27

Capítulo I

Tabela 2. Categorias, tipos e pontos de amostragens coletadas durante a realização do experimento.....30

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos do gene *rpoB* (*primers*) a serem utilizados para identificação de espécies de *Cronobacter* spp. ....37

Tabela 4. Sequência de oligonucleotídeos (*primers*) dos genes *gluA*, *ompA*, *ompX*, *cpa*, *sadA* e *bcsG*.....41

Tabela 5. Antimicrobianos testados.....44

Tabela 6. Positividade de *Cronobacter* spp. nas categorias de amostras, pontos de amostragem e número de amostras positivas .....47

Tabela 7. Identificação das espécies, categorias de amostra, adesão em poliestireno e inox, perfil genotípico e multidroga resistente dos isolado de *Cronobacter* spp. ....50

Tabela 8. Comparação estatística dos resultados obtidos para cada princípio ativo testado.....59

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMO - Amoxicilina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATM - Aztreonam

AZI – Azitromicina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIP – Ciprofloxacina

CIP – *Clean in place*

COP – *Clean out place*

CLO - Cloranfenicol

CTF - Ceftiofur

GEN - Gentamicina

IN – Instrução Normativa

IPM - Imipenem

MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária de Abastecimento

MDR – Multidroga Resistente

MDS - *Molecular Detection System*

PFGE - *Pulsed Field Gel Eletroforese*

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SUT - Sulfametoxazol +trimetoprima

TET - Tetraciclina

TSA - Ágar Trypticase de Soja

TSB - Caldo Trypticase de Soja

WPC – *Whey protein Concentrate*

WPI – *Whey Protein Isolate*

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                 | 16 |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                                                                      | 18 |
| 2.1 O gênero <i>Cronobacter</i>                                                                                                                     | 18 |
| 2.2 Casos de <i>Cronobacter</i> spp. no Brasil e no Mundo                                                                                           | 20 |
| 2.3 Mecanismos de virulência em <i>Cronobacter</i> spp.                                                                                             | 22 |
| 2.4 Susceptibilidade de <i>Cronobacter</i> spp. frente a antibióticos                                                                               | 23 |
| 2.5 Formação de biofilmes                                                                                                                           | 25 |
| 2.6 Produção de Soro de Leite                                                                                                                       | 26 |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                                                                                                 | 31 |
| 3.1 Objetivo Geral                                                                                                                                  | 31 |
| 3.2 Objetivos Específicos                                                                                                                           | 31 |
| <b>4. CAPÍTULO I – PERFIL PATOGENICO DE ISOLADOS DE <i>Cronobacter</i> SPP. OBTIDOS DE UMA INDUSTRIA DE CONCENTRAÇÃO E SECAGEM DE SORO DE LEITE</b> | 33 |
| <b>4.1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                               | 34 |
| <b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                                                                       | 35 |
| 4.2.1 Obtenção das amostras                                                                                                                         | 35 |
| 4.2.2 Isolamento de <i>Cronobacter</i> spp.                                                                                                         | 38 |
| 4.2.3 Caracterização genotípica do microrganismo                                                                                                    | 40 |
| 4.2.3.1 Identificação das espécies de <i>Cronobacter</i> spp. por PCR                                                                               | 40 |
| 4.2.3.2 Identificação dos genes de virulência de <i>Cronobacter</i> spp. por PCR                                                                    | 41 |
| 4.2.3.3 Eletroforese em gel de campo pulsado PFGE                                                                                                   | 42 |
| 4.2.4 Mecanismos de resistência do microrganismo                                                                                                    | 43 |
| 4.2.4.1 Teste de concentração inibitória mínima (CIM)                                                                                               | 43 |
| 4.2.4.2 Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos                                                                                             | 44 |
| 4.2.4.3 Determinação da capacidade de adesão dos isolados                                                                                           | 45 |
| <b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                                   | 46 |
| 4.3.1 Caracterização e análise genotípica dos isolados                                                                                              | 46 |
| 4.3.2 Mecanismos de resistência dos isolados                                                                                                        | 55 |
| <b>4.5 CONCLUSÕES</b>                                                                                                                               | 62 |
| Referências                                                                                                                                         | 63 |

|              |    |
|--------------|----|
| Anexos.....  | 71 |
| Anexo I..... | 71 |

## 1. INTRODUÇÃO

O soro de leite é um subproduto proveniente de laticínios fabricantes de queijo. Estima-se que por ano sejam fabricados 8 bilhões de litros de soro de leite por ano (EMBRAPA, 2023). Sua ampla aplicabilidade como ingrediente de chocolates, recheios de biscoitos, pães, bebidas lácteas, fármacos, nutrição esportiva, fórmulas infantis e para imunossuprimidos, tem despertado o interesse para o desenvolvimento de novos produtos, utilizando o soro de leite como substituto de ingredientes lácteos.

Poucas indústrias no Brasil processam o soro de leite líquido, transformando-o em pó, devido ao alto custo e ao grande volume necessário para justificar o seu processamento. Normalmente, para a concentração de altas proteínas presentes no soro de leite, emprega-se a tecnologia de separação por membranas combinadas ao processo de secagem por *spray dryer*.

A cadeia produtiva de leite no Brasil, desempenha papel importante dentro do agronegócio. Normas e legislações são bem estruturadas e esclarecidas pelos órgãos regulamentadores brasileiros (como Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA) para a produção de leite, queijos e derivados lácteos.

Atualmente, a Instrução Normativa Nº 94 de 18 de setembro de 2020 (BRASIL, 2020) estabelece o regulamento técnico que rege os padrões de identidade e qualidade do soro de leite, seja o produto em pó ou em sua forma líquida. O padrão microbiológico dos produtos em pó, devem contemplar a avaliação de microrganismos aeróbios mesófilos viáveis, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus aureus* coagulase positivo e *Salmonella* spp. Ainda, o soro de leite em pó deve ser avaliado quanto a enterotoxinas estafilocócicas e *Enterobacteraceae* de acordo com a Instrução Normativa Nº 161 de 1 de julho de 2022 (BRASIL, 2022), que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos.

Devido as características do processo de secagem do soro de leite e as diferentes aplicações do soro de leite em pó, *Cronobacter* spp., pode ser um microrganismo de grande importância a ser monitorado e controlado no ambiente fabril. *Cronobacter* spp. é uma bactéria patogênica, capaz de sobreviver a diferentes

temperaturas (faixa ótima de multiplicação 5 a 45 °C) e condições ambientais (variação de pH, condições diferentes de umidade e desenvolvimento em diferentes superfícies) (LAMPEL et al., 2012). Diversos estudos têm demonstrado a persistência desse microrganismo em ambientes de produção de secagem de leite em pó e fabricantes de fórmulas infantis (MULLANE et al., 2007; CRAVEN et al., 2010; BEUCHAT et al., 2013). Além disso, *Cronobacter* spp. já foi isolada em diferentes tipos de alimentos como especiarias, frutas e vegetais (KARDOS et al., 2017), cereais (MINOR et al., 2015) e doces (VOJKOVSKA et al., 2016).

Nos últimos anos, foram registrados diversos recalls de fórmulas infantis devido à contaminação por *Cronobacter sakazakii*. Em dezembro de 2023, lotes de uma fórmula hipoalergênica foram recolhidos em vários países após testes identificarem a presença da bactéria. No Brasil, a Anvisa suspendeu preventivamente a comercialização de seis lotes. Em fevereiro de 2023, aproximadamente 145.000 latas de uma fórmula infantil à base de plantas foram recolhidas nos Estados Unidos pelo mesmo motivo, apesar da ausência de casos relatados. Já em 2022, um recall global envolveu fórmulas infantis após a detecção de *Cronobacter* em uma fábrica nos EUA, com quatro bebês infectados e um óbito registrado. Esses episódios reforçam a importância do controle sanitário rigoroso e da vigilância contínua na produção de alimentos. Atualmente no Brasil, apenas fórmulas infantis para lactentes são monitoradas quanto a ausência de *Cronobacter* spp., de acordo com a IN Nº 161 de 1 de julho de 2022 (BRASIL, 2022).

Sabendo que o soro de leite em suas diferentes concentrações de proteína, são utilizados como principal ingrediente de fórmulas infantis, nutrição esportiva, idosos e para imunossuprimidos, bem como, é ingrediente principal de diferentes produtos prontos para o consumo, *Cronobacter* spp. podem ser considerados, um microrganismo de grande relevância para monitoramento na cadeia de produção.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O gênero *Cronobacter*

*Cronobacter* é um gênero de bactérias gram-negativas e anaeróbios facultativos, em forma de bastonete e não formadora de esporos (IVERSEN et al., 2008). Tem faixa de multiplicação de 5,5 a 45°C. É membro da família *Enterobacteraceae* e está intimamente ligado aos gêneros *Enterobacter* e *Citrobacter*. Inclui sete espécies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. terturicensis*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. universalis* e *C. condimentii* (IVERSEN et al., 2008; JOSEPH et al., 2012; FORSYTHE et al., 2014).

*C. sakazakii* e *C. malonaticus* são espécies patogênicas e afetam pessoas com o sistema imunológico comprometido (KENT et al., 2015). Forsythe et al. (2014), classificou esses dois microrganismos como grupo 1, sendo considerados de relevância clínica, pois há relatos de infecção em todas as faixas etárias; *C. terturicensis* e *C. universalis*, são classificados como grupo 2, pois os isolados raramente foram relatados em casos clínicos; e *C. dublinensis*, *C. muytjensii* e *C. condimentii*, pertencem ao grupo 3, devido apresentar pouca importância clínica, sendo comensais ambientais.

*C. sakazakii* é o microrganismo mais frequente do gênero *Cronobacter* entre todas as faixas etárias, principalmente em bebês, crianças e adultos (especialmente idosos) imunossuprimidos (HEPERKAN et al., 2017). Junto à *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, são conhecidas como espécies mais patogênicas, causadoras de meningite, sepse e enterocolite necrosante em recém-nascidos e lactentes (JANG et al., 2020). Os casos de meningite foram identificados apenas em neonatos, sendo o principal veículo de contaminação as fórmulas infantis contaminadas com o patógeno (LANGDON et al., 2016). Bebês que sobrevivem após a infecção por *Cronobacter spp.*, frequentemente apresentam sequelas neurológicas, como tetraplegia, hidrocefalia e retardo do desenvolvimento neural (HOLY e FORSYTHE, 2014).

*C. sakazakii* ao atingir a circulação sistêmica, possui grande afinidade pelo sistema nervoso central, aumentando a propensão em causar meningite em recém-nascidos de baixo peso e lactentes (YAN et al., 2012). Ao alcançar o cérebro, o microrganismo pode causar ventriculite e formar cistos cerebrais, que podem evoluir

para hidrocefalia, infartos cerebrais, necrose do tecido cerebral e liquefação da massa branca cerebral (BOWEN; BRADREN, 2006). A meningite causada por *C. sakazakii* geralmente é fatal e pode levar a um atraso neurológico severo, hidrocefalia e quadriplegia (LAI, 2001).

Estudos mostram que as fórmulas infantis, bem como outros alimentos contaminados para bebês são os principais causadores da infecção infantil (YAN et al., 2012). Ingredientes crus de diferentes origens e ingredientes termicamente sensíveis adicionados às fórmulas infantis sem qualquer tratamento térmico tem sido implicado como via potencial de transmissão para a *Cronobacter spp.* (HEALY et al., 2007).

Frequentemente, *Cronobacter spp.* é associada a produtos lácteos processados. Estudos apontaram a presença de *Cronobacter spp.* em produtos lácteos, como o queijo (LEE et al., 2012), leite em pó e soro de leite em pó (HEPERKAN et al., 2017). Estudos realizados em leite cru demonstram a presença de componentes que inibem naturalmente o microrganismo (CHEIN et al., 2010). *Cronobacter spp.* tem capacidade de sobreviver à secagem por pulverização e por longos períodos em materiais secos (FAO-OMS, 2008). Estudos de Forsythe et al. (2014), apontam a sobrevivência do microrganismo em fórmulas e cereais infantis desidratados, em atividade de água de 0,30 a 0,83.

Diversos fatores estão envolvidos na sobrevivência do microrganismo como a produção de capsula de heteropolissacarídeo que permite maior resistência ao processo de secagem (IVERSEN; FORSYTHE, 2003) e a adesão desse microrganismo às superfícies de equipamentos e utensílios favorece ao desenvolvimento de biofilmes permitindo a resistência e a instalação nas diferentes fábricas de alimentos (FANG et al., 2015). Estudos com legumes e saladas (OSAILI et al., 2009), especiarias (BEUCHAT et al., 2008), ovos (CRUZ et al., 2011), salsicha (CUI et al., 2002), cereais (CAUBILLA BARRÃO et al., 2007), apontam ampla prevalência de *Cronobacter spp.* em contaminar diferentes tipos de alimentos.

As espécies de *Cronobacter* se adaptaram para sobreviver a condições adversas, principalmente no ambiente de fabricação de alimentos. Sua capacidade de formar biofilme, proporciona proteção as células contra diferentes estratégias de controle, como tratamento térmico, estresse osmótico, detergentes, sanitizantes e

desinfetantes que rotineiramente são utilizados em unidades de processamento de alimentos (DANCER et al., 2009).

## 2.2 Casos de *Cronobacter* spp. no Brasil

No Brasil, relatos de casos de contaminação por *Cronobacter* spp., já foram reportados (ALSONOSI et al., 2015 e BRANDÃO et al., 2015). Contudo, nestes estudos, não foi possível identificar o veículo de contaminação e muitos pacientes não ingeriram fórmula infantil, apontando que outras fontes, podem ser o veículo de contaminação (ALSONOSI et al., 2015 e BRANDÃO et al., 2015).

Conforme previsto na IN Nº 161 de 1º de julho de 2022 (BRASIL, 2022), *Cronobacter* spp. é previsto como microrganismo alvo para padrões microbiológicos na categoria de alimentos infantis e fórmulas para nutrição enteral em pó. O número de unidade amostral é 30; 0 amostras aceitáveis (c) com presença de *Cronobacter* spp.; e mínimo (m) de ausência para o microrganismo. Padrões microbiológicos de alimentos destinados a lactentes e crianças de primeira infância (entre 6 meses e 3 anos), fórmulas para crianças maiores de 3 anos e adultos, assim como qualquer outra categoria de alimento, não apresentam *Cronobacter* spp. como microrganismo alvo para avaliação.

Segundo PubMLST (*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*, 2023), 216 isolados de *Cronobacter* spp., foram registrados e avaliados de 2005 a 2022. Desses, 157 isolados eram *C. sakakii*, 26 isolados foram caracterizados como *C. malonaticus*, 14 isolados eram *C. dublinenses*, 7 isolados *C. turicensis*, 2 isolados *C. muytjensii* e 10 identificados como outros. 51,9% dos microrganismos foram isolados de ingredientes alimentícios, 16,2% eram provenientes de alimentos prontos para o consumo, 6% eram isolados de saladas, 3,2% foram isolados de fórmulas infantis e 2,8% tinham origem clínica. A figura 1, apresenta a origem de isolados submetidos a pesquisas no PubMLST até o de 2023. China e Estados Unidos lideram o ranking de pesquisas com *Cronobacter* spp.

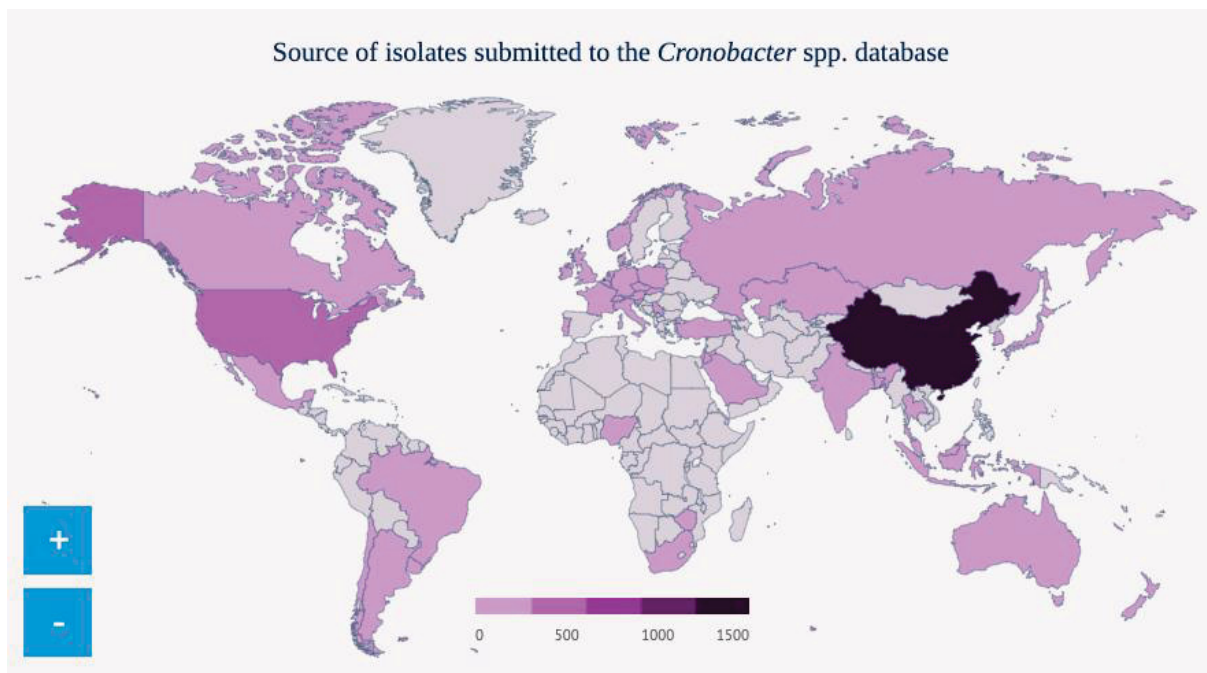


Figura 1. Registros de consulta ao banco de dados do PubMLST para *Cronobacter* spp. (Fonte: PubMLST, 2023)

Nos últimos anos, o Brasil registrou alguns casos de recall de produtos alimentícios devido à contaminação por *C. sakazakii*. Em janeiro de 2024, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) proibiu preventivamente a importação, comercialização, distribuição e uso de seis lotes da fórmula infantil em pó após comunicado da *Food and Drug Administration* (FDA) sobre o recolhimento voluntário desses lotes devido à possível contaminação por *C. sakazakii*. Embora não tenha sido identificada a exportação desses lotes ao Brasil, a medida foi adotada como precaução.

Em fevereiro de 2022, a Anvisa emitiu um alerta sobre o recolhimento de fórmulas infantis em pó de três grandes marcas, fabricadas nos Estados Unidos, após a FDA iniciar uma investigação sobre quatro internações de lactentes, incluindo um óbito, após o consumo dessas fórmulas. Três dos bebês apresentaram infecção por *C. sakazakii*, e um por *Salmonella Newport*. Embora a representante da empresa no Brasil tenha informado que não houve importação dos produtos recolhidos, a Anvisa manteve o alerta como medida preventiva.

Além dos casos relatados anteriormente, estudos apontam que, entre 1997 e 2013, foram reportadas infecções por *Cronobacter* no Brasil, principalmente em

neonatos (OLIVEIRA et al., 1999; SANTOS et al., 2000; BARREIRA et al., 2003 e BRANDÃO et al., 2015). Contudo, o número preciso de casos não pôde ser determinado, e em muitos relatos, o veículo de contaminação não foi identificado.

### 2.3 Mecanismos de virulência em *Cronobacter* spp.

Alguns mecanismos de virulência e patogenicidade de *Cronobacter* spp. já foram descobertos, e a virulência varia entre as cepas (HOLÝ et al., 2019). Sabe-se que essa bactéria pode invadir células intestinais humanas, replicar em macrófagos e invadir a barreira hematoencefálica (CAUBILLA-BARRON et al., 2007; ALMAJED; FORSYTHE, 2016). Além, da *Cronobacter* possuir capacidade de evasão imune, o que lhe permite evitar a resposta imune do hospedeiro (MITTAL et al, 2009; JOSEPH; FORSYTHE, 2011).

O microrganismo, para causar uma infecção sistêmica, precisa aderir às células hospedeiras como as células epiteliais intestinais, e em seguida deslocar para os tecidos subjacentes e atingir a corrente sanguínea e então disseminar por todo o corpo (WILSON et al., 2002).

Alguns fatores de virulência podem facilitar a invasão de *Cronobacter* no hospedeiro. O gene *cpa* foi estudado por Franco et al. (2011), que demonstraram relação entre o gene e a capacidade de *C. sakasakii* invadir células do hospedeiro. Além disso, o gene *cpa* expresso por *C. sakasakii*, teve relação direta na degradação de proteínas séricas presente no sangue do hospedeiro, permitindo assim, que o microrganismo fique protegido de eliminação. Outro gene relacionado à virulência de *Cronobacter* é o *sodA*. Esse gene é codificador da superóxido dismutase, que pode proteger as bactérias do estresse oxidativo devido ao fato de conseguir a conversão de radicais livres de oxigênio em peróxido de hidrogênio (FARR; KOGOMA, 1991). A resistência ao estresse oxidativo produzidos por macrófagos, favorece a permanência e sobrevivência intracelular da bactéria em macrófagos por longos períodos (TOWNSEND et al., 2007; JOSEPH et al. 2012).

As proteínas de membrana externa A (*OmpA*) e X (*OmpX*) desempenham um papel importante na adesão e invasão de células intestinais, células endoteliais do

cérebro através da ligação da bactéria a fibronectina (LIU, et al., 2012) e penetração da barreira hematoencefálica (FORSYTHE, 2015). *OmpA* e *OmpX* estão envolvidas nas diferenças de virulência entre cepas de *C. sakazakii* (YE et al., 2015).

#### 2.4 Susceptibilidade de *Cronobacter* spp. frente a antibióticos, detergentes e sanitizantes

Atualmente, os antibióticos são comumente usados para o tratamento clínico de infecções por *Cronobacter*. No entanto, devido ao uso indevido de antibióticos e à falta de orientação científica e racional sobre o uso de antibióticos, a resistência de *Cronobacter* e outras bactérias patogênicas aos antibióticos aumentou ao longo dos anos, aumentando a dificuldade do tratamento clínico com antibióticos. Em geral, as infecções por *Cronobacter* são tratadas principalmente com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (por exemplo, cefalosporinas e penicilinas), fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclina (DEPARDIEU et al., 2007; ALMAJED e FORSYTHE, 2016).

O uso de várias classes diferentes de antibióticos também tornou o *Cronobacter* mais resistente aos antibióticos. Chon et al. (2012) ao avaliar cepas de *Cronobacter* isoladas de alimentos secos coreanos observou que 77,8% de todas as cepas foram consideradas resistentes às cefalosporinas após testes de resistência a antibióticos. Hajam et al. (2017) isolaram 53 cepas de *Cronobacter* de 399 alimentos de varejo, e todas as cepas foram consideradas resistentes à eritromicina, enquanto duas cepas de *Cronobacter* foram resistentes à tetraciclina (ZHANG et al., 2015).

Em um surto de diarreia no México, Parra-Flores et al. (2018) testaram perfis de resistência a antibióticos e virulência tecidual de *C. sakazakii* e *Enterobacter* recuperados de PIF, fezes infantis e ambientes de processamento de PIF. Os resultados mostraram que *C. sakazakii* foi significativamente mais resistente a antibióticos do que *Enterobacter*, com 83% das cepas sendo resistentes a mais de um antibiótico (PARRA-FLORES et al., 2018). Carvalho et al. (2000) investigaram o *Cronobacter* em fórmulas infantis desidratadas comerciais e cereais infantis desidratados. Os resultados dos testes de tolerância a antibióticos mostraram que *Cronobacter* apresentou alta taxa de resistência à cefazolina (94,4%), mas baixas taxas de resistência à amoxicilina (9,45%), cefpodoxima (5,55%), estreptomicina (1,35%) e trimetoprima/sulfametoxazol (1,35%) (CARVALHO et al., 2020).

Farmer et al. (2015), relataram a resistência de *Cronobacter* spp. a ampicilina e cefalosporinas de primeira e segunda geração. Quando comparado *Cronobacter* spp. com outros microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, cepas de *Cronobacter* tem sido mais susceptível aos antibióticos de terceira geração, como ampicilina, cloranfenicol, cefalosporinas e aminoglicosídeos (SHI et al., 2018).

Holý et al. (2019) analisaram 52 isolados de *Cronobacter* provenientes de casos clínicos. Todos os isolados foram susceptíveis aos antibióticos testados. Lepuschitz et al. (2019), analisaram 21 isolados de *Cronobacter*, e 20 isolados foram susceptíveis a todos os antibióticos testados, somente 1 isolado apresentou resistência a ampicilina, cefotaxima. No Brasil, Santos et al., (2000) relataram três casos (uma criança e dois neonatos) com septicemia causada por *C. sakazakii* e o tratamento realizado foi com cefalosporinas de terceira geração, com a sobrevivência dos pacientes.

Barreira et al. (2003), relataram um caso de um neonato com meningite decorrente de *Cronobacter*, o tratamento inicial foi realizado com cefotriaxona combinado a ampicilina, porém não foi obtida melhora, e então o tratamento foi alterado para cefotaxima combinada a gentamicina. O tratamento novamente não foi eficaz resultando no óbito do paciente. Chaves et al. (2018), relataram um caso de bacteremia e meningite por *Cronobacter* spp. em um recém-nascido prematuro, o tratamento inicial foi realizado com cefepima e ampicilina. Foi realizada a hemocultura do paciente, sendo identificado *Cronobacter* spp. resistentes a cefalotina e ceftiofina. Devido à piora clínica, o tratamento foi alterado para meropenem, resultando no óbito do paciente.

Em comparação com outros patógenos de importância para alimentos, há poucos estudos descrevendo a eficácia de detergentes e sanitizantes para controle *Cronobacter* spp. em superfícies encontradas em plantas de fabricação de laticínios, como por exemplo, em aço inoxidável (KIM et al., 2007; BAE et al., 2012; CHOI et al., 2012; SONG et al., 2014; TORLAK et al., 2015; LINDSAY et al., 2022). Há também estudos limitados que compararam diretamente a eficácia de diferentes sanitizantes contra diferentes espécies de *Cronobacter*. No entanto, dois estudos, um sobre *C. sakazakii* (Kim et al., 2007) e um sobre *C. malonaticus* (Ye et al., 2018), indicaram que diferentes espécies de *Cronobacter* spp. são inativadas de forma semelhante quando expostas aos tipos de sanitizantes aplicados em ambientes de fabricação de laticínios. Kim et al. (2007), avaliaram ácido peracético suspenso em água e verificaram que *C.*

*sakazakii* foi reduzido em  $> 6 \log$  UFC em 1 min. Ye et al. (2018), utilizaram 0,1% de peróxido e notaram que *C. malonaticus* foi reduzido em  $> 6 \log$  UFC após 10 min ao suspender em água estéril o produto químico.

## 2.5 Formação de biofilmes

Biofilmes podem ser definidos como comunidades multicelulares complexas aderidas a uma superfície (CIOFU et al., 2022). Bactérias que vivem no biofilme estão sempre inseridas em uma matriz de polissacarídeos extracelulares (EPS), DNA e proteínas (AGEORGES et al., 2020; RAVAIOLI et al., 2020). O processo de formação de biofilme é um tanto semelhante à “dispersão de sementes” visualizado em plantas, que inclui a fixação inicial, a formação de microcolônias, a maturação e a eventual dispersão do biofilme. Patógenos transmitidos por alimentos podem formar biofilmes difíceis de remover na superfície de ambientes e equipamentos de produção de alimentos, tornando-se assim uma fonte potencial de contaminação, representando altos riscos à segurança alimentar e à saúde pública.

*Cronobacter* pode formar biofilmes em várias superfícies comuns de contato com alimentos, como tubos de alimentação infantil, materiais de polietileno de grau alimentício e chapas de aço inoxidável (IVERSEN et al., 2004; KIM et al., 2006; AMALARADJOU E VENKITANARAYANAN, 2011). O ambiente externo pode induzir *Cronobacter* a produzir EPS, que são os principais componentes da matriz do biofilme bacteriano (JUNG et al., 2013).

*Cronobacter* tem uma ampla faixa de temperatura para multiplicação, forte resistência à pressão e capacidade eficiente de formar biofilmes em materiais como látex, aço inoxidável e vidro, contribuindo para sua disseminação bem-sucedida no processamento de alimentos (IVERSEN et al., 2004; SHAKER et al., 2008). Fatores ambientais, como temperatura e composição de nutrientes, bem como funções internas de autorregulação, como regulação de genes e detecção de *quorum sensing*, influenciam a formação do biofilme (LEHNER et al., 2005; YE et al., 2015).

As cepas de *Cronobacter* apresentam como temperatura ótima para multiplicação o intervalo entre 37 e 43°C, entretanto algumas cepas se desenvolvem entre 25 e 45°C, e outras ainda na faixa de 6 a 47°C (BREEUWER et al. 2003;

IVERSEN et al., 2004; FARMER et al., 2015). A termotolerância observada nesta espécie é semelhante àquela exibida por outras enterobactérias (IVERSEN et al., 2004). Breeuwer et al. (2003), verificaram que cepas de *C. sakazakii* foi capaz de se multiplicar no intervalo de temperatura de 45 a 47°C, o que significa, que as bactérias pertencentes ao gênero, suportam temperaturas superiores à tolerada pela maioria das enterobactérias (HUERTAS et al., 2015).

Ainda em relação as características de multiplicação em diferentes temperaturas, estudos revelam que *Cronobacter* spp. apresenta taxa de sobrevivência maior na temperatura de 4°C do que 30°C (BEUCHAT et al. 2008). Essa capacidade foi relatada também por Iversen et al. (2004) que observaram que as espécies deste gênero são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração em fórmulas infantis durante a estocagem, bem como em equipamentos e utensílios utilizados no preparo do alimento infantil.

Ye et al. (2015), estudaram a habilidade de isolados de *Cronobacter*, produzirem biofilmes sob diferentes valores de pH, temperatura e tempo, em culturas em laboratório. Como resultado, os autores observaram que o pH foi determinante para a formação de biofilmes e que quantidade mais expressiva de biofilme foi encontrada quando o cultivo do microrganismo foi realizado em pH 5,0 (9 cepas, 39,1%), temperatura de 28°C (23 cepas, 100%) e 48 h (14 cepas, 60,9%).

Essa característica também contribui para a resistência das células microbianas frente a condições adversas, tais como: exposição a antimicrobianos, saneantes, às variações de pH, ao aquecimento e à dessecação (HEALY et al., 2007; BEUCHAT et al. 2008).

## 2.6 Produção de Soro de Leite

O soro de leite é um subproduto das indústrias de laticínios, provenientes da produção de queijos. Em sua composição, o soro de leite apresenta cerca de 90% do volume total do leite utilizado na produção de queijo e contém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite, como proteína, lactose, vitaminas e minerais (BRASIL, 2020).

Com o avanço da tecnologia, o soro de leite passou a ser utilizado principalmente como ingrediente para oferecer sabor lácteo, com aspecto físico semelhante ao do leite em pó. É aplicado como matéria prima na produção de alimentos de diversas categorias como pães, biscoitos, bolos, sorvetes, bebidas lácteas, chocolates, coberturas, entre diversos outros produtos processados. Além da ampla utilização para nutrição esportiva (*Whey Protein*), nutrição infantil, idosos e imunossuprimidos.

Para obtenção do soro de leite em pó, concentrados e isolados proteicos de soro são utilizadas a tecnologia de separação por membranas, a evaporação à vácuo e a secagem em *spray dryer*. A tecnologia por membranas é a separação dos sólidos presentes no soro de leite através de uma membrana semipermeável. O fluido que atravessa a membrana é chamado de permeado (este é composto por lactose, sais minerais e parte da gordura do soro), o retentado, por sua vez, é o que fica retido na membrana (composto por proteínas), podendo ser classificado de acordo com o seu percentual de proteínas. Este retentado recebe o nome de *Whey Protein Concentrate* (WPC) ou *Whey Protein Isolate* (WPI) e são ejetados das membranas a partir da pressão realizada por bombas.

Atualmente, existem 4 tipos de membranas e estas se diferenciam pela micragem (poros das membranas) e pressão necessária para atividade no processo de produção. A tabela 1 apresenta os diferentes tipos de membrana.

Tabela 1. Classificação das membranas de acordo com as suas características.

| <b>Tipo de membrana</b> | <b>Porosidade</b> | <b>Pressão necessária</b> |
|-------------------------|-------------------|---------------------------|
| Microfiltração          | 10 – 0,1 µm       | 0,5 – 2 bar               |
| Ultrafiltração          | 0,1 – 0,01 µm     | 1 – 7 bar                 |
| Nanofiltração           | 0,01 – 0,001 µm   | 4 – 25 bar                |
| Osmose Reversa          | < 0,001 µm        | 10 – 80 bar               |

Após realizado o processo de concentração por membranas, o produto passa por um processo de evaporação (etapa importante para a redução de água presente no produto) para melhor eficiência de secagem em *spray dryer*. No anexo I é possível

visualizar um diagrama resumido das etapas de concentração e secagem do soro de leite.

Para as áreas úmidas do processo de fabricação, a limpeza não deve criar aerossóis, que são uma rota de contaminação conhecida (JACOBS et al., 2011). Os drenos e ralos também são conhecidos por abrigar *Cronobacter* spp. (GAN et al., 2021) e, portanto, o jato de água dos drenos para limpeza também deve ser evitado. As partes secas do processo devem ser mantidas o mais secas possível (BOURDICHON et al., 2021). Lavar com água pode causar condensação, o que incentivará o crescimento de *Cronobacter* spp. e outros microrganismos (BOURDICHON et al., 2021). Os controles do secador também ajudam a controlar a água no processamento a seco, evitando a pegajosidade e bloqueios do pó. As condições otimizadas do secador minimizam a necessidade de limpar esses bloqueios realizando atividades intrusivas, que também podem introduzir contaminação microbiana. Partes do secador como o leiteo fluidizado também são reservatórios conhecidos para *Cronobacter* spp. (FEI et al., 2015).

Além disso, métodos de limpeza a seco devem ser utilizados em instalações secas (BOURDICHON et al., 2021). No entanto, é preciso lembrar que vassouras, aspiradores de pó e pó de laticínios podem abrigar *Cronobacter* spp. (CHASE et al., 2017), tornando importante o gerenciamento dos utensílios de limpeza.

Para uma planta de processamento e secagem de soro de leite, a baixa atividade de água observada no ambiente de da torre de secagem, significa há áreas no processo em que o crescimento ou a inativação de *Cronobacter* spp. ocorrerá a partir da aplicação de calor. Assim, as plantas de secagem necessitam manter o ambiente o mais livre possível dessa bactéria para evitar eventos de recontaminação a partir da implementação de práticas de limpeza validadas, mantendo o processo o mais fechado possível e evitando a entrada de água (LINDSAY et al, 2024).

Em geral, os processos de fabricação de soro de leite em pó são fechados, no entanto, o produto em pó pode ocasionalmente escapar dos equipamentos, e esse pó vazado também já foi descrito anteriormente como uma fonte potencial de *Cronobacter* spp. (PEI et al., 2019). O produto em pó também pode contaminar facilmente as superfícies do piso e, portanto, os materiais do piso são pontos comuns de isolamento para essa bactéria (LINDSAY et al., 2019). A vedação do processo e a

prevenção do vazamento de pó também atenuam a disseminação de microrganismos. A eliminação de vazamentos de pó também ajuda muito a manter o ambiente limpo e, assim, limita os nutrientes presentes no ambiente geral para o crescimento microbiano.

O processamento também deve evitar que o pó já processado seja reintroduzido no produto processado (chamado de retrabalho a seco do produto). Esse tipo de prática de retrabalho tem sido apontado como uma via de contaminação em fórmulas infantis (JACOBS et al., 2011).

Ingredientes e aditivos usados para produzir produtos formulados, como lecitina e outros, foram descritos como reservatórios para contaminação por *Cronobacter* spp. (CETINKAYA, et al., 2013). Um estudo de Walsh et al. (2011) mostrou que *Cronobacter* spp. foram capazes de sobreviver bem em lecitina líquida por um longo período. Isso significa que a lecitina adicionada à fórmula infantil após o aquecimento deve receber seu próprio tratamento térmico validado antes de sua adição, para evitar recontaminação pós-aquecimento.

A higiene dentro das instalações de embalagem e filtros de mangas (dispositivos associados aos secadores de spray de leite em pó que coletam partículas, impedindo que entrem na planta de fabricação ou sejam liberadas no ar) também pode ajudar a controlar *Cronobacter* spp. A bactéria foi encontrada em pisos dessas instalações, nos enchimentos de sacos e contaminando os filtros de mangas devido à poeira de pó seco (CSORBA et al., 2022). A própria embalagem pode ser uma fonte dessa bactéria (LU et al., 2014) e deve ser adequadamente descontaminada.

Planos de amostragem apropriados, baseados em estatísticas, devem ser aplicados à amostragem e aos testes do produto para *Cronobacter* spp. (JONGENBURGER et al., 2011). Isso ocorre porque a contaminação no produto normalmente não é homogênea. Amostradores automáticos que utilizam pequenas quantidades de pó ao longo do ciclo de fabricação de um lote podem ajudar com a natureza heterogênea dos produtos (PARRA-FLORES, 2015). É fundamental que a amostragem do produto seja representativa de todo o processo (por exemplo, quando a amostragem composta do lote é realizada, é importante que a amostra seja bem misturada para garantir que represente o lote).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.5 Objetivo Geral

Investigar a presença de *Cronobacter* spp. em uma indústria de concentração e secagem de soro de leite a partir de amostras de produto, água provenientes do processo CIP, superfícies de equipamentos e manipuladores.

#### 3.6 Objetivos Específicos

- Identificar as espécies de *Cronobacter* isoladas nas amostras de produto, água CIP e superfície de equipamentos e manipuladores;
- Verificar a capacidade de adesão dos isolados obtidos em superfície abiótica de poliestireno e aço inoxidável;
- Testar a susceptibilidade dos isolados frente à antibióticos, detergentes e sanitizantes;
- Confirmar a similaridade genética dos isolados;
- Avaliar mecanismos de virulência das cepas isoladas.

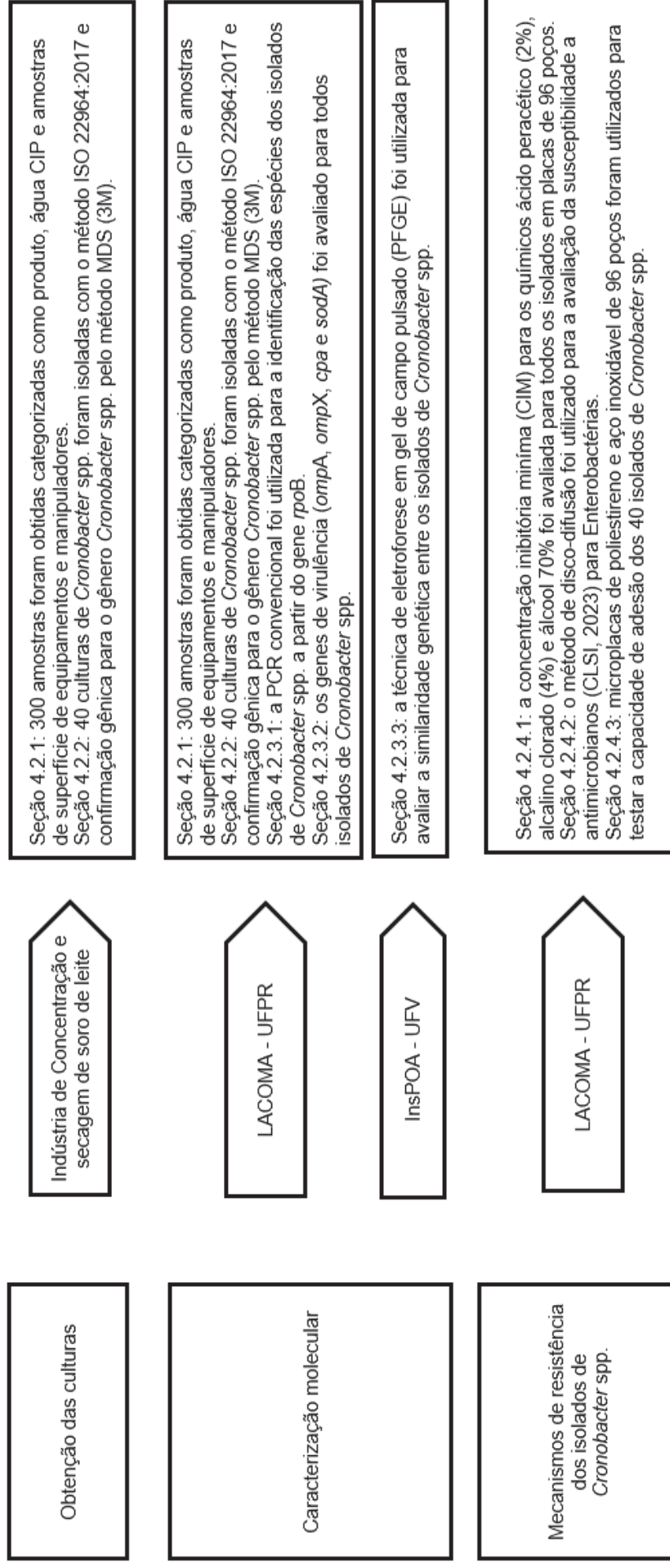


FIGURA 2. DIAGRAMA CONCEITUAL DA SEÇÃO DE MATERIAL E MÉTODOS

## CAPÍTULO I – *Cronobacter* spp. EM INDÚSTRIA DE CONCENTRAÇÃO E SECAGEM DE SORO DE LEITE: PREVALÊNCIA, EPIDEMIOLOGIA E VIRULÊNCIA

Soro de leite em pó tem sido empregado a diferentes produtos como ingrediente para sabor lácteo, recheios, misturas para bolos, sorvetes, nutrição esportiva, fórmulas infantis e para imunossuprimidos. *Cronobacter* spp. é um microrganismo patogênico, capaz de sobreviver a condições adversas no ambiente. O microrganismo já foi isolado em diferentes tipos de alimentos, como especiarias, frutas e vegetais, cereais, sopas instantâneas e doces. Estudos realizados em fábricas de leite em pó e produção de fórmulas infantis, têm demonstrado a persistência desse microrganismo no ambiente. Atualmente no Brasil, o microrganismo é avaliado como requisito obrigatório apenas em fórmulas infantis. Sabendo que o soro de leite em suas diferentes concentrações de proteína, são utilizados como principal ingrediente de diferentes produtos prontos para o consumo, *Cronobacter* spp. podem ser considerados, um microrganismo de grande relevância para monitoramento na cadeia de produção. O objetivo do trabalho foi investigar a presença de *Cronobacter* spp. em uma indústria de concentração e secagem de soro de leite a partir de amostras de produto, água provenientes do processo CIP, superfícies de equipamentos e manipuladores. *Cronobacter* spp. foi avaliada a partir de swabs de equipamentos, filtros de ar e mãos e botas dos colaboradores foram realizados pós o processo de limpeza e sanitização. Água de enxágue final de CIP foram amostradas. Produtos como matéria prima, matéria prima pasteurizada, produto concentrado por tecnologia de membranas e produto em pó foram avaliados. Todas as amostras foram processadas a partir da metodologia de isolamento de *Cronobacter* spp. recomendadas pela ISO e a confirmação genotípica para o gênero *Cronobacter* foi realizada a partir do método *Molecular Detection System* (MDS, 3M). 40 isolados de *Cronobacter* spp. foram obtidos das 300 amostras coletadas no período amostral (dezembro de 2022 a outubro de 2023), representando 13,2% de positividade. 37 isolados foram identificados como *C. sakazakii* e 3 isolados como *C. muytjensii*. 68% dos isolados foram classificados como aderentes em superfície de aço inoxidável e 35% foram aderentes em superfície de poliestireno. 95% dos isolados foram classificados como multidroga resistentes (resistentes a três ou mais antibióticos). 14 grupos com similaridade genética foram identificados na análise de PFGE. Ao avaliar a sensibilidade frente dos isolados frente aos produtos químicos ácido peracético E alcalino clorado, o ácido peracético apresentou melhor eficiência para inibição do crescimento microbiano. Em estudos com *Cronobacter* spp. realizados em ambientes de produção de leite em pó, foi atribuído que os veículos de contaminação das instalações e produto eram provenientes de falhas higiênico sanitárias dos equipamentos, manipuladores e aditivos utilizados na formulação do produto. A potencial virulência de *Cronobacter* spp. foi constatada nesta pesquisa, trazendo informações para a indústria e órgãos regulamentares que possibilitam realizar avaliações de risco e definir estratégias de intervenção para controlar doenças relacionadas a *Cronobacter* spp. visto que o microrganismo apresenta grande relevância para a saúde pública.

Palavras-chave: *Cronobacter*; soro de leite; higienização industrial; perfil patogênico; PFGE.

## 4.1 INTRODUÇÃO

*Cronobacter* spp. é um gênero de bactérias gram-negativas amplamente distribuído no meio ambiente, frequentemente encontrado em alimentos, especialmente em fórmulas infantis em pó (FARMER et al., 2015). Esse microrganismo tem despertado grande interesse devido à sua capacidade de causar infecções graves, como meningite, septicemia e enterocolite necrosante, particularmente em neonatos e lactentes (FORSYTHE et al., 2018).

*Cronobacter* spp. destaca-se por sua capacidade de sobreviver em ambientes secos e por sua resistência a condições de estresse, como altas temperaturas e desinfetantes. Essa resiliência representa um desafio significativo para a indústria alimentícia e para sistemas de controle de qualidade (LEHNER et al., 2018).

O microrganismo já foi isolado em diversas categorias de alimentos, como temperos, frutas e vegetais, cereais, sopas instantâneas e principalmente misturas secas. Estudos realizados em fábricas de leite em pó e produção de fórmulas infantis demonstraram a persistência desse microrganismo no meio ambiente (GAN et al., 2021). Atualmente no Brasil, o microrganismo é avaliado como requisito obrigatório apenas em fórmulas infantis.

O soro de leite em pó e seus derivados têm sido utilizados em diversos produtos como ingrediente para promover o sabor lácteo, aplicado em recheios, misturas para bolos, sorvetes, nutrição esportiva, fórmulas infantis e fórmulas para imunossuprimidos. A demanda por alimentos funcionais tem aumentado nos últimos anos devido às preocupações dos consumidores em aumentar a saúde, sem abrir mão da praticidade. Esses alimentos oferecem diversos benefícios à saúde devido à sua composição nutricional. Estudos têm demonstrado efeitos positivos no controle de doenças como obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes e hipertensão (SWEAZEA e JOHNSTON, 2019).

Sabendo que o soro de leite em suas diferentes concentrações proteicas é utilizado como ingrediente principal de diversos produtos prontos para consumo, *Cronobacter* spp. podem ser considerado um microrganismo de grande relevância para monitoramento nestas linhas de processamento de derivados em pó a base de

leite. Como não é conhecido o ambiente natural de *Cronobacter* spp., a sua onipresença em diferentes ambientes torna difícil o seu controle nas plantas de processamento de alimentos.

Com isso, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Cronobacter* spp. em uma indústria de concentração e secagem de soro de leite a partir de amostras de produto, água provenientes do processo CIP, superfícies de equipamentos e manipuladores.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Obtenção das amostras

O estudo foi desenvolvido em uma indústria de processamento (concentração e secagem) de soro de leite, regularmente fiscalizada pelo Serviço de Fiscalização Federal (SIF). Foram realizadas coletas em quatro datas diferentes entre os anos de 2022 e 2023. Um total de 300 amostras foram obtidas no período de coleta tendo sido categorizadas como produto, água CIP e amostras de superfície (*swab* de equipamentos pós processo de limpeza e sanitização, botas e mãos de colaboradores e filtros de ar). Os pontos amostrais e suas respectivas identificações estão descritas na tabela 2.

Em cada amostragem, foram padronizados o volume amostral em 500 mL para as amostras em forma líquida (água, matéria prima e produto concentrado). As amostras de água CIP (provenientes do processo de higienização *clean in place*) foram coletadas a partir da água do último enxágue (enxágue pós processo de sanitização do equipamento) em torneiras próprias para amostragem conectadas ao equipamento. Para obter as amostras de água foi realizado o escoamento da água, seguido de higienização da torneira com auxílio de água destilada, e posteriormente flambagem da torneira com auxílio de maçarico. Todos os frascos utilizados eram estéreis e continham tiosulfato de sódio a 1,8%.

As amostras de superfície foram obtidas a partir de *swabs* de esponja estéreis (3M *Microbiology*, St. Paul, MN, EUA), pré-umedecidas com 25 mL de solução salina peptona tamponada e armazenadas em embalagem estéril. Com auxílio de um

gabarito estéril foram amostrados 100 cm<sup>2</sup> das superfícies desejadas. Todas as amostras provenientes de equipamentos foram amostradas após o processo de higienização, respeitando o período de ação do sanitizante utilizado (15 minutos após aplicação do ácido peracético). As amostras das mãos e botas dos colaboradores foi realizada após o cumprimento dos protocolos de barreira sanitária para acesso as instalações das salas de envase, utilizando toda a superfície de uma mão e bota do colaborador.

Tabela 2. Categorias, tipos e pontos de amostragens coletadas durante a realização do experimento

| Categoria                                  | Tipo de Amostra                  | Ponto de Amostragem                                            |
|--------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Água CIP                                   | Água – Enxágue Final<br>(500 mL) | Veículo de transporte – Contentor                              |
|                                            |                                  | Silo de armazenamento                                          |
|                                            |                                  | Tanque – Armazenagem de Produto Concentrado                    |
|                                            |                                  | Pasteurizador                                                  |
|                                            |                                  | Membrana – Ultrafiltração                                      |
|                                            |                                  | Membrana – Nanofiltração                                       |
|                                            |                                  | Evaporador                                                     |
|                                            |                                  | Tanque de armazenamento – Torre de Secagem                     |
|                                            |                                  | Ciclone – Torre de Secagem                                     |
|                                            |                                  | Duto de Envase – Torre de Secagem                              |
| Produto                                    | Produto líquido (500 mL)         | Matéria Prima – Veículo de transporte                          |
|                                            |                                  | Matéria Prima – Silo de Armazenamento                          |
|                                            |                                  | Matéria Prima – Antes Pasteurizador                            |
|                                            |                                  | Matéria Prima – Depois Pasteurizador                           |
|                                            |                                  | Matéria Prima Pasteurizada - Silo de Armazenagem               |
|                                            |                                  | Produto Concentrado – Membrana Ultrafiltração                  |
|                                            |                                  | Produto Concentrado - Membrana Nanofiltração                   |
|                                            |                                  | Produto Concentrado – Tanque de armazenamento                  |
|                                            |                                  | Produto Concentrado – Pós Evaporador                           |
|                                            |                                  | Produto Concentrado – Tanque de Armazenagem – Torre de Secagem |
| Superfície de Equipamentos e Manipuladores | Swab (100 cm²)                   | Produto em Pó – Torres de Secagem                              |
|                                            |                                  | Veículo de transporte – Contentor                              |
|                                            |                                  | Silo de armazenamento - Área                                   |
|                                            |                                  | Tanque W – Armazenagem de Produto Concentrado                  |
|                                            |                                  | Tanque de armazenamento – Torre de Secagem                     |
|                                            |                                  | Sala de envase – Piso                                          |
|                                            |                                  | Sala de envase - Duto de envase                                |
|                                            |                                  | Sala de envase – Ralo                                          |
|                                            |                                  | Sala de envase – Filtro de ar                                  |
|                                            |                                  | Leito Fluidizador – Torre de Secagem                           |
|                                            |                                  | Malha da Peneira – Torre de Secagem                            |
|                                            |                                  | Torre de Secagem – Bicos Aspersores                            |
|                                            |                                  | Bota Colaborador - Sala Envase                                 |
|                                            |                                  |                                                                |
|                                            |                                  |                                                                |
|                                            |                                  |                                                                |
|                                            |                                  |                                                                |
|                                            |                                  |                                                                |
|                                            |                                  |                                                                |
|                                            |                                  |                                                                |

As amostras de matéria-prima (soro de leite fluído) foram coletadas em frascos estéreis diretamente dos tanques dos caminhões. Amostras de pasteurizadores e tanques de processo foram coletados em torneiras conectadas aos equipamentos (próprias para amostragem – as mesmas torneiras utilizadas para coleta de água CIP) com frascos estéreis. Para obter as amostras, primeiramente foi escoado parte do produto (cerca de 1000 mL). Em seguida foi realizada a higienização da torneira de coleta com auxílio de um pissete com álcool 70%. Após, as torneiras foram flambadas com auxílio de um maçarico. Novamente, foi escoado parte do produto e realizado a coleta com frasco estéril.

Os produtos em pó foram coletados a partir do coletor automático acoplado no duto de envase. Antes do início do processo de secagem o Controle de Qualidade acopla duas embalagens plásticas estéreis ao equipamento. Cada amostra pesava aproximadamente 500 gramas e representam o lote de produção.

Todas as amostras coletadas em equipamentos e tanques foram realizadas logo após o processo de higienização garantindo que o fluxo das amostragens fosse o mesmo caminho a ser seguido desde a plataforma de recebimento de matéria prima até o produto em pó.

#### 4.2.2 Isolamento de *Cronobacter* spp.

Para o isolamento de *Cronobacter* spp. foi utilizado o método preconizado pela *International Standardisation Organisation* (ISO) 22964:2017 (ISO, 2017). Uma unidade analítica de 25 mL dos produtos líquidos (matéria-prima, produto pasteurizado e concentrados) e água CIP foram adicionados à 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% (APT, Oxoid). Para os produtos em pó, 25 g das amostras foram pesadas e adicionadas à 225 mL de APT. Para as amostras de *swab*, foram adicionados ao saco Nasco™ 225 mL de água peptonada tamponada 0,1%. Todos os procedimentos foram executados em fluxo laminar, homogeneizados e incubados em estufa com temperatura controlada a 37°C por 20 horas. Todas as amostras foram processadas em triplicata para confirmação dos resultados.

Após o período de incubação, todas as amostras pré-enriquecidas foram homogeneizadas e uma alíquota foi transferida para 10 mL de meio *Cronobacter Screening Broth* (CSB, Merck) suplementado com vancomicina (10 mg/mL). Novamente as amostras foram incubadas em estufa a 42°C por 22 horas. As amostras positivas (turbamento do meio – meio apresenta cor amarela quando positivo), foram inoculadas por esgotamento na superfície do meio de cultura seletivo *Chromogenic Cronobacter Isolation* (CCI, Merck). As placas foram incubadas em estufa regulada na temperatura de 42°C por 22 horas.

As colônias típicas de *Cronobacter* spp. em ágar CCI apresentam a cor azul ou verde azulado. Após selecionadas as colônias características (3 a 8 colônias em cada placa) elas foram semeadas em ágar Trypticase de Soja (TSA, Merck) e incubadas a 37°C por 48 horas. Posteriormente, foi realizada a identificação fenotípica através dos testes bioquímicos: hidrólise de citrato, teste de oxidase, teste de arginina dehidrolase e lisina/ ornitina descarboxilase, teste de fermentação em carboidratos (D-sorbitol, D-rhamnose, D-sucrose e D-melibiose).

Todas as amostras após o processo de incubação na etapa de pré-enriquecimento foram analisadas através do método *Molecular Detection System* (MDS, 3M – sistema de detecção molecular de patógenos). 20 µL da amostra enriquecida foi transferida para tubos de lise (LS – nesses tubos continham 580 µL de solução de lise 3M) e posicionadas na bandeja do aparelho de aquecimento. 20 µL de meio de cultura estéril (meio utilizado para o enriquecimento das amostras) foi transferido para um tubo LS e utilizado como controle negativo. O bloco de aquecimento foi previamente aquecido na temperatura de 100°C e a mesma temperatura foi utilizada para aquecimento das amostras. Após o tempo de 15 minutos, a bandeja com os tubos LS foi retirada do bloco de aquecimento e transferida para o bloco de resfriamento por 5 minutos. O processo de aquecimento altera a coloração das amostras (amarelo indica amostra quente e rosa indica amostra fria).

Com o auxílio de uma pipeta, 20 µL do sobrenadante de todas as amostras resfriadas (inclusive controle negativo) foram transferidas para um novo tubo (neste tubo estão presentes os 6 pares de primers de *Cronobacter* spp. e o conjunto de enzimas) e com a pipeta foi realizado a mistura 5 vezes da amostra. 20 µL do controle negativo, foram transferidos também ao controle positivo (tubo com mistura de DNA e enzimas). Os tubos foram tampados e posicionados no equipamento para

amplificação. O tempo de “corrida” do equipamento foi de 75 minutos e os resultados visualizados através do software do equipamento.

Os isolados de *Cronobacter* spp. foram armazenadas em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) contendo 20% de glicerol para as análises posteriores.

#### 4.2.3 Caracterização genotípica do microrganismo

##### 4.2.3.1 Identificação das espécies de *Cronobacter* spp. por PCR

Os isolados obtidos armazenados em TSB foram repicados para o caldo BHI à 35 °C por 24 horas. 200 µL de cada cultura crescida no caldo BHI foram transferidos para tubos e centrifugados por 10 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 400 µL de tampão EDTA. Os tubos foram colocados em banho maria a 100°C por 10 minutos e posteriormente resfriados a temperatura ambiente por 2 minutos. Novamente os tubos foram centrifugados a 15000 g por 2 minutos e uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foram utilizadas para a PCR. O restante do material em suspensão, foi mantido armazenado em um novo tubo na temperatura de -20°C.

Em todos os protocolos, as reações tiveram um volume final de 25 µL, contendo 5 µL do DNA extraído, 10 pmol dos *primers* e água ultrapura livre de nucleases para completar o volume final. Como controle positivo foram utilizados o DNA extraído de *C. sakazakii*, *C. muytgensii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. universalis* e *C. condimenti* (todas ATCC) e água DNase/RNase livre como controle negativo.

Todos os isolados foram submetidos a PCR para identificação de espécie através do gene *rpoB*. Os oligonucleotídeos para o gene *rpoB* estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos do gene *rpoB* (*primers*) a serem utilizados para identificação de espécies de *Cronobacter* spp.

| Espécie               | Sequência de oligonucleotídeos ( <i>primers</i> )                                       | Tamanho do produto PCR | Referência                                 |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------|
| <i>C. sakazakii</i>   | Csak F: 5'- CGGGTTACGCAGGGTTGA-3'<br>Csak R: 5'- GCGGTTGCCAGTGAATAAGAT-3'               | 222 bp                 | Stoop et al., 2009;<br>Lehner et al., 2012 |
| <i>C. malonaticus</i> | Cmal F: 5'-CGT CGT ATC TCT GCT CTC-3'<br>Cmal R: 5'-AGG TTG GTG TTC GCC TGA-3'          | 251 bp                 | Stoop et al., 2009;<br>Lehner et al., 2012 |
| <i>C. turicensis</i>  | Ctur F: 5'-CGG TAA AAG AGT TCT TCG GC-3'<br>Ctur R: 5'-GTA CCG CCA CGT TTC GCC-3'       | 3628                   | Stoop et al., 2009;<br>Lehner et al., 2012 |
| <i>C. dublinensis</i> | Cdubl F: 5'-GCA CAA GCG TCG TAT CTC C-3'<br>Cdubl R: 5'-TTG GCG TCA TCG TGT TCC-3       | 418 bp                 | Stoop et al., 2009;<br>Lehner et al., 2012 |
| <i>C. muytjensii</i>  | Cmuy F: 5'-TGT CCG TGT ATG CGC AGA CC-3'<br>Cmuy R: 5'-TGT TCG CAC CCA TCA ATG CG-3'    | 289 bp                 | Stoop et al., 2009;<br>Lehner et al., 2012 |
| <i>C. universalis</i> | Cgenom F: 5'-ACA AAC GTC GTA TCT CTG CG-3'<br>Cgenom R: 5'-AGC ACG TTC CAT ACC GGT C-3' | 506 bp                 | Stoop et al., 2009;<br>Lehner et al., 2012 |
| <i>C. condimenti</i>  | Ccon F: 5'- AAC GCC AAG CCA ATC TCG-3'<br>Ccon R: 5'-GTA CCG CCA CGT TTT GCT- 3'        | 689 bp                 | Lehner et al., 2012                        |

Todos os produtos amplificados da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose, a 1,5% por 45 minutos. Em seguida, visualizado em luz ultravioleta em transluminador.

#### 4.2.3.2 Identificação dos genes de virulência de *Cronobacter* spp. por PCR

O material genético armazenado a -20 °C de cada isolado foi utilizado para avaliar os mecanismos de virulência. Os genes *ompA*, *ompX*, *cpa* e *sodA* foram avaliados para todos os isolados através da PCR. A sequência de primers de cada um dos genes está descrita na tabela 4.

Todas as reações tiveram um volume final de 25 µL, contendo 5 µL do DNA extraído, 10 pmol dos *primers* e água ultrapura livre de nucleases para completar o

volume final. Como controle positivo foram utilizados o DNA extraído de *C. sakazakii* e *C. muytgensii* (ambas ATCC) e água DNase/RNase livre como controle negativo.

Tabela 4. Sequência de oligonucleotídeos (*primers*) dos genes *gluA*, *ompA*, *ompX*, *cpa*, *sadA* e *bcsG*

| Gene        | Sequência de oligonucleotídeos ( <i>primers</i> )                       | Tamanho do produto PCR | Referência           |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------|
| <i>ompX</i> | F: 5' CACCATGAAAAAATTGCATGTCTTTCAG 3'<br>R: 5' GAAGCGGTAACCCACACCTGC 3' | 700 bp                 | Kim et al., 2010     |
| <i>ompA</i> | F: 5' GGATTTAACCGTGAACCTTTTCC 3'<br>R: 5' CGCCAGCGATGTTAGAAGA 3'        | 469 bp                 | Nair; 2006           |
| <i>cpa</i>  | F: 5' CTAGGGCGATGATAGCTGCCTCCG 3'<br>R: 5' CTAGGGGGAACAGCCACGAGGAAA 3'  | 1015 bp                | Cruz et al., 2011    |
| <i>sodA</i> | F: 5' GTCAACAACGCTAACG 3'<br>R: 5' CCCATCAGCGGGGAAT 3'                  | 352 bp                 | Towsand et al., 2007 |

Os produtos amplificados da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose, a 1,5% por 45 minutos. Em seguida, visualizado em luz ultravioleta em transluminador.

#### 4.2.3.3 Eletroforese em gel de campo pulsado PFGE

Os isolados foram submetidos à eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) conforme descrito pela PulseNet (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EUA) para espécies de *Cronobacter* spp.

Os isolados de *Cronobacter* spp. cultivados em caldo BHI à 35 °C por 24 horas foram ajustados para uma densidade óptica de 0,7–0,9 ( $\lambda = 610$  nm), para a digestão de restrição do DNA em plugues de agarose, o DNA foi restrito com a enzima *XbaI* (50U/amostra) e *Salmonella* enterica sorovar Braenderup foi usada como referência para o padrão de peso molecular. A eletroforese foi conduzida seguindo as condições no CHEF-DR III e incluiu um tempo de troca inicial de 1,8 s, um tempo de troca final de 25 s e um tempo total de execução de 18 h. O dendrograma foi criado usando o método de grupo de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) com coeficiente de Dice, tolerância (1,5%), otimização (5%) e similaridade (99%).

Analísado usando o software BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

#### 4.2.4 Mecanismos de resistência do microrganismo

##### 4.2.4.1 Teste de concentração inibitória mínima (CIM)

A verificação da inibição do crescimento dos isolados frente ao sanitizante ácido peracético e detergente alcalino clorado foi testada a partir da concentração inibitória mínima (CIM). A solução mãe para todos os produtos químicos foram preparadas a partir da diluição do produto concentrado misturado em água destilada autoclavada até atingir a concentração indicada pelo fabricante do produto químico (ácido peracético 2% e alcalino clorado 4%)

A MIC foi determinada através do método de micro diluição em caldo baseado no protocolo *Clinical and Laboratory Standards Instituto* (CLSI, 2015) com modificações. Os isolados foram inoculados em caldo BHI e incubados à 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação todos os isolados foram padronizados até atingir a escala 0,5 de Mc Farland. As placas de 96 poços foram divididas em duplicatas para cada isolado e 100 µL de caldo BHI foi adicionado em cada poço da placa. Posteriormente, 200 µL de cada um dos produtos químicos (ácido peracético e alcalino clorado) diluídos na maior concentração indicada pelo fabricante foram inoculados separadamente na primeira linha de poços e realizadas diluições seriadas (1:2) de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,57; 0,78; 0,39 e 0,19%.

Posteriormente, foi adicionado mais 80 µL de BHI para complementar a diluição seriada e 20 µL de inóculo padronizado a partir da escala Mc Farland ( $1,0 \times 10^5$  UFC/mL) em todos os poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A leitura foi realizada observando-se a turvação ou não nos poços, conclusivo para crescimento e ausência de crescimento, respectivamente. Após isso, com auxílio de um *Pin Replicator* 1 µL de cada poço foi semeado para placas de petri contendo ágar Muller Hinton (MH) e incubadas a 35 °C por 24 h para avaliar o crescimento microbiano. A menor concentração de cada um dos produtos químicos capazes de inibir

completamente o crescimento bacteriano foi considerada a concentração inibitória mínima.

Para avaliar a diferença estatística dos produtos químicos testados, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) nos resultados obtidos nas três repetições de cada princípio ativo. Como houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, para cada média obtida foi aplicado o teste Tukey. As análises foram conduzidas no Programa R (versão 4.0.5, 2024).

#### 4.2.4.2 Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos

A avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos para os isolados de *Cronobacter* spp. foi realizada com o método de disco-difusão descrito por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023) para Enterobactérias. Os antimicrobianos testados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Antimicrobianos testados

| Classe                   | Antimicrobianos                     | Concentração (µg) |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| Penicilina               | Amoxicilina (AMO)                   | 10                |
| Cefalosporina 3ª geração | Ceftiofur (CTF)                     | 30                |
| Monobactam               | Aztreonam (ATM)                     | 30                |
| Carbapenema              | Imipenem (IPM)                      | 10                |
| Fluoroquinolona          | Ciprofloxacina (CIP)                | 5                 |
| Tetraciclina             | Tetraciclina (TET)                  | 30                |
| Aminoglicosídeo          | Gentamicina (GEN)                   | 10                |
| Inibidores do fosfato    | Sulfametoxazol + trimetoprima (SUT) | 23,7/1,25         |
| Anfenicóis               | Cloranfenicol (CLO)                 | 30                |
| Trimetoprima             | Azitromicina (AZI)                  | 15                |

Os isolados foram cultivados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) e incubados a 35°C por 24 horas. Após o tempo de incubação foram ajustados na escala

0,5 McFarland em BHI (corresponde aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL). Com o auxílio de um *swab* do tipo cotonete o caldo ajustado foi estriado em placa com ágar Mueller-Hinton (MH) e após aplicados os discos. As placas foram incubadas a 37°C por 20 horas e após foram realizadas as leituras de acordo com as diretrizes do CLSI (2023) e classificados como sensíveis ou resistentes (os isolados com perfil intermediário foram considerados resistentes). Os isolados de *Cronobacter* spp. resistentes a mais de três classes de antimicrobianos foram definidos como multirresistentes (MDR).

#### 4.2.4.3 Determinação da capacidade de adesão dos isolados

Os isolados de *Cronobacter* spp. foram avaliados para quanto a capacidade de adesão. Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno (Nest® Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) e aço inoxidável de 96 poços, de acordo com a metodologia descrita por Stepanović et al. (2000).

Cada isolado foi inoculado em 3 mL de caldo TSB e incubado a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24h. Posteriormente, os caldos foram ajustados para uma densidade óptica de 0,5 na escala de McFarland, e alíquotas de 200 µL foram transferidas em triplicata para uma microplaca de 96 poços, sendo incubadas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 h. Como controle negativo, três poços foram preenchidos somente com caldo TSB não inoculado. Após a incubação, os poços foram submetidos a três lavagens com 250 µL por poço de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2). As células aderidas foram fixadas com 200 µL de metanol a 99% por 15 minutos e secas à temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram corados com 200 µL de violeta de cristal 1% por 15 min. O corante foi removido em três etapas de lavagem com água destilada, e as placas foram mantidas à temperatura ambiente até secarem. Por fim, para leitura, foram adicionados 160 µL de ácido acético glacial 33% (v/v), e a absorbância foi avaliada em leitora de microplacas a 450 nm.

Os resultados de adesão foram obtidos e classificados de acordo com Stepanović et al. (2000), sendo a avaliação média dos resultados de absorbância de cada amostra (DOa) comparada com a média da absorbância dos controles negativos

acrescido de três vezes o desvio padrão (DOcn). O grau de adesão foi determinado de acordo com a seguinte classificação: não aderente ( $DOa \leq DOcn$ ), fracamente aderente ( $DOcn < DOa \leq 2 \cdot DOcn$ ), moderadamente aderente ( $2 \cdot DOcn < DOa \leq 18 \cdot DOcn$ ) e fortemente aderente ( $DOa > 18 \cdot DOcn$ ). Os testes foram realizados em três repetições e os resultados expressos em média.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.3.1 Caracterização e análise genotípica dos isolados

Foram obtidos 40 isolados de *Cronobacter* spp. a partir das 300 amostras coletadas do processo de concentração e secagem de soro de leite (apenas um isolado por amostra positiva) representando 13,2% de positividade. A maior ocorrência de *Cronobacter* spp. foi em amostras obtidas da categoria produtos (matéria-prima, concentrados e em pó, 6,3%), seguidas das amostras de superfície de equipamentos e manipuladores (4,3%) e amostras de água CIP (2,6%). Na tabela 6 estão compilados os resultados por categoria e ponto amostral.

Tabela 6. Positividade de *Cronobacter* spp. nas categorias de amostras, pontos de amostragem e número de amostras positivas

| <b>Categoria de Amostra</b>                           | <b>Pontos de amostragem positivas para <i>Cronobacter</i> spp.</b> | <b>Nº de amostra positiva</b> | <b>% Positividade da categoria</b> |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Superfície de equipamentos e manipuladores            | Tanque 1 – Armazenagem de Produto Concentrado                      | 3                             | 4,3%                               |
|                                                       | Sala de Envase 2 – Ralo                                            | 3                             |                                    |
|                                                       | Tanque 2 – Armazenagem de Produto Concentrado                      | 2                             |                                    |
|                                                       | Sala de Envase 2 - Piso                                            | 2                             |                                    |
|                                                       | Bota do Colaborador (Sala de Envase) - Torre 2                     | 1                             |                                    |
|                                                       | Sala de Envase 2 – Filtro de Ar 1                                  | 1                             |                                    |
|                                                       | Sala de Envase – Filtros de Ar 2                                   | 1                             |                                    |
|                                                       |                                                                    |                               |                                    |
|                                                       |                                                                    |                               |                                    |
| Água CIP                                              | Tanque 1                                                           | 2                             | 2,6%                               |
|                                                       | Membrana Ultrafiltração 2                                          | 2                             |                                    |
|                                                       | Membrana Ultrafiltração 3                                          | 1                             |                                    |
|                                                       | Membrana Nanofiltração 2                                           | 1                             |                                    |
|                                                       | Ciclone 2 – Torre 2                                                | 1                             |                                    |
|                                                       | Tanque 2                                                           | 1                             |                                    |
|                                                       |                                                                    |                               |                                    |
| Produto (matéria-prima, produto concentrado ou em pó) | Matéria – Prima (Soro de Leite fluido)                             | 10                            | 6,3%                               |
|                                                       | Produto Concentrado – Membrana Ultrafiltração 2                    | 3                             |                                    |
|                                                       | Produto Concentrado – Membrana Ultrafiltração 3                    | 2                             |                                    |
|                                                       | Produto Concentrado – Membrana Ultrafiltração 4                    | 1                             |                                    |
|                                                       | Produto Concentrado – Tanque 1                                     | 1                             |                                    |
|                                                       | Produto Concentrado – Tanque 2                                     | 1                             |                                    |
|                                                       | Produto Final – Torre de Secagem                                   | 1                             |                                    |
|                                                       |                                                                    |                               |                                    |
|                                                       |                                                                    |                               |                                    |
|                                                       |                                                                    |                               |                                    |

O processo de separação das proteínas de soro de leite acontece por concentração através da tecnologia de membranas e são secados em *spray dryer*. Toda a matéria-prima é pasteurizada e esse processo é capaz de eliminar *Cronobacter*

spp. (ZHU et al., 2013). Dessa forma, a presença de *Cronobacter* spp. no processo produtivo, indica contaminação proveniente do ambiente (MOUSAVI et al., 2023).

Em estudos com *Cronobacter* spp. realizados em ambientes de produção de leite em pó (KANDHAI et al., 2004; KUCEROVA et al., 2010; FANG, et al., 2015; HAYMAN et al., 2020), foi atribuído que os veículos de contaminação das instalações e produto eram provenientes de falhas higiênico-sanitárias dos equipamentos, manipuladores e aditivos utilizados na formulação do produto.

A positividade de *Cronobacter* spp. nas amostras de ambiente e água CIP, podem estar relacionadas a falhas no procedimento de limpeza e sanitização de equipamentos e instalações. Hayman et al. (2020), afirmam que é necessário medidas preventivas mais rigorosas para o controle de *Cronobacter* spp., em áreas de produção de lácteos. Hayman et al. (2020), comparam as medidas de controle para *Salmonella* spp. impostas pelo *Codex Alimentarius* (1979), como zoneamento das áreas de produção, controle microbiológico da matéria-prima, projeto higiênico sanitário dos equipamentos e instalações, foram importantes para a erradicação da contaminação em produtos lácteos e podem contribuir para o controle de *Cronobacter* spp.

Contudo, o controle da umidade seria a ação com maior impacto para erradicação da contaminação por *Cronobacter* spp., principalmente nas áreas de secagem e salas de envase do produto (HAYMAN et al., 2020). Mesmo nas menores condições de umidade, *Cronobacter* spp. pode se desenvolver e aumentar o número populacional, apresentando maior probabilidade de contaminação do produto (BOWEN et al., 2017). A implementação de condições higiênico-sanitárias adicionais nas áreas de secagem do produto, bem como um monitoramento ambiental, podem contribuir para o controle de *Cronobacter* spp. (ROBERTS et al., 2010).

Embora a maior parte das amostras positivas para *Cronobacter* spp. tenham sido amostradas em áreas úmidas (de concentração de proteínas), as amostras positivas obtidas na torre de secagem (principalmente na área de envase) demonstram que as medidas de controle adotadas atualmente, não são suficientes para evitar a contaminação por *Cronobacter* spp. Estudos realizados em indústrias de produção de leite em pó também relataram a positividade de *Cronobacter* spp. em salas de envase (CRAVEN et al., 2010; FANG et al., 2015), entradas de ar das salas

de envase (CRAVEN et al, 2010), filtros de ar (MULLANE et al., 2008), pisos e aspiradores de pó (IVERSEN et al., 2009) e salas de embalagem (FANG et al., 2015), enfatizando a importância de implementar medidas que garantam o controle microbiológico das áreas de secagem e envase do produto.

Os 40 isolados de *Cronobacter* spp. foram submetidos a PCR para identificação das espécies. 37 isolados (92,5%) foram identificados como *Cronobacter sakasakii* e 3 isolados (7,5%) foram identificados como *Cronobacter muytjensii*. Ao avaliar os genes de virulência, todos os isolados apresentaram positividade para os genes *cpa* e *ompX*, 92,5% apresentaram a presença do gene *ompA* e 82,5% foram positivos para o gene *sodA*. Os 3 isolados identificados como *C. muytjensii* não apresentaram os genes de virulência *sodA* e *ompA*. A distribuição dos isolados em relação às espécies e categoria de amostra está descrita na Tabela 7.

Tabela 7. Identificação das espécies, categorias de amostra, adesão em poliestireno e inox, concentração inibitória mínima, perfil genotípico e multidroga resistente dos isolado de *Cronobacter* spp.

| Número do isolado | Espécie       | Categoria da amostra                       | Adesão em Poliestireno | Adesão em Inox | CIM              |                  |     | Genes de virulência |      |      | Antibiograma |
|-------------------|---------------|--------------------------------------------|------------------------|----------------|------------------|------------------|-----|---------------------|------|------|--------------|
|                   |               |                                            |                        |                | Alcalino clorado | Ácido peracético | cpa | sodA                | OmpA | OmpX |              |
| 1                 | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | Moderada       | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 2                 | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | Forte          | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 3                 | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | -              | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 4                 | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | -                      | -              | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 5                 | C. muytjensii |                                            | -                      | Fraca          | 4%               | 2%               | +   | -                   | -    | +    | Não MDR      |
| 6                 | C. sakazakii  |                                            | -                      | Moderada       | 4%               | 2%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 7                 | C. sakazakii  |                                            | -                      | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 8                 | C. sakazakii  |                                            | -                      | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 9                 | C. sakazakii  | Água CIP                                   | -                      | Fraca          | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 10                | C. sakazakii  | Água CIP                                   | -                      | Fraca          | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 11                | C. sakazakii  | Água CIP                                   | -                      | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 12                | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 13                | C. sakazakii  | Produto                                    | Fraca                  | Fraca          | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 14                | C. sakazakii  | Produto                                    | Fraca                  | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | -                   | +    | +    | MDR          |
| 15                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | Moderada               | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 16                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | Moderada               | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 17                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | Fraca                  | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 18                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | Fraca                  | Moderada       | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 19                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | Fraca                  | Forte          | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 20                | C. sakazakii  | Água CIP                                   | Fraca                  | -              | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 21                | C. sakazakii  | Água CIP                                   | -                      | -              | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 22                | C. sakazakii  | Água CIP                                   | -                      | Fraca          | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 23                | C. sakazakii  | Água CIP                                   | Fraca                  | Fraca          | 4%               | 1%               | +   | -                   | +    | +    | MDR          |
| 24                | C. sakazakii  | Produto                                    | Fraca                  | Fraca          | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 25                | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | Fraca          | 4%               | 2%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 26                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | Fraca                  | Moderada       | 2%               | 2%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 27                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | Fraca                  | Fraca          | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 28                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | Fraca                  | Moderada       | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 29                | C. sakazakii  | Superfície de equipamentos e manipuladores | -                      | -              | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 30                | C. sakazakii  | Água CIP                                   | -                      | -              | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 31                | C. muytjensii | Água CIP                                   | -                      | Fraca          | 2%               | 1%               | +   | -                   | -    | +    | MDR          |
| 32                | C. sakazakii  | Água CIP                                   | -                      | Fraca          | 4%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 33                | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | -              | 2%               | 2%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 34                | C. muytjensii | Produto                                    | -                      | Fraca          | 2%               | 1%               | +   | -                   | -    | +    | Não MDR      |
| 35                | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | -              | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 36                | C. sakazakii  | Produto                                    | Fraca                  | Fraca          | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 37                | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | -              | 2%               | 1%               | +   | -                   | +    | +    | MDR          |
| 38                | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | -              | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 39                | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | -              | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |
| 40                | C. sakazakii  | Produto                                    | -                      | -              | 2%               | 1%               | +   | +                   | +    | +    | MDR          |

*C. sakazakii* e *C. muytjensii* foram amostrados neste estudo. *C. sakazakii* é uma espécie com importância clínica e normalmente está associada a doenças em neonatos e imunossuprimidos. *C. muytjensii* por sua vez é uma espécie conhecida normalmente por sua associação a contaminações ambientais e baixa infecção relatada em humanos. Sonbol et al. (2022) avaliou através da técnica MLST *Cronobacter* spp. isoladas num período de 20 anos de 14 países diferentes, predominantemente 78% dos isolados eram *C. sakazakii* e apenas 1% eram *C. muytjensii*. Brandão et al. (2015) estudou a presença de *Cronobacter* spp. em ervas e especiarias do varejo brasileiro, 4 espécies foram identificadas, dentre elas 37 isolados de *C. sakazakii* e apenas dois isolados de *C. muytjensii* foram encontrados. A baixa presença de *C. muytjensii* pode estar relacionada a sensibilidade do microrganismo por não apresentar mecanismos de defesa similares aos do grupo I (CRAVEN et al., 2010).

A detecção dos genes de virulência *ompX* (adesão e invasão das células do hospedeiro) e *cpa* (invasão e disseminação de *Cronobacter* spp. em células do hospedeiro) foi identificada em todos os isolados. A presença dos genes é um indicativo da patogenicidade dos isolados amostrados na indústria de concentração e secagem de soro de leite. Os genes *ompA* e *ompX* funcionam sinergicamente no processo de adesão e invasão as células intestinais e cerebrais, o que contribui para a virulência dos isolados (CHANDRAPALA et al., 2014). Neste estudo, apenas os isolados de *C. muytjensii* não apresentaram positividade para o gene *ompA*. Foi demonstrado que cepas de *Cronobacter* que expressam a proteína *ompA* são mais resistentes a morte e apresentam a capacidade de se multiplicarem em células dendríticas (MITTAL et al., 2009; HOLÝ et al., 2019).

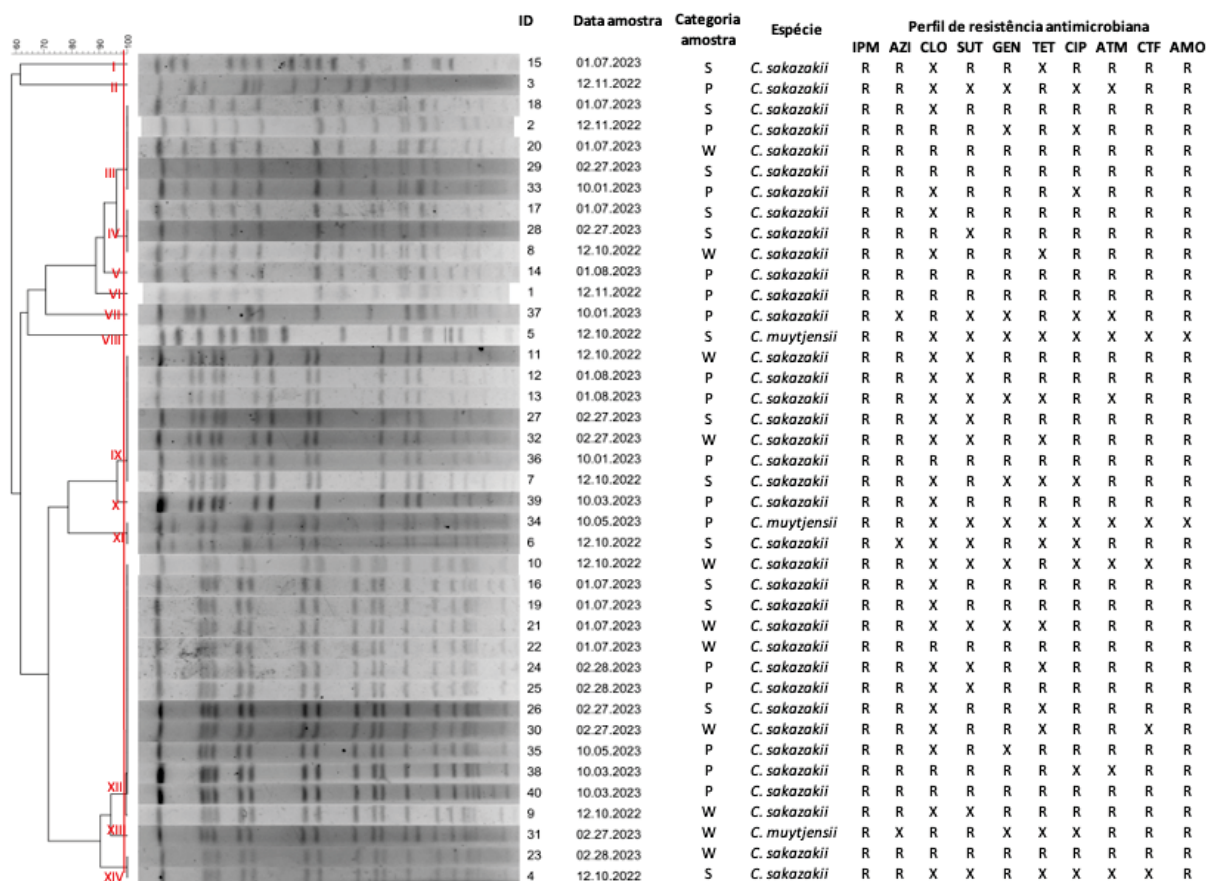
*Cpa* é um ativador de plasminogênio que permite a invasão e disseminação de *Cronobacter* spp. no hospedeiro (CRUZ et al., 2011; FRANCO et al., 2011). Além de promover a resistência de *Cronobacter* spp. (FRANCO et al., 2011; SINGH et al., 2015) representa um fator de grande importância na resistência de cepas de *Cronobacter* spp. a morte no hospedeiro, facilitando sua disseminação para diversos tecidos e órgãos no hospedeiro (ALMAJED; FORSYTHE, 2016).

O gene *sodA* confere proteção ao estresse oxidativo (TOWNSEAND et al., 2007) e contribui para uma melhor sobrevivência de *Cronobacter* spp. em macrófagos

(TOWNSEND *et al.*, 2007; BAO *et al.*, 2017). Os três isolados de *C. muytjensii* e quatro isolados de *C. sakazakii* deste estudo não foram positivos para o gene *sodA*.

Para identificar o perfil de similaridade genética, os 40 isolados de *Cronobacter* spp. foram submetidos a análise de PFGE e caracterizados em 14 “clusters” com nível de similaridade de 99%. O dendrograma gerado a partir da análise de PFGE está apresentado na figura 3. Apesar da elevada diversidade genética observada entre os isolados, foi possível identificar durante o período de amostragem isolados com perfis de restrição altamente semelhantes como: cluster III agrupa os isolados amostrados nos meses de dez./2022, jan., fev. e out./2023 (amostras de água CIP, superfícies de equipamentos e produto); cluster IX aponta similaridade entre os isolados obtidos em dez./2022, jan., fev. e out./2023 (amostras de água CIP, superfícies de equipamentos e produto); o cluster XII agrupa o maior número de isolados identificados como *C. sakazakii* amostrados também entre dez./2022, jan., fev. e out./2023. Vale ressaltar que no cluster XII a amostra 24 era referente a produto final. Os 3 isolados de *C. muytjensii* não apresentaram similaridade entre si.

Ao comparar o perfil de similaridade genica dos isolados obtidos neste estudo com os resultados do perfil de resistência antimicrobiana verificamos o comportamento idêntico de resistência em apenas nos clusters III e IX (isolados 29 e 33; e isolados 11 e 12 todos identificados como *C. sakazakii*). Não foi identificado semelhança no perfil de resistência antimicrobiana entre os isolados de *C. muytjensii*.



Legenda: P – Produto, S – Superfície e manipulador, W – Água CIP, R – Resistente, X - Sensível

FIGURA 3. DENDROGRAMA DOS PERFIS DE PFGE DOS ISOLADOS DE *Cronobacter* spp.

A semelhança entre os isolados obtidos de diferentes etapas do processo e em diferentes meses, indica potencial reintrodução destes subtipos ou a persistência temporária nas diferentes áreas da fábrica de concentração e secagem de soro de leite. Falhas no processo de higienização dos equipamentos e ambientes de processamento, assim como falhas nos procedimentos de higiene dos manipuladores de alimentos podem contribuir para a contaminação cruzada e desenvolvimento de biofilmes de *Cronobacter* spp., justificando os resultados obtidos.

Para as áreas úmidas do processo de fabricação, deve-se evitar durante a higienização criar aerossóis, que são uma rota de contaminação conhecida (JACOBS et al., 2011). Os drenos e ralos também são conhecidos por abrigar *Cronobacter* spp. (GAN et al., 2021) e, portanto, o jato de água dos drenos para limpeza também deve ser evitado. As partes secas do processo devem ser mantidas o mais secas possível (BOURDICHON et al., 2021). A higienização do ambiente de processamento quando

realizada com água pode causar condensação, o que incentivará o crescimento de *Cronobacter* spp. e outros microrganismos (BOURDICHON et al., 2021). Os controles do secador pós higienização também ajudam a controlar a água antes do início do processo de secagem do produto (FEI et al., 2015). Além disso, métodos de limpeza a seco devem ser utilizados em na torre de secagem (BOURDICHON et al., 2021). No entanto, é preciso lembrar que vassouras, aspiradores de pó e pó de laticínios podem abrigar *Cronobacter* spp. (CHASE et al., 2017), tornando importante o gerenciamento dos utensílios de limpeza.

A detecção positiva de *C. sakazakii* no produto final sugere que os procedimentos de boas práticas de fabricação da fábrica falharam em garantir os controles de processo. Os resultados obtidos no PFGE associados ao ambiente de processamento do produto demonstraram que nos 14 grupos formados houve possível contaminação entre superfície dos equipamentos e manipuladores e produto, sugerindo que a contaminação do produto final foi resultado de contaminação ambiental. Lu et al. (2024), Ibrahin et al. (2022) e Muller et al. (2016) ao avaliar *C. sakazakii* em superfícies de indústrias de mistura úmida e sementes, obtiveram resultados semelhantes e apontam que o ambiente da instalação de produção serve como a principal fonte de contaminação durante a produção. Mullane et al. (2008) ao avaliar a presença de *Cronobacter* spp. em uma indústria de fórmulas infantis notou que o principal veículo de contaminação era devido o controle deficiente sobre os de funcionários e equipamentos facilitando a disseminação de *C. sakazakii* por toda a unidade de produção.

A onipresença do gênero *Cronobacter* em indústrias de produtos lácteos sugere que a higiene geral e o monitoramento contínuo do ambiente de processamento para *Cronobacter* spp. são importantes (BOURDICHON et al., 2021). U programa abrangente de monitoramento de patógenos ambientais deve ser estabelecido para encontrar *Cronobacter* spp. e, em seguida, aplicar medidas de controle como por exemplo o processo de higienização. A presença ou ausência de bactérias indicadoras em superfícies de contato com alimentos, como *Enterobacteriaceae*, também ajuda a estabelecer o status de higiene de ambientes que podem favorecer e abrigar *Cronobacter* spp. (BOURDICHON et al., 2021). No entanto, deve-se observar que *Enterobacteriaceae* não pode prever com segurança a presença ou ausência de

*Cronobacter* spp., e que programas paralelos de monitoramento específicos para esse patógeno devem estar em vigor (CRAVEN et al., 2021).

#### 4.3.2 Mecanismos de resistência dos isolados

Todos os isolados foram testados quanto a adesão em superfície de poliestireno e aço inoxidável. *Cronobacter* spp. apresentou maior adesão na superfície de aço inoxidável onde 5% dos isolados foram classificados como fortemente aderente, 33% moderadamente aderente e 30% fracamente aderente. Ao testar os mesmos isolados na superfície de poliestireno, 5% foram classificados como moderadamente aderente e 30% como fracamente aderente. O maior percentual de não aderentes foi observado na superfície de poliestireno (65% dos isolados). Os 3 isolados identificados como *C. muytjensii* foram classificados como não aderentes em superfície de poliestireno e como fracamente aderente em superfícies de aço inoxidável. Todos os isolados classificados como fortemente e moderadamente aderente eram *C. sakazakii*. Os dados obtidos podem ser observados na tabela 7.

A avaliação do potencial de adesão dos isolados obtidos é de fundamental importância para compreender a interação de *Cronobacter* spp. com as superfícies analisadas. A capacidade de adesão é uma característica que influencia na persistência, colonização e formação de biofilme (CARVALHO et al., 2023). *C. sakazakii* é capaz de se fixar em materiais abióticos como silício, látex, policarbonato, aço inoxidável, vidro e cloreto de polivinila (IVERSEN et al., 2004, LEHNER et al., 2005, GRIM et al., 2008). A maior adesão verificada neste estudo foi em superfícies de aço inoxidável (68% dos isolados – quando somados os percentuais de fortemente, moderadamente e fracamente aderência). 35% dos isolados foram classificados como capazes de aderir a superfície de poliestireno. Nesse contexto, a capacidade de adesão apresentada dos isolados ressalta um alerta, indicando que o microrganismo pode potencialmente sobreviver aos processos de limpeza e sanitização por meio da formação de biofilme.

Todos os 40 isolados foram testados quanto a sensibilidade a antimicrobianos. 100% dos isolados foram resistentes a IPM; 95% dos isolados foram considerados

resistentes para AMO; 92,5% apresentaram resistência a AZI; 87,5% apresentaram resistência a CTF; 80% foram resistentes a ATM; 72,5% foram resistentes a GEN; 70% apresentaram resistência a CIP; 65% apresentaram resistência a TET; 57,5% apresentaram resistência a SUT; e 32,5% foram resistentes a CLO. Diante disso, 95% dos isolados apresentaram o perfil de resistência a pelo menos 3 classes de antimicrobianos e foram classificados como multidroga resistente. Os dois isolados que não apresentaram perfil de resistência a mais que 3 classes de antimicrobianos foram identificados como *C. muytjensii*. 20% dos isolados apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados (4 isolados de amostras de produto, 3 isolados de amostras de água CIP e 1 isolados de amostra de superfície). Os dados referentes a sensibilidade aos antimicrobianos testados e categorias de amostras estão disponíveis no quadro 1.

A resistência de alguns microrganismos a antimicrobianos pode acontecer devido a troca de material genético entre outros microrganismos ou a partir de mutações (LANGDON *et al.*, 2016; FEI *et al.*, 2017; KARDOS, 2017). Alguns fatores como o estresse ambiental, temperatura, extremos de pH e falta de nutrientes podem causar alterações na fisiologia do microrganismo, o que leva a diminuição do crescimento como uma forma de defesa da célula em combate ao estresse (BOWEN *et al.*, 2006). A adaptação aos fatores extremos pode levar ao desenvolvimento de resistência aumentada ou diminuída a outros estresses, e em alguns casos desenvolvem a resistência a antibióticos (CHAVES-LOPEZ *et al.*, 2006).

Frequentemente CLO, CTF e GEN são indicados para o tratamento de infecções causadas por *Cronobacter* spp (TOWNSEND *et al.*, 2018). A resistência a antimicrobianos pertencentes as classes de penicilinas (AMO), macrolídeo (AZI), carbapenema (IPM) e cefalosporinas de terceira geração (CTF) já foi descrita para *Cronobacter* spp. demonstrando possíveis dificuldades para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo.

O alto percentual de isolados MDR obtidos neste estudo demonstram preocupação para a saúde pública, indicando a disseminação cepas mais resistentes de *Cronobacter* spp. no ambiente. Zeng *et al.* (2018) verificaram a resistência de *C. sakazakii* isolado de fluido de abscesso cerebral de um neonato na China e que esse isolado era multirresistente, apresentando resistência a 8 antibióticos testados (ampicilina, cefazolina, ceftriaxona, aztreonam, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol

e trimetoprim/sulfametoxazol). Cechin et al. (2024) identificaram a multirresistência em 30% dos isolados de *Cronobacter* spp. provenientes de amostras de alimentos com baixa atividade de água. Chon et al. (2021) atribuíram que o efeito do estresse ambiental na suscetibilidade a antimicrobianos pode contribuir para a multidroga resistência de *C. sakazakii*.

Quadro 1. Perfil multidroga resistente dos isolados de *Cronobacter* spp. e suas respectivas categorias de amostra.

| Número do Isolado | Espécie              | Antimicrobiano |       |       |       |       |       |       |       |       |       | MDR | Categoria da Amostra |          |            |
|-------------------|----------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|----------------------|----------|------------|
|                   |                      | IPM            | AZI   | CLO   | SUT   | GEN   | TET   | CIP   | ATM   | CTF   | AMO   |     | Produto              | Água CIP | Superfície |
| 1                 | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 2                 | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 3                 | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 4                 | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 5                 | <i>C. muytjensii</i> |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | -   |                      |          |            |
| 6                 | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 7                 | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 8                 | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 9                 | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 10                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 11                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 12                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 13                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 14                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 15                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 16                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 17                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 18                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 19                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 20                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 21                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 22                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 23                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 24                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 25                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 26                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 27                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 28                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 29                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 30                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 31                | <i>C. muytjensii</i> |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 32                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 33                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 34                | <i>C. muytjensii</i> |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | -   |                      |          |            |
| 35                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 36                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 37                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 38                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 39                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| 40                | <i>C. sakazakii</i>  |                |       |       |       |       |       |       |       |       |       | X   |                      |          |            |
| % Resistência     |                      | 100%           | 92,5% | 32,5% | 57,5% | 72,5% | 65,0% | 70,0% | 80,0% | 87,5% | 95,0% |     |                      |          |            |

Legenda: Amoxicilina - AMO (10 µg); ceftiofur - CTF (30 µg); aztreonam - ATM (30 µg); imipenem - IPM (10 µg); ciprofloxacina - CIP (5 µg); tetraciclina - TET (30 µg); gentamicina - GEN (10 µg), sulfametoxazol + trimetoprima - SUT (23,75/1,25 µg), cloranfenicol - CLO (30 µg) e azitromicina - AZI (15 µg). Legenda: IPM. Vermelha = resistência, verde = sensível e cinza = categoria da amostra. X = Multidroga resistente.

Nos testes para definição da concentração inibitória mínima para os isolados de *Cronobacter* spp. quando avaliados produtos químicos frequentemente utilizados no processo de higienização na indústria de concentração e secagem de soro de leite, foram observadas que o ácido peracético na concentração indicada pelo fabricante (2%) apresentou eficiência em 87,5% dos isolados. O produto alcalino clorado (4%) por sua vez, foi eficiente para inibir o crescimento de *Cronobacter* spp. em 57,5% dos isolados. O ácido peracético e o alcalino clorado foram capazes de inibir o crescimento dos isolados (12,5% e 42,5% respectivamente) na diluição de 50%. Houve diferença significativa entre os produtos químicos testados e os resultados da análise estatística das repetições e dos tratamentos utilizados estão dispostos na tabela 8.

Tabela 8. Tolerância de *Cronobacter* spp. no teste CIM para cada princípio ativo testado.

| Princípio ativo  | % de inibição<br>(Concentração<br>em 100%) | Média (teste<br>Tukey) | % de inibição<br>(Concentração<br>em 50%) | Média (teste<br>Tukey) |
|------------------|--------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|------------------------|
| Ácido Peracético | 87,5%                                      | 33,7a                  | 12,5%                                     | 6,3a                   |
| Alcalino Clorado | 57,5%                                      | 20,3b                  | 42,5%                                     | 19,7b                  |

O produto ácido peracético apresentou bons resultados para a inibição do crescimento dos isolados de *C. sakazakii* (80% dos isolados foram sensíveis ao químico testado com a concentração máxima recomendada pelo fabricante). O alcalino clorado apresentou 50% de eficiência na eliminação de *C. sakazakii*. Os três isolados identificados como *C. muytjensii* apresentaram sensibilidade ao ácido peracético e alcalino clorado testados na concentração máxima indicada pelo fabricante. Os resultados de sensibilidade das duas espécies de *Cronobacter* spp. aos diferentes produtos químicos estão compilados na figura 4.

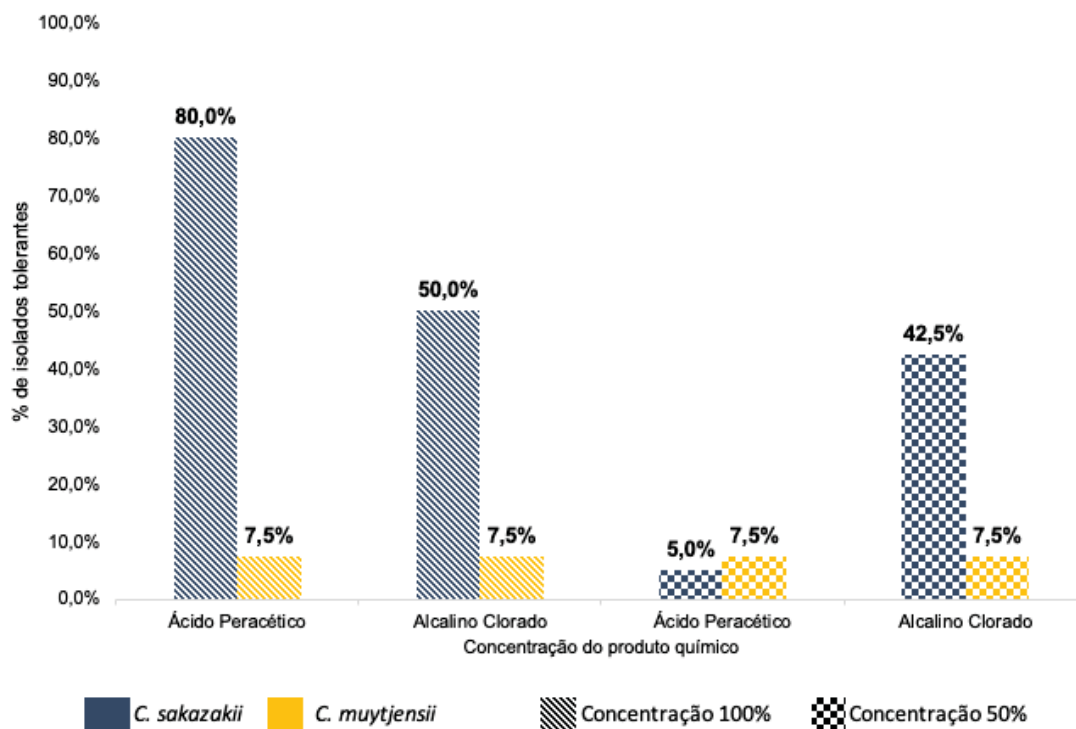


FIGURA 4. TOLERÂNCIA DAS ESPÉCIES DE *Cronobacter* spp. FRENTE AOS PRODUTOS QUÍMICOS TESTADOS

Algumas concentrações de desinfetantes comumente são usadas na indústria de alimentos para controle de microrganismos como ácido peracético, dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio, podem inativar *Cronobacter* spp. em diferentes superfícies (NIU et al., 2016). Ácido peracético e alcalino clorado foram utilizados para verificar a concentração inibitória mínima dos isolados. Foi identificado que o princípio ativo ácido peracético foi mais eficiente para inibição do crescimento de *Cronobacter* spp. Em estudo semelhante realizado por Lin et al. (2023) o agente químico alcalino clorado apresentou baixa eficiência na eliminação do microrganismo. Resultado semelhante foi verificado por Lin et al. (2023), ao testar um químico a base de cloro em superfícies de aço inoxidável de produtos lácteos com a presença de *Cronobacter* spp. Yang et al. (2022), descobriram que o efeito inibitório dos sanitizantes contra *C. sakazakii* isolados de leite foi significativamente diminuído. Huang et al. (2020), afirmam que a presença de material orgânico em produtos lácteos é um dos elementos mais críticos que perturbam a eficiência do cloro contra microrganismos, seja interagindo com o desinfetante ou impedindo que ele faça contato com as bactérias.

A capacidade de formação de biofilme em *Cronobacter* spp. pode aumentar a persistência no ambiente de fabricação (LING et al., 2020). Biofilmes de *Cronobacter* spp. demonstraram ser mais resistentes a sanitizantes do que suas células planctônicas (LINDSAY et al., 2022). A quebra de ciclo ou tratamento de choque utilizando ácido (HCl ou ácido cítrico com pH ~ 4,2) ou um produto alcalino (pH 9) em limpezas CIP ou COP podem aumentar a tolerância de *Cronobacter* spp. ao calor e contribuir para a eliminação de biofilmes (ZHOU et al., 2020).

#### 4.4 CONCLUSÃO

*Cronobacter* spp. foi avaliado em uma indústria de concentração e secagem de soro de leite. Dos 40 isolados obtidos nas diferentes categorias de amostras estabelecidas neste estudo, 37 foram identificados como *C. sakazakii* e 3 como *C. muytjensii*. A matéria-prima bem como falhas no processo de limpeza e sanitização de equipamentos, ambientes de trabalho e manipuladores de alimentos, além da capacidade de formação de biofilmes podem ser classificados como as principais causas da contaminação encontrada e a similaridade genica entre os isolados.

Sabendo da aplicação do soro de leite como ingrediente de diferentes produtos prontos para o consumo e que nem todos os produtos são tratados termicamente antes de chegar ao consumidor final, a identificação de *C. sakazakii* neste estudo deve ser considerada de grande preocupação para saúde pública. Os isolados apresentaram adesão em superfícies de aço inox e poliestireno, resistência aos antibióticos indicados para o tratamento de infecções e presença de genes de virulência confirmando seu perfil patogênico. Os produtos químicos ácido peracético e alcalino clorado apresentaram boa eficiência na eliminação de *C. muytjensii* e *C. sakazakii* quando utilizados na concentração recomendada pelo fabricante.

A potencial virulência de *Cronobacter* spp. foi constatada nesta pesquisa e forneceu orientação básica e conhecimento para a indústria rever procedimentos de boas práticas de fabricação ao longo do processo de produção. Além disso, o presente estudo traz considerações significativas a respeito da epidemiologia de *Cronobacter* spp. possibilitando órgãos regulamentares a realizar avaliações de risco e definir estratégias de intervenção para controlar doenças relacionadas a *Cronobacter* spp. visto que o microrganismo apresenta grande relevância para a saúde pública.

## REFERÊNCIAS

- AGEORGES, V., MONTEIRO, R., LEROY, S., BURGESS, C. M., PIZZA, M., CHAUCHEYRAS-DURAND, D., DESVAUX, M. Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): from bacterial adhesion to biofilm formation **FEMS Microbiol. Rev.**, 44, pp. 314-350, 2020.
- ALMAJED, F.S., FORSYTHE, S.J. *Cronobacter sakazakii* clinical isolates overcome host barriers and evade the immune response. **Microbial Pathogenesis**, 90: 55-63, 2016.
- ALSONOSI, A. et al. The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalized patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 34, n. 10, p. 1979-1988, 2015.
- AMALARADJOU, M. A., VENKITANARAYANAN, K. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. **J. Food Protect.**, 74, pp. 200-208, 2011.
- BAE, Y. M., BAEK, S. Y., LEE, S. Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, 153, 2012.
- BALDWIN, A.; LOUGHLIN, M.; CAUBILLA-BARRON, J.; KUCEROVA, E.; MANNING, G.; DOWSON, C.; FORSYTHE, S. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. **BMC Microbiology**, 9: 223-231, 2009.
- BAO, X., YANG, L., CHEN, L., LI, B., LI, L., LI, Y., et al. Analysis on pathogenic and virulent characteristics of the *Cronobacter sakazakii* strain BAA-894 by whole genome sequencing and its demonstration in basic biology science. **Microb. Pathog.** 109: 280–286, 2017.
- BARREIRA ER, SOUZA DC, GOIS PF, FERNANDES JC. 9. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatrics** (São Paulo). 25 (1/2): 65-70, 2003.
- BEUCHAT, L.R. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature. **Food Microbiol.**, 24:767–777, 2013.
- BEUCHAT, L.R., RYU, J.H. Fate of *Enterobacter sakazakii* attached to or in biofilms on stainless steel upon exposure to various temperatures or relative humidities. **J Food Prot**; 71:940–945, 2008.
- BOURDICHON, F., BETTS, R., DUFOUR, C., FANNING, S., FARBER, J., MCCLURE, P., WINKLER, A. Processing environment monitoring in low moisture food production facilities: Are we looking for the right microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, 356, 2021.
- BOWEN, A. B.; BRADEN, C. R. Invasive *Enterobacter sakazakii* in infants. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 8, p. 1185-1189, 2006.
- BOWEN, A.B., BRADEN, C.R. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. **Emerge Infect Dis** 12, 1185–1189, 2006.
- BRANDÃO ML, UMEDA NS, CARVALHO KR, 12. Filippis I. 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. **Vigil Sanit Debate**. 3(3):91-6. 2015.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 161, DE 01 DE JULHO DE 2022, estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de julho de 2022.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA), INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 94, DE 18 DE SETEMBRO DE 2020, estabelece o padrão de identidade e qualidade para o soro de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de setembro de 2020.
- BREEUWER, P.; LARDEAU, A.; PETERZ, M.; JOOSTEN, H. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **J. Appl. Microbiol.** 95, 967–973, 2003

CARVALHO, G. G., CALARGA, A. C., TEODORO, J. R., QUEIROZ, M. M., ASTUDILLO-TRUJILLO, C. A., LEVY, C. E., BROCCCHI, M., KABUKI, D. Y. Isolation, comparison of identification methods and antibiotic resistance of *Cronobacter* spp. in infant foods. **Food Res. Int.**, 137, 2020.

CARVALHO, C.R., SILVA, C.C., UMEDA, N.S., LOPES, S.M. Pesquisa, identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 75: 1690, 2023.

CAUBILLA BARRON, J., HURRELL, E., TOWNSEND, S., CHEETHAM, P., LOCCARRILLO, C., FAYET, O., PRERE, M.F., FORSYTHE, S.J. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. **J. Clin. Microbiol.** 45, 3979–3985, 2007.

CAUBILLA BARRON, J.; FORSYTHE, S.J. Dry stress, and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant fórmula. **J. Food Prot.** 70: 2111–2117, 2007.

CETIN, H. K., MORGAN, M. C. Antimicrobial efficacy of cinnamaldehyde, chitosan and high-pressure processing against *Cronobacter sakazakii* in infant formula. **J. Food Saf.**, 40, 2020.

CETINKAYA, E., JOSEPH, S., AYHAN, K., FORSYTHE, S. J. Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. **Molecular and Cellular Probes**, 27, 2013.

CHANDRAPALA, D., KIM, K., CHOI, Y., SENEVIRATHNE, A., KANG, D. H., RYU, S., *et al.* Putative *inv* is essential for basolateral invasion of Caco-2 Cells and acts synergistically with OmpA to Affect in vitro and in vivo virulence of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544. **Infect. Immun.** 82: 1755–1765, 2014.

CHASE, H. R., GOPINATH, G. R., ESHWAR, A. K., STOLLER, A., FRICKER-FEER, C., GANGIREDLA, J., LEHNER, A. Comparative genomic characterization of the highly persistent and potentially virulent *Cronobacter sakazakii* ST83, CC65 strain H322 and other ST83 strains. **Frontiers in Microbiology**, 8, 2017.

CHAVES-LOPEZ, C., HAMMACK, T.; SONG, K.Y.; LAMPEL, K. A. Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.353–360, 2006.

CHAVES, C.E.V., BRANDÃO, M.L.L., LACERDA, M.L.G.G., ROCHA, C.A.B.C., LEONE DE OLIVEIRA, S.M.D.V., PARPINELLI, T.C., PANIAGO, A.M.M. Fatal *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 494 meningitis in a newborn. Brazil. **Emerging Infectious Disease**, 24(10): 1948–1950, 2018.

CHEN, L., YANG, J., YU, J., YAO, Z., SUN, L., SHEN, Y., JIN, Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, 33 (Database issue), D325–D328, 2005.

CHEN, Y. *et al.* Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection and isolation of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula: precollhaymaborative study. **J AOAC Int**, v. 92, n. 3, p. 862-872, 2010.

CHOI, N. Y., BAEK, S. Y., YOON, J. H., CHOI, M. R., KANG, D. H., LEE, S. Y. Efficacy of aerosolized hydrogen peroxide-based sanitizer on the reduction of pathogenic bacteria on a stainless steel surface. **Food Control**, 27, 2012.

CHON, J. W., SONG, K. Y., KIM, S. Y., HYEON, J. Y., SEO, K. H. Isolation and characterization of *Cronobacter* from desiccated foods in Korea. **J. Food Sci.**, 77 (7), 2012.

CHON, J. W., SEO, K. H., KIM, B., HER, D., JEONG, K.-Y. Evaluation of Commercial Disinfectants for Efficacy at Inactivating *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in Water: A Preliminary Study. **Journal of Dairy Science Biotechnology**, 39, 2021.

CIOFU, O., MOSER, C., JENSEN, P. O., HOIBY, N. Tolerance and resistance of microbial biofilms **Nat. Rev. Microbiol.**, 20, pp. 621-635, 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Tenth Edition. CLSI

document M07-A10. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th ed. CLSI supplement M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2023.

CRAVEN H.M., MCAULEY C.M., DUFFY L.L., FEGAN N. Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. **J. Appl. Microbiol.** 109:1044–52, 2010.

CRUZ, A., XICOHTENCATL-CORTES, J., GONZA'LEZ-PEDRAJO, B., BOBADILLA, M., ESLAVA, C., ROSAS, I. Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources. **Can. J. Microbiol.** 57: 735–744, 2011.

CSORBA, C., PAJIĆ, M., BLAGOJEVIĆ, B., FORSYTHE, S., RADINOVIĆ, M., VELEBIT, B. Prevalence, characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in a milk powder processing environment: The first reported case in Serbia. **Food Science and Nutrition**, 10, 2022.

CUI, J., HU, J., DU, X., YAN, C., XUE, G., LI, S., CUI, Z., HUANG, H., YUAN, J. Genomic Analysis of Putative Virulence Factors Affecting Cytotoxicity of *Cronobacter*. **Frontiers in Microbiology**, 10: 3104, 2022.

DANCER, G.I., MAH, J.H., RHEE, M.S., HWANG, I.G., KANG, D.H. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. **J Appl Microbiol**, 107: 1606–1614, 2009.

DEPARDIEU, F., PODGLAJEN, I., LECLERCQ, R., COLLATZ, E., COURVALIN, P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20 (1), 2007.

DIAS, REGIANE C.B. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Apmis**, v. 124, n. 4, p. 299-308, 2016.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2023**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br> Acesso em: 30 de junho de 2024.

FANG, R., WANG, Q., YANG, B., ZHANG, J., CAO, B., GENG, W., FENG, X., YANG, J., YANG, J., GE, W. Prevalence and subtyping of *Cronobacter* species in goat milk powder factories in Shaanxi province, China. **Journal of Dairy Science**, 98(11): 7552-7559, 2015.

FAO/WHO FOOD STANDARD. Codex Alimentarius Official Standards. CODE OF HYGIENIC PRACTICE FOR POWDERED FORMULAE FOR INFANTS AND YOUNG CHILDREN. **Official Codex Standard**. List CAC/RCP 66- 2008.

FARMER, J. J. III. My 40-Year History with *Cronobacter/Enterobacter sakazakii* - Lessons Learned, Myths Debunked, and Recommendations. **Front Pediatr**, v. 3, n. 84, 2015.

FARR, S. B., KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiol Rev** 55, 561–585, 1991.

FEI, P., MAN, C., LOU, B., FORSYTHE, S. J., CHAI, Y., LI, R., JIANG, Y. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China. **Applied and Environmental Microbiology**, 81, 2015.

FEI, E. J., COOPER, J. E.; Multilocus sequence typing - what is resolved. **Trends Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 373-377, 2017.

FORSYTHE, S.J. New Insights into the Emergent Bacterial Pathogen *Cronobacter*. **School of Science and Technology**, Nottingham Trent University, Nottingham, UK. 2015.

FORSYTHE, S.J.; DICKINS, B.; JOLLEY, K.A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. **BMC Genomics**, 15(1): 1121, 2014.

FRANCO, A., KOTHARY, M., GOPINATH, G., JARVIS, K., GRIM, C., HU, L., et al., Cpa, the outer membrane protease of *Cronobacter sakazakii*, activates plasminogen and mediates resistance to serum bactericidal activity, **Infect. Immun.**, 79: 1578-1587, 2011.

GAN, X., YANG, B., WANG, X., DONG, Y., HU, Y., XU, J., LI, F. Contamination, persistence and dissemination of *Cronobacter* during the production of powdered infant formula in China in 2016. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, 13, 2021.

GRIM, C. et al. Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. **BMC Genomics**, v. 14, p. 366, 2008.

HAJAM, I. A., DAR, P. A., SHAHNAWAZ, I., JAUME, J. C., LEE, J. H. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. **Exp. Mol. Med.**, 49 (9), 2017.

HAYMAN M.M., EDELSON-MAMMEL S.G., CARTER P.J., CHEN Y.I., METZ M., SHEEHAN J.F., TALL B.D., THOMPSON C.J., SMOOT L.A. Prevalence of *Cronobacter* spp. and *Salmonella* in Milk Powder Manufacturing Facilities in the United States. **J Food Prot.** 2020.

HEALY, B., WALSH, C., WHYTE, P., WALL, P.G., et al. *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. **Minerva Pediatr.**, 59(2):137-48, 2007.

HENRY, M., FOULADKHAH, A. Outbreak history, biofilm formation, and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings. **Microorganisms**, 7, 2019.

HEPERKAN, D., DALKILIC-KAYA, G., JUNEJA, V.K., *Cronobacter sakazakii* in baby foods and baby food ingredients of dairy origin and microbiological profile of positive samples. **LWT**. 75: 402-407, 2017.

HOLÝ, O., FORSYTHE, S. *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. **J Hosp Infect.**, 86(3):169–177, 2014.

HOLÝ, O., CRUZ-CÓRDOVA, A., XICOHTENCATL-CORTES, J., HOCHÉL, I., PARRAFLORES, J., PETRZELOVÁ, J., FACEVICOVÁ, K., FORSYTHE, S., ALSONOSI, A. Occurrence of virulence factors in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* originated from clinical samples. **Microbial Pathogenesis**, 127: 250–256, 2019.

HUANG, M., ZHANG, M., BHANDARI, B. Recent development in the application of alternative sterilization technologies to prepared dishes: A review Crit. **Rev. Food Sci. Nutr.**, 59, 2020.

HUERTAS, J. P., FERNANDEZ, P. S., PALOP, A. Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores. **Food Microbiol**, 34:158–163, 2013.

IBRAHIM, A.H.M., ALI, M.E.E., AHMED, M.F.E., ABDELKHALEK, A. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* in raw milk and some dairy products at Mansoura city. **Journal of Advanced Veterinary Research**, 12, 2022.

**ISO 22964:2017**: Microbiology of the food chain. 2017.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 11, p. 443-454, november, 2003.

IVERSEN, C., LANE, M., FORSYTHE, S. J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. **Lett. Appl. Microbiol.**, 38, pp. 378-382, 2004.

IVERSEN, C.; MULLANE, N.; MCCARDEL, B.; TAL, B.D.; LEHNER, A.; FANNIN, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. *Cronobacter* gen nov, a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen nov, comb nov, *Cronobacter malonaticus* sp nov, *Cronobacter turicensis* sp nov, *Cronobacter muytjensii* sp nov, *Cronobacter dublinensis* sp nov, *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp *dublinensis* subsp nov, *Cronobacter dublinensis* subsp *lausannensis* subsp nov and *Cronobacter dublinensis* subsp *lactaridi* subsp nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 1442–1447, 2008.

- JACOBS, C., BRAUN, P., HAMMER, P. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. **Journal of Dairy Science**, 94, 2011.
- JANG, H., GOPINATH, G.R., ESHWAR, A., SRIKUMAR, S., NGUYEN, S., GANGIREDLA, J., PATEL, I.R., FINKELSTEIN, S.B., NEGRETE, F., WOO, J., LEE, Y., FANNING, S., STEPHAN, R., TALL, B.D., LEHNER, A. The Secretion of Toxins and Other Exoproteins of *Cronobacter*: **Role in Virulence, Adaption, and Persistence**. *Microorganisms*, 8(2): 229, 2020.
- JOLLEY A. K. BRAY E. J. MAIDEN M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Disponivel em: <https://pubmlst.org/organisms/cronobacter-spp> Acesso em: 17 de maio de 2023.
- JONGENBURGER, I., REIJ, M. W., BOER, E. P. J., GORRIS, L. G. M., ZWIETERING, M. H. Actual distribution of *Cronobacter* spp. in industrial batches of powdered infant formula and consequences for performance of sampling strategies. **International Journal of Food Microbiology**, 151, 2011.
- JOSEPH, S. FORSYTHE, S.J. Predominance of *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 4 in Neonatal Infections. **Emerging Infectious Diseases, CDC**. Vol. 17, No. 9, 1713–1715, 2011.
- JOSEPH, S., FORSYTHE, S.J. Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter* spp., generated by multilocus sequence typing and analysis. **Front. Microbiol.** 3:397, 2012.
- JUNG, J. H., CHOI, N. Y., LEE, S. Y. Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. **Food Microbiol.**, 34, pp. 70-80, 2013.
- KANDHAI, M. C. et al. A New protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1267-1270, 2004.
- KARDOS, N. Overuse of antibiotics and antibiotic resistance in medical applications featuring carbapenemase resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). **SOJ Microbiol. Infect. Dis.** 1– 27, 2017.
- KENT, R.M., FITZGERALD, G.F., HILL, C., STANTON, C., ROSS, P.R., Review - Novel Approaches to Improve the Intrinsic Microbiological Safety of Powdered Infant Milk Formula. **Nutrients**, 7, 1217-1244, 2015.
- KIM, H., RYU, J.K., BEUCHAT, L. R. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 72, pp. 5846-5856. 2006.
- KIM, H., RYU, J. H., BEUCHAT, L. R. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, 2007.
- KUCEROVA, E. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. **PLoS ONE**, v.5, n.3, p.1-10, 2010.
- LAI, K.K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. **Medicine** 80, 113–122, 2001.
- LAMPEL, K. A., AL-KHALDI S., CAHILL S.M. *Cronobacter* spp. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins (Second Edition), **Food and Drug Administration**, 9-13, 2012.
- LANGDON, A., CROOK, N., DANTAS, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. **Genome Med.**, 8:39, 2016.
- LEE, Y.D., PARK, J.H. Complete genome of temperate phage ENT39118 from *Cronobacter sakazakii*. **Journal of Virology**, 86(9), 5400–5401, 2012.
- LEHNER, A., FRICKER-FEER, C., STEPHAN, R. Identification of the recently described *Cronobacter condimenti* by an *rpoB*-gene-based PCR system. **J. Med. Microbiol.** 61, 1034- 1035, 2012.
- LEHNER, A., STEPHAN, R. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2850-2857, 2004.

- LEHNER, A., TALL, B. D., FANNING, S., SRIKUMAR, S. *Cronobacter* spp.—opportunistic foodborne pathogens: an update on evolution, osmotic adaptation and pathogenesis. **Curr. Clin. Microbiol. Rep.**, 2018.
- LEPUSCHITZ, S., RUPPITSCH, W., PEKARD-AMENITSCH, S., FORSYTHE, S. J., CORMICAN, M., MACH, R. L., EUCRONI Study Group. Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans, Europe, 2017. **Emerging Infectious Diseases**, 25(3), 515–522, 2019.
- LIN, J.M., ZHANG, C.S., LI, H.Y., ZENG, W.J., HE, Y.W., YE, Q.P. The glutaredoxin gene, *grxB*, affects acid tolerance, surface hydrophobicity, auto-aggregation, and biofilm formation in *Cronobacter sakazakii*. *Front. Microbiol.*, 9, 2023.
- LING, N., FORSYTHE, S., WU, Q., DING, Y., ZHANG, J., ZENG, H. Insights into *Cronobacter sakazakii* biofilm formation and control strategies in the food industry. **Engineering**, 6, 2020.
- LINDSAY, D., LAING, S., FOUHY, K. I., SOUHOKA, L., BEAVEN, A. K., SOBOLEVA, T. K., MALAKAR, P.K. Quantifying the uncertainty of transfer of *Cronobacter* spp. between fomites and floors and touch points in dairy processing plants. **Food Microbiology**, 84, 2019.
- LINDSAY, D., KILLINGTON, A., FOUHY, K., LOH, M., MALAKAR, P. The CDC biofilm bioreactor is a suitable method to grow biofilms, and test their sanitiser susceptibilities, in the dairy context. *International Dairy Journal*, 126, 2022.
- LIU, Q., MITTAL, R., EMAMI, C.N., IVERSEN, C., FORD, H.R., PRASADARAO, N.V. Human isolates of *Cronobacter sakazakii* bind efficiently to intestinal epithelial cells in vitro to induce monolayer permeability and apoptosis. **J. Surg. Res.** 176: 437–447, 2012.
- LU, Y., CHEN, X.A., LU, J., MAN C., CHAI, Y. A., JIANG, Y. J. Comparison of methods for the microbiological identification and typing of *Cronobacter* species in infant formula **Journal of Dairy Science**, 97, pp. 632-641, 2024
- MINOR, T., LASHER, A., KLONTZ, K., BROWN, B., NARDINELLI, C., ZORN, D. The per case and total annual costs of foodborne illness in the United States. **Risk Anal.** 35(6): 1125–39, 2015.
- MITTAL, R., BULGHERESI, S., EMAMI, C., PRASADARAO, N.V. *Enterobacter sakazakii* targets DC-SIGN to induce immunosuppressive responses in dendritic cells by modulating MAPKs. **J Immunol**, 183: 6588–6599, 2009
- MOUSAVI, E. K., HUNT, L. KOOLMAN, F. BUTLER, S. Fanning *Cronobacter* species in the built food production environment: A review on persistence, pathogenicity, regulation and detection methods. **Microorganisms**, 11, p. 1379, 2023
- MULLANE, N.R., IVERSEN, C., HEALY, B., WALSH, C., WHYTE, P., WALL, P.G., *et al.* *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. **Minerva Pediatr.**, 59(2):137-48, 2007
- MULLANE, N.R., WHYTE, P., WALL, P.G., QUINN, T., FANNING, S. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterize and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. **Int J Food Microbiol**, 116:73–81, 2008
- MÜLLER, A., STEPHAN, R., FRICKER-FEER, C., LEHNER, A. Genetic diversity of *Cronobacter sakazakii* isolates collected from a Swiss infant formula production facility. **Journal of Food Protection**, 76, 2016.
- NIU, J.T., PAN, R. L., ZHOU, B.B., LOU, X., JIANG, S.Y., ZHAO, F., PENG, C.X., MAN, Y.J. Effects of common disinfectants on the survival of *Cronobacter* spp. on the surfaces of different materials. **Zhongguo Rupin Gongye**, 44, 2016.
- OLIVEIRA, A. C.; MARTINHO, G. H.; DIAS, R. R.; SAVASSI, L. C. M. Investigação de surto por *Enterobacter sakazakii* na Unidade de Neonatologia do HC/UFGM. In: **BIENAL DE EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**, 2., 1999.
- OSAILI, T., SHAKER, R., JARADAT, Z., HARTANTYO, S.H.P., ABDULLAH SANI, N., ESTUNINGSIH, S., FORSYTHE, S.J. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. **Int. J. Food Microbiol.** 136: 185–188, 2009.

- PARRA-FLORES, J., AGUIRRE, J., JUNEJA, V., JACKSON, E. E., CRUZ-CORDOVA, A., SILVA-SANCHEZ, J., FORSYTHE, S. Virulence and antibiotic resistance profiles of *Cronobacter sakazakii* and *Enterobacter* spp. involved in the diarrheic hemorrhagic outbreak in Mexico. **Front. Microbiol.**, 9, 2018.
- PEI, X., LI, Y., ZHANG, H., ZHAN, L., YU, X., LAN, G., MEI, L.. Surveillance and characterisation of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories. **Food Control**, 96, 2019.
- POIMENIDOU, S.V.; DALMASSO, M.; PAPADIMITRIOU, K.; SKANDAMIS, P.N.; JORDAN, K. Virulence Gene Sequencing Highlights Similarities and Differences in Sequences in *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains of Clinical and Food Origin From 3 Different Geographic Locations. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.1103, p.1-15, 2018.
- PubMLST (*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*, 2023). Disponível em: <https://pubmlst.org> Acesso em: 01/06/2023
- RAVAIOLI, S., CAMPOCCIA, D., SPEZIALE, P., PIETROCOLA, G., ZATORSKA, B., MASO, A., PRESTERL, E., MONTANARO, L., ARCIOLA, C. R., Various biofilm matrices of the emerging pathogen *Staphylococcus lugdunensis*: exopolysaccharides, proteins, e DNA and their correlation with biofilm mass). **Biofouling**, 36, pp. 86-100, 2020.
- ROBERTS, T.A., PITT, J.I., CORDIER, J.L., GORRIS, L.G.M., GRAM, L., SWANSON, K.M.J. TOMPKIN, R.B. In: Microbiology of Foods 6: **Microbial Ecology of Food Commodities**; ed.2, Springer-Verlag New York Inc, 2010.
- SANTOS, M., SILVA, C.L.P., SAMPAIO, J., MARANGONI, D.V., PINTO, M., MOREIRA, B.M. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.21, n.2, p. 140, 2000.
- SHAKER, R., JARADAT, Z., HARTANTYO, S.H.P., ABDULLAH SANI, N., ESTUNINGSIH, S., FORSYTHE, S.J. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. **Int. J. Food Microbiol.** 136: 185–188, 2008.
- SHI, L., LIANG, Q., ZHAN, Z., FENG, J., ZHAO, Y., CHEN, Y., *et al.* Co-occurrence of 3 different resistance plasmids in a multi-drug resistant *Cronobacter sakazakii* isolate causing neonatal
- SONBOL, H., HARIRI, S., DESAI, P., MCCLELLAND, M., FORSYTHE, S.J. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol** 50, 3031–3039, 2022.
- SONG, K. G., CHON, J. W., KIM, H., PARK, C., SEO, K. H. Sodium hypochlorite-mediated inactivation of *Cronobacter* spp. biofilms on conveyor belt chips. **Food Science and Biotechnology**, 23, 2014.
- SWEAZEA, K. L., JOHNSTON, C. S. Cardioprotective potential of flaxseeds in diabetes. **Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes**, 2019.
- TORLAK, E., GÖKMEN, M., AYDEMİR, R. Efficacy of disinfectants against *Cronobacter* biofilm on plastic surfaces. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, 7, 2015.
- TOWNSEND, S.M., HURRELL, E., GONZALEZ-GOMEZ, I., LOWE, J., FRYE, J.G., FORSYTHE, S., BADGER, J.L. *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. **Microbiology**, 153: 3538-3547, 2007.
- TOWSEND S.; HURRELL, E.; FORSYTHE, S. Virulence studies of *C. sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. **BMC Microbiology**, v.8, p.64, 2018.
- VOJKOVSKA, H., KARPISKOV A, R., ORIESKOV A, M., DRAHOVSKA, H. Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic, **Int. J. Food Microbiol.**, 217:130–136, 2016.
- WANG, Y., LING, N., JIAO, R., ZHANG, X., REN, Y., LI, H., YE, Y. Transcriptomic analysis reveals novel desiccation tolerance mechanism of *Cronobacter* based on type VI secretion system inhibition. **Food Research International**, 172, 2023.

WILSON, M., MCNAB, R., HENDERSON, B. Bacterial Disease Mechanisms: An Introduction to Cellular Microbiology, **Cambridge University Press**, 2002.

YAN, Q.Q., CONDELL, O., POWER, K., BUTLER, F., TALL, B.D., 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**, 113: 1–15, 2012.

YANG, S.K., KIM, S.Y., CHOI, D.H., YOU, S.C., LEE, W.S., BANG, H.G. Effect of acid, desiccation and heat stresses on the viability of *Cronobacter sakazakii* during rehydration of powdered infant formula and in simulated gastric fluid. **Food Control**, 50, 2022.

YE, Y., GAO, J., JIAO, R., LI, H., WU, Q., ZHANG, J., ZHONG, X. The Membrane Proteins Involved in Virulence of *Cronobacter sakazakii* Virulent G362 and Attenuated L3101 Isolates. **Front. Microbiol.** 6:1238, 2015.

YE, Y., ZHANG, M., JIAO, R., LING, N., ZHANG, X., TONG, L., WU, Q. Inactivation of *Cronobacter malonaticus* cells and inhibition of its biofilm formation exposed to hydrogen peroxide stress. **Journal of Dairy Science**, 101, 2018.

ZHANG, Y., JALAN, N., ZHOU, X., GOSS, E., JONES, J. B., SETUBAL, J. C., DENG, X., WANG, N. Positive selection is the main driving force for evolution of citrus canker-causing *Xanthomonas*. **ISME J.**, 9 (10) 2015.

ZENG, H., LEI, T., HE, W., ZHANG, J., LIAN, G., LI, C., LING, N., DING, Y., WU, S., WANG, J., WU, Q. Novel Multidrug-Resistant *Cronobacter sakazakii* Causing Meningitis in Neonate, China, 2015. **Emerg Infect Dis.**, 24(11): 2121–2124, 2018.

ZHOU, A., CAO, Y., ZHOU, D., HU, S., TAN, W., XIAO, X., LI, X. Global transcriptomic analysis of *Cronobacter sakazakii* CICC 21544 by RNA-seq under inorganic acid and organic acid stresses. **Food Research International**, 130, 2020.

ZHU, S., SCHNELL S., FISCHER, M. Growth inhibition of *Cronobacter* spp. strains in reconstituted powdered infant formula acidified with organic acids supported by natural stomach acidity **Food Microbiol.**, 35, pp. 121-128, 2013.

## ANEXOS

Anexo I – Diagrama do processo de concentração e secagem do soro de leite

