

Avaliação da formação de biofilmes de *Cronobacter sakazakii* em superfícies abióticas pelo método Dry Surface Biofilme (DSB)

Palavras-Chave: *Cronobacter*, Biofilme, alimentos, baixa atividade de água

Autores(as):

MARIA CLARA MACHADO DE CAMPOS, FEA – UNICAMP

VINICIUS SILVA ALEXANDRE VAZ, FEA – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO (Orientadora), FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Embora os alimentos secos nas últimas décadas sejam comumente considerados como alimentos seguros, tem se notado um crescimento de casos de doenças transmitidas por alimentos ligados a alimentos com baixa atividade de água (LMF) em todo o mundo. É importante ressaltar que a baixa atividade de água (a_w) impede o crescimento microbiano, mas proporciona sobrevivência por longos períodos (ACUFF et al., 2023).

Os biofilmes aderidos a superfícies secas (DSB, Dry Surface Biofilm) carregam em sua composição patógenos responsáveis por contaminação ao longo da cadeia de produção, são difíceis de serem detectados e possuem maior resistência a higienização e desinfecção (LEDWOCH et al., 2019).

Cronobacter sakazakii é uma bactéria patogênica que possui tolerância a processos de desidratação e pode sobreviver em superfícies abióticas e em LMF (BALAMURUGAN et al., 2022). Dentre os alimentos, as fórmulas infantis em pó são consideradas o principal veículo de contaminação em surtos envolvendo neonatos (BEUCHAT et al., 2009). A infecção por *Cronobacter* em recém-nascidos é classificada como grave, e dentre os sintomas, a meningite é a mais severa, com taxas de letalidade de 40 a 80% (GAO et al., 2022).

Em 2022, nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) emitiu um comunicado solicitando o recolhimento de um produto infantil em pó com risco de contaminação por *C. sakazakii*, que resultou em quatro hospitalizações e dois óbitos (YAN et al., 2023; FDA, 2022).

No Brasil, foram reportados casos de contaminação por *Cronobacter* no período de 1999 a 2013, sendo que os casos de neonatos se destacaram com maior ocorrência (BRANDÃO et al., 2017). No entanto, apesar da alta letalidade em neonatos, da capacidade de formação de biofilmes e da resistência aos processos de estresse dessecativo, ainda não há trabalhos na literatura sobre a adesão de biofilmes de *Cronobacter* através da técnica DSB.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a formação de biofilmes de *C. sakazakii* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno pelo método de DSB, a fim de entender melhor os mecanismos de adesão e resistência dessa bactéria patogênica.

METODOLOGIA:

Cinco cepas de *C. sakazakii* isoladas de alimentos de baixa a_w foram utilizadas no estudo. Todos os isolados são de origem brasileira e foram doados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz. As cepas foram armazenadas em biofreezer (-80 °C) até o momento do uso. Para a reativação de cada cepa, uma pérola de vidro foi transferida para 5 mL de caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI, Difco, USA), com incubação a 37 °C por 18-20 h. Após este período, as cepas foram estriadas em ágar Trypticase de Soja (TSA, Difco, USA) inclinado e incubadas a 37 °C por 18-20 h.

Para a formação do DSB, foi preparado um *pool* de *C. sakazakii* com população final de 6 log UFC/mL em caldo Trypticase de Soja (TSB, Difco, USA). Após isso, cupons de polipropileno (PP) e aço inoxidável (AI) foram dispostos em placas de 24 poços e, em seguida, foi adicionado 1 mL do inóculo em cada poço. As placas foram incubadas em temperatura ambiente e sob agitação suave em shaker durante a fase úmida. Na fase seca, os poços com inóculo foram drenados e posteriormente incubados em estufa a 25 °C. Para cada tratamento, foi definido um tempo de fase úmida e seca, contendo dois ciclos cada e três repetições independentes (T1 = 48 h fase úmida e 48 h fase seca, T2 = 24 h fase úmida e 72 h fase seca).

Por fim, foram realizadas as quantificações do biofilme, onde os cupons foram retirados das placas e imersos em 10 mL de solução salina (0,85%) por 30 s para retirada de células planctônicas e, posteriormente, imersos em tubos contendo 5 mL de solução salina com pérolas de vidro e agitados por 1 min para remoção de células sésseis cultiváveis (CSC). Em seguida, foi realizado plaqueamento em TSA e a incubação a 37 °C por 24 h (adaptado de ZIECH et al., 2016). Os resultados foram expressos em log de UFC/cm².

Para as contagens de células sésseis viáveis (CSV), 1 mL desta solução salina foi transferido para tubos contendo 1 mL de meio mínimo (caldo M9 sem glicose, SIGMA-ALDRICH, USA) suplementado com 10.000 U de catalase de fígado bovino (SIGMA, USA) e incubado a 37 °C por 6 h para recuperação de células viáveis, mas não cultiváveis (VBNC), adaptado de LEDWOCH et al. (2019). Após cada procedimento, foi realizado plaqueamento em TSA, com incubação a 37 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em log UFC/cm².

Para a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), um cupom de cada tratamento foi imerso em 10 mL de solução salina por 1 min para remoção das células planctônicas. Em seguida, cada cupom foi imerso por 3 h em 2 mL de solução tampão de fosfato 0,1 M suplementada com glutaraldeído

a 2%. Após este período, os cupons foram lavados duas vezes em solução tampão de fosfato 0,1 M e submetidos a desidratação gradual com etanol p.a., seguindo a metodologia de LOU et al. (2013). Os cupons foram transferidos para o secador de ponto crítico (Balzers Union, modelo CPD 030, Liechtenstein) para a remoção completa do álcool com injeção de dióxido de carbono. Posteriormente, os cupons foram revestidos com ouro por 150 s usando o *Sputter Coater* e observados em microscópio eletrônico de varredura (TermoFisher Scientific – Quattro S, República Tcheca).

Os resultados de contagens microbianas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistical Analysis System (SAS v.9.3, Cary, North Carolina, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos de CSC não apresentaram diferenças significativas entre as superfícies de PP para os tratamentos avaliados ($p > 0,05$). Ou seja, o tempo de exposição a fase seca de formação do biofilme resultou em menor CSC. Entretanto, a superfície de AI apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Já as contagens de CSV não apresentaram diferenças significativas entre as superfícies e os tratamentos ($p > 0,05$). A população bacteriana variou de 6,3 a 8,1 log UFC/cm² e de 8,5 a 9,0 log UFC/cm² para CSC e CSV, respectivamente (Figura 1).

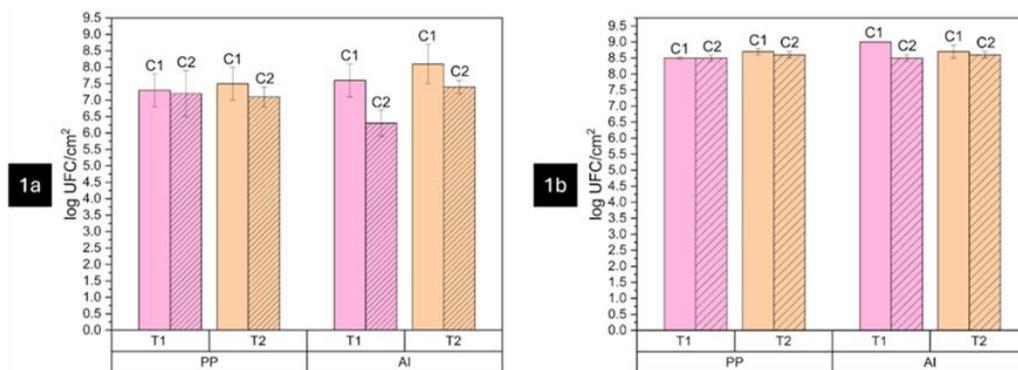


Figura 1 - Contagens de células sésseis cultiváveis (CSC, 1a) e células sésseis viáveis (CSV, 1b) do biofilme de *C. sakazakii* em cupom de AI e PP. T1 = 48 h fase úmida e 48 h fase seca, T2 = 24 h fase úmida e 72 h fase seca. C1 = ciclo 1, C2 = ciclo 2.

Um estudo de CENTELEGHE et al. (2023) investigou a formação de DSB por *Klebsiella pneumoniae* em três estágios de maturação. Inicialmente, a contagem de UFC/mL foi de 5,15 log. Após 4 semanas de incubação, observou-se uma redução para 4,01 log de UFC/mL. Curiosamente, o mesmo biofilme foi submetido a mais 2 semanas de incubação, resultando em uma diminuição adicional de 1,58 log de UFC/mL nas células obtidas.

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura (figura 2), verificou-se a presença de células com alterações morfológicas devido ao estresse dessecativo, como alongamento celular, formatos esféricos, dessecação celular e lise celular, além da presença de matriz de exopolissacarídeo (EPS).

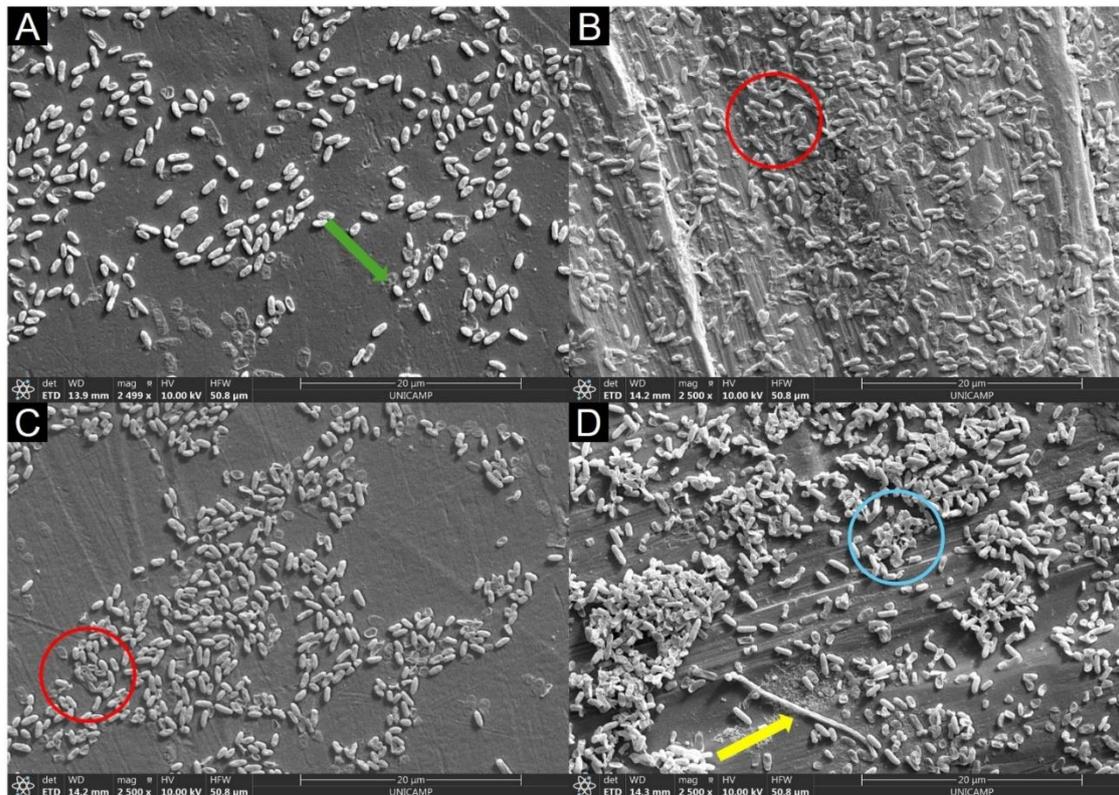


Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura do biofilme seco de *Cronobacter* em cupons de PP: T1(A), T2(C) e AI: T1(B), T2(D). A seta amarela indica alongamento celular, a seta verde indica células em formatos esféricos, os círculos vermelhos indicam células com dessecação e/ou lise celular, e o círculo azul, a formação de EPS.

Assim como observado para *Cronobacter sakazakii*, DUGGAN et al. (2024) relataram alterações morfológicas, como a formação de EPS, células encurtadas e com sinais de injúria em DSB de *Salmonella* Typhimurium.

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos destacam a capacidade de *C. sakazakii* em formar biofilme tanto em polipropileno quanto em aço inoxidável, mesmo quando expostos a condições de estresse dessecativo. Verificou-se também que o estresse dessecativo favoreceu alterações morfológicas nas células, assim como o aumento do número de VBNC, especialmente em superfícies de polipropileno.

BIBLIOGRAFIA

ACUFF, J. C., et al. **Practice and Progress: Updates on Outbreaks, Advances in Research, and Processing Technologies for Low-moisture Food Safety.** Journal of Food Protection, 86(1), 100018. 2023.

AYE, Y. et al. **Effects of culture conditions on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains and distribution of genes involved in biofilm formation.** *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 1–6. 2015.

BALAMURUGAN, S. et al. **Modeling the UV-C Inactivation Kinetics and Determination of Fluence Required for Incremental Inactivation of *Cronobacter* spp.** *Journal of Food Protection*, 85(11), 1625–1634. 2022.

BEUCHAT, L. R. et al. ***Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation.** *International Journal of Food Microbiology*, 136(2), 204–213. 2009.

BRANDÃO, M. L. L. et al. ***Cronobacter* spp.: infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil.** *Brazilian Journal of Food Technology*, 21. 2017.

CENTELEGHE, I. et al. ***Klebsiella pneumoniae* survives on surfaces as a dry biofilm.** *American Journal of Infection Control*, 51(10), 1157–1162. 2023.

DUGGAN, K. et al. **Susceptibility of *Salmonella enterica* Typhimurium dry surface biofilms to disinfection.** *Journal of Food Safety*, 44(2), e13117. 2024.

FDA. **Investigation of *Cronobacter* Infections in Powdered Infant Fórmula** (February 2022). Disponível em: FDA Investigation - *Cronobacter* Infections. Acesso em: 27 de julho de 2024.

GAO, Z. et al. **Evaluation of Potential for Butyl and Heptyl Para-Hydroxybenzoate Enhancement of Thermal Inactivation of *Cronobacter sakazakii* during Rehydration of Powdered Infant Formula and Nonfat Dry Milk.** *Journal of Food Protection*, 85(8), 1133–1141. 2022.

LEDWOCH, K. et al. **Artificial dry surface biofilm models for testing the efficacy of cleaning and disinfection.** *Letters in Applied Microbiology*, 68(4), 329–336. 2019.

LOU, Z. et al. **Separation and enrichment of burdock leaf components and their inhibition activity on biofilm formation of *E. coli*.** *Food Control*. 32. 270–274. 2013.

YAN, P. et al. **Biocontrol and anti-biofilm potential of aerosols sprayed slightly acidic electrolyzed water against *Cronobacter sakazakii* in infant food industry.** *LWT*, 178,114598. 2023.

ZIECH, R. et al. **Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. Isolated from Brazilian poultry processing plants.** *LWT - Food Science and Technology*. 68. 2016.