PERSISTÊNCIA DE *CRONOBACTER SAKAZAKII* EM FRUTAS SECAS

Palavras-Chave: *C. sakazakii*, frutas secas, sobrevivência, pH, atividade de água.

Autoras:

Emily Ferreira da Cruz, FEA – UNICAMP

Ma. Carine da Fonseca Cechin, FEA – UNICAMP

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki, FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO

Cronobacter spp. são bactérias oportunistas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, incluindo sete espécies, das quais *C. sakazakii* é a mais associada às infecções. Este patógeno pode causar doenças graves em neonatos, como enterocolite necrosante, septicemia e meningite, e também infecções em adultos (Parte et al., 2020; Jang et al., 2021).

O alimento que deu origem ao interesse por *Cronobacter* spp. foi a fórmula infantil em pó, associada a casos de infecção neonatal (Farmer, 2015; FAO/OMS, 2006). No entanto, a bactéria também já foi isolada de diversos alimentos, como cereais, vegetais, frutas, ervas, carnes e alimentos prontos para o consumo (Zeng et al., 2020; Cechin, 2022). Entre eles, os alimentos secos são particularmente relevantes, pois *Cronobacter* spp. podem persistir neles por longos períodos, como demonstrado em fórmulas infantis em pó a sobrevivência de *C. sakazakii* por até dois anos (Forsythe, 2018), evidenciando sua notável resistência a ambientes extremos (Osaili et al., 2009).

Os alimentos de baixa umidade (LMF, do inglês *low moisture foods*) são definidos como aqueles com Aw $\leq$ 0,85 e incluem produtos naturalmente secos ou desidratados (FAO/WHO, 2022). *Cronobacter* spp. já foram isoladas de LMF como especiarias, farinhas, aveia e linhaça (Brandão et al., 2017; Silva et al., 2019), mas estudos relataram ausência do patógeno em frutas secas (Berthold-Pluta et al., 2021, Cechin, 2022), o que pode estar relacionado a outros fatores como o pH desse alimento. O pH influencia diretamente na multiplicação microbiana. Embora valores baixos de pH inibam a maioria dos micro-organismos, *Cronobacter spp.* apresentam tolerância à acidez, podendo sobreviver em ambientes com pH próximo de 4,5, dependendo da cepa e do tipo de ácido presente (Alvarez-Ordóñez et al., 2012; Zhu et al., 2013). Essa adaptação pode explicar sua presença em alguns alimentos com pH ácido.

Frutas secas apresentam Aw entre 0,60 e 0,85 (Celestino, 2010) e pH inferior a 4,5 (Witthuhn et al., 2005), o que pode explicar a ausência de *Cronobacter* spp. nesses produtos. Estudos mostram que a bactéria foi capaz de sobreviver em frutas frescas como maçã, pera e melão, com pH entre 4,83 e 5,84 (Santo et al., 2016). Com isso, o objetivo desse estudo foi investigar a capacidade de sobrevivência de *C. sakazakii* em alimentos com baixa Aw e baixo pH, a fim de elucidar a ausência deste patógeno em determinados tipos de produtos.

METODOLOGIA

Cepas de *Cronobacter sakazakii* e preparação do inóculo

Foram utilizadas cinco cepas de *Cronobacter sakazakii* (C10, C84, C112, C116 e C152) previamente isoladas de alimentos de baixa atividade de água (granola, semente de chia e semente de linhaça) no Brasil. A cepas foram caracterizadas geneticamente através da técnica de *multilocus sequencing typing* (MLST), e apresentavam diferentes tipos de sequência (Cechin et al., 2022). As cepas foram cultivadas em caldo triptona de soja (TSB) a 37° C por 24 horas. Para o preparo do inóculo, as culturas foram centrifugadas individualmente a 10.000 × g por 15 minutos, e as células foram ressuspendidas em tampão fosfato salina (PBS) e padronizadas na escala 0,5 de McFarland. Concentrações de aproximadamente 10^8 UFC/mL foram utilizadas para inoculação nos experimentos. A concentração do inóculo foi confirmada por contagem em placas em ágar triptona de soja (TSA) incubadas a 37° C por 24h.

Preparo e inoculação das amostras de frutas secas

Neste estudo foram utilizadas amostras de uvas passas e damascos adquiridas no comércio de Campinas, São Paulo. As amostras de frutas secas foram pesadas em frascos de vidro, sendo utilizadas 10 g de uva passa e entre 6 a 11 g de damasco, de acordo com o tamanho das unidades Em seguida os frascos contendo as amostras foram submetidas à esterilização em autoclave a 121° C por 15 minutos. Após a esterilização, as amostras foram secas em estufa a 55° C por aproximadamente 20 horas para remoção da umidade. Quando atingiram a temperatura ambiente, as amostras foram inoculadas com 1 mL da suspensão bacteriana e mantidas em fluxo laminar por 3 a 4 horas para absorção do inóculo. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a 25° C, para a avaliação da sobrevivência das cepas. Os valores de pH e atividade de água das amostras foram determinados no início de cada experimento, após esterilização, secagem e adição de PBS nas amostras, utilizando-se um pHmetro digital Tecnal TEC-5 e o equipamento Aqualab VSA, respectivamente.

Avaliação da sobrevivência de *C. sakazakii*

A quantificação de *C. sakazakii* nas amostras foi realizada através da técnica de contagem na superfície de placas com TSA incubadas a 37° C por 24 h nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 e 12 dias após a inoculação para as amostras de damasco, e até o tempo 10 dias para as amostras de uva passa. A sobrevivência foi avaliada a partir do momento em que não houve mais contagem de células viáveis em placas. Para verificar as sobrevivências, as amostras foram pré-enriquecidas em 90 mL de água peptonada tamponada (BPW) e incubadas a 37° C por 24 a 48 horas. Em seguida, foram estriadas em TSA e incubadas a 37° C por 24 h para verificar a presença ou ausência de *C. sakazakii*.

Análise estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata, com cada tempo de análise contendo duas amostras, totalizando seis repetições em cada tempo de estudo. Os dados obtidos foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) para dados contendo distribuição normal, e teste de Kruskal Wallis para dados que não apresentaram distribuição normal, utilizando o software R (R Core Team, 2019).

RESULTADOS

Os parâmetros de pH e Aw das amostras foram mensurados em cada replicata de experimento. O pH das amostras de uva passa foi de 4,06 ± 0,08 e das amostras de damasco de 4,32 ± 0,13. A atividade de água das amostras de uva passa foi de 0,63 ± 0,04 e das amostras de damasco de 0,69 ± 0,03.

As análises microbiológicas das cepas C10, C84, C112, C116 e C152 mostraram variações na contagem e na sobrevivência ao longo do tempo nas amostras de uva passa e damasco. Por isso, os resultados foram organizados separadamente para cada fruta. A Figura 1 apresenta os dados de sobrevivência das cepas ao longo do tempo de estudo nas amostras de uva passa. Os resultados da sobrevivência das cepas nas amostras de damasco estão apresentados na Figura 2. As análises estatísticas não evidenciaram diferença significativa ($p > 0,05$) na sobrevivência entre as cepas ao longo do tempo nas amostras de uva passa e damasco .

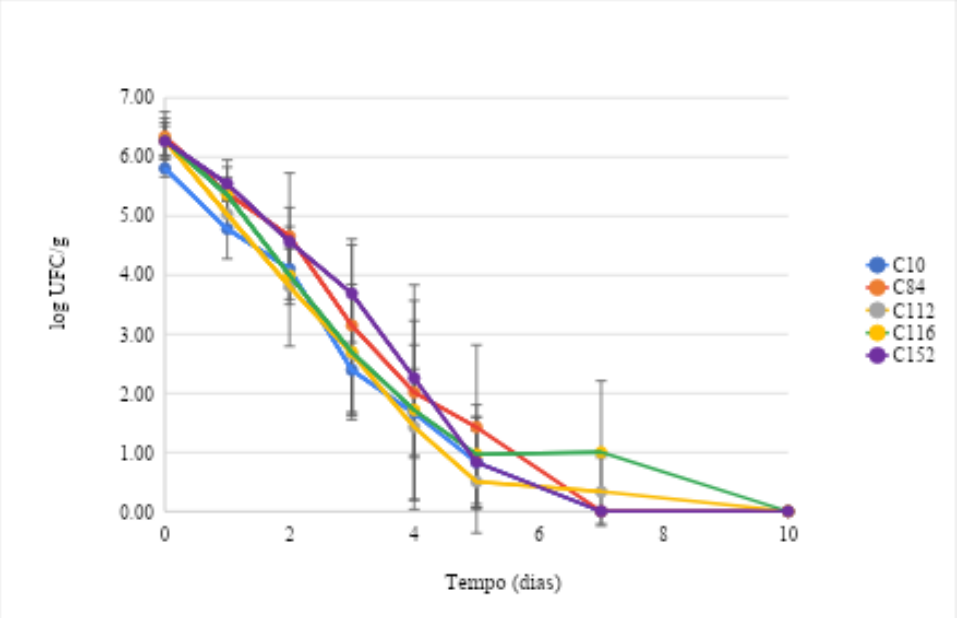

Figura 1. Comportamento da sobrevivência de cepas de *Cronobacter sakazakii* ao longo de 10 dias em amostras de uva passa. As barras indicam o desvio padrão entre as replicatas. O limite mínimo de contagem do método foi 2 log UFC/g. Valores entre 1 e 2 log UFC/g indicam que houve contagem acima do limite do método em pelo menos uma replicata. Valores menores que 1 log UFC/g mas maiores que 0 log UFC/g indicam que *C. sakazakii* foi recuperada em pelo menos uma replicata.

O comportamento das cepas durante a estocagem a 25º C foi similar nas duas frutas avaliadas, com redução na quantidade de sobreviventes ao longo do tempo. No entanto, as cepas inoculadas no damasco apresentaram maior tempo de sobrevivência em comparação com as das uvas passas, mesmo quando a contagem inicial do inóculo ou do tempo zero (T0) era maior nas uvas. Observou-se que a bactéria permaneceu viável até o 7º dia em algumas cepas nas uvas passas e até o 10º dia em algumas cepas nas amostras de damasco, o que sugere que determinadas cepas podem apresentar maior resistência às condições adversas desses alimentos. Esse comportamento pode estar associado ao ambiente menos ácido e maior aw no damasco, contribuindo para persistência de *C. sakazakii*. Além disso, pequenas variações de aw entre as triplicatas podem ter influenciado na sobrevivência das cepas.

Os estudos anteriores demonstram que *C. sakazakii* é capaz de sobreviver por longos períodos em alimentos secos e com baixa atividade de água. Gurtler e Beuchat (2007) mostraram que este

patógeno permaneceu viável por pelo menos 3 meses em fórmulas infantis com atividade de água (Aw) entre 0,25 e 0,50. Com relação ao pH, Fakruddin et al. (2014) observaram que, embora a bactéria não cresça em pH 2,5, ela sobrevive em pH 3,9, apresentando queda progressiva na quantidade celular com o aumento da acidez. Esses dados indicam que os parâmetros de Aw e pH do damasco foram potencialmente mais favoráveis à persistência das cepas, em comparação à uva passa.

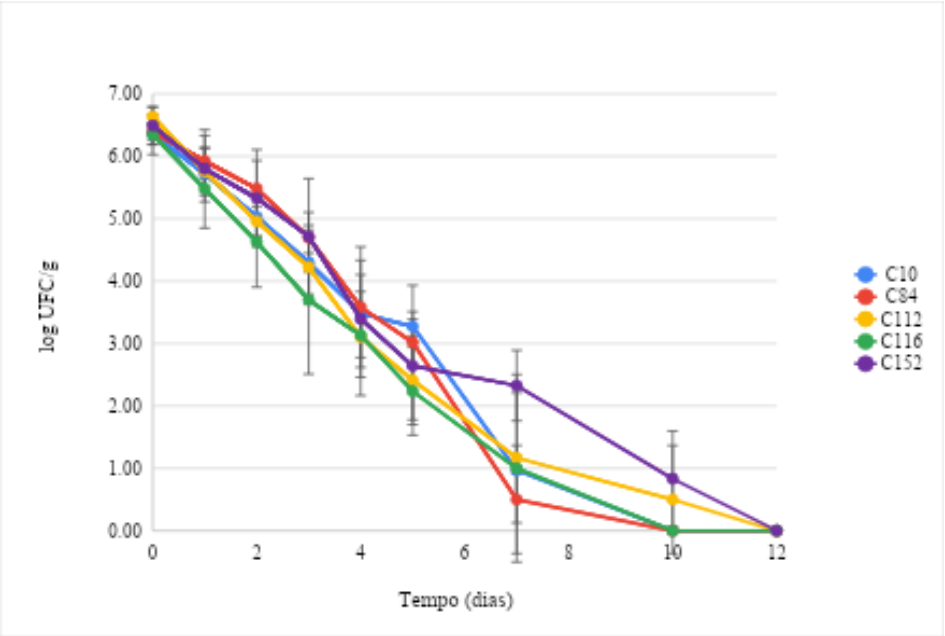

Figura 2. Comportamento da sobrevivência de cepas de *Cronobacter sakazakii* ao longo de 12 dias em amostras de damasco. As barras indicam o desvio padrão entre as replicatas. O limite mínimo de contagem do método foi 2 log UFC/g. Valores entre 1 e 2 log UFC/g indicam que houve contagem acima do limite do método em pelo menos uma replicata. Valores menores que 1 log UFC/g mas maiores que 0 log UFC/g indicam que *C. sakazakii* foi recuperada em pelo menos uma replicata.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que *Cronobacter sakazakii* foi capaz de sobreviver por até dez dias em frutas secas com baixa atividade de água e pH ácido, com maior tempo de sobrevivência observado nas amostras de damasco. O pH menos ácido e pequenas variações de aw podem ter favorecido a persistência do patógeno nesse alimento. Esses resultados indicam que frutas desidratadas podem permitir a sobrevivência de cepas de *C. sakazakii*, ressaltando a importância do monitoramento microbiológico nesses produtos.

BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; BEGLEY, M., HILL, C. Polymorphisms in *rpo*S and stress tolerance heterogeneity in natural isolates of *Cronobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 3975–3984, 2012. DOI: 10.1128/AEM.07835-11.

BERTHOLD-PLUTA, A.; GARBOWSKA, M.; STEFAŃSKA, I.; STASIAK-RÓŻAŃSKA, L.; STASIAK-RÓŻAŃSKA, L.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; PLUTA, A. Microbiological quality of nuts, dried and candied fruits, including the prevalence of *Cronobacter* spp. **Pathogens**, v. 10, n. 7, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens10070900.

BRANDÃO, M. L. L.; UMEDA, N. S.; JACKSON, E.; FORSYTHE, S. J.; FILIPPIS, I. Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. **Food Microbiology**, v. 63, p.

129-138. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.011.

CECHIN, C. F. *Cronobacter* spp. em alimentos de baixa atividade de água: detecção, caracterização genética e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2022.

CELESTINO, S. M. C. Embrapa, Princípios de secagem de alimentos, 2010. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77765/1/doc-276.pdf.

FAKRUDDIN, M.; RAHAMAN, M.; AHMED, M. M.; HOQUE, M. M. Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. Biological Research, v. 47, art. 63, 25 nov. 2014. https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-63.

FAO - Food and Agricultural Organization-World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. In: **Microbiological Risk Assessment Series 10**. Rome, 2006. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9241563311.

FAO/WHO. Ranking of low moisture foods in support of microbiological risk management: meeting report and systematic review. **Microbiological Risk Assessment Series No. 26**. Rome, 2022. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240044036.

FARMER, J. J III. My 40-year history with *Cronobacter*/*Enterobacter sakazakii* – lessons learned, myths debunked, and recommendations. **Frontiers in Pediatrics**, v. 3, n. 84, 2015. DOI: 10.3389/fped.2015.00084.

FORSYTHE, S.J. Updates on the *Cronobacter* genus. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 23–44, 2018. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012246.

GURTLER, J. B.; BEUCHAT, L. R. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1579–1586, 2007. DOI: https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.7.1579.

JANG, H.; GOPINATH, G.; NEGRETE, F.; WEINSTEIN, L.; LEHNER, A.; FANNING, S.; TALL, B. D. *Cronobacter* species. **In Foodborne infections and intoxications**, p. 265–283, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00009-8.

OSAILI, T.; FORSYTHE, S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula**. International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 2, p. 214–220, 2009. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006.

PARTE, A.C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; REIMER, L.C.; GÖKER, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 70, p. 5607-5612, 2020. DOI: https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332.

SANTO, D.; GRAÇA, A.; NUNES, C.; QUINTAS, C. Survival and growth of *Cronobacter sakazakii* on fresh-cut fruit and the effect of UV-C illumination and electrolyzed water in the reduction of its population. **International Journal of Food Microbiology**, v. 231, p. 10–15, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.023.

SILVA, J. N.; VASCONCELLOS, L.; FORSYTHE, S. J.; FILIPPIS, I.; BRANDÃO, M. L. L. Molecular and phenotypical characterization of *Cronobacter* species isolated with high occurrence from oats and linseeds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 1, 2019. DOI: https://doi.org/10.1093/femsle/fny289.

WITTHUHN, R.C.; ENGELBRECHT, S.; JOUBERT, E.; BRITZ, T.J. Microbial content of commercial South African high-moisture dried fruits. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 722–726, 2005. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02500.x.

ZENG, H.; LI, C.; LING, N.; ZHANG, J.; CHEN, M.; LEI, T.; WU, S.; YANG, X.; LUO, D.; DING, Y.; WANG, J.; ZHANG, S.; WU, Q. Prevalence, genetic analysis and CRISPR typing of *Cronobacter* spp. isolated from meat and meat products in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 321, 108549, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108549.

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 Microbiology.** v. 35, p. 121–128, 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.005.