

Deteção de *Cronobacter* spp. Através do Sistema Innovate™ e o Kit Láctico RapiScreen™

Introdução

As espécies de *Cronobacter* são bactérias gram-negativas que se encontram naturalmente no ambiente. As *Cronobacter* podem sobreviver em alimentos secos, como fórmula infantil em pó, leite em pó, chás de ervas e amidos, mesmo ao longo de todo o processo de desidratação. Também são conhecidas por causarem infeções graves e frequentemente com risco de vida em bebés.

Para minimizar o risco, é vital testar se o produto final tem contaminação por micro-organismos. O Sistema de Deteção Microbiana Rápida Innovate™ foi concebido para a rápida deteção de micro-organismos numa série de produtos, incluindo leite e fórmula para bebés. Para detetar níveis muito baixos de contaminantes nesses tipos de produtos, é necessária uma etapa de enriquecimento para garantir que há ATP suficiente presente para deteção. Normalmente, um produto é incubado na sua própria embalagem para enriquecer o ATP de qualquer célula microbiana contaminante. São usadas referências pré-estabelecidas obtidas a partir de produtos não contaminados para determinar resultados positivos.

Objetivo

O objetivo deste estudo é validar o Sistema Innovate, utilizando o Kit Láctico RapiScreen para a deteção de *Cronobacter muytjensii* e *Cronobacter sakazakii* em vários produtos de leite de aveia para demonstrar equivalência às técnicas tradicionais de placas.

Equipamento, Materiais e Reagentes

- Ansas de inoculação estéreis
- Pipetas e pontas estéreis
- Incubadoras com capacidade para 30 ou 35 ± 2 °C
- Toalhas de álcool
- Kit Láctico RapiScreen (inclui reagentes, polipropileno (PP) frascos, placas de microtitulação)
- Ágar Dextrose de Batata (PDA, na sigla em inglês)
- Placas de Ágar Triptona de Soja (TSA, em inglês)
- Caldo Triptona de Soja (TSB, em inglês)
- Medidor de pH e elétrodos (i.e., sensores Mettler-Toledo InLab®)
- Sistema de Bolsa de Geração de Gás Anaeróbio com Indicador Pak™ EZ
- Seringas, 1 mL e 3 mL
- Tampão Fosfato-salino Dulbecco - DPBS (sigla em inglês) (1X)
- Cola para Calçado, Reparação Transparente para Calçado e Revestimento Protetor
- Agulhas Precision Glide, 16 medida 1 ½"
- Controlo positivo de ATP
- Instrumento Sistema Innovate

Organismos e Produtos do Teste

- Micro-organismos
 - *Cronobacter muytjensii*, ATCC # 51329
 - *Cronobacter sakazakii*, ATCC# 29544
- Tipos de produtos lácteos testados
 - Leite Achocolatado ESL
 - Leite Magro ESL
 - Leite Original ESL
 - Leite para Espuma UHT
 - Leite Achocolatado UHT
 - Leite Original UHT



Métodos

As culturas de *Cronobacter* foram preparadas com a reidratação dos grânulos ATCC, dispondo-os em riscado nas placas de TSA e cultivando por 24 horas à temperatura apropriada (30 ± 1 °C e 35 ± 1 °C, respetivamente, para *C. muytjensii* e *C. sakazakii*). Foram selecionadas as colónias e uma série de diluições de 10 vezes foram preparadas em DPBS, e as contagens de placas foram preparadas para identificar uma concentração <100 UFC.

Para determinar os níveis de referência de ATP, cada produto lácteo foi inicialmente incubado por 48 horas a 32 °C. As amostras foram misturadas e 25 mL de cada produto foram transferidos para um recipiente estéril para teste. Foram realizados testes de pH de luminância de fundo/base de referência através do Kit Láctico RapiScreen.

Uma vez estabelecidas referências e preparadas culturas, cada tipo de produto foi inoculado em triplicado a <100 UFC por recipiente (Níveis elevados de concentrações também foram inoculados para comparação). Os micro-organismos foram introduzidos com uma seringa através da parte superior do recipiente e vedados com Cola para Calçado. Um recipiente não inoculado foi incubado com cada conjunto inoculado para controlo negativo. Foram estabelecidos controlos positivos meio da inoculação do caldo triptona de soja. Foram incubadas amostras de *C. muytjensii* a 30 ± 1 °C com amostras de *C. sakazakii* a 35 ± 1 °C por um período total de dois dias. Tanto no dia 1 como no dia 2, foram retiradas alíquotas de cada recipiente e testadas no Sistema Innovate através do Kit Láctico RapiScreen. Paralelamente, 10 µL de cada amostra de produto foram inoculados em placas de TSA e incubados durante 24 horas para confirmação de crescimento e morfologia.

Resultados

Em todos os tipos de leite testados, detetou-se o crescimento de níveis altos e baixos de concentrações em ambas as espécies de *Cronobacter* após 24 horas de incubação através do Sistema Innovate e do Kit Láctico RapiScreen (Tabelas 1 e 2). Os valores típicos de RLU caíram entre 40 000 e 175 000, demonstrando um crescimento robusto e produção de ATP, mesmo quando a concentração foi de <100 UFC. Os controlos não inoculados apresentaram valores de referência de entre 6 e 25 UFC, típicos para produtos UHT e ESL adequadamente processados.

Em contraste, a deteção de *Cronobacter* em placas não foi observada até após 48 horas de incubação. Confirmou-se que todas as amostras positivas do Sistema Innovate cresceram por meio de placa de cultura, mesmo aquelas com baixos níveis de concentração (<100 UFC). Até mesmo culturas com concentração elevada não foram confirmadas até às 48 horas. Este método padrão não confirmou a contaminação às 24 horas em nenhum tipo de amostra – embora o Sistema Innovate e o Kit Láctico RapiScreen o fizessem.



Tabela 1. Detecção de *Cronobacter muytjensii* em Vários Tipos de Produtos de Leite de Aveia

Detecção <i>C. muytjensii</i> (horas)				
Tipo de Produto	Sistema Innovate		Placas	
	Concentração Alta de UFC	Concentração Baixa de UFC	Concentração Alta de UFC	Concentração Baixa de UFC
ESL Original	24 h	24 h	48 h	48 h
UHT Original	24 h	24 h	48 h	48 h
Achocolatado ESL	ND	24 h	ND	48 h
ESL Magro	ND	24 h	ND	48 h
Leite para Espuma UHT	ND	24 h	ND	48 h
Achocolatado UHT	ND	24 h	ND	48 h
Não inoculado	-	-	-	-

Tabela 2. Detecção de *Cronobacter sakazakii* em Vários Tipos de Produtos de Leite de Aveia

Detecção <i>C. sakazakii</i> (horas)				
Tipo de Produto	Sistema Innovate		Placas	
	Concentração Alta de UFC	Concentração Baixa de UFC	Concentração Alta de UFC	Concentração Baixa de UFC
ESL Original	24 h	24 h	48 h	48 h
UHT Original	24 h	24 h	48 h	48 h
Achocolatado ESL	ND	24 h	ND	48 h
ESL Magro	ND	24 h	ND	48 h
Leite para Espuma UHT	ND	24 h	ND	48 h
Achocolatado UHT	ND	24 h	ND	48 h
Não inoculado	-	-	-	-

Conclusões:

Conforme se mostra nas tabelas acima (Tabelas 1 e 2), o Sistema Innovate detetou tanto *C. muytjensii* quanto *C. sakazakii* após 24 h de incubação em todos os produtos inoculados com os organismos. Quanto ao método tradicional de plaqueamento, foram obtidos resultados positivos após 48 h para todas as amostras testadas.

Os resultados para o crescimento no dia 3 e depois não foram concluídos devido ao crescimento excessivo de ambos os organismos em todos os produtos. No dia 2, todos os recipientes de produtos estavam inchados. Por causa disto, os recipientes foram descartados após o dia 2 para evitar que os produtos rebentassem dentro da incubadora. Da mesma forma, apenas as concentrações baixas para os achocolatados ESL, ESL Magro, Espuma de leite UHT e Leite Achocolatado UHT foram testados, devido ao rápido crescimento de ambos os organismos em todos os produtos de leite de aveia.



Sumário

O processamento asséptico de produtos de leite de aveia pode ajudar a reduzir o risco de contaminação microbiana dos produtos. Isto é claramente mostrado nos baixos valores de referência para deteção de ATP em amostras não inoculadas. Além disso, a contaminação de *Cronobacter* em níveis baixos (<100 UFC por recipiente) pode ser detetada em 24 horas através do Sistema Innovate e o Kit Láctico RapiScreen. Isto foi 24 horas mais rápido do que a deteção com métodos padrão de plaqueamento, verificando que o Sistema Innovate de Deteção Microbiana Rápida superou o método de referência quando usado para deteção de *Cronobacter*.

Com base nestes resultados, a Hygiena[®] recomenda o uso do Sistema Innovate para a deteção de baixos níveis de espécies de *Cronobacter* em produtos lácteos UHT e ESL.