

Detecção de *Cronobacter sakazakii* em Bebidas à Base de Soja através do Sistema Innovate™ e o Kit Láctico RapiScreen™

Introdução

Cronobacter sakazakii é uma bactéria coliforme em forma de báculo, com motilidade, gram-negativa, não formadora de esporos, da família *Enterobacteriaceae*, género *Cronobacter*. Tem estado implicada em surtos de doença neonatal (bebés prematuros), em casos isolados de indivíduos gravemente imunocomprometidos e em idosos, mas raramente causa doença em adultos saudáveis. 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.

Para minimizar o risco, é vital testar se o produto final tem contaminação por micro-organismos. O Sistema de Detecção Microbiana Rápida Innovate™ foi concebido para a rápida detecção 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 detecção. 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 detecção de *Cronobacter sakazakii* em vários produtos de bebida proteica à base de soja para demonstrar equivalência às técnicas tradicionais de placas.

Equipamento, Materiais e Reagentes

- Ansas de inoculação estéreis
- Pipetas e pontas estéreis
- Incubadoras com capacidade para 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®)
- 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 sakazakii*, ATCC# 29544
- Tipos de produtos lácteos testados
 - Bebida proteica completa à base de soja, chocolate
 - Bebida proteica completa à base de soja, chocolate
 - Batido UHT à base de soja, chocolate
 - Batido UHT à base de soja, baunilha



Métodos

1. Culturas

As culturas de *Cronobacter sakazakii* foram preparadas através do plaqueamento de organismo liofilizado em placas TSA. As culturas foram preparadas em TSB e cultivadas por 24 horas a 35 ± 1 °C. Um conjunto de diluição em série de dez vezes foi então feito através de DPBS, e foram preparadas contagens de placas em placas TSA para encontrar uma concentração <100 UFC. O inóculo real para o organismo utilizado durante a inserção da amostra foi determinado com o seu plaqueamento em duplicados em placas TSA. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C e contadas após 24 horas.

2. Avaliações de pH

Os produtos cujo pH foi avaliado foram medidos em triplicado, para garantir a precisão das medições. O medidor de pH utilizado para a medição dos produtos foi calibrado antes do uso. Isto demonstrou que não era necessário realizar testes adicionais para confirmar que o Kit Láctico RapiScreen era capaz de neutralizar suficientemente os produtos.

3. Determinação de Luminância de Fundo e de Base de Referência de RLU

Para determinar os níveis de referência de ATP, cada produto foi inicialmente incubado por 24 horas a 37 °C. As amostras foram totalmente misturadas e 20 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.

O nível de luminância de fundo de ATP de cada produto foi determinado pela execução de uma análise utilizando solução tampão ATX em vez do reagente ATX reconstituído. A análise foi então repetida através de ATX reconstituído para permitir a remoção do sinal de ATP da luminância de fundo. Estes resultados são referidos como os valores RLU de Referência. Os valores RLU de Referência devem ser baixos e consistentes, demonstrando que o sinal RLU de luminância de fundo desapareceu totalmente. Um valor de RLU de referência estável permite definir um limiar (positivo/negativo) de valor de corte para identificar amostras contaminadas.

- Protocolo de Referência: Dispensar 60 µL ATX – Batido 10 min – Siga as instruções do RapiScreen Láctico para deteção
- Protocolo de Luminância de Fundo: Dispensar 60 µL tampão ATX – batido 10 - - Siga as instruções do RapiScreen Láctico para deteção

Uma vez estabelecidas linhas de referência e preparadas culturas, cada tipo de produto foi inoculado em duplicado a <100 UFC por recipiente. 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. Os controlos positivos foram estabelecidos por meio da inoculação de TSB ou DPBS com 100 µl da cultura <100 UFC.

As amostras foram incubadas a 35 ± 2 °C por até sete dias. Nos dias 1 a 7, foram retiradas alíquotas de cada recipiente e testadas no Sistema Innovate através do Kit Láctico RapiScreen. Paralelamente, em cada dia, 10 µL de cada amostra de produto foram inoculados em placas de TSA e incubados durante 24 horas a 35 ± 2 °C para crescimento e confirmação de morfologia.

Resultados

Em todos os tipos de bebidas testadas, o crescimento de baixos níveis de concentração de *Cronobacter sakazakii* foi detetado após 24 horas de incubação através do Sistema Innovate e o Kit Láctico RapiScreen (Tabela 1). Os valores de RLU variaram de 1600 até mais de 81 000, demonstrando um crescimento robusto e produção de ATP, mesmo com concentração <100 UFC. Não foram obtidos dados após o dia 3 em nenhum dos quatro produtos inoculados devido a fuga do produto, resultado da formação excessiva de gás. Todos os resultados

positivos sobre o Sistema Innovate foram confirmados através da disposição em riscado de produtos em TSA. Os controlos não inoculados apresentavam valores de referência de entre 3 e 14 UFC, típicos para produtos UHT adequadamente processados.

Tabela 1. Detecção de *Cronobacter sakazakii* em Vários Produtos de Bebida à Base de Soja

*Fuga – A produção de gás do organismo fez com que o recipiente do produto rebentasse ou ficasse com uma fuga.

Luminância de Fundo do Produto: Não se aplica		Base de Referência do Produto: Não se aplica		Limite: Não se aplica						
<i>C. sakazakii</i>	Inoculação Alvo	Inoculação Real	Confirmação Resultado de Placa	Dias: Valor RLU (Média)						
	N.º Célula UFC	N.º Célula UFC		1	2	3	4	5	6	7
Chocolate à Base de Soja (SBC, na sigla em inglês)	<100	90	Crescimento	4379	2861	1601	Fuga*	Fuga	Fuga	Fuga
Baunilha à Base de Soja (SBV na sigla em inglês)	<100	90	Crescimento	32 269	45 726	8208	Fuga	Fuga	Fuga	Fuga
Achocolatado UHT (UC)	<100	90	Crescimento	31 496	31 367	Fuga	Fuga	Fuga	Fuga	Fuga
Baunilha UHT (UV)	<100	90	Crescimento	65 270	81 627	5553	Fuga	Fuga	Fuga	Fuga
Painel em Branco	Inoculação Alvo	Inoculação Real	Confirmação Resultado de Placa	1	2	3	4	5	6	7
<i>Controlo Negativo SBC: 35 °C</i>	0	0	Negativo	5	4	4	4	6	4	5
<i>Controlo Negativo SBV: 35 °C</i>	0	0	Negativo	13	11	10	12	12	14	14
<i>Controlo negativo UC: 35 °C</i>	0	0	Negativo	5	5	3	5	6	4	4
<i>Controlo Negativo UV: 35 °C</i>	0	0	Negativo	12	10	9	8	12	11	11

Conclusões:

Como se mostra na tabela acima (Tabela 1), a *C. sakazakii* foi detetada através do Sistema Innovate e do Kit Láctico RapiScreen após 24 h de incubação em todos os produtos com inoculados. Quanto ao método tradicional de plaqueamento, foram obtidos resultados positivos para todas as amostras testadas, com a morfologia esperada.

Os resultados para o crescimento no dia 4 e depois não foram concluídos devido ao crescimento excessivo de ambos os organismos em todos os produtos. No dia 3, todos os recipientes de produtos ficaram inchados e, no dia 4, houve fuga causada pela produção excessiva de gás, indicativa de crescimento do organismo.



Sumário

O processamento asséptico de produtos de bebida à base de soja 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 sakazakii* em níveis baixos (<100 UFC por recipiente) pode ser detetada em 24 horas através do Sistema Innovate e o Kit Láctico RapiScreen. Na verdade, foram detetados valores de RLU muito elevados de *C. sakazakii* em Chocolate de Proteína Completa à Base de Soja, Baunilha à Base de Soja, Baunilha UHT e Chocolate UHT, validando assim que o Sistema Innovate seria uma ferramenta útil na deteção de *C. sakazakii* em todos estes tipos de produtos.

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