



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Rosana Francisco Siqueira dos Santos
Bacharel em Ciências Biológicas**

**“Avaliação de diferentes *métodos para detecção de
Cronobacter spp (Enterobacter sakazakii)* em alimentos”**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Doutora em Ciências de Alimentos.

**Dr. José Luiz Pereira
Orientador**

**Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
Co-orientadora**

Este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado
defendida por Rosana Francisco Siqueira dos Santos, aprovada
pela comissão julgadora em 29/08/2011 e orientada pelo Dr.
José Luiz Pereira

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Santos, Rosana Francisco Siqueira
Sa59a Avaliação de diferentes métodos para detecção de
Cronobacter spp (Enterobacter sakazakii) em alimentos /
Rosana Francisco Siqueira Santos. -- Campinas, SP: [s.n],
2011.

Orientador: José Luiz Pereira.
Coorientador: Valéria Christina Amstalden Junqueira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Enterobacter sakazakii. 2. Fórmula infantil. 3.
Detecção. I. Pereira, José Luiz. II. Junqueira, Valéria
Christina Amstalden. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. VI.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of different methods for determination of
Cronobacter spp (Enterobacter sakazakii) in foods

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Enterobacter sakazakii

Infant formula

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

José Luiz Pereira [Orientador]

Dirce Yorika Kabuki

Luciana Maria Ramires Esper

Karen Signori Pereira

Neliane Ferraz de Arruda Silveira

Data da defesa: 29/08/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Luiz Pereira

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos-DCA

Dra. Dirce Yorika Kabuki

Membro

Faculdade de Engenharia de Alimentos-DTA

Dra. Luciana Maria Ramires Esper

Membro

Universidade Federal Fluminense

Dra. Maristela Nascimento

Membro

Instituto Tecnologia de Alimentos-Ital

Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira

Membro

Instituto Tecnologia de Alimentos-ITAL

Dra. Patrícia da Silva Melo

Membro

Veris Faculdades IBTA Metrocamp

Dra. Karen Signori Pereira

Membro

Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Dra. Neusely da Silva

Membro

Instituto Tecnologia de Alimentos-Ital

Dedico esta tese:

A **DEUS**,

Meu fiel amigo em todas as horas, sempre em minha vida. Obrigada
pela minha existência!

A minha mãe, **Marinalva** e meus irmãos.

Mãe, obrigada pelo amor e carinho, mas principalmente pela sabedoria com que me educou. Obrigada por acreditar em mim e me amar muito. Aos queridos irmãos **Cícero e Laerte**, que abdicaram parte de suas vidas em prol da minha e por sempre cuidarem de mim. Nunca vou esquecer-me disso. Amo vocês!

Ao **Amlton**, meu esposo e querido amigo,

Obrigada por fazer parte da minha vida e por me amar. Você é muito especial. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Dr. José Luiz Pereira** por ter me dado à oportunidade de realizar mais esse ideal em minha vida.

A minha co-orientadora, **Dra. Valéria C. Amstalden Junqueira** pelo carinho e orientação.

A minha amiga **Dra. Neusely da Silva** pela confiança, ensinamentos e principalmente pelo amor dedicado.

As amigas de hoje e sempre **Karen Signore Pereira, Luciana Maria Ramires Esper, Lílian Stranghetthi Jorge e Thaís Belo Anacleto dos Santos** pela força e companheirismo.

As companheiras de projeto **Thais Reis e Carolina Moura**, obrigada pela ajuda.

Aos amigos da Microbiologia do Itai, **Dionir, Adelaide, Luciara, Silvinha, Gaby, Neliane, Bia, Abel, Maristela, Marta**, enfim, a todos que sempre cooperaram comigo.

Ao **Cosme** da pós-graduação pela dedicação, paciência e por todas as informações passada.

A **Fapesp** pelo financiamento do projeto e bolsas.

ÍNDICE

INDÍCE DE TABELAS	x
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Taxonomia	5
3.2 Fatores de virulência	6
3.2.1 Produção de enterotoxina	6
3.2.2 Formação de cápsula e biofilme	10
3.3 Fórmulas infantis em pó e <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	12
3.4 Redução de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) em fórmulas infantis em pó	17
3.5 Métodos de análises de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	20
3.5.1 Métodos de Muytjens et al., (1988)	22
3.5.2 Métodos de Nazarowec-White e farber (1997a)	24
3.5.3 Método FDA, (2002a)	25
3.5.4 Método ISO/TS 22964 (2006)	27
3.5.5 Método do Sistema BAX® de detecção por Polymerase Chain Raction (PCR)	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Amostragem	32
4.2 Descrição dos métodos de ensaio	32
4.2.1 Método ISO/TS 22964 (2006)	32
4.2.2 Método ISO/TS 22964 (2006)modificado	33
4.2.3 Método do Sistema BAX®	34
4.3 Determinação do numero mais provável NMP 100g	35
4.4 Avaliação do efeito da refrigeração na sensibilidade dos métodos	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Isolamento e contagem de <i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i> spp) nas amostras analisadas	37
5.2 Comparação dos meios ESIA e DFI no protocolo de ensaio ISO/TS 22964 (2006)	44

5.3	Avaliação do método do Sistema BAX®	45
5.3.1	Confirmação cultural dos resultados do método do Sistema BAX®	45
5.3.2	Comparação dos resultados do método do Sistema BAX® e do método ISO/TS 22964 (2006)	48
5.4	Composição de alíquotas	51
5.4.1	Efeito da composição da sensibilidade do método ISO/TS 22964 (2006)	52
5.4.2	Efeito da composição das amostras na sensibilidade do Método do Sistema BAX®	54
5.4.3	Efeito da refrigeração do caldo de enriquecimento na detecção de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	56
5.5	Características das cepas de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) isoladas	56
5.6	Outras enterobacterias α -glicosidase positivas isoladas	58
6.	CONCLUSÕES	61
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8.	APÊNDICES	72
8.1	Apêndice 1. Identificação das amostras	72
8.2	Apêndice 2. Resultados das análises por amostra e alíquota	73
8.3	Apêndice 3. Identificação das culturas isoladas	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Tempo necessário para <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) atingir a dose infectante (1000 células) em formulas infantis reconstituídas	9
Tabela 2	Resistência térmica (valor D e valor Z) de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) (linhagem tipo e linhagem capsulada) avaliada em caldo tripticase de soja (TSB) e em formula infantil reconstituída	18
Tabela 3	Métodos utilizados na detecção de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) em formulas infantis nos últimos anos	21
Tabela 4	Resultados de presença/ausência de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) nas amostras analisadas utilizando o método ISO/TS 22964 (2006), ISO modificado e Sistema BAX®	37
Tabela 5	Amostras em que foi detectada presença de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) e Número Mais Provável por 100g	39
Tabela 6	Resultados da detecção de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) nas amostras e alíquotas analisadas pelo método ISO/TS 22964 (2006), usando os meios de cultura ESIA e DFI para isolamento de colônias presuntivas	44
Tabela 7	Resultados da confirmação cultural das amostras positivas do método do Sistema BAX®	46
Tabela 8	Comparação dos resultados do método do Sistema BAX® com o resultado do método da ISO/TS 22964 (2006)	48
Tabela 9	Resultados da comparação entre a análise e 5 alíquotas de 100g e a análise de amostra composta no método ISO/TS 22964 (2006) usando os meios de cultura ESIA e DFI	52
Tabela 10	Resultados da comparação entre a análise e 5 alíquotas de 100g e a análise de amostra composta pelo método do Sistema BAX®	55
Tabela 11	Características das cepas de <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>) isoladas nos meios de cultura ESIA e DFI	57
Tabela 12	Perfil API 20E de cepas α glicosidase positivas isoladas das amostras analisadas, mas não confirmadas como <i>Cronobacter</i> spp (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	59
Tabela 13	Perfil API 20E de cepas de enterobacterias α glicosidase negativas pigmentadas de amarelo isoladas das amostras analisadas	60

RESUMO

Cronobacter spp (*Enterobacter sakazakii*) é uma bactéria patogênica oportunista, que tem sido associada a surtos e casos esporádicos de meningite, enterocolite necrosante e sepse em recém nascidos. Em 2008 as cepas dessa espécie foram divididas em várias novas espécies e transferidas para o novo gênero *Cronobacter* spp. Um dos métodos mais recentes para sua detecção é o da ISO 22964 (2006), que inclui duas etapas de enriquecimento, o isolamento de colônias típicas (α -glicosidase positivas) no meio seletivo diferencial ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) e a confirmação das culturas através de testes bioquímicos. Há, entretanto, necessidade de métodos e meios de cultura alternativos para o isolamento de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), objetivo desse trabalho. Para isso, 83 amostras foram analisadas usando a técnica de PCR através do sistema BAX® (Dupont Qualicon), em comparação com o método cultural ISO/TS 22964:2006. Dois meios de cultura seletivos diferenciais foram usados para isolamento de culturas típicas: o Ágar de Isolamento de *E.sakazakii* (ESIA) e o Ágar Druggan-Forsythe-Iversen (DFI). *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) foi isolado em 13,25% das amostras analisadas, sendo mais freqüente em amostras de soja em grãos (destinada à preparação de bebidas à base de soja), em leite em pó e em amido de milho. Nas fórmulas infantis em pó o micro-organismo foi encontrado em 6% das amostras. A unidade analítica de 25g não se mostrou adequada para o isolamento das cepas, porque a contagem encontrada nas amostras positivas (unidade analítica de 500g) foi muito baixa (variando de <0,22 a >1,61NMP/100g). Em 27% das amostras positivas,

Cronobacter spp só foi isolado de colônias atípicas (α -glicosidase negativas) no ESIA e/ou no DFI. Em 9% das amostras as cepas isoladas também não apresentaram pigmentação amarela no TSA. Os resultados mostraram desempenho equivalente do ESIA e do DFI, no protocolo de ensaio da ISO/TS 22964 (2006). O método do Sistema BAX® apresentou desempenho inferior ao método ISO/TS 22964 (2006), com uma alta porcentagem de resultados falsos positivos no PCR (73,33%) e uma porcentagem significativa de resultados falsos negativos na confirmação cultural (53,85%). Os resultados indicaram que, a pesquisa de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em produtos destinados à alimentação de recém nascidos, deve ser feito com unidade analítica de pelo menos 500g, preferencialmente maior, porque a contagem encontrada nas amostras positivas foi muito baixa.

Palavras chave: *Enterobacter sakazakii*, fórmula infantil, métodos.

SUMMARY

Cronobacter spp (*Enterobacter sakazakii*) is an opportunist pathogenic bacterium, which has been associated to outbreaks and sporadically cases of meningitis, necrotizing enterocolitis and sepsis in newborns. In 2008, strains of this species was divided in some new species and transferred to the new genus *Cronobacter* spp. One of the most recent method used to determine the microorganisms is ISO 22964 (2006), that includes two stages of enrichment, isolation of typical colonies (positive α - glycosidase) in the differential media selective ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) and biochemical tests for confirmation. However, it already exists alternative and rapid methods for the isolation of *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), which were the aim of this study. For this, 83 samples were analyzed using the Polymerase Chain Reaction method (PCR) by BAX® System (DuPont Qualicon), in comparison with ISO/TS 22964:2006 method. Two differential selective media were used to isolation of typical colonies: Agar of Isolation for *E. sakazakii* (ESIA) and Agar Druggan-Forsythe-Iversen (DFI). *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) was isolated in 13.25% of the analyzed samples being more frequent in bean (designated to prepare soy base drink), powered milk and corn flour samples. In powered infantile formula, 6% of the samples were contaminated. The analytical unit of 25g was not adequate for the isolation this microorganism, where the count detected in the positive samples (analytical unit of 500g) was very low (among of <0.22 and >1,61MPN/100g). In 27% of positive samples, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) was only isolated from atypical colonies (α -glycosidase negative) in

ESIA and/or DFI. Nine per cent (9%) of the strains isolated from samples did not show yellow pigment in the TSA. Results showed equivalent performance of both ESIA and DFI medias, following the of ISO/TS 22964 (2006) assay protocol. The PCR method (BAX® System) showed lower performance when compared with ISO/TS 22964 (2006) method. A high percentage of false positive results (73.33%) and a significant percentage of false negative results in the cultural confirmation (53.85%) were observed with PCR method. The results indicated that the research of *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) in products destined to the feeding of just born, must be made with analytical unit of at least 500g (or major quantity) due to the counting found in the positive samples was very low.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, infant formula, methods

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os micro-organismos patogênicos representam uma grande preocupação para as indústrias de alimentos, entre esses patógenos estão *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), frequentemente implicados em surtos associados com a ingestão de alimentos contaminados (NITSCHKE et al. 2009).

Espécies de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) tem sido frequentemente isoladas de ambiente, em alimentos tais como trigo, arroz, ervas e especiarias e outros produtos alimentícios (IVERSEN e FORSYTHE, 2003; OSAILI et al., 2009). São consideradas patógenos emergentes, oportunistas, associadas a manifestações clínicas em crianças, principalmente em neonatos que se alimentam de fórmulas infantis em pó (EL-SHAROUD et al. 2008). Podem, também, ser causa de surtos raros de meningites, bacteremia, enterocolite necrotizante e meningoencefalite (AMALARADJOU, HOAGLAND e VENKITANARAYANAN, 2009; O'BRIEN et al. 2009).

De acordo com O'Brien et al. (2009), a fonte exata de contaminação por *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) ainda é desconhecida, porém vários estudos apontam a fórmula infantil em pó como veículo de transmissão. Para Osaili (2009) o amido proveniente do trigo e arroz, usado como matéria na fabricação da fórmula infantil, pode ser também considerado uma fonte de contaminação por *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

A fórmula infantil em pó não é um produto considerado estéril podendo ser uma fonte em potencial para micro-organismos patogênicos (AMALARADJOU,

HOAGLAND e VENKITANARAYANAN, 2009). De acordo com Caubilla-Barron e Forsythe (2007) cepas encapsuladas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) podem sobreviver no produto desidratado por até 2,5 anos.

Para Osaili et al. (2008) a sobrevivência do micro-organismo nesse produto, cuja atividade de água é baixa, depende da sua capacidade de sobreviver à pressão osmótica durante a secagem da fórmula infantil no ambiente de produção. Breeuwer et al. (2003) relata que *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) tem demonstrado ser mais resistente a dessecação do que outras enterobactérias.

Beuchat et al. (2009) relatam que a composição da fórmula infantil em pó, associada a atividade de água e a temperatura de estocagem, irão afetar a sobrevivência de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) no produto e em outros alimentos. De acordo com Edelson-Mammel, Forteous e Buchanan. (2005) o micro-organismo pode sobreviver na fórmula infantil em pó por até dois anos.

Para Pagotto e Farber (2009), quando a fórmula infantil em pó é inadequadamente manipulada, durante sua reconstituição pode haver contaminação do produto (ambiente/manipulador).

Apesar da importância que a presença de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em alimentos vem ganhando nos últimos anos, métodos para o isolamento e detecção de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) não são específicos devido à sensibilidade de um número de cepas aos agentes seletivos geralmente usados nos meios para Enterobacteriaceae, como sais biliares, corantes e antibióticos (IVERSEN e FANNING 2009).

Todos os dados coletados parecem apontar o método da International Standardization Organization/TS 22964 (2006) (ISO) como uma das melhores opções disponíveis no momento para a detecção de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*). Permanece, entretanto, uma dúvida sobre sua adequação no que tange a quantidade de amostra a ser utilizada. Todos os levantamentos feitos ao longo dos anos, incluindo os de Santos et al. (2006), indicam que a população de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) nas amostras é muito baixa, sendo possível que, mesmo com um método mais sensível e mais seletivo, como é o caso da ISO/TS 22964 (2006), o micro-organismo não seja detectado. Então, consideramos necessária uma comparação do desempenho desse método com diferentes quantidades de amostra analisadas.

Outra necessidade é avaliar se meios cromogênicos disponíveis no mercado como o Ágar Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) pode substituir o *Enterobacter sakazakii* Identification Ágar (ESIA).

Os dados disponíveis até o momento deixam claro que a análise pelo método de PCR do Sistema BAX® é simples e rápida, tornando-o bastante atrativo. Entretanto é um método recente, ainda não completamente validado para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) porque não há estudos suficientes.

2 OBJETIVOS

Assim, consideramos plenamente justificados os objetivos desse trabalho, apresentados abaixo:

- 1) Avaliar o desempenho do método ISO/TS 22964 (2006) e do método de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do Sistema BAX® na recuperação de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em amostras naturalmente contaminadas, usando diferentes unidades analíticas (25, 100 e 500g);
- 2) Avaliar o desempenho do Ágar DFI como meio alternativo para o Ágar ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Ágar), no protocolo de ensaio ISO/TS 22964 (2006);
- 3) Avaliar o desempenho dos métodos ISO/TS 22964 (2006) e método de PCR do Sistema BAX® interrompidos durante o final de semana, com refrigeração do caldo Lauril Sulfato Triptose modificado suplementado com Vancomicina (mLST-V);
- 4) Avaliar a frequência de isolamento de cepas atípicas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TAXONOMIA

De acordo com Iversen e Fanning (2009) *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) é considerado um patógeno oportunista veiculados por alimentos. Têm ganhado notoriedade devido a sua relação com infecções de crianças devido ao consumo de fórmulas infantis em pó contaminadas. A bactéria pertence à família Enterobacteriaceae, sendo bastonete Gram negativo, não produtor de esporos, anaeróbio facultativo, fermentador de glicose e oxidase negativa (BRENNER, KRIEG e STANLEY, 2005). Até 1980 esta enterobactéria era designada como uma variante da espécie *Enterobacter cloacae* produtora de pigmentos amarelados, quando foi proposta a criação de uma nova espécie, *Enterobacter sakazakii* (FARMER III et al.1980).

Iversen et al. (2004) avaliaram 126 cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) fazendo uma análise filogenética, usando análise comparativa do DNA 16S ribossomático através do kit Micro-Seq 500 16S rDNA (Applied Biosystems) e sequenciamento do gene hsp60 e, perceberam uma heterogeneidade taxonômica e genética entre as cepas, indicando a possibilidade de uma nova espécie. Em contra partida, Iversen et al. (2007a) classificaram taxonomicamente *Enterobacter sakazakii* e propuseram uma reclassificação deste micro-organismo, baseando-se em estudos das características genotípicas e fenotípicas de 210 cepas identificadas como *Enterobacter sakazakii*, inserindo-o num novo gênero, *Cronobacter*, e considerando as novas espécies *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinensis* e *Cronobacter turicensis*. Em

2008, foi publicada oficialmente a nova taxonomia. Os autores reconhecem ainda que a taxonomia destes micro-organismos não esteja totalmente elucidada, e que as metodologias desenvolvidas para a identificação do *E. sakazakii* mantém a sua aplicabilidade em relação ao novo gênero *Cronobacter* spp (IVERSEN e FANNING, 2009).

3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

3.2.1 Produção de Enterotoxinas

Os fatores de virulência relacionados a *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) ainda não estão totalmente elucidados. Drudy et al. (2006) indicam que a capacidade de produção de enterotoxina pelo *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) não está clara, uma vez que nem os genes que codificam a toxina e nem a própria proteína foram ainda identificados.

Pagotto et al. (2003) desenvolveram um estudo para avaliar a dose letal e infecciosa desse micro-organismo onde utilizaram ratos recém-nascidos como modelo. Foram inoculados por via intraperitoneal e oral 18 cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), sendo 8 isoladas de alimentos, 9 de isolados clínicos e uma cepa de referência (ATCC 29544) com o objetivo de avaliar a produção de enterotoxina. Das 18 cepas estudadas, 4 foram positivas para a produção de enterotoxinas. As 18 cepas foram letais a uma concentração administradas pela via oral de 10^8 UFC/rato, a cepa de referência revelou-se negativa para a produção de enterotoxina. Um isolado clínico e um isolado de alimento apresentaram-se letais por via oral a 10^7 UFC depois de 48 e 72h respectivamente, e um isolado clínico e um alimentar revelaram-se letais por via

intraperitoneal nas concentrações de 10^5 UFC. Para os autores, membros da família Enterobacteriaceae estão envolvidos em surtos de infecções extraintestinais por possuírem características associadas aos fatores de virulência. A penetração na camada epitelial da mucosa intestinal é um mecanismo de virulência importante de diversos micro-organismos patogênicos entéricos, tais como *Vibrio* spp, *Salmonella* spp e *Escherichia coli*. Entretanto para Drudy et al. (2006) as adesinas específicas e os receptores das células de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), envolvidos nos processos, ainda não estão totalmente elucidados.

A endotoxina é um componente da parede celular das bactérias Gram-negativas (HURLEY, 1995), termoestável e pode estar presente na fórmula infantil em pó em grandes concentrações através do micro-organismo (TONWSEND et al. 2007). De acordo com Jacks e Wu (1974) há duas classes de enterotoxinas, termoestável e termolábil, produzidas por vários gêneros diferentes da família Enterobacteriaceae. Para Hurley (1995) a co-presença de endotoxemia e bactérias Gram-negativas podem indicar fatores de virulência da bactéria.

De acordo com Tonwsend et al. (2007), o risco de doença entérica em neonatos alimentados com fórmula infantil em pó é multifatorial, incluindo a ingestão de micro-organismos patogênicos oportunistas, toxinas citotóxicas bacterianas e sistema imunológico imaturo. Presume-se que a endotoxemia seja um mediador central do processo fisiopatológico que conduz complicações tais como a deficiência orgânica e falência múltipla dos órgãos em pacientes com sepsis ocasionadas por bactérias Gram-negativas (HURLEY, 1995).

Pouco se sabe sobre os mecanismos específicos de virulência de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), mas o microrganismo parece ter uma propensão a infectar o sistema nervoso central, causando meningite, cistos ou abscessos. Retardo do desenvolvimento e hidrocefalia são seqüelas bem reconhecidas (FAO/WHO, 2004).

Para Iversen e Forsythe (2003) mesmo não havendo evidência epidemiológica para estipular uma dose infectante, para os autores uma primeira aproximação seria 1000 células (10^3 UFC), podendo variar de acordo com a característica da espécie, estado de saúde do hospedeiro (saudável ou imunocomprometido) e a fonte alimentar. Para esses mesmos autores, o sistema imunológico imaturo dos neonatos e o pH estomacal não ácido favorecem a passagem do *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) para o intestino.

De acordo com Muytjens, Roelofs-Willemse e Jaspard (1988) a concentração do microrganismo na fórmula infantil está em torno de 0,36UFC/100g. Considerando a taxa de crescimento do micro-organismo em diferentes temperaturas para que atinja a dose infectante seriam necessárias 14 gerações (Tabela 1) (IVERSEN e FORSYTHE, 2003).

De acordo com Iversen, Lane e Forsythe (2004) a temperatura ótima de crescimento do micro-organismo varia entre 37 e 43°C, dependendo do meio de cultura. O tempo de geração a 37°C varia de 14 a 29 minutos, em diferentes meios de cultura e de 19 a 21 minutos em fórmula infantil reconstituída. A 6 e 21°C o tempo de geração é de 13,7 e 1,7h, respectivamente (em fórmula infantil reconstituída) podendo portanto se multiplicarem, ainda que lentamente, sob refrigeração. O *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda que a fórmula

infantil reconstituída não ultrapasse 4h de exposição à temperatura ambiente em unidades de cuidados intensivos para neonatos, preferivelmente, para minimizar o potencial de crescimento do *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) devendo ser armazenada em temperaturas $\leq 4^{\circ}\text{C}$ (FDA, 2002b). Pagoto et al. (2003) relatam que com uma concentração de 1UFC/ml na fórmula reconstituída armazenada em temperatura ambiente levaria 10h para atingir uma população de 10^7 UFC em uma alimentação infantil de 100ml.

Tabela 1. Tempo necessário para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) atingir a dose infectante (1000 células) em fórmulas infantis reconstituídas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de geração (horas)	Tempo necessário para atingir 14 gerações
10	13,6	7,9 dias
18	2,9	1,7 dias
21	1,3	17,9h
37	0,5	7h

Fonte: Iversen e Forsythe (2003).

De acordo com Iversen e Forsythe (2003), *Cronobacter* spp é ubíquo e pode estar presente em vários alimentos crus como o leite, por exemplo. Entretanto medidas como o controle inicial na matéria-prima nas indústrias de alimentos, redução nos níveis de contaminação do leite cru, tratamento térmico adequado para eliminação do micro-organismo e aplicação de critérios microbiológicos podem auxiliar no controle do micro-organismo.

Arku et al. (2008) avaliaram a sobrevivência de cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) ao processo de secagem por *spray drying* durante 12 semanas. As amostras contaminadas com as cepas CFS 155, 237, 1001 e ATCC 51329 em concentrações entre 10^2 e 10^7 UFC/g foram armazenadas sob

temperatura ambiente (18-20°C) em *bags* de polietileno para evitar às reações de oxidação e a entrada de umidade que contribui para o aumento da atividade de água, acelerando desse modo reações de degradação. Após 4 semanas de armazenamento com uma umidade relativa de 60%, a atividade de água (Aa) estava entre 0.291 e 0.330. A cepa de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) CFS1001 foi a única detectada em todas as amostras analisadas após 12 semanas de armazenamento.

Para Nazrowec-White e Farber (1997b) o leite em pó reconstituído é um meio aquoso que contém proteína, lactose e minerais, o que juntamente com elevado teor de sólidos totais e gordura, pode conferir uma medida de proteção térmica aos micro-organismos durante a secagem através do pulverizador.

3.2.2 Formação de capsula e biofilme

Cronobacter spp (*Enterobacter sakazakii*) forma cápsulas de material polissacarídeo, composto de ácido glicurônico (29-32%), D-glicose (23-30%), D-galactose (19-24%), D-fucose (13-22%) e D-manose (0-8%) (FARMER et al., 1980). De acordo com Iversen e Forsythe (2003) a cápsula estaria envolvida na habilidade do organismo em sobreviver por muito tempo nas fórmulas infantis em pó (24 meses) e dessa maneira aderir às superfícies e formar biofilme que proporciona resistência aos agentes de limpeza e sanitizantes.

Vários estudos mostraram que bactérias podem aderir e formar biofilme nas superfícies de materiais encontrados em ambientes de fabricação de produtos alimentícios, resultando em fonte importante de contaminação (NITSCHKE et al. 2009). A formação de biofilme pelos micro-organismos Gram-

negativos tem sido estudada extensivamente em *Pseudomonas*, *Salmonella* sp e *Escherichia*. A matriz do biofilme formada por esses gêneros bacterianos é composta em sua maior parte por polissacarídeos extracelulares (HEREDIA, WESLEY, e GARCIA, 2009). O desenvolvimento de biofilme em superfícies é um processo dinâmico e envolve etapas como, adesão, crescimento, mobilidade e produção do polissacarídeo extracelular (APARNA e YADAV, 2008). Fornece uma barreira física e protege o microrganismo de vários ambientes hostis tais como pressão osmótica, luz Ultra Violeta (UV), calor, inanição, ácidos, detergentes, antibióticos, fagócitos, anticorpos e bacteriófagos (LEHNER et al. 2005).

De acordo com Iversen, Lane e Forsythe (2004) *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) presentes em fórmulas infantis adere com mais facilidade ao silicone, ao látex e ao policarbonato quando comparada com adesão em aço inoxidável. Esses materiais são empregados na fabricação de utensílios e equipamentos utilizados para preparação de alimentos, portanto estes devem ser limpos logo após o uso para impedir a formação de biofilme.

Nitschke et al. (2009) estudaram a taxa de adesão de microrganismos patogênicos nas superfícies e verificaram que *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) mostrou maior afinidade pelo polipropileno (63,8%) do que pelo aço inoxidável (51,7%).

Estudos de Iversen, Lane e Forsythe (2004) demonstraram que uma linhagem encapsulada de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) foi capaz de formar biofilme melhor em látex, silicone e policarbonato em relação ao aço inoxidável. Contagens médias de $6,0 \times 10^3$ UFC/cm² foram obtidas em látex após

24h de incubação em fórmula infantil a 37°C. Em aço inoxidável a contagem foi de 50UFC/cm².

Para Lehner et al. (2005) a produção de biofilme permite ao micro-organismo unir-se e aderir-se aos vários tipos de superfícies ambientais devido a habilidade de produzir celulose protegendo as células dentro do biofilme contra a ação dos sanitizantes. Nas cepas isoladas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) os polissacarídeos extracelulares geralmente contem L-fucose que possivelmente fornece uma barreira protetora contra esforços físicos e/ou ambientais. Para esses mesmos autores uma das características mais intrigantes de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) é sua alta tolerância à pressão osmótica e a ambientes secos, demonstrando em várias pesquisas que os polissacarídeos extracelulares têm um papel importante nesses fatores.

Para Iversen e Fanning (2009) embora haja evidência do habitat natural estabelecido em fábrica, o reservatório primário deste micro-organismo não está ainda elucidado e desta maneira surge a questão sobre o risco significativo para a saúde em relação a contaminação extrínseca da fórmula infantil durante a preparação doméstica e se outros tipos de alimentos podem representar um perigo potencial para grupos de risco, como os idosos e neonatos.

3.3 FÓRMULAS INFANTIS EM PÓ E *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*)

A Portaria 977, de 05 de Dezembro de 1998, considera-se fórmula Infantil para lactentes o produto em forma líquida ou em pó, destinado a alimentação de lactentes, sob prescrição, em substituição total ou parcial do leite humano, para

satisfação das necessidades nutricionais deste grupo etário. A composição essencial das fórmulas Infantis para lactentes é à base de leite de vaca ou de outros animais e/ou de outros componentes comestíveis de origem animal e vegetal que se consideram adequados para a alimentação de lactentes. Quanto a forma de apresentação pode ser encontrada na forma líquida pronta para consumo, líquida concentrada, necessitando de diluição em água e em pó, necessitando de água para seu preparo (BRASIL, 1998). A matéria-prima utilizada na preparação das fórmulas infantis em pó, geralmente é o leite, o qual é sujeito a algumas alterações como redução no conteúdo protéico e mineral, aumento no conteúdo de carboidratos, aumento na relação Ca/P, adição de vitaminas e de gordura modificada de forma a assemelhar-se ao leite materno (NAZAROWEC-WHITE e FARBER, 1999).

As fórmulas infantis em pó são as mais utilizadas como fonte de alimentação para lactentes de forma exclusiva ou em combinação com outros alimentos (IVERSEN e FORSYTHE, 2003). São utilizadas quando há a impossibilidade de amamentação de lactentes pelas mães ou estas optam por não amamentá-los com leite materno (NAZAROWEC-WHITE e FARBER, 1997b).

Para Pagotto e Farber (2009), a fórmula infantil em pó é um produto consumido por milhões de crianças todos os dias no mundo inteiro e é considerado um alimento seguro, entretanto informações científicas relatam seguramente que um novo gênero de patógeno, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), pode estar presente na fórmula infantil em pó.

De acordo com Food and Agriculture Organization/*World Health Organization* (FAO/WHO, 2008), a utilização da tecnologia atual na produção das fórmulas infantis em pó não é capaz de reduzir os níveis de microrganismos procedentes dos ingredientes. Assim, sua segurança microbiológica exige a adesão estrita às boas práticas higiênicas na produção, durante a reconstituição até o momento do consumo. Os principais fatores que afetam os perigos microbiológicos associados às fórmulas infantis em pó incluem: o nível de contaminação das fórmulas, o nível de higiene na preparação e distribuição da fórmula reconstituída, a inclusão de um tratamento eficaz no momento da reconstituição e a duração do período de pré-alimentação, principalmente em relação à temperatura. Nazarowec-White e Farber (1997a) em seus estudos indicam a importância da preparação e do armazenamento apropriado da fórmula infantil em pó e reconstituída no que diz respeito à sobrevivência e ao crescimento de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*). Além disso, mesmo baixos níveis de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) presentes nestes produtos têm a capacidade de se multiplicar durante a reconstituição bem como durante o tempo de espera. Para Nazorewec-White e Farber (1997a) o armazenamento impróprio da fórmula infantil reconstituída em temperatura ambiente pode permitir o crescimento do *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

Codex Alimentarium (2008) relata que há quatro rotas por onde *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) e *Salmonella* sp podem incorporar na fórmula infantil em pó: através da adição dos ingredientes durante a fabricação da mistura da fórmula infantil em pó; através da contaminação da fórmula nos ambientes durante as etapas de processamento ou secagem; através da

contaminação da fórmula infantil em pó após abertura da embalagem; e através da contaminação durante ou após a reconstituição pelos manipuladores antes da alimentação.

A *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* recomendam o uso da água a 70°C no preparo de fórmula infantil reconstituída para eliminar possível contaminação por *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) uma vez que, de acordo com Nazarowec-White e Farber (1997b), é o micro-organismo mais termotolerante em relação aos membros da família Enterobacteriaceae (FAO/WHO, 2007).

Para Vargas-Leguás et al. (2009) a preparação das mamadeiras para consumo é uma etapa crítica para a proliferação de micro-organismos patogênicos. Para esses autores as mamadeiras só devem ser retiradas da refrigeração no momento do consumo e descartadas logo após a administração.

De acordo com Simmons et al. (1989) e Bar-Oz et al. (2001), as infecções neonatais têm sido associadas com a colonização de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em equipamentos e utensílios utilizados na preparação dos alimentos, tais como escovas, liquidificadores e colheres. Para os autores, os recipientes, mamadeiras e utensílios devem ser totalmente higienizados, tão rapidamente quanto possível após o uso, para impedir a formação de biofilmes. Uma vez que a concentração do micro-organismo nas formulas infantis em pó é baixa, adequadas condições de higiene rigorosamente seguidas, bem como controle do binômio tempo e temperatura de resfriamento no armazenamento das fórmulas reconstituídas, minimizam o risco de contaminação e desenvolvimento do microrganismo.

Para a FAO/WHO (2007) a contaminação extrínscica pode ocorrer no ambiente de preparação quando utensílios contaminados (por exemplo, colheres, misturadores, frascos e mamadeiras) são usados na preparação da fórmula infantil em pó ou durante a alimentação.

A rotulagem do produto, programas educativos ao consumidor e o treinamento da equipe de funcionários em hospitais devem ser contínuos e apropriados para fornecerem informações adequadas e atualizadas aos preparadores em relação a reconstituição e uso seguro do produto (CODEX ALIMENTARIUM, 2008).

De acordo com Dancer et al. (2009) a habilidade de crescer em uma atividade de água (Aa) de 0,94 não foi relatada para nenhuma Enterobacteriaceae, apenas para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), sendo portanto considerado um dos membros da família Enterobacteriaceae mais resistentes à pressão osmótica.

Para Edelson-Mammel, Porteous e Buchanan (2005) a fórmula infantil em pó é embalada sob uma atmosfera inerte para impedir a oxidação dos nutrientes, condição que também pode promover a sobrevivência de células bacterianas em estado latente devido a sobrevivência de células viáveis. Os autores relataram a sobrevivência de células viáveis por um longo período (2,5 anos) em fórmula infantil desidratada.

Para Kandhai et al. (2010) um parâmetro importante na determinação da sobrevivência de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em fórmula infantil em pó é a atividade de água (Aa). Este parâmetro foi monitorado durante um estudo de armazenamento utilizando duas cepas de *Cronobacter sakazakii*(*Enterobacter*

sakazakii) ATCC 29544, *Cronobacter* MC10, e outras seis cepas bacterianas inoculadas em fórmula infantil desidratada e armazenadas durante 22 semanas em diversas temperaturas, entre 7 a 42°C. A concentração inicial inoculada foi de 10⁴UFC/g na fórmula em pó. Em todas as cepas testadas foi observado que o número de células diminuía mais rapidamente à medida que a temperatura aumentava. As cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) sobreviveram melhor em altas temperaturas, entre 37 e 42°C, em relação às demais bactérias. Após 5 dias do armazenamento a 30, 37 e 42°C, a Aa média do produto diminuiu para 0.129. A Aa diminuiu mais lentamente a 7, 15 e 22°C, alcançando valores de 0.286, de 0.180, e de 0.152 respectivamente após 5 dias do armazenamento. Ao final do armazenamento a 22 C , após 22 semanas, apenas *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*) e *Cronobacter* MC10 eram ainda detectáveis.

3.4 REDUÇÃO DE *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) NAS FÓRMULAS INFANTIS EM PÓ

Para Gurtler, Kornacki e Beuchat (2005) o número relativamente elevado de espécies de *Cronobacter* spp em fórmulas infantis resulta da resistência térmica apresentada por algumas espécies deste gênero.

Nazarowec-White e Farber (1997b) determinaram a resistência térmica a 52, 54, 56, 58 e 60°C de um conjunto de 10 cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) (5 isolados clínicos e 5 de alimentos) em fórmulas infantis reconstituídas. Os valores D (tempo de redução decimal) para cada temperatura foram respectivamente, 54,8, 23,7, 10,3, 4,2 e 2,5 minutos. Com estes resultados,

os autores concluíram que *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) é um dos membros mais termodúricos da família Enterobacteriaceae encontrados em produtos lácteos.

Tabela 2. Resistência térmica (valor D e valor Z) de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) (linhagem tipo e linhagem encapsulada) avaliada em Caldo Trypticase de Soja (TSB) e em fórmula infantil reconstituída.

Meio	Linhagem	Valor D (min)*			Valor z (°C)*
		58°C	60°C	62°C	
TSB	Tipo	1,3 (0,28)	0,9 (0,17)	0,4 (0,08)	5,6 (0,13)
	Capsulada	1,7 (0,38)	0,2 (0,06)	0,2 (0,13)	5,6 (0,50)
Fórmula infantil	Tipo	2,6 (0,48)	1,1 (0,11)	0,3 (0,12)	5,8 (0,40)
	Capsulada	3,8 (1,95)	1,8 (0,82)	0,2 (0,11)	5,7 (0,12)

*Os dados entre parênteses são desvio padrão.

Fonte: (IVERSEN; LANE; FORSYTHE, 2004).

Iversen, Lane e Forsythe (2004) realizaram uma avaliação da resistência térmica de duas cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) (linhagem tipo e uma linhagem encapsulada) em Trypticase Soy Broth (TSB) e em fórmula infantil reconstituída (Tabela 2). Foi verificado valor D_{58} entre 1,3 a 3,8 minutos e valor D_{62} entre 0,2 a 0,4 minutos, sem diferença significativa entre as linhagens ou entre o TSB e a fórmula infantil reconstituída. O valor z médio, obtido para as duas cepas, foi de 5,7°C. Esses dados de resistência térmica foram considerados, pelos autores, como similares aos de outras enterobactérias, como *Salmonella* em leite em pó reconstituído. Utilizando os valores de D_{60} (1,1 min) e z (5,7°C) os autores fizeram uma previsão do valor D a 71,2°C, estimado em 0,7 segundos. Com base nessa previsão concluíram que o processo de pasteurização high temperature short time (HTST) = 71,7°C/15s é eficaz na redução contra *Cronobacter* spp

(*Enterobacter sakazakii*), podendo promover 21 reduções decimais na população alvo.

Segundo Breeuwer et al. (2003), a capacidade de sobrevivência das células de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em temperaturas como 45°C, bem como a sua capacidade de crescimento a 47°C é sinônimo de que nos ambientes quentes e secos, como os presentes nos secadores industriais, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) assume uma vantagem competitiva quando comparados aos outros membros da família Enterobacteriaceae. A trealose, um dissacarídeo não redutor, tem papel fundamental na resistência e secagem, uma vez que estabiliza a membrana dos fosfolipídios e proteínas.

Lee et al. (2006) em seus estudos avaliaram o efeito da inativação de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em fórmula infantil através da utilização de raios gama e água quente a 80°C. Foi observado redução na população inicial de 5,9logUFC/g e 5,4logUFC/g do micro-organismo utilizando radiação gama de 3kGy e rehidratação com água quente a 80°C. A radiação com 5kGy reduziu a população de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) abaixo do limite de detecção (10^2 UFC/g).

Testes “in vitro” avaliaram a resistência osmótica de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) a uma atividade de água (Aa) igual a 0.934 em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com 40% de sorbitol a 45°C e constataram que o micro-organismo é mais resistente que *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. Desta forma, os autores, sugeriram que a resistência osmótica de *Cronobacter* spp (*Enterobacter*

sakazakii) poderá aumentar o risco do micro-organismo se tornar dominante no ambiente, aumentando, assim, a probabilidade de contaminação pós-processamento (BREEUWER et al. 2003).

3.5 MÉTODOS DE ANÁLISES DE *Cronobacter* spp.

Métodos para o isolamento e detecção da *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) são difíceis devido à sensibilidade de um número de cepas aos agentes seletivos geralmente usados nos meios para Enterobacteriaceae, como sais biliares, corantes e antibióticos (IVERSEN e FANNING, 2009).

Vários métodos têm sido utilizados para a detecção de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em fórmulas infantis, os quais se encontram resumidos na Tabela 3. Todos seguem basicamente as mesmas etapas, com variações nos meios de cultura e condições de incubação utilizadas. Essas etapas são o pré-enriquecimento, para a reparação de células injuriadas; o enriquecimento seletivo, para elevar a população alvo a níveis detectáveis; o plaqueamento seletivo diferencial, para obtenção de colônias com características típicas e isolamento das culturas; e a confirmação, para verificar se as culturas isoladas pertencem ao gênero *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

Para Druggan e Iversen (2009) a etapa de pré-enriquecimento pode aumentar a sensibilidade do método, mas não tem nenhum impacto na especificidade porque nenhum agente seletivo é utilizado. O que se observa no desenvolvimento desses métodos é que só recentemente foram desenvolvidos

procedimentos com meios de cultura e condições de incubação especificamente direcionadas ao *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

Tabela 3. Métodos utilizados na detecção de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em fórmulas infantis nos últimos anos.

Método	Pré Enriquecimento	Enriquecimento Seletivo	Plaqueamento diferencial	Confirmação
Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspas (1988)	BPW ^a 36°C/ <i>overnight</i>	EEB ^a 36°C/ <i>overnight</i>	VRBG ^a (plaqueamento em profundidade) 36°C/ <i>overnight</i>	BA/BEM ^a 36°C/ <i>overnight</i> API 20E Colônias amarelas em NA (25°C/48h), DNAase, alfa glicosidase
Nazarowec-White e Farber (1997a)	Fórmula reconstituída com água destilada estéril a 36°C/ <i>overnight</i>	EEB ^a 36°C/ <i>overnight</i>	VRBG (plaqueamento em profundidade) 36°C/ <i>overnight</i>	TSB-YE ^a com ágar e kit miniaturizado API 20E
Food and Drug Administration (FDA, 2002a)	Fórmula reconstituída com água destilada estéril a 36+1°C/24h	EEB ^a 36+1°C/24h	VRBG (plaqueamento por estria) 36+1°C/24h	TSA ^a 25+1°C/48-72h Colônias amarelas seguem para teste de Oxidase e kit miniaturizado API 20E
ISO/TS 22964 (2006)	BPW 37+1°C/18+2h	mLST-V ^a 44+0,5°C/24+2h	ESIA ^a 44+1°C/24+2h	TSA 25+1°C/44-48h Colônias amarelas seguem para teste de Oxidase e kit miniaturizado API 20E ou série bioquímica
BAX (Dupont/Qualicon)	Não é feito	mLST-V 44+0,5°C/24+2h	Lise das células resultados positivos estrias em ESIA a partir do mLSTV e incubação a 44+1°C/24+2h	Como no método ISO 22964

^a **BPW** = Água Peptonada Tamponada, **EEB** = Caldo de Enriquecimento de *Enterobacteriaceae*, **mLST-V** = Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina, **VRBG** = Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose, **ESIA** = Ágar de Isolamento de *Enterobacter sakazakii*, **NA** = Ágar Nutriente, **BA** = Ágar Sangue, **TSB-YE** = Caldo Tripticase de Soja Extrato de Levedura, **TSA** = Ágar Tripticase de Soja.

Os métodos iniciais (Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspas (1988), Nazarowec-White e Farber (1997a) e FDA, 2002a), são procedimentos de enriquecimento de enterobactérias que, no final, verificam a presença de

Cronobacter spp (*Enterobacter sakazakii*) em meio à microbiota acompanhante, não incluindo etapas que inibem o crescimento das enterobactérias, dificultando o isolamento de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), visto que tanto o enriquecimento seletivo quanto o plaqueamento diferencial são feitos em meios de cultura de uso geral para enterobactérias.

3.5.1 Método de Muytjens, Roelofs-Willemse e Jaspard (1988)

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA, 2002a), o primeiro método quantitativo de isolamento de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) foi o de Muytjens et al. (1988), que aplicou a técnica de diluição múltipla para a contagem pelo método do Número Mais Provável (NMP). O método consiste nas seguintes etapas: Pré enriquecimento: Inoculação de três alíquotas de 100g, três alíquotas de 10g e três alíquotas de 1g (333g) das amostras de fórmulas infantis em pó em 900, 90 e 9ml de Água Peptonada Tamponada (BPW), respectivamente, seguida da incubação por uma noite a 36°C. Enriquecimento seletivo: transferência de 10ml de cada cultura em BPW para 90ml de Caldo de Enriquecimento de Enterobacteriaceae (EEB), seguida da incubação por uma noite a 36°C. Plaqueamento diferencial: transferência de 1ml de cada cultura em EEB para 20ml de Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), plaqueamento em profundidade e incubação por uma noite a 36°C. Seleção de colônias típicas e confirmação: seleção das colônias com características típicas de Enterobacteriaceae no VRBG, isolamento em Blood Ágar (BA) e Ágar Eosina Azul

de Metileno (EMB) e identificação utilizando o “kit” API 20E da BioMérieux®. Confirmação das culturas características pelo uso do API 20E através da verificação do desenvolvimento de colônias amarelas em Ágar Nutriente (após 48h de incubação a 25°C), teste de DNase e teste de atividade de α -Glicosidase.

O método de Muytjens, Roelofs-Willems e Jaspars (1988) não é, na verdade, um método de contagem de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), mas sim, de enterobactérias, porque tanto o Caldo EEB como o Ágar VRBG são meios de isolamento de enterobactérias. A estratégia usada foi enriquecer as enterobactérias, selecionar colônias típicas no VRBG, isolar e identificar um número significativo delas e verificar se eram *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*). Considerando que nenhuma etapa do procedimento oferece qualquer vantagem competitiva para as cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), que podem estar em menor número em relação às demais enterobactérias, havendo o risco de não se conseguir isolar o micro-organismo alvo. Para contornar essa dificuldade é importante inocular quantidades de amostra bem maiores do que normalmente se inocula para a análise de *Salmonella*, por exemplo, (25g). É um método extremamente trabalhoso e dispendioso, uma vez que nove alíquotas de cada amostra são inoculadas e cada uma gera um número significativo de colônias para identificação e confirmação através do API 20E.

Para Witthuhn, Kemp e Britz (2006) a etapa de enriquecimento em caldo EEB pode também ajudar na recuperação das células de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) que foram injuriadas durante o processamento do alimento.

3.5.2 Método de Nazarowec-White e Farber (1997a)

Esse método, usado durante um levantamento da incidência de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em fórmulas infantis no Canadá, é uma modificação do método Muytjens, Roelofs-Willemse e Jaspas (1988). Consiste nas seguintes etapas: Pré enriquecimento: feito da mesma forma descrita por Muytjens et al. (1988), porém, substituição do BPW por água destilada estéril, ou seja, o pré enriquecimento é feito na própria fórmula infantil, reconstituída. Enriquecimento seletivo: conforme descrita por Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspas (1988), sem modificação. Plaqueamento diferencial: conforme descrita por Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspas (1988), sem modificação. Seleção de colônias típicas e confirmação: seleção de colônias com características típicas de Enterobacteriaceae no VRBG, isolamento em Ágar Triticase de Soja com Extrato de Levedura (TSA-YE) e identificação através do API 20E. O resultado do API 20E é considerado definitivo, sem testes adicionais de confirmação.

O método de Nazarowec-White, Farber (1997a) apresenta uma desvantagem em relação ao de Muytjens et al. (1988): fazer o pré enriquecimento na própria fórmula infantil, reconstituída. Isso limita a aplicabilidade da técnica porque não é possível enriquecer os ingredientes da formulação (exceto leite em pó) ou amostras do ambiente de fabricação, por exemplo, sem um caldo de enriquecimento. No entanto, para análise das fórmulas isso é vantajoso, porque não envolve gastos com caldo de pré enriquecimento nem trabalho de preparação no laboratório.

3.5.3 Método da FDA (2002a)

O método da FDA (2002a) é derivado do método de Nazarowec-White, Farber (1997a), com algumas modificações: Pré enriquecimento: feito da mesma forma descrita por Nazarowec-White e Farber (1997a), sem modificação. Enriquecimento seletivo: conforme descrita por Nazarowec-White, Farber (1997a), sem modificação. Plaqueamento diferencial: no mesmo meio usado por Nazarowec-White e Farber (1997a), porém, alteração do plaqueamento em profundidade por inoculação em estrias. Seleção de colônias típicas e confirmação: seleção de cinco colônias isoladas com características típicas de Enterobacteriaceae no VRBG, inoculação por estrias em Ágar Triticase de Soja (TSA) incubação a 25°C/48-72h. Após a incubação, seleção das colônias pigmentadas de amarelo, teste de oxidase e identificação com o API 20E. O resultado do API 20E é considerado definitivo, sem testes adicionais de confirmação.

O método da FDA (2002a) também utiliza água destilada na etapa de pré-enriquecimento. Para Druggan e Iversen (2009), isto atua como um meio de recuperar células injuriadas, principalmente para fórmulas infantis que incluem peptona como parte da sua composição. Nas fórmulas infantis a falta de nutrientes do pré-enriquecimento é compensada pela sua composição. No entanto, o uso da água destilada para o isolamento e enumeração de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) nas matérias-primas usadas na fabricação fórmula infantil em pó não seria recomendável pela falta de nutrientes necessários para recuperação das células injuriadas.

O método da FDA ainda apresenta a desvantagem de enriquecer e selecionar todas as enterobactérias e ser restrito a análise de fórmulas infantis e leite em pó. Apresenta, entretanto, uma vantagem em relação ao de Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspar (1988) e Nazarowec-White e Farber (1997a): fazer uma triagem inicial das culturas que produzem pigmento amarelo antes da identificação no API 20E. Isso reduz a carga de trabalho envolvida nos ensaios porque apenas as culturas pigmentadas seguem para a identificação.

Entretanto, não utiliza o teste de atividade de α -glicosidase na triagem inicial das cepas para a confirmação, o que é desvantajoso, porque várias outras enterobactérias podem produzir pigmento amarelo. O API 20E não inclui o teste de atividade de α -glicosidase que, no método de Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspar (1988), é feito separadamente.

Outra desvantagem dos métodos anteriores (Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspar (1988), Nazarowec-White e Farber (1997a) e mantidas no da FDA é a utilização do teste de diluição múltipla para a quantificação pelo NMP, inoculando três alíquotas 100g, três alíquotas de 10g e três alíquotas de 1g (333g no total). Considerando que inúmeros estudos demonstraram que a contagem de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) é muito baixa nas amostras, não se justifica trabalhar com diluições. A aplicação de um teste de diluição única, inoculando 5 alíquotas de 100g, por exemplo (500g no total), seria mais sensível e menos trabalhoso, reduzindo o número de alíquotas para a confirmação.

3.5.4 Método ISO/TS 22964 (2006)

O método da ISO ISO/TS 22964, (2006) segue as mesmas etapas do método da FDA, mas utiliza meios de cultura diferenciados, que permitem uma melhor seleção e diferenciação de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) das enterobactérias acompanhantes.

É um método qualitativo (presença/ausência) que também pode ser aplicado para a quantificação pela técnica do NMP, assim como o método da FDA (2002a). As etapas são: Pré enriquecimento: inoculação na proporção de 1:10 de amostra por diluente, Água Peptonada Tamponada (BPW), seguida da incubação a $37\pm 1^{\circ}\text{C}/16\text{-}20\text{h}$. Enriquecimento seletivo: transferência de 0,1ml da cultura em BPW para 10ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (mLST-V), seguida da incubação a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}/24\pm 2\text{h}$. Plaqueamento diferencial: inoculação de uma alçada da cultura obtida no caldo m-LST-V, por estrias de esgotamento, no Agar de Isolamento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA), seguida da incubação a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}/24\pm 2\text{h}$. Seleção de colônias típicas e confirmação: seleção das colônias verde azuladas em ESIA, típicas de atividade de α -glicosidase, isolamento em TSA por estrias de esgotamento (incubação a $25^{\circ}\text{C}/44\text{-}48\text{h}$), observação da produção de pigmento amarelo e, em caso positivo, provas bioquímicas em “kit” miniaturizado (não especifica marcas) ou a seguinte bateria de testes: oxidase, lisina e ornitina descarboxilase, arginina dehidrolase, citrato e fermentação de D-sorbitol, L-rhamnose, D-sacarose, D-melibiose e amidaglina.

O método da ISO/TS 22964 (2006) é bem mais recente e o primeiro efetivamente direcionado a *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), criando condições para reduzir a competição das enterobactérias nas várias etapas do ensaio. O pré enriquecimento é feito em BPW, assim como originalmente descrito por Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspar (1988), com duas vantagens: pode ser aplicado a qualquer tipo de amostra e pode ser utilizado para o ensaio simultâneo de *Salmonella*. A norma não especifica a quantidade de amostra a ser inoculada, mas remete-se à ISO 8261 (2001) que, para fórmulas infantis e leite em pó a recomendação é 10g. Essa quantidade é a mínima necessária, não havendo impedimentos ao uso de quantidades maiores, em uma única alíquota (presença/ausência) ou múltiplas alíquotas (NMP), desde que mantida a diluição de 1:10.

O enriquecimento seletivo é feito em mLST-V, que contém 3,4% (p/v) de NaCl e 10mg/l de vancomicina. O caldo LST original não contém vancomicina e o teor de sal é de 0,5%. É o meio tradicionalmente utilizado para a contagem de coliformes em alimentos pelo NMP, incubado a 35°C/24h. A elevação do teor de sal e a incubação a 44°C criam condições mais competitivas para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), em relação às enterobactérias. *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) cresce a 44°C (Brenner, Krieg e Stanley, 2005), ao contrário de inúmeros coliformes. A vancomicina normalmente é adicionada aos meios de cultura para inibir bactérias Gram positivas.

O'brien et al. (2009) em seus estudos observaram que uma das 5 cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) (E632) estudadas não

creceu no meio de cultura mLST-V. Para esses autores isso se deve a sensibilidade dessas cepas aos agentes antimicrobianos usados no meio de enriquecimento seletivo.

O plaqueamento diferencial recomendado pelo método é feito no ESIA, meio seletivo diferencial que contém desoxicolato de sódio e cristal violeta, agentes caracteristicamente usados em meios de isolamento de enterobactérias, para inibir bactérias Gram positivas. Contém ainda 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glocopiranosídeo, um substrato cromogênico para a α -glicosidase. As colônias das cepas que produzem α -glicosidase são verde azulada, podendo ser diferenciadas das que não produzem a enzima. Essa primeira triagem é seguida da observação da produção de pigmento amarelo em TSA, aumentando significativamente a probabilidade de selecionar as culturas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*). As provas bioquímicas recomendadas são mais discriminatórias para diferenciar *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) das outras enterobactérias que produzem α -glicosidase e pigmento amarelo. O método menciona ainda que a substituição do ESIA por outro meio de cultura deve ser validada.

3.5.5 Método do Sistema Bax® de Detecção por *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

O método do Sistema BAX® detecta cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em alimentos selecionados incluindo fórmula infantil, leite em pó, ingredientes e produtos a base de soja, incluindo amostras ambientais após enriquecimento (DUPONTQUALICON, 2000).

O método utiliza a Polymerase Chain Reaction (PCR) para a rápida amplificação de um fragmento específico do DNA, ou seja, uma seqüência genética única de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) que é estável e não é afetada pelas condições de crescimento e sua detecção na reação de PCR é uma forte indicação da presença do micro-organismo (DUPONT/QUALICON, 2000). O método consiste no enriquecimento seletivo direto da amostra em Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado suplementado com Vancomicina (mLST-V), mesmo procedimento adotado pelo método ISO/TS 22964 (2006), sem o pré enriquecimento em Água Peptonada Tamponada –BPW. Seguido de um segundo enriquecimento em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), incubado a 37°C por 3 horas. A amostra é então aquecida em uma solução de lise, para liberação do DNA genômico e, após a lise, é adicionada aos tubos de PCR, contendo os reagentes para amplificação e detecção. Os tubos são colocados no termociclador/detector, onde o fragmento alvo, após 38 ciclos de amplificação gera um sinal fluorescente, automaticamente detectado pelo equipamento. Esse sinal é analisado pelo software do sistema, que apresenta o resultado como positivo (presença) ou negativo (ausência). O Manual do Usuário do método do Sistema Bax® não estabelece a forma de confirmação dos resultados positivos,

que pode ser feita, por exemplo, pelo método ISO/TS 22964 (2006), a partir do caldo mLST-V.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram utilizadas 83 amostras no desenvolvimento do trabalho, descritas no Apêndice 1, incluindo 20 de açúcar, 21 de amido de milho, 18 de fórmulas infantis em pó, 17 de leite em pó, 6 de soja em grãos (usada para o preparo de bebida à base de soja) e 1 cacau em pó. As amostras foram coletadas no varejo da cidade de Campinas (SP) ou fornecidas por fabricantes, no período de 14/03/2007 a 05/11/2008. De cada amostra foi feita uma composição de 3 embalagens de 500g, totalizando 1.500g. As amostras foram analisadas em 5 porções de 100g e sem inoculação artificial. Para cada método foram utilizadas 5 porções diferentes de 100g, porém da mesma compostagem.

4.2 Descrições dos métodos de ensaio

As amostras foram analisadas utilizando-se três métodos, em paralelo, descritos abaixo.

4.2.1 Método ISO/TS 22964, (2006)

a) Pré enriquecimento. Fracionou-se cada amostra em cinco alíquotas de 100g e homogeneizou-se cada alíquota separadamente, em 900ml de BPW (diluição 1:10).

b) Enriquecimento seletivo. Seguiu-se o ensaio de cada alíquota separadamente, transferindo 0,1ml do BPW para 10ml de caldo mLST-V, sendo incubados a $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24 \pm 2\text{h}$.

c) Plaqueamento diferencial. Estriou-se (estrias de esgotamento) uma alçada do caldo mLST-V em uma placa de Ágar de Isolamento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA) e incubou-se a $44\pm 1^{\circ}\text{C}/24\pm 2\text{h}$. Após incubação verificou se houve a presença de colônias típicas (1-3mm, verdes ou verde azuladas).

d) Confirmação preliminar. Havendo colônias típicas (presuntivas) na placa de ESIA, selecionou-se cinco para a confirmação e, havendo menos de cinco, selecionou-se todas. Inoculou-se cada colônia selecionada (estrias de esgotamento) em uma placa de Ágar Trypticase de Soja (TSA) e incubou-se a $25\pm 1^{\circ}\text{C}/44-48\text{h}$. Após incubação, verificou-se a presença de colônias típicas (amarelas). Em caso positivo, selecionou-se uma colônia amarela para a confirmação pelo kit API 20E (BioMérieux).

A composição das alíquotas foi realizada após a incubação e 1ml de cada frasco de BPW, com a alíquota pré-enriquecida, foi transferido para um mesmo tubo de ensaio estéril. O tubo foi agitado em “vortex” e, então, 0,1ml do BPW composto foi transferido para 10ml de Caldo mLST-V, para continuação do ensaio.

4.2.2 Método ISO/TS 22964 (2006) Modificado

Seguiu-se o mesmo procedimento do método ISO/TS 22964 (2006), com exceção do item c (plaqueamento diferencial), no qual o Ágar de Isolamento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA) foi substituído pelo Ágar Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) da Oxoid, incubado a $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Não havendo colônias típicas no DFI, ou havendo menos de cinco, colônias atípicas foram isoladas em seu lugar.

Da mesma forma, na triagem das culturas em TSA, não havendo colônias típicas, as atípicas foram isoladas em seu lugar. As colônias atípicas também foram submetidas à confirmação, para avaliar com que frequência *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) apresenta características atípicas em DFI (α -glicosidase negativa) ou TSA (sem pigmento amarelo).

4.2.3 Método do Sistema Bax®

a) Primeiro enriquecimento (seletivo). Fracionou-se cada amostra em cinco alíquotas de 100g e homogeneizou-se cada alíquota separadamente, em 900ml de caldo mLST-V (diluição 1:10).

b) Segundo Enriquecimento. Seguiu-se o ensaio de cada alíquota separadamente, transferindo 10 μ l do caldo mLST-V para 500 μ l de caldo BHI, em um tubo de segundo enriquecimento. Os tubos foram incubados por 3 horas a 35-37°C e conservou-se o caldo mLST-V e o caldo BHI sob refrigeração a 4°C até a obtenção dos resultados preliminares.

c) Ensaio no método do Sistema Bax®. Após incubação, procedeu-se o ensaio de PCR seguindo-se as orientações do manual do usuário (DUPONT/QUALICON, 2000).

d) Confirmação dos resultados presuntivos. Inoculou-se as amostras que apresentaram resultado positivo em ESIA e DFI através de plaqueamento em superfície de 0,25ml do caldo mLST-V mantido sob refrigeração. Continuou-se o ensaio conforme o método ISO/TS 22964 (2006) e ISO/TS 22964 (2006) Modificado, item c (plaqueamento

diferencial). O mesmo procedimento foi repetido a partir dos tubos de caldo BHI mantidos sob refrigeração.

As cinco alíquotas de 100g foram analisadas separadamente e, também, compostas depois do primeiro enriquecimento.

A composição das alíquotas, pelo método do Sistema BAX®, foi realizada após a incubação, 1ml de cada frasco de caldo mLST-V, com a alíquota enriquecida, foi transferido para um mesmo tubo de ensaio estéril. O tubo foi agitado em “vortex”, então, 10µl do caldo mLST-V composto foram transferidos para 500µl de caldo BHI, para continuação do ensaio.

4.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP/100g)

A unidade analítica de 500g foi fracionada em cinco alíquotas de 100g, analisadas separadamente para determinação do Número Mais Provável (NMP/100g) de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*). O cálculo do NMP foi feito através da fórmula abaixo (FDA, 1998):

$\text{NMP/g ou ml} = (1/z) \cdot 2,303 \log (t/n)$	<p>z = peso ou volume de amostra por alíquota t = número total de alíquotas inoculadas n = número de alíquotas negativas</p>
---	--

4.4 Avaliação do efeito da refrigeração na sensibilidade dos métodos

A influência da refrigeração sobre a sensibilidade dos três métodos estudados foi avaliada através do armazenamento a 4°C por 96h das bolsas de BPW para o método da ISO/TS 22964 (2006) e de m-LST-V para o método do

Sistema Bax®. Completado o período de estocagem refrigerada, os ensaios foram repetidos de acordo com as metodologias oficiais descritos no item 3.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento e contagem de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) nas amostras analisadas

No total foram analisadas 83 amostras e suas respectivas alíquotas, cujos resultados encontram-se detalhadas no Apêndice 2. considerando os resultados positivos dos 3 métodos utilizado, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) foi isolado em 10 das 83 amostras analisadas (12,05%) (Tabela 4), sendo três de amido de milho (14,28%), uma de fórmula infantil em pó (5,55%), quatro de leite em pó (23,53%) e duas de soja em grãos (33,33%).

Tabela 4. Resultados da presença/ausência de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) nas amostras analisadas, utilizando-se os métodos ISO/TS 22964 (2006), ISO/TS 22964 (2006) modificado e método do Sistema BAX®.

Nº	Alimento	BAX® presuntivo	BAX® confirmado	ISO 22964 (ESIA)	ISO Modificado (DFI)
1	Soja em grãos	+	+	+	+
2	Soja em grãos	+	-	-	-
3	Soja em grãos	-	-	-	+
4	Cacau em pó	+	-	-	-
5	Açúcar líquido	-	-	-	-
6	Amido industrial	-	-	-	-
7	Amido industrial	+	-	-	-
8	Açúcar líquido	+	-	-	-
9	Fórmula infantil em pó	+	-	+	+
10	Fórmula infantil em pó	+	-	-	-
11	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
12	Soja em grãos	-	-	-	-
13	Soja em grãos	-	-	-	-
14	Soja em grãos	-	-	-	-
15	Amido de milho	-	-	-	-
16	Leite em pó integral	-	-	+	+
17	Amido de milho	-	-	-	-
18	Leite em pó integral	+	-	-	-
19	Leite em pó integral	-	-	-	-
20	Amido de milho	-	-	+	-
21	Amido de milho	+	-	-	-
22	Amido industrial	+	-	-	-
23	Amido industrial	+	-	-	-
24	Fórmula infantil em pó	+	-	-	-
25	Fórmula infantil em pó	+	-	-	-

Tabela 4. Continuação

Nº	Alimento	BAX® presuntivo	BAX® confirmado	ISO 22964 (ESIA)	ISO Modificado (DFI)
26	Fórmula infantil em pó	+	-	-	-
27	Amido de milho	-	-	-	-
28	Amido de milho	-	-	-	-
29	Amido de milho	-	-	-	-
30	Amido de milho	-	-	-	-
31	Leite em pó integral	+	+	-	-
32	Leite em pó integral	-	-	+	+
33	Leite em pó integral	-	-	-	-
34	Glicose desidrata de milho com 39% dextrose	-	-	-	-
35	Açúcar de milho 20% dextrose	-	-	-	-
36	Amido de milho	+	-	-	-
37	Amido de milho	-	-	-	-
38	Amido de milho	-	-	-	-
39	Fórmula infantil em pó	+	-	-	-
40	Leite em pó integral	-	-	-	-
41	Leite em pó integral	+	-	-	-
42	Leite em pó integral	-	-	-	-
43	Açúcar refinado	-	-	-	-
44	Açúcar refinado	+	-	-	-
45	Açúcar refinado	-	-	-	-
46	Açúcar refinado	-	-	-	-
47	Açúcar refinado	-	-	-	-
48	Açúcar refinado	-	-	-	-
49	Amido de milho	-	-	-	-
50	Amido de milho	-	-	-	-
51	Fórmula infantil em pó	+	-	-	-
52	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
53	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
54	Amido de milho	-	-	NR	NR
55	Amido de milho	-	-	-	-
56	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
57	Fórmula infantil em pó	+	-	-	-
58	Leite em pó integral	+	-	-	-
59	Amido de milho	+	+	+	+
60	Amido de milho	+	+	+	+
61	Açúcar refinado	-	-	-	-
62	Açúcar refinado	-	-	-	-
63	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
64	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
65	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
66	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
67	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
68	Fórmula infantil em pó	-	-	-	-
69	Açúcar refinado	-	-	-	-
70	Açúcar extra fino	-	-	-	-

Tabela 4. Continuação

Nº	Alimento	BAX® presuntivo	BAX® confirmado	ISO 22964 (ESIA)	ISO Modificado (DFI)
71	Açúcar refinado	-	-	-	-
72	Açúcar refinado	-	-	-	-
73	Açúcar refinado	-	-	-	-
74	Açúcar cristal	-	-	-	-
75	Açúcar refinado	+	-	-	-
76	Açúcar refinado	-	-	-	-
77	Leite em pó integral	-	-	-	-
78	Leite em pó	-	-	-	-
79	Leite em pó	+	-	+	+
80	Leite em pó	-	-	-	-
81	Leite em pó	-	-	-	-
82	Leite em pó integral	+	-	-	-
83	Leite em pó integral	+	-	-	-

NR=não realizado

A contagem encontrada nas amostras positivas (Tabela 5) foi muito baixa, variando de <0,22 a >1,61/100g. Esses valores estão próximos aos relatados na literatura (MUYTJENS, ROELOFS-WILLEMSE e JASPAR, 1988, OONAKA et al. 2010), para fórmulas infantis, incluindo as envolvidas em infecções neonatais por *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

Tabela 5. Número Mais Provável de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em 100g de amostra.

Amostra	Código da Amostra	NMP/100g
Soja em grãos	2496/07	0,92
Soja em grãos	2498/07	<0,22*
Fórmula infantil em pó	3890/07	0,22
Leite em pó	4269/07	0,22
Amido de milho	4273/07	<0,22*
Leite em pó	5850/07	0,22
Leite em pó	5851/07	0,22
Amido de milho	5685/08	1,61
Amido de milho	5686/08	>1,61
Leite em pó	12107/08	0,22

*Não detectado nas alíquotas de 100g, mas presente na amostra composta.

Em trabalhos anteriores, Santos et al. (2006), analisaram fórmula infantil e amido e verificaram que *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) esteve presente em 28,57% de formulações infantis para prematuros, crianças de 0 a 6 meses (1ª idade) e 6 meses a 1 ano (2ª idade) analisadas. Em termos quantitativos os valores encontrados nos produtos (fórmula e amido) variaram de 0,22 a 1,61NMP/100g.

Oonaka et al. (2010) analisaram um total de 149 amostras de fórmula infantil em pó, sendo 61 de produção doméstica (Japão) e 88 importadas, utilizando alíquota de 333g por amostra. Enterobactérias foram isoladas de 36 amostras (24,2%) e destas 9 (6,0%) foram positivas para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), sendo 4 de amostras domésticas e 5 de importadas e a contagem foi de 0,36 a 0,91NMP/100g.

Palcich et al. (2009) analisaram um total 186 amostras de fórmula infantil em pó para crianças de 0 a 6 meses, utilizando alíquota de 333g através da técnica de NMP, além de 256 amostras de diferentes fontes como fórmula infantil reconstituída, ambientes das cozinhas, água, mamadeiras, utensílios e mãos dos manipuladores de Hospitais da cidade de São Paulo. A contagem de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) e Enterobactérias detectada nas fórmulas em pó foi <0,03NMP/100g e <5UFC/100g, respectivamente. Somente uma amostra apresentou contagem em torno de 5UFC/100g para enterobactérias e em uma foi verificada 0,3UFC/100g de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), indicando a baixa incidência do micro-organismo nesses produtos. Nas demais 256 amostras foi detectada a presença de enterobactérias e *Cronobacter* spp (*Enterobacter*

sakazakii) em 2 amostras (resíduos de mamadeira e esponja). Nesse estudo, os autores observaram práticas que poderiam trazer riscos como a manutenção das fórmulas infantis reconstituídas em temperatura ambiente por até 4 horas, favorecendo o crescimento de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

De acordo com a FAO/WHO (2004) mesmo os baixos níveis de contaminação por esse micro-organismo em fórmulas infantis em pó são considerados um fator de risco significativo, pelo seu potencial de multiplicação durante a preparação e tempo de espera sob condições favoráveis para seu desenvolvimento antes do consumo da fórmula infantil reconstituída.

Para Kandhai et al. (2010) a quantificação da taxa de sobrevivência de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em fórmula infantil em pó pode fornecer dados úteis para avaliação de risco, através da determinação de prováveis níveis de contaminação neste tipo de produto durante armazenamento.

Para Palcich et al. (2009), apesar da baixa ocorrência do patógeno nas amostras analisadas e o baixo número de enterobactérias encontrado nas cozinhas de preparação de alimentos lácteos, os procedimentos higiênicos e as práticas de preparação das fórmulas infantis utilizadas nas seções de neonatais, no Brasil, necessitam de melhorias.

Gurtler e Beuchat (2007) em seus estudos relataram que *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) com uma população inicial de 0,02UFC/ml pode aumentar sua população em ≥ 1 log UFC/ml em fórmula infantil reconstituída entre 12, 21, e 30°C em 48, 12 e 8h, respectivamente. Com 0,53UFC/ml, o patógeno pode aumentar sua população acima de 1 logUFC/ml na fórmula infantil

reconstituída entre 12 e 21°C após 24 e 8h, respectivamente. Um aumento superior a 3 logUFC/ml pode ser observado após exposição a 30° C/8h. Segundo esses autores a população inicial de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) de 0,02 e 0,53UFC/ml sobrevive por até 72h a 4°C e se desenvolve em temperatura superior a 12°C.

Junqueira et al. (2008) determinaram o tempo de desenvolvimento de cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) isoladas de amido, fórmula infantil em pó e grão de soja em mamadeiras armazenadas a temperaturas de 4°C, 10°C e 35°C. Observaram que a 35°C, na primeira hora de armazenamento, houve multiplicação do micro-organismo e essa multiplicação continuou aumentando um ciclo logarítmico a cada hora. A 10°C o micro-organismo permaneceu sem multiplicação até 36 horas de armazenamento, apresentando uma discreta multiplicação entre 36 e 48 horas de armazenamento, indicando que essa temperatura não é segura para impedir completamente a multiplicação de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*). Porém, a 4°C não foi observado crescimento das cepas isoladas de amido e fórmula infantil em pó, demonstrando que o armazenamento de mamadeiras preparadas a temperaturas de 4°C não representa risco de multiplicação. Contudo, o período de armazenamento não deve se prolongar além de 24 horas, visto que a cepa isolada de grão de soja foi capaz de multiplicar-se no intervalo entre 36 e 48 horas.

Chap et al. (2008) analisaram 318 amostras de 7 países, utilizando uma alíquota de 25g, sendo 136 de fórmulas infantis em pó, 179 de outros produtos infantis e 3 amostras de chá de ervas. *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*)

foi isolado de 1 amostra de fórmula infantil (1%) e de 22 (12%) de outros produtos infantis, não sendo detectado nas amostras de chá de ervas.

Muytjens Roelofs-Willemse e Jaspar (1988) analisaram 141 amostras de fórmulas infantis em pó, originadas de 28 países. Membros da família Enterobacteriaceae estiveram presentes em 52,5% das amostras. As espécies mais frequentemente isoladas foram *Enterobacter agglomerans* (em 35 amostras), *Enterobacter cloacae* (em 30 amostras), *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) (em 20 amostras) e *Klebsiella pneumoniae* (em 13 amostras). A contagem desses micro-organismos foi menor que 1UFC/100g em 78% das amostras e as maiores contagens observadas foram de 92UFC/100g para *E. cloacae* e 66UFC/100g para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

A FAO/WHO (2004) destaca que vários ingredientes usados na formulação de alimentos infantis (leite em pó, amido, lactose, sacarose, lecitina, vitaminas) apresentam alto risco de conter enterobactérias (amido, por exemplo), enquanto outros não (óleos, por exemplo).

Para Vargas-Leguás et al. (2009) deve ser aplicado um protocolo com lavagem das mãos dos manipuladores, limpeza e desinfecção das superfícies, temperatura da sala de preparação $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Além do uso de água estéril para evitar a proliferação de micro-organismos patogênicos como *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) e outras enterobactérias e evitar a contaminação externa por outros micro-organismos causadores de doenças durante a reconstituição da fórmula infantil em pó.

5.2 Comparação dos meios ESIA e DFI no protocolo de ensaio ISO/TS 22964 (2006)

Os resultados da comparação do desempenho dos meios diferenciais, ESIA e DFI, utilizados para identificação de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) segundo o protocolo de ensaio ISO/TS 22964 (2006) encontram-se na Tabela 6.

Do total de 83 amostras analisadas, em 81 (97,59%) foi observada concordância entre os resultados obtidos com os dois meios. Em duas amostras (2,41%) foi observado discordância, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) foi detectado no Agar DFI, mas não no ESIA.

Tabela 6. Resultados da detecção de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) nas amostras e alíquotas analisadas pelo método ISO/TS 22964 (2006), usando o ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) e o DFI (Druggan-Forsythe-Iversen Agar) para isolamento de colônias presuntivas.

Resultados por amostra			Resultados por alíquotas		
Alimento	ESIA	DFI	Alíquota	ESIA	DFI
Soja em grãos	+	+	4 ^a	+	-
			composta	+	+
Soja em grãos	-	+	composta	-	+
Fórmula infantil em pó	+	+	4 ^a	+	+
			composta	+	+
Leite em pó integral	+	+	4 ^a	+	+
Amido de milho	+	+	composta	+	+
			5 ^a	-	+
Leite em pó integral	+	+	2 ^a	+	+
			composta	+	+
			3 ^a	+	+
Amido de milho	+	+	4 ^a	+	+
			5 ^a	+	-
			composta	+	+
			1 ^a	+	+
Amido de milho	+	+	2 ^a	+	+
			3 ^a	+	+
			4 ^a	+	+
			5 ^a	-	+
			composta	+	+
Leite em pó	+	+	3 ^a	-	+
			composta	+	-
Demais amostras(73)	-	-	Demais alíquotas (464)	-	-
Total positivas	08	10	Total positivas	18	19
Total negativas	75	73	Total negativas	468	467

Considerando o total de 486 alíquotas analisadas, em 479 (98,6%) foi observado concordância entre os resultados obtidos com os dois meios. Em sete amostras (1,4%) foi observado discordância, sendo que quatro amostras foram no ágar DFI e negativas no ESIA e três foram negativas no DFI e positivas no ESIA. Com base nesses resultados, o DFI pode substituir o ESIA com sucesso, no protocolo de ensaio da ISO/TS 22964 (2006).

Iversen e Forsythe (2007), trabalhando com 177 culturas puras de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), isoladas de fontes clínicas, ambientais e de alimentos, também observaram pouca diferença no desempenho dos dois meios, 99% das cepas desenvolveram-se no DFI e 96% no ESIA. Iversen et al. (2007b) avaliando 210 cepas deste patógeno isoladas das mesmas fontes, encontraram uma cepa incapaz de crescer nos dois meios e 4,3% dos isolados não se desenvolveram no ESIA. Segundo Iversen et al. (2008a), a sensibilidade e a especificidade desses dois meios são muito próximas.

5.3 Avaliação do método Sistema BAX®

5.3.1. Confirmação cultural dos resultados do método do Sistema Bax®

Os dados da comparação dos resultados do método Sistema BAX® com os confirmados culturalmente encontram-se na Tabela 7. Apenas as amostras positivas no método Sistema Bax® foram submetidas à confirmação cultural, a partir dos caldos de primeiro ou segundo enriquecimento do método do Sistema BAX® (mLST-V ou BHI, estriados no ESIA ou DFI).

Tabela 7. Resultados da confirmação cultural de amostras de alimentos positivas para *Cronobacter spp* (*Enterobacter sakazakii*) no método Sistema BAX®.

Código da Amostra	Nº de alíquotas presuntivas no método Bax®	Nº de alíquotas Confirmadas no ESIA	Nº de alíquotas Confirmadas no DFI
Soja em grãos	4	3	3
Soja em grãos	1	0	0
Cacau em pó	1	0	0
Amido industrial	1	0	0
Açúcar líquido	1	0	0
Fórmula infantil em pó	2	0*	0*
Fórmula infantil em pó	1	0	0
Leite em pó integral	1	0*	0*
Leite em pó integral	5	0	0
Amido de milho	6	0	0*
Amido industrial	1	0	0
Amido industrial	1	0	0
Fórmula infantil em pó	1	0	0
Fórmula infantil em pó	3	0	0
Fórmula infantil em pó	1	0	0
Leite em pó integral	1	1	0
Leite em pó integral	5	0	0
Amido de milho	6	0	0
Fórmula infantil em pó	3	0	0
Leite em pó integral	5	0	0
Açúcar refinado	1	0	0
Fórmula infantil em pó	1	0	0
Fórmula infantil em pó	2	0	0
Leite em pó integral	2	0	0
Amido de milho	3	3	3
Amido de milho	5	4	4
Açúcar refinado	1	0	0
Leite em pó	5	0*	0*
Leite em pó integral	5	0	0
Leite em pó integral	3	0	0
Demais (53)	0	não determinado	não determinado

*A presença de *Cronobacter spp* (*E. sakazakii*) nessa amostra foi confirmada através do método ISO/TS 22964 (2006).

**Em quatro amostras *E. sakazakii* não foi isolado a partir dos caldos de primeiro ou segundo enriquecimento do método do Sistema BAX®, mas foi detectado pelo método ISO, confirmando o resultado positivo do PCR.

Considerando o resultado por amostras (unidade analítica de 500g), o método do Sistema BAX® sinalizou a presença de *Cronobacter spp* (*Enterobacter sakazakii*) em 36,14% (30/83) das amostras analisadas. Entretanto, em apenas 13,33% (4/30) dessas amostras *Cronobacter spp* (*Enterobacter sakazakii*) foi isolado culturalmente, a partir dos caldos de primeiro ou segundo enriquecimento do método Sistema BAX®. Em 13,33% (4/30) não foi confirmado o isolado

sinalizado pelo método do Sistema BAX® através do método cultural, mas encontrado no método ISO/TS 22964 (2006), o que confirmou o resultado positivo da sinalização do método do Sistema Bax®.

Assim, observou-se uma alta taxa de resultados presuntivos positivos pelo método do Sistema BAX®, que não foram confirmados culturalmente. Considerando-se as quatro amostras confirmadas a partir dos caldos de 1º ou 2º enriquecimento do método do Sistema BAX® e quatro confirmadas pelo método ISO/TS 22964 (2006), temos oito amostras confirmadas em 30 (26,67%) e 22 (73,33%) não confirmadas.

Witthuhn, Kemp e Britz (2006) em seus estudos confirmaram a amplificação bem sucedida de PCR em cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) isoladas de fórmulas infantis e outros produtos alimentícios para bebês do Sul da África. Esses mesmos autores relataram que das 22 amostras de fórmulas infantis 4 (18%) foram detectadas pelo método de PCR, após serem enriquecidas em Enterobacteriaceae Enrichment Broth (EEB). O enriquecimento dos produtos infantis foi fundamental para que o microrganismo se multiplicasse, pois o nível de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) nessas amostras estava baixo antes do enriquecimento, $\leq 9,0 \times 10^2$ UFC/g, após o enriquecimento esses valores subiram para $\leq 5,8 \times 10^8$ UFC/g e dessa maneira foi possível detectar pelo método de PCR.

Proudy et al. (2008) relatam que a validação de métodos rápidos é necessária para identificar o mais cedo possível cepas responsáveis por surtos. Para eles técnicas de genotipagem fornecem vantagens pela rapidez e facilidade de interpretação.

Fricker-Feer et al. (2011) em seus estudos mostra que kits específicos e com bom desempenho baseado em PCR em tempo real para detecção de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em fórmula infantil em pó estão disponíveis comercialmente, e que podem ajudar a reduzir o risco nas fórmulas infantis contaminadas.

5.3.2 Comparação dos resultados do método do Sistema BAX® e do método ISO/TS 22964 (2006)

A comparação dos resultados confirmados do método do Sistema BAX® com os resultados do método ISO/TS 22964 (2006) encontram-se na Tabela 8. Nessa comparação, foi considerado o protocolo completo do método do Sistema BAX®, ou seja, apenas o resultado da sinalização do método do Sistema Bax® quando negativo ou o resultado da confirmação cultural, quando positivo.

Tabela 8. Comparação dos resultados do método do Sistema BAX® com os resultados do método ISO/TS 22964 (2006).

Alimento	Nº de alíquotas positivas no método do Sistema Bax®			Nº de alíquotas positivas no método ISO/TS 22964/2006	
	PCR	Confirmadas no ESIA	Confirmadas no DFI	Usando ESIA	Usando DFI
Soja em grãos	4	3	3	2	1
Soja em grãos	0	0	0	0	1
Fórmula infantil em pó	2	0	0	2	2
Leite em pó integral	1	0	0	1	1
Amido de milho	0	0	0	1	0
Amido de milho	6	0	0	0	1
Leite em pó integral	1	1	0	0	0
Leite em pó integral	0	0	0	2	2
Amido de milho	3	3	3	4	3
Amido de milho	5	4	4	6	6
Leite em pó	5	0	0	1	1
Leite em pó integral	5	0	0	0	0
Leite em pó integral	3	0	0	0	0
Demais (70)	0	não determinado	não determinado	0	0

Considerando o total de 83 amostras analisadas, em 73 (87,95%) foi observada concordância entre os resultados obtidos pelo método ISO/TS 22964 (2006) (usando o ESIA e/ou o DFI) e o método do Sistema BAX®, sendo três positivas e 70 negativas.

Em oito amostras (10%) foi observada discordância. Em uma amostra (5850/07) *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) foi detectado no método do Sistema BAX® mas não na ISO/TS 22964 (2006). Em três amostras, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) foi detectado no método ISO/TS 22964 (2006), mas não sinalizado no método do Sistema BAX®. Em quatro foi detectado no método ISO/TS 22964 (2006) e sinalizado como positivo no método do sistema Bax®, mas não foi confirmado pelo método cultural.

Assim, de 13 amostras positivas no total, em sete (53,85%) *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) não foi detectado pelo método do Sistema BAX®, sendo três (23,05%) negativas na etapa presuntiva do método e quatro (30,8%) na confirmação.

Esses resultados corroboram a conclusão anterior, de que a confirmação cultural usando o protocolo do método do Sistema BAX® é menos produtiva do que o protocolo da ISO/TS 22964 (2006), e também demonstraram uma alta taxa de falsos resultados negativos no próprio método do Sistema BAX®.

Iversen et al. (2008a) destacam que várias cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) não crescem bem no caldo mLST-V, outras poucas cepas são incapazes de crescerem a 44°C e que amostras contendo apenas essas cepas apresentariam falsos resultados negativos, quando enriquecidas nesse meio. O protocolo do método do Sistema BAX® parte do enriquecimento seletivo

das amostras em mLST-V, enquanto o protocolo ISO/TS22964 (2006) inclui uma etapa de pré enriquecimento não seletivo em BPW. De acordo com Derzelle et al (2007) o enriquecimento em BPW a 37°C favorece o crescimento de células injuriadas. A heterogeneidade das cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) presentes nas amostras e a diferença nos protocolos de ensaio (ISO/TS 22966/2006 e Sistema Bax®) pode ter provocado uma maior incidência de falsos negativos observados nesse trabalho.

Derzelle et al. (2007), analisaram amostras do ambiente de fábricas de fórmulas infantis (ingredientes de mistura em pó, ambiente e equipamento de processamento e produtos acabados) com alíquota de 25g (18 amostras), 50g (19 amostras) e 10g (1 amostra) e encontraram discrepâncias entre os resultados do método do Sistema BAX® e da ISO/IDF (TS 22964:2006). Em seus estudos eles avaliaram 38 amostras, 22 (9:50g, 12:25g e 1:10g) foram positivas para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) utilizando o método do Sistema Bax®, porém 6 desses resultados (3 positivos e 3 negativos) não foram concordantes com o método da ISO/IDF (TS 22964:2006). Na conclusão dos autores, o baixo nível de contaminação e a amostragem foram as causas das diferenças.

Derzelle, Dilasser (2006) avaliaram 41 amostras contaminadas naturalmente, incluindo fórmula infantil, amostras de ambiente de fabricação de fórmula infantil, usando 2 métodos paralelamente, método cultural da ISO e PCR real-time, usando porções de 25g em duplicata para cada amostra. Das 41 amostras analisadas, 23 foram positivas para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), porém o método cultural da ISO/IDF identificou 22 amostras como positivas e o método PCR real-time identificou 23 amostras, indicando 97,5% de

concordância entre ambos os métodos testados. Os autores relataram ainda que a definição dos valores da amostra discordante entre os métodos testados foram baseados em uma curva padrão ficando em torno de 10^3 a 10^4 UFC/ml no final das etapas de crescimento dos dois meios de enriquecimento (BPW e mLST-V). Entretanto quando testado após um único enriquecimento de 18h em BPW, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) não foi detectado pelo método real-time PCR em contraste com as 22 amostras positivas por ambos os métodos indicando que o crescimento do micro-organismo ocorreu realmente durante o segundo enriquecimento, assim não seria possível sua identificação pelo método real-time antes de dois dias de incubação, concluindo que células injuriadas e estressadas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em fórmulas infantis e em ambientes fabris são plausíveis. Os dados em conjunto sugeriram que a amostra detectada pelo real-time PCR não foi um resultado falso positivo, indicando que o ensaio PCR real-time foi altamente sensível quando comparado com o método cultural convencional.

5.4 Composição de alíquotas

O objetivo da análise das alíquotas compostas foi tornar a quantificação (NMP) de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) mais econômica, isto é, apenas quando a amostra composta indicasse a presença de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), os ensaios seriam repetidos com as alíquotas individuais, mantidas sob refrigeração.

Nesse sentido, duas situações foram avaliadas para demonstrar: 1º) se a composição não reduziria a sensibilidade dos métodos e 2º) se a refrigeração do

caldo enriquecido, até a obtenção do resultado da amostra composta, não comprometeria a detecção.

5.4.1 Efeito da composição na sensibilidade do método ISO/TS 22964(2006)

Os resultados da comparação entre a análise das cinco alíquotas de 100g e a análise da amostra composta no método ISO/TS 22964 (2006), usando o ESIA e o DFI, encontram-se na Tabela 9.

Usando o ESIA como meio de plaqueamento, em seis amostras foi encontrada pelo menos uma alíquota positiva, dentre as cinco de 100g analisadas. Em cinco dessas seis amostras (83%) o resultado da composta foi concordante, apresentando também resultado positivo. Em uma amostra (17%) houve discordância, que apresentou uma alíquota positiva porém o resultado da composta foi negativo.

Tabela 9. Resultados da comparação entre a análise das cinco alíquotas de 100g e a análise da amostra composta no método ISO/TS 22964 (2006), usando o ESIA e o DFI.

Código da Amostra	Resultados do ESIA		Resultados do DFI	
	Nº de alíquotas positivas	Amostra composta	Nº de alíquotas positivas	Amostra composta
Soja em grãos	1	+	0	+
Soja em grãos	0	-	0	+
Fórmula infantil em pó	1	+	1	+
Leite em pó integral	1	-	1	-
Amido de milho	0	+	0	-
Amido de milho	0	-	1	-
Leite em pó integral	1	+	1	+
Amido de milho	3	+	2	+
Amido de milho	5	+	5	+
Leite em pó	0	+	1	-
Demais (73)	0	-	0	-

Nas demais 77 amostras, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) não foi detectado em qualquer das cinco alíquotas de 100g analisadas. Em 75 (97,4%) o

resultado da composta foi concordante, apresentando também resultado negativo. Em duas amostras (2,6%) houve discordância, as amostras, que não apresentaram alíquotas positivas, mas o resultado da composta foi positivo.

Usando o DFI como meio de plaqueamento, em sete amostras foi encontrada pelo menos uma alíquota positiva, dentre as cinco de 100g analisadas. Em quatro dessas sete amostras (57%) o resultado da composta foi concordante, apresentando também resultado positivo. Em três amostras (43%) houve discordância, as amostras, que apresentaram uma alíquota positiva, mas o resultado da composta foi negativo.

Nas demais 76 amostras, *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) não foi detectado em qualquer das cinco alíquotas de 100g analisadas. Em 74 (97,4%) o resultado da composta foi concordante, apresentando também resultado negativo. Em duas amostras (2,6%) houve discordância, as amostras, que não apresentaram alíquotas positivas, mas o resultado da composta foi positivo.

E dessa maneira, verificou-se que a análise de amostra composta foi produtiva, aumentando o número de amostras positivas detectadas. Porém, não achamos recomendável substituir a análise das alíquotas pela análise de amostra composta, porque houve uma porcentagem relevante (43%) de amostras em que o resultado foi negativo.

5.4.2 Efeito da composição das amostras na sensibilidade do método do Sistema BAX®

Os resultados da comparação entre a análise das cinco alíquotas de 100g e a análise de amostra composta pelo método do Sistema BAX® encontram-se no Tabela 10.

No total de 83 amostras analisadas, o método do Sistema BAX® sinalizou 15 amostras compostas como positivas, das quais três foram confirmadas culturalmente no protocolo do método do Sistema Bax® e três confirmadas no método ISO/TS 22964 (2006). Então, 60% (9/15) das amostras compostas sinalizadas pelo método do Sistema Bax® não foram confirmadas culturalmente, uma taxa de falso positivo muito elevado, embora menor do que a obtida com as alíquotas (73,33%) individualmente.

Ainda no total de 83 amostras analisadas, o método do Sistema Bax® sinalizou 67 amostras compostas como negativas, das quais uma teve pelo menos uma alíquota confirmada culturalmente no protocolo do método do Sistema Bax® e duas confirmadas no método ISO/TS 22964 (2006). Então, 4,5% (3/67) das amostras compostas não sinalizadas pelo método do Sistema Bax® foram confirmadas culturalmente, uma taxa de falso negativo muito alta para o uso da composta em lugar das alíquotas.

Tabela 10. Resultados da comparação entre a análise das cinco alíquotas de 100g e a análise de amostra composta pelo método Sistema BAX®.

Código da Amostra	Resultado do PCR		Confirmação no ESIA		Confirmação no DFI	
	Nº de alíquotas positivas	Amostra composta	Nº de alíquotas positivas	Resultado composta	Nº de alíquotas positivas	Resultado composta
Soja em grãos	3	+	2	+	3	-
Soja em grãos	1	-	0	/	0	/
Cacau em pó	1	-	0	/	0	/
Amido industrial	1	-	0	/	0	/
Açúcar líquido	1	ND	0	/	/	/
Fórmula infantil em pó	1	+	0 (*1)	-	0 (*1)	-
Fórmula infantil em pó	0	+	0	-	0	-
Leite em pó integral	1	-	0 (*1)	/	0 (*1)	/
Leite em pó integral	5	+	0	-	0	-
Amido de milho	5	+	0	-	0 (*1)	-
Amido industrial	1	-	0	/	0	/
Amido industrial	1	-	0	/	0	/
Fórmula infantil em pó	1	-	0	/	0	/
Fórmula infantil em pó	2	+	0	-	0	-
Fórmula infantil em pó	1	-	0	/	0	/
Leite em pó	1	-	1	/	0	/
Leite em pó	4	+	0	-	0	-
Amido de milho	5	+	0	-	0	-
Fórmula infantil em pó	3	-	0	/	0	/
Leite em pó integral	4	+	0	-	0	-
Açúcar refinado	1	-	0	/	0	/
Fórmula infantil em pó	1	-	0	/	0	/
Fórmula infantil em pó	1	+	0	-	0	-
Leite em pó integral	1	+	0	-	0	-
Amido de milho	2	+	2	+	2	+
Amido de milho	4	+	3	+	3	+
Açúcar refinado	1	-	0	/	0	/
Leite em pó	4	+	0 (*1)	-	0 (*1)	-
Leite em pó integral	5	+	0	0	0	0
Leite em pó integral	3	-	0	/	0	/
Demais (53)	0	-	0	/	0	/

*Resultado confirmado no método ISO. ND= Não Determinado, /=sem confirmação porque não houve alíquota positiva ou amostra composta

5.4.3 Efeito da Refrigeração do Caldo de Enriquecimento na Detecção de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*)

Para avaliar esse efeito, as bolsas com as alíquotas individuais foram refrigeradas pelo tempo mínimo necessário à obtenção de um resultado positivo na amostra composta (96h). Os ensaios foram feitos até a etapa de isolamento das cepas, mas não foi possível concluir a identificação.

5.5 Características das Cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) Isoladas

As características das cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) isoladas no ESIA e DFI encontram-se na Tabela 11.

No total, foram isoladas 41 culturas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), a partir das amostras positivas, cujas características encontram-se sumariadas na Tabela 11. Dessas, 30 (73%) apresentaram produção de α -glicosidase no ESIA ou DFI e 33 (81%) apresentaram pigmentação amarela no TSA (22 com pigmentação intensa e 11 com pigmentação leve).

No total de 10 amostras positivas para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em 04 (40%) só foram detectadas cepas atípicas (α -glicosidase negativas) no ESIA e/ou no DFI (amostras 01, 03, 20 e 21). Em duas (amostra 01 e 20), as cepas isoladas também não apresentaram pigmentação amarela.

A ocorrência de cepas α -glicosidase negativas ou não pigmentadas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) já foi relatada na literatura por Iversen, Forsythe (2007), que, trabalhando com 177 culturas puras de *Cronobacter* spp

(*Enterobacter sakazakii*), observaram 4,6% das cepas atípicas no DFI, 2,3% atípicas no ESIA e 2% não produtoras de pigmento amarelo no TSA.

Tabela 11. Características das cepas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) isoladas no ESIA e DFI.

Cepa n°	Amostra	Alíquota	Meio	α -glicosidase	Pigmento amarelo
1.	01	4	ESIA	-	+
2.	01	composta	ESIA	-	-
3.	01	composta	ESIA	-	-
4.	01	composta	ESIA	-	-
5.	01	composta	ESIA	-	-
6.	01	composta	DFI	-	+
7.	03	composta	DFI	-	+
8.	03	composta	DFI	-	+
9.	09	4	ESIA	+	+
10.	09	4	DFI	+	+
11.	09	composta	ESIA	+	+
12.	09	composta	DFI	+	+
13.	16	4	ESIA	+	leve
14.	16	4	DFI	+	leve
15.	20	composta	ESIA	-	-
16.	20	composta	ESIA	-	-
17.	21	5	DFI	-	leve
18.	32	2	ESIA	+	+
19.	32	2	DFI	+	+
20.	32	composta	ESIA	+	+
21.	32	composta	DFI	+	+
22.	59	3	ESIA	+	+
23.	59	3	DFI	+	+
24.	59	4	ESIA	+	+
25.	59	4	DFI	+	+
26.	59	5	ESIA	+	-
27.	59	composta	ESIA	+	+
28.	59	composta	DFI	+	-
29.	60	1	ESIA	+	+
30.	60	1	DFI	+	+
31.	60	2	ESIA	+	leve
32.	60	2	DFI	+	leve
33.	60	3	ESIA	+	leve
34.	60	3	DFI	+	leve
35.	60	4	ESIA	+	leve
36.	60	4	DFI	+	leve
37.	60	5	DFI	+	leve
38.	60	composta	ESIA	+	leve
39.	60	composta	DFI	+	leve
40.	79	3	DFI	+	+
41.	79	composta	ESIA	+	+

Mofokeng et al. (2011) trabalhando com 34 isolados de alimentos como leite cru, fórmula infantil em pó, carne e outros, verificaram que duas cepas foram negativas para a enzima α -glicosidase, usando o meio de cultura DFI.

Iversen et al. (2006), trabalhando com 189 culturas α -glicosidase positivas de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), observaram 2% das cepas não produtoras de pigmento amarelo em TSA. Na descrição das espécies do novo gênero *Cronobacter* spp, Iversen et al. (2008b) relatam *Cronobacter muytjensii* como α -glicosidase negativo (mais de 90% das cepas) e as demais espécies como positivas (mais de 90% das cepas). Para Oh e Kang (2004) a atividade da α -glicosidase não é única para *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

5.6. Outras enterobactérias α -glicosidase positivas isoladas

Em algumas amostras foram encontradas outras cepas α -glicosidase positivas não confirmadas como *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*). Os perfis API 20E dessas cepas encontram-se na Tabela 12.

Essas cepas foram agrupadas em oito perfis API 20E, identificados pelas chaves de identificação como *Serratia ficaria*, *Pantoea* sp., *Raoultella ornithinolytica* e *Enterobacter cloacae*. As cepas de *Serratia ficaria* apresentaram pigmentação amarela intensa em TSA e foram isoladas apenas no DFI. Lehner et al. (2006) também observaram que *S. ficaria* produz colônias típicas no DFI, mas não no ESIA. As cepas de *Raoultella ornithinolytica* apresentaram pigmentação amarela intensa ou leve em TSA e a identificação foi considerada duvidosa. As cepas de *Pantoea* spp apresentaram pigmentação amarela positiva, negativa ou

leve. Em dois perfis a identificação foi considerada boa, mas em outros dois foi considerada incorreta ou de baixa discriminação. As cepas de *E. cloacae* foram isoladas no ESIA e no DFI, apresentando pigmentação levemente amarela ou negativa. A chave de identificação do API 20E considerou a identidade dessas cepas duvidosa ou confiável apenas em nível de gênero, apresentando a possibilidade de que sejam *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

Iversen et al. (2008a) recomendam precaução ao interpretar os resultados de galerias de testes bioquímicos como o API 20E, porque as chaves de identificação ainda não incorporaram as mudanças na taxonomia de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

Tabela 12. Perfil API 20E de isolados α -glicosidase positivas isoladas das amostras, mas não confirmadas como *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*).

Amostra	Meio de isolamento	α -glicosidase	Pigmento amarelo	Identidade*
20, 21	ESIA e DFI	+	+ ou -	<i>Pantoea</i> sp 64%, <i>Escherichia vulneris</i> 14,6% identificação incorreta
20, 21	ESIA e DFI	+	+ ou -	<i>Pantoea</i> sp 68%, <i>Rahnella aquatilis</i> 19,9% baixa discriminação
20, 21	ESIA e DFI	+	leve ou -	<i>Pantoea</i> sp 95,1% boa identificação
20	ESIA	+	leve	<i>Pantoea</i> sp 95,3% boa identificação
60	ESIA	+	leve	<i>Enterobacter cloacae</i> 69%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 18,7% perfil duvidoso
59	DFI	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
14	ESIA e DFI	+	+ ou leve	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 84,1% perfil duvidoso
2	DFI	+	+	<i>Serratia ficaria</i> 96,1% boa identificação

Várias outras cepas de enterobactérias α -glicosidase negativas, mas pigmentadas de amarelo foram isoladas, apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Perfil API 20E dos isolados de enterobactérias α -glicosidase negativas pigmentadas de amarelo isoladas das amostras.

Amostra	Meio de isolamento	α -glicosidase	Pigmento amarelo	Identidade
6	ESIA e DFI	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i> 66,4%, boa identificação no gênero
1, 2	ESIA e DFI	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
2	ESIA	-	+	<i>Enterobacter cancerogenus</i> 93,9% perfil duvidoso
12	DFI	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 48,1% baixa discriminação
2	DFI	-	+	<i>Pantoea</i> spp 79,8% identificação incorreta
12	ESIA e DFI	-	+	<i>Pantoea</i> spp 42,2%, baixa discriminação
3	DFI	-	+	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 84,1% perfil duvidoso
12	ESIA	-	+	<i>Serratia ficaria</i> 98,9% boa identificação
6	ESIA e DFI	-	+	<i>Serratia rubidae</i> 50%, identificação aceitável no gênero
6	ESIA	-	+	<i>Serratia rubidae</i> 43,8%, baixa discriminação

A maioria dessas cepas apresentou perfil API 20E duvidoso, incorreto, de baixa discriminação ou aceitável apenas no gênero. As identidades mais prováveis apontadas pelas chaves de identificação foram *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* spp, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia ficaria*, *Serratia rubidae*, *Enterobacter cancerogenus* e *Enterobacter cloacae*.

6 CONCLUSÕES

Cronobacter spp (*Enterobacter sakazakii*) foi isolado em 13,25% das amostras analisadas, sendo mais freqüente em grãos de soja (destinada à preparação de bebidas à base de soja), no leite em pó e no amido de milho. Nas fórmulas infantis em pó foi encontrado em 6% das amostras.

Os resultados mostraram que, a pesquisa de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) produtos destinados à alimentação de recém nascidos, deve ser feito com unidade analítica de pelo menos 500g, preferencialmente maior, porque a contagem encontrada nas amostras positivas foi muito baixa (variando de <0,22 a >1,61/100g).

O DFI substituiu o ESIA com sucesso, no protocolo de ensaio da ISO/TS 22964 (2006).

Na confirmação dos resultados positivos do método do Sistema Bax® o protocolo não foi eficiente, deixando de detectar uma porcentagem significativa de amostras positivas. O protocolo da ISO/TS 22964 (2006), que inclui uma primeira etapa de enriquecimento não seletivo, foi mais produtivo, do que o método do Sistema BAX® cujo enriquecimento inicial é feito no caldo seletivo.

No método ISO/TS 22964 (2006), a composição de alíquotas para a análise foi produtiva, aumentando o número de amostras positivas detectadas. Mas também se observou uma porcentagem relevante de amostras positivas em que *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) não foi detectado na composta. Os dados indicaram que, dada à reduzida população de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) nas amostras, é recomendável a análise das cinco

alíquotas de 100g e, também, da composta, para aumentar a probabilidade de isolamento do microrganismo.

No método do Sistema BAX®, a composição de alíquotas reduziu a porcentagem de falsos positivos de 73,33% para 60% das amostras, mas ainda muito alta. Além disso, a taxa de falsos negativos também foi elevada (4,5% das amostras) para ser utilizada na rotina.

O monitoramento da presença de *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*) em produtos destinados à alimentação de recém nascidos, particularmente os prematuros e os de baixo peso corporal, ou seja, grupo de risco deve ser feito em unidade analítica de pelos menos 500g, devido ao baixo nível de contaminação encontrado nos produtos. Para isso, a técnica do NMP no formato de diluição única, usando cinco ou mais alíquotas iguais de 100g é muito mais prático, sensível e econômico, do que o formato de diluição múltipla recomendado pela Food and Drug Administration (FDA), que utiliza uma série de três alíquotas de 100g, três de 10g e três de 1g (unidade analítica de 333g, no total).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKUNTE, A., VALDRAMIDIS, V.P., TIWARI, B.K. SLONE, N., CULLEN, P.J., O DONNELL, C.P., SCANNELL, A. Resistance of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula during ultrasound at controlled temperatures: A quantitative approach on microbial responses. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, n. 1-2, p. 53–59, 2010.

AMALARADJOU., M. A. R., HOAGLAND, T. A., VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 2, p.146-149, 2009.

APARNA, M. S., YADAV, S. Biofilms: microbes and disease: review. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p.526-530, Dec. 2008.

ARKU, B., MULLANE, N., FOX, E., FANNING, S. KIERAN JORDAN, K. *Enterobacter sakazakii* survives spray drying. **International Journal of Dairy Technology** v. 61, n. 1, p. 102-108, February 2008.

BAR-OZ, B., PREMINGER, A., PELEG, O., BLOCK, C., ARAD, I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. **Acta Paediatrica**. v. 90, n. 3, p. 356-358, 2001.

BEUCHAT, L. R, KIM, H., GURTLER, J. B., LIN, L. C., RYU, J. H, GLENNER M. RICHARDS, G. M. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. **International Journal of Food Microbiology** v. 136, n. 2, p.204–213, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998**. Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento, 1998.

BREEUWER, P., LARDEAU, A., PETERZ, M., JOOSTEN, H.M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology** v. 95, n. 5, p.967–973, 2003.

BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science Business Media Inc., 2005.

CAC/RCP 66 **Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children**. p. 1-29, 2008. Disponível em: www.codexalimentarius.net/download/standards/11026/CXP066e.pdf. Acesso em: 07/11/2010.

CHAP, J., JACKSON, P., SIQUEIRA, R., GASPAR, N., QUINTAS, C., PARK, J., OSAILI, T., SHAKER, R., JARADAT, Z., HARTANTYO, S. H. P., SANI, N. A., ESTUNINGSIH, S., FORSYTHE, S. J. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other Cronobacter spp. in follow up formulas and infant foods. **International Journal of Food Microbiology** v. 136, n. 2, p. 185-188, 2008.

CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE. ***Enterobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formulae**. Meeting Report. 31st Session, Geneva, 30 June-4 July, 2008. Disponível em: www.fao.org/ag/AGN/agns/jemra/Sakazaki_FUF_report.pdf. Acesso em: 07/11/2010.

CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE. **Risk Profile of *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula**. 36th session. Washington DC, USA, 29 March-3 April, 2004. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh36/fh04_12e.pdf. Acesso em: 07/11/2010.

DANCER, G. I., MAH, J. H., RHEE, M. S., HWANG, I. G., KANG, D. H. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) to environmental stresses **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1606-1614, 2009.

DERZELLE, S., DILASSER, F., MALADEN, V. *et al.*. Comparison of Three Chromogenic Media and Evaluation of Two Molecular-Based Identification Systems for the Detection of *Enterobacter sakazakii* from Environmental Samples from Infant Formulae Factories. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7. p.1678-1684, 2007.

DERZELLE, S.; DILASSER, F. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formulae. **BMC Microbiology**, v. 6, n.100, 2006.

DRUDY, D., MULLANE, N. R., QUINN, T., WALL, P. G., FANNING, S. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 7, p. 996-1002, April 1, 2006.

DRUGGAN, P., IVERSEN, C. Culture media for the isolation of Cronobacter spp. **International Journal of Food Microbiology** v. 136, n. 2, p-169-178, 2009.

DUPONT/QUALICON. **Manual do Usuário**. Sistema BAX® – Análise em PCR com detecção automatizada, São Paulo, 2000.

EDELSON-MAMMEL, S. G.; FORTEOUS, M. K.; BUCHANAN, R. L. Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula, **Journal of Food protection**, v. 68, n.9, p.1900-1902, 2005.

EL-SHAROUD, W.M., EL-DIN, M.Z., ZIADA, D.M., AHMED, S.F., KLENA, J.D. Surveillance and genotyping of *Enterobacter sakazakii* suggest its potential transmission from milk powder into imitation recombined soft cheese. **Journal of Applied Microbiology** v. 105, n. 2, p. 559–566, 2008.

FARMER III, J. J., ASBURY, M. A., HICKMAN, F. W., BRENNER, D. J., and THE *ENTEROBACTERIACEAE STUDY GROUP*. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.30, n.3, 569-584, 1980.

FAO/WHO: Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Meeting Report: ***Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in Powdered Follow-up Formulae**, October/2008. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_followup.pdf. Acessado em 21/01/2010.

FAO/WHO: Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Guidelines for the safe preparation, storage and handling of powdered infant formula**, 2007. Disponível no site em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf. Acessado em 21/01/2010.

FAO/WHO, Joint FAO/WHO **Workshop on *Enterobacter sakazakii*, and other microorganisms in powdered infant formula**. Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2004. disponível no site: <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en>. Acessado 21/01/2010

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered infant formula in neonatal intensive care units**. 2002b. Disponível em <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/ProductSpecificInformation/InfantFormula/AlertsSafetyInformation/ucm111299.htm>. Acessado em 21 de Janeiro de 2010

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA); CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. **Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula**. 2002a. Disponível no site: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114665.htm>, acessado em: 14/07/2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**. 8. ed. Revisão. A. Arlington: Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1998.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**, São Paulo: Editora Atheneu, 1996, p.182.

FRICKER-FEER, C.; CERNELA, N.; BOLZAN, S.; LEHNER, A.; STEPHAN, R. Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for

detection of Cronobacter species. **International Journal of Food Microbiology**. v.146, n. 2, p. 200-202, 2011.

GRIFFITHS, M. Quorum sensing. In: M. Griffiths. **Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance**. Woodhead July 2005. Cap. 22, p. 580-640.

GURTLER, J. B., BEUCHAT, L. R. Growth of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Infant Formula as Affected by Composition and Temperature. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p.2095–2103, 2007.

GURTLER, J.B., KORNACKI, J.L., BEUCHAT, L.R.,. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 1, p.1–34, 2005.

HEREDIA, N., WESLEY, I., GARCIA, S. Cronobacter Gen. Nov. (Enterobacter) sakazakii: Current knowledge and future considerations. **Microbiology Safe Foods**, p. 667, 2009. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=q2Rfq1ZIWTMC&dq=HEREDIA,+WESLEY+e+GARCIA,+2009%2BEnterobacter+sakazakii&source>. Acesso em: 21/01/2010.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D., 1999. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. 4ª. ed. São Paulo: Varela, 629p.

HUBER, B., RIEDEL, K., HENTZER, M., HEYDORN, A., GOTSCHLICH, A., GIVSKOV, M., MOLIN, S., EBERL, L. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology** v. 147, p. 2517-2528, 2001.

ISO/TS 22964:2006(E). **Milk and milk products: detection of *Enterobacter sakazakii***. The International Organization for Standardization, 2006.

ISO 16140:2003. **Microbiology of food and animal stuffs Protocol for the validation of alternative methods**. 1st ed. The International Organization for Standardization, 2003.

IVERSEN, C.; FANNING, S. Introductory note to the Cronobacter special issue. **International Journal of Food Microbiology** v. 136, n. 2, p. 151, 2009.

IVERSEN, C.; DRUGGAN, P.; SCHUMACHER, S. *et al.*,. Development of a novel screening method for the isolation of “*Cronobacter*” spp (*Enterobacter sakazakii*). **Applied and Environmental Microbiology** v. 74, n.8, p. 2550-2553, 2008a.

IVERSEN, C., MULLANE, N., MCCARDELL, B. *et al.*,. *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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 58, n. 6, p. 1442-1447, 2008b.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S., Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology** v.73, n. 1, p. 48-52, 2007.

IVERSEN, C.; LEHNER, A.; MULLANE, N. *et al.*, Identification of “*Cronobacter*” spp (*Enterobacter sakazakii*). **Journal of Clinical Microbiology** v. 45, n. 11, p. 3814-3816, 2007b.

IVERSEN, C.; LEHNER, A.; MULLANE, N.; BIDLAS, E.; CLEENWERCK, I.; MARUGG, J.; FANNING, S.; STEPHAN, R.; JOOSTEN, H. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. **BMC Evolutionary Biology** v. 7, n. 64, 2007a.

IVERSEN, C.; LANCASHIRE, L; WADDINGTON, M. *et al.*, Identification fo *Enterobacter sakazakii* from closely related species: the use of artificial neural networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. **BMC Microbiology** v. 6, n. 28, 2006.

IVERSEN, C., LANE, M. & FORSYTHE, S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**. v.38, n. 5, p. 378-382, 2004.

IVERSEN, C.; WADDINGTON, M.; ON, S. L. W.; STEPHEN FORSYTHE, S. Identification and Phylogeny of *Enterobacter sakazakii* Relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5368-5370, Nov. 2004.

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, 2003.

JACKS, T. M., WU, B. J. Biochemical Properties of *Escherichia coli* Low-Molecular-Weight, Heat-Stable Enterotoxin. *Infection and Immunity*, v. 9, n. 2, p. 342-347, Feb., 1974.

- HURLEY, J. C. Endotoxemia: Methods of Detection and Clinical Correlates. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 268–292, Apr. 1995.
- KANDHAI, M. C., REIJ, M. W., VAN SCHOTHORST, M., GORRIS, L. G. M., ZWIETERING, M. H. Inactivation rates of *Cronobacter* spp. and selected other bacterial strains in powdered infant Formulae stored at different temperatures. **Journal of Food Protection**, v.73, n. 5, p. 839–848, 2010.
- KIM, H., BANG, J., 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. **Journal of Food Protection**, vol. 71, n.5, p. 940-945, 2008.
- KIM, K. P.; LOESSNER, M. J. *Enterobacter sakazakii* Invasion in Human Intestinal Caco-2 Cells Requires the Host Cell Cytoskeleton and Is Enhanced by Disruption of Tight Junction. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 562–570, feb. 2008.
- KIM, K. P.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M. J. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 195-203, 2007.
- LEHNER, A., NITZSCHE, S., BREEUWER, P. *et al.*, Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. **BMC Microbiology** v. 6, n. 15, February 2006.
- LEHNER, A., RIEDEL, K., EBERL, L., BREEUWER, P., DIEP, B., STEPHAN, R. Biofilm Formation, Extracellular Polysaccharide Production, and Cell-to-Cell Signaling in Various *Enterobacter sakazakii* Strains: Aspects Promoting Environmental Persistence. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 11, p.2287–2294, 2005.
- MOFOKENG, L.; CAWTHORN, D.; WITTHUHN, R. C.; LUCIA E.C.M. ANELICH, E. C. M.; JOOSTE, P. J. Characterization of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) isolated from various south african food sources. *Journal of Food Safety*. v.31, n. 1, p.98-107, 2011.
- MÜRMAN, L., MALLMANN, C. A. DILKIN, P. Temperatura de armazenamento de alimentos em estabelecimentos comerciais na cidade de Santa Maria, RS. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, n. 3, p.309-313, 2005.
- MUYTJENS, H. L., ROELOFS-WILLEMSE, H., JASPAR, G. H. J. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**. v.26, n. 4, p.743-746, 1988.

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J.M., Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. **Journal Medical Microbiology**. v. 48, n. 6, p.559–567, 1999.

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J.M Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, n. 1, p. 9-13. 1997b.

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Journal of Food Protection**. v. 60, n. 3, p. 226-230. 1997a.

NITSCHKE, M., ARAÚJO, L. V., COSTA, S. G. V. A. O., et al., Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. **Letters in Applied Microbiology**. v. 49, n. 2, p. 241–247, 2009.

NORIEGA, F. R., KOTLOFF K. L., MARTIN M. A., SCHWALBE R. S., Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. **Pediatric Infectious Diseases Journal** v. 9, n. 7, p. 447–449, 1990.

O'BRIEN, S., HEALY, B., NEGREDO, C., FANNING, S., IVERSEN, C. Evaluation of a new one-step enrichment in conjunction with a chromogenic medium for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p-1472–1475, 2009.

OH, S. W., KANG, D. H. Fluorogenic Selective and Differential Medium for Isolation of *Enterobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5692–5694, Sept. 2004.

OONAKA, K., FURURATA, K., HARA, M., FUKUYAMA, M. Powder infant formula milk contaminated with *Enterobacter sakazakii*. **Journal Infectious Disease**, v. 63, p. 103-107, 2010.

OSAILI, T.M., SHAKER, R.R., AL-HADDAQ, M.S., AL-NABULSI AND, A.A. HOLLEY, R.A. Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula **Journal of Applied Microbiology** v. 107, n. 3, p. 928–935, 2009.

OSAILI, T.M., SHAKER, R.R., OLAIMAT, A. N., AL-NABULSI AND, A.A. HOLLEY, M.A., FORSYTHE, S. J. Detergent and Sanitizer Stresses Decrease the Thermal Resistance of *Enterobacter sakazakii* in InfantMilk Formula. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 3, p. 154-157, 2008.

PAGOTTO F. J., FARBER, J. M. *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): Advice, policy and research in Canada. **International Journal of Food Microbiology** v. 136, n. 2, p. 238–245, 2009.

PAGOTTO, F.J., NAZAROWEC-WHITE, M., BIDAWID, S., FARBER, J. M. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. **Journal of Food Protection** v. 66, n. 3, p. 370-375, 2003.

PALCICH, G., GILLIO, C. M., ARAGON-ALEGRO, L. C., PAGOTTO, F. J., FARBER, J. M., LANDGRAF, M., DESTRO, M. T. *Enterobacter sakazakii* in dried infant formulas and milk kitchens of maternity wards in São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p.37-42, 2009.

Proudy, I., Bougle, D., Coton, E., Coton, M., Leclercq, R., M. Vergnaud, M. Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and sequencing of the fliC gene. **Journal of Applied Microbiology** v. 104, n. 1, p. 26–34, 2008.

SANTOS, R. F. S.; SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; PEREIRA, J. L.; GOMES, A. R. **Determination of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula, reconstituted and utensils used in baby's bottle preparation**, poster P 1-38. Apresentado no International Association for Food Protection, Calgary, Canada, 13 to 16 August 2006.

JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVA, I. F.; VALENTE, T. G.; SANTOS, R. F. S.; SOARES, M. M. S. R. **Desenvolvimento de cepas de *Enterobacter sakazakii* em mamadeiras armazenadas sob diferentes temperaturas**. Apresentado no Sympósium on Food Safety and International Association of Food Protection Latin America, Campinas, São Paulo, Julho de 2008.

SIMMONS, B. P.; GELFAND, M. S.; HAAS, M.; METTS, L.; FERGUSON, J. *Enterobacter sakazakii* infection in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. **Infectious Control Hospital Epidemiology**. v. 10, n. 9, p. 398-401, 1989.

TOWNSEND, S., BARRONB, J. C., LOC-CARRILLOB, C., FORSYTHE, S. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. **Food Microbiology**. v. 24, n. 1, p.67–74, 2007.

VARGAS-LEGUA´S, H., RODRIGUEZ GARRIDO, V., LORITE CUENCA, R. C., PEREZ-PORTABELLA, C., REDECILLAS FERREIRO, M., CAMPINS MARTI, M. Guia para a elaboracion de formulas infantiles em polvo en el médio hospitalario. Sistema de analisis de peligros y puntos de control critico. **Anales de Pediatria**. v.70, n.6, p.586-593, 2009.

WEISS, C., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. Application and acceptability of three commercial systems for detection of *Enterobacter sakazakii* in ready-to-eat vegetable salads. **Archiv für Lebensmittelhygiene**. v. 56, n. 2, p. 34-38, 2005.

WITTHUHN, R. C., KEMP, F., BRITZ, T. J. Isolation and PCR detection of *Enterobacter sakazakii* in South African food products, specifically infant formula milks **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 23, n. 2, p. 151-157, fev. 2007.

8. APÊNDICES

Apêndice 1. Identificação das amostras

Nº	Código	Data entrada	Produto
1	2496/07	14/03/07	Soja em grãos
2	2497/07	14/03/07	Soja em grãos
3	2498/07	14/03/07	Soja em grãos
4	2499/07	14/03/07	Cacau em pó
5	2864/07	28/03/07	Açúcar líquido invertido
6	3486/07	23/04/07	Amido
7	3487/07	23/04/07	Amido
8	3711/07	04/05/07	Açúcar líquido invertido
9	3890/07	11/05/07	Fórmula infantil p/ lactentes
10	3891/07	11/05/07	Fórmula infantil p/ lactentes
11	3892/07	11/05/07	Fórmula infantil p/ lactentes
12	4198/07	28/05/07	Soja em grãos
13	4199/07	28/05/07	Soja em grãos
14	4200/07	28/05/07	Soja em grãos
15	4268/07	30/05/07	Amido
16	4269/07	30/05/07	Leite em pó integral
17	4270/07	30/05/07	Amido de milho
18	4271/07	30/05/07	Leite em pó integral
19	4272/07	30/05/07	Leite em pó integral
20	4273/07	30/05/07	Amido de milho
21	4274/07	30/05/07	Amido de milho
22	4335/07	04/06/07	Amido
23	4337/07	04/06/07	Amido
24	4356/07	04/06/07	Fórmula infantil p/ lactentes
25	4357/07	04/06/07	Fórmula infantil com ferro p/ lactentes
26	4358/07	04/06/07	Fórmula infantil com ferro p/ lactentes
27	5846/07	06/08/07	Amido de milho
28	5847/07	06/08/07	Amido de milho
29	5848/07	06/08/07	Amido de milho
30	5849/07	06/08/07	Amido de milho
31	5850/07	06/08/07	Leite em pó integral
32	5851/07	06/08/07	Leite em pó integral
33	5852/07	06/08/07	Leite em pó integral
34	5794/07	03/08/07	Glicose desidratada de milho com 39% dextrose
35	6309/07	22/08/07	Açúcar de milho 20% dextrose
36	3167/08	05/03/08	Amido de milho
37	3168/08	05/03/08	Amido de milho
38	3169/08	05/03/08	Amido de milho
39	3170/08	05/03/08	Fórmula infantil
40	3171/08	05/03/08	Leite em pó integral
41	3172/08	05/03/08	Leite em pó integral
42	3173/08	05/03/08	Leite em pó integral
43	3233/08	06/03/08	Açúcar
44	3234/08	06/03/08	Açúcar
45	3235/08	06/03/08	Açúcar
46	3236/08	06/03/08	Açúcar
47	3246/08	06/03/08	Açúcar
48	3247/08	06/03/08	Açúcar
49	3248/08	06/03/08	Amido de milho

Apêndice 1. Continuação

Nº	Código	Data entrada	Produto
50	3250/08	06/03/08	Amido de milho
51	3251/08	06/03/08	Fórmula infantil
52	3255/08	06/03/08	Fórmula infantil p/ lactentes
53	3256/08	06/03/08	Fórmula infantil p/ lactentes
54	4346/08	08/04/08	Amido de milho
55	4347/08	08/04/08	Amido de milho
56	5682/08	26/05/08	Fórmula infantil
57	5683/08	26/05/08	Fórmula infantil
58	5684/08	26/05/08	Leite em pó integral
59	5685/08	26/05/08	Amido de milho
60	5686/08	26/05/08	Amido de milho
61	5687/08	26/05/08	Açúcar
62	5688/08	26/05/08	Açúcar
63	5832/08	27/05/08	Fórmula infantil
64	5833/08	27/05/08	Fórmula infantil
65	5834/08	27/05/08	Fórmula infantil
66	5835/08	27/05/08	Fórmula infantil
67	6307/08	11/06/08	Fórmula infantil
68	6309/08	11/06/08	Fórmula infantil
69	9393/08	12/09/08	Açúcar refinado
70	9394/08	12/09/08	Açúcar extra fino
71	9395/08	12/09/08	Açúcar refinado especial
72	9396/08	12/09/08	Açúcar refinado
73	9397/08	12/09/08	Açúcar refinado especial
74	9701/08	24/09/08	Açúcar cristal
75	9702/08	24/09/08	Açúcar refinado
76	9703/08	24/09/08	Açúcar refinado
77	12105/08	05/11/08	Leite em pó integral
78	12106/08	05/11/08	Leite em pó
79	12107/08	05/11/08	Leite em pó
80	12108/08	05/11/08	Leite em pó
81	12109/08	05/11/08	Leite em pó
82	12633/08	18/11/08	Leite em pó
83	12634/08	18/11/08	Leite em pó

Apêndice 2. Resultados das análises por amostra e alíquota

*Os resultados positivos incluem, entre parênteses, a produção de α -glicosidase e de pigmento amarelo pela(s) cepa(s) de *E. sakazakii* isolada(s).

Amostra	Alíquota	Unidade analítica	PCR BAX (Presuntivo)	BAX Confirmação ESIA*	BAX ConfirmaçãoDFI*	ISO 22964 ESIA*	ISO 22964 DFI*
1	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	+ (++)	+ (++)	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	+	-	+ (- -)	+ (++)	-
	5	100g	+	+ (++)	+ (++)	-	-
	Composta		+	+ (++)	-	+ (- -)	+ (+)
2	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	-	-
	5	100g	-	/	/	-	-
	Composta		-	/	/	-	-
3	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	-	-
	Composta		-	/	/	-	+ (+)
4	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	-
5	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		não realizada	/	/	não realizada	não realizada
6	1	100g	-	/	/	-	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	-	-
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	-
7	1	100g	-	/	/	-	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	-	-
	4	100g	-	/	/	-	-
	5	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	-	-
8	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		não realizada	/	/	sem crescimento	sem crescimento

Amostra	Alíquota	Unidade analítica	PCR BAX (Presuntivo)	BAX Confirmação ESIA*	BAX ConfirmaçãoDFI*	ISO 22964 ESIA*	ISO 22964 DFI*
9	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	+ (++)	+ (++)
	5	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	sem crescimento	sem crescimento	+ (++)	+ (++)
10	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	-	-	sem crescimento	-
11 = 3892/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
12 = 4198/07	1	100g	-	/	/	-	-
	2	100g	-	/	/	-	-
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta	100g	-	/	/	-	-
13 = 4199/07	1	100g	-	/	/	-	-
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
14 = 4200/07	1	100g	-	/	/	-	-
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
15 = 4268/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
16 = 4269/07	1	100g	-	/	/	-	-
	2	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	+ (+ leve)	+ (+ leve)
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
17 = 4270/07	1	100g	-	/	/	-	-
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	-	-
18 = 4271/07	1	100g	+	-	-	-	-
	2	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	sem crescimento	sem crescimento	-	-

Amostra	Alíquota	Unidade analítica	PCR BAX (Presuntivo)	BAX Confirmação ESIA*	BAX ConfirmaçãoDFI*	ISO 22964 ESIA*	ISO 22964 DFI*
19 = 4272/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	-	-
20 = 4273/07	1	100g	-	/	/	-	-
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	+ (- -)	-
21 = 4274/07	1	100g	+	sem crescimento	-	-	-
	2	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	-	+ (- leve)
	Composta		+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
22 = 4335/07	1	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
23 = 4337/07	1	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
24 = 4356/07	1	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
25 = 4357/07	1	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
26 = 4358/07	1	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
27 = 5846/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
28 = 5847/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento

Amostra	Alíquota	Unidade analítica	PCR BAX (Presuntivo)	BAX Confirmação ESIA*	BAX ConfirmaçãoDFI*	ISO 22964 ESIA*	ISO 22964 DFI*
29 = 5848/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
30 = 5849/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
31 = 5850/07	1	100g	+	+ (++)	-	-	-
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	-	-
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
32 = 5851/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	+ (++)	+ (++)
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	+ (++)	+ (++)
33 = 5852/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
34 = 5794/07	1	100g	-	/	/	-	-
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
35 = 6309/07	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
36 = 3167/08	1	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	+	-	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
37 = 3168/08	1	100g	-	/	/	-	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	-	-
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	-	-
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
38 = 3169/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento

Amostra	Alíquota	Unidade analítica	PCR BAX (Presuntivo)	BAX Confirmação ESIA*	BAX ConfirmaçãoDFI*	ISO 22964 ESIA*	ISO 22964 DFI*
39 = 3170/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
40 = 3171/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
41 = 3172/08	1	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
42 = 3173/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
43 = 233/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
44 = 3234/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
45 = 3235/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
46 = 3236/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
47 = 3246/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
48 = 4347/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento

Amostra	Alíquota	Unidade analítica	PCR BAX (Presuntivo)	BAX Confirmação ESIA*	BAX ConfirmaçãoDFI*	ISO 22964 ESIA*	ISO 22964 DFI*
49 = 3248/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
50 = 3250/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
51 = 3251/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
52 = 3255/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
53 = 3256/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
54 = 4346/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
55 = 4347/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
56 = 5682/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
57 = 5683/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
58 = 5684/08	1	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	-	-
	Composta		+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento

Amostra	Alíquota	Unidade analítica	PCR BAX (Presuntivo)	BAX Confirmação ESIA*	BAX ConfirmaçãoDFI*	ISO 22964 ESIA*	ISO 22964 DFI*
59 = 5685/08	1	100g	+	+ (++)	+ (++)	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	+ (++)	+ (++)	+ (++)	+ (++)
	4	100g	-	/	/	+ (++)	+ (++)
	5	100g	-	/	/	+ (++)	-
	Composta		+	+ (++)	+ (++)	+ (++)	+ (+)
60 = 5686/08	1	100g	+	+ (+ leve)	+ (+ leve)	+ (++)	+ (++)
	2	100g	+	+ (++)	+ (++)	+ (+ leve)	+ (+ leve)
	3	100g	+	-	-	+ (+ leve)	+ (+ leve)
	4	100g	+	+ (+ leve)	+ (+ leve)	+ (+ leve)	+ (+ leve)
	5	100g	-	/	/	+ (+ leve)	+ (++)
	Composta		+	+ (++)	+ (++)	+ (+ leve)	+ (+ leve)
61 = 5687/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
62 = 5688/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
63 = 5832/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
64 = 5833/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
65 = 5834/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	-
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
66 = 5835/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
67 = 6307/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
68 = 6309/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento

Amostra	Alíquota	Unidade analítica	PCR BAX (Presuntivo)	BAX Confirmação ESIA*	BAX ConfirmaçãoDFI*	ISO 22964 ESIA*	ISO 22964 DFI*
79 = 12107/08	1	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	-	-	+(++)
	4	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	-	-	+(++)	-
80 = 12108/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	-
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
81 = 12109/08	1	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	2	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	4	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	5	100g	-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		-	/	/	sem crescimento	sem crescimento
82 = 12633/08	1	100g	+	-	sem crescimento	-	-
	2	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	-	-
	4	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	-	-
	5	100g	+	-	-	sem crescimento	sem crescimento
	Composta		+	-	-	-	-
83 = 12634/08	1	100g	-	/	/	-	-
	2	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	-	-
	3	100g	+	sem crescimento	sem crescimento	-	-
	4	100g	-	/	/	-	-
	5	100g	+	sem crescimento	-	-	-
	Composta		-	/	/	-	-

Apêndice 3. Identificação das Culturas Isoladas

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
1.	1-2496/07	1.3	EBB-1.3.3	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 305 373	Enterobacter sakazakii 98,4% boa identificação
2.	1-2496/07	1.3	DBB-1.3.5	DFI	BAX-BHI	+	+	3 307 173	Enterobacter sakazakii 99,1% muito boa identificação
3.	1-2496/07	1.3	DBL-1.3.5	DFI	BAX-LST	+	+	3 305 373	Enterobacter sakazakii 98,4% boa identificação
4.	1-2496/07	1.4	IE-1.4.1	ESIA	ISO	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
5.	1-2496/07	1.4	IE-1.4.2	ESIA	ISO	-	+	3 345 773	Enterobacter sakazakii 99,5% muito boa identificação
6.	1-2496/07	1.4	IE-1.4.3	ESIA	ISO	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
7.	1-2496/07	1.4	IE-1.4.4	ESIA	ISO	-	-	5 205 373	<i>Raoultella terrigena</i> 64% baixa discriminação
8.	1-2496/07	1.4	IE-1.4.5	ESIA	ISO	-	-	5 205 373	<i>Raoultella terrigena</i> 64% baixa discriminação
9.	1-2496/07	1.4	ID-1.4.1	DFI	ISO	-	-	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
10.	1-2496/07	1.4	ID-1.4.2	DFI	ISO	-	-	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
11.	1-2496/07	1.4	ID-1.4.3	DFI	ISO	-	-	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
12.	1-2496/07	1.4	ID-1.4.4	DFI	ISO	-	-	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
13.	1-2496/07	1.4	ID-1.4.5	DFI	ISO	-	-	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
14.	1-2496/07	1.4	EBB-1.4.1	ESIA	BAX-BHI	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
15.	1-2496/07	1.4	EBB-1.4.2	ESIA	BAX-BHI	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
16.	1-2496/07	1.4	EBB-1.4.3	ESIA	BAX-BHI	-	-	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
17.	1-2496/07	1.4	EBB-1.4.4	ESIA	BAX-BHI	-	-	7 345 773	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 84,1% perfil duvidoso
18.	1-2496/07	1.4	EBB-1.4.5	ESIA	BAX-BHI	-	leve	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
19.	1-2496/07	1.4	DBB-1.4.1	DFI	BAX-BHI	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
20.	1-2496/07	1.4	DBB-1.4.2	DFI	BAX-BHI	-	-	3 345 773	Enterobacter sakazakii 99,5% muito boa identificação
21.	1-2496/07	1.4	DBB-1.4.3	DFI	BAX-BHI	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
22.	1-2496/07	1.4	DBB-1.4.4	DFI	BAX-BHI	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
23.	1-2496/07	1.4	DBB-1.4.5	DFI	BAX-BHI	-	-	7 345 773	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 84,1% perfil duvidoso
24.	1-2496/07	1.4	DBL-1.4.1	DFI	BAX-LST	-	-	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
25.	1-2496/07	1.4	DBL-1.4.2	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
26.	1-2496/07	1.4	DBL-1.4.3	DFI	BAX-LST	-	-	3 345 573	Enterobacter sakazakii 91,1% boa identificação
27.	1-2496/07	1.4	DBL-1.4.4	DFI	BAX-LST	-	-	3 345 573	Enterobacter sakazakii 91,1% boa identificação
28.	1-2496/07	1.4	DBL-1.4.5	DFI	BAX-LST	-	-	3 345 573	Enterobacter sakazakii 91,1% boa identificação
29.	1-2496/07	1.5	IE-1.5.1	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
30.	1-2496/07	1.5	IE-1.5.2	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
31.	1-2496/07	1.5	IE-1.5.3	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
32.	1-2496/07	1.5	IE-1.5.4	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
33.	1-2496/07	1.5	IE-1.5.5	ESIA	ISO	-	-	3 305 113	<i>Enterobacter cancerogenus</i> 99,9% excelente identificação
34.	1-2496/07	1.5	ID-1.5.1	DFI	ISO	-	-	3 305 113	<i>Enterobacter cancerogenus</i> 99,9% excelente identificação
35.	1-2496/07	1.5	ID-1.5.2	DFI	ISO	-	-	3 305 113	<i>Enterobacter cancerogenus</i> 99,9% excelente identificação
36.	1-2496/07	1.5	ID-1.5.3	DFI	ISO	-	-	3 305 113	<i>Enterobacter cancerogenus</i> 99,9% excelente identificação
37.	1-2496/07	1.5	ID-1.5.4	DFI	ISO	-	-	3 305 113	<i>Enterobacter cancerogenus</i> 99,9% excelente identificação
38.	1-2496/07	1.5	ID-1.5.5	DFI	ISO	-	-	3 305 113	<i>Enterobacter cancerogenus</i> 99,9% excelente identificação
39.	1-2496/07	1.5	EBL-1.5.1	ESIA	BAX-LST	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
40.	1-2496/07	1.5	EBL-1.5.3	ESIA	BAX-LST	+	+	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
41.	1-2496/07	1.5	DBB-1.5.2	DFI	BAX-BHI	+	+	3 345 773	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,5% muito boa identificação
42.	1-2496/07	1.5	DBL-1.5.4	DFI	BAX-LST	+	leve	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
43.	1-2496/07	1.C	IE-1.C.1	ESIA	ISO	-	-	3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação
44.	1-2496/07	1.C	IE-1.C.2	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
45.	1-2496/07	1.C	IE-1.C.3	ESIA	ISO	-	-	3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação
46.	1-2496/07	1.C	IE-1.C.4	ESIA	ISO	-	-	3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação
47.	1-2496/07	1.C	IE-1.C.5	ESIA	ISO	-	-	3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação
48.	1-2496/07	1.C	ID-1.C.1	DFI	ISO	-	+	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
49.	1-2496/07	1.C	ID-1.C.2	DFI	ISO	-	-	3 305 153	<i>Enterobacter amnigenus</i> 41,5%/ <i>Enterobacter cancerogenus</i> 32,4%/ <i>Enterobacter sakazakii</i> 10,5% identificação incorreta
50.	1-2496/07	1.C	ID-1.C.3	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
51.	1-2496/07	1.C	ID-1.C.4	DFI	ISO	-	+	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
52.	1-2496/07	1.C	ID-1.C.5	DFI	ISO	-	+	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
53.	1-2496/07	1.C	EBB-1.C.3	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
54.	1-2496/07	1.C	EBB-1.C.5	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 307 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,1% muito boa identificação
55.	1-2496/07	1.C	DBB-1.C.1	DFI	BAX-BHI	+	+	7 345 773	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 84,1% perfil duvidoso
56.	1-2496/07	1.C	DBL-1.C.4	DFI	BAX-LST	+	+	3 345 553	<i>Enterobacter amnigenus</i> 83,2% perfil duvidoso
57.	1-2496/07	1.C	EBL-1.C.4	ESIA	BAX-LST	+	-	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
58.	2-2497/07	2.4	IE-2.4.1	ESIA	ISO	-	-	3 205 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 91,5% boa identificação
59.	2-2497/07	2.4	IE-2.4.2	ESIA	ISO	-	-	3 205 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 91,5% boa identificação
60.	2-2497/07	2.4	IE-2.4.3	ESIA	ISO	-	-	3 205 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 91,5% boa identificação
61.	2-2497/07	2.4	ID-2.4.1	DFI	ISO	-	-	3 205 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 91,5% boa identificação
62.	2-2497/07	2.4	ID-2.4.2	DFI	ISO	-	-	3 205 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 91,5% boa identificação
63.	2-2497/07	2.4	ID-2.4.3	DFI	ISO	-	-	3 205 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 91,5% boa identificação
64.	2-2497/07	2.4	ID-2.4.4	DFI	ISO	-	-	3 205 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 91,5% boa identificação
65.	2-2497/07	2.4	ID-2.4.5	DFI	ISO	-	-	3 205 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 91,5% boa identificação
66.	2-2497/07	2.5	IE-2.5.1	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
67.	2-2497/07	2.5	IE-2.5.2	ESIA	ISO	-	+	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
68.	2-2497/07	2.5	IE-2.5.3	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
69.	2-2497/07	2.5	IE-2.5.4	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
70.	2-2497/07	2.5	ID-2.5.1	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
71.	2-2497/07	2.5	ID-2.5.2	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
72.	2-2497/07	2.5	ID-2.5.3	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
73.	2-2497/07	2.5	ID-2.5.4	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
74.	2-2497/07	2.5	ID-2.5.5	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
75.	2-2497/07	2.C	IE-2.C..1	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
76.	2-2497/07	2.C	IE-2.C..2	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
77.	2-2497/07	2.C	IE-2.C..3	ESIA	ISO	-	+	1 345 113	<i>Enterobacter cancerogenus</i> 93,9% perfil duvidoso
78.	2-2497/07	2.C	IE-2.C..4	ESIA	ISO	-	+	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
79.	2-2497/07	2.C	IE-2.C..5	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
80.	2-2497/07	2.C	ID-2.C..1	DFI	ISO	-	+	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
81.	2-2497/07	2.C	ID-2.C..2	DFI	ISO	-	+	1 205 153	<i>Pantoea</i> spp 79,8% identificação incorreta
82.	2-2497/07	2.C	ID-2.C..5	DFI	ISO	+	+	1 207 573	<i>Serratia ficaria</i> 96,1% boa identificação
83.	3-2498/07	3.5	IE-3.5.1	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
84.	3-2498/07	3.5	IE-3.5.2	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
85.	3-2498/07	3.5	IE-3.5.3	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
86.	3-2498/07	3.5	IE-3.5.4	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
87.	3-2498/07	3.5	IE-3.5.5	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
88.	3-2498/07	3.5	ID-3.5.1	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
89.	3-2498/07	3.5	ID-3.5.2	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
90.	3-2498/07	3.5	ID-3.5.3	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
91.	3-2498/07	3.5	ID-3.5.4	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
92.	3-2498/07	3.5	ID-3.5.5	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
93.	3-2498/07	3.C	IE-3.C.1	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
94.	3-2498/07	3.C	IE-3.C.2	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
95.	3-2498/07	3.C	IE-3.C.3	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
96.	3-2498/07	3.C	IE-3.C.4	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
97.	3-2498/07	3.C	IE-3.C.5	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
98.	3-2498/07	3.C	ID-3.C.1	DFI	ISO	-	+	3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação
99.	3-2498/07	3.C	ID-3.C.4	DFI	ISO	-	+	3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação
100.	3-2498/07	3.C	ID-3.C.5	DFI	ISO	-	+	7 345 773	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 84,1% perfil duvidoso
101.	4-2499/07	4.C	ID-4.C.1	DFI	ISO	-	leve	1 045 553	<i>Pantoea</i> sp 95,3% boa identificação no gênero
102.	4-2499/07	4.C	ID-4.C.2	DFI	ISO	-	leve	1 045 553	<i>Pantoea</i> sp 95,3% boa identificação no gênero
103.	4-2499/07	4.C	ID-4.C.3	DFI	ISO	-	-	1 045 553	<i>Pantoea</i> sp 95,3% boa identificação no gênero
104.	4-2499/07	4.C	ID-4.C.4	DFI	ISO	-	leve	1 045 553	<i>Pantoea</i> sp 95,3% boa identificação no gênero
105.	4-2499/07	4.C	ID-4.C.5	DFI	ISO	-	-	1 045 553	<i>Pantoea</i> sp 95,3% boa identificação no gênero

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
106.	6-3486/07	6.3	IE-6.3.1	ESIA	ISO	-	+	3 205 163	<i>Enterobacter cloacae</i> 66,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 24,3% boa identificação no gênero
107.	6-3486/07	6.3	IE-6.3.2	ESIA	ISO	-	+	1 205 163	<i>Serratia rubidae</i> 50%, <i>Serratia plymuthica</i> 37,9% identificação aceitável no gênero
108.	6-3486/07	6.3	IE-6.3.3	ESIA	ISO	-	+	1 205 163	<i>Serratia rubidae</i> 50%, <i>Serratia plymuthica</i> 37,9% identificação aceitável no gênero
109.	6-3486/07	6.3	IE-6.3.4	ESIA	ISO	-	+	1 205 163	<i>Serratia rubidae</i> 50%, <i>Serratia plymuthica</i> 37,9% identificação aceitável no gênero
110.	6-3486/07	6.3	IE-6.3.5	ESIA	ISO	-	+	0 205 163	<i>Serratia rubidae</i> 43,8%, <i>Serratia plymuthica</i> , 33,2%, <i>Pantoea</i> sp 20,1% baixa discriminação
111.	6-3486/07	6.3	ID-6.3.1	DFI	ISO	-	+	3 205 163	<i>Enterobacter cloacae</i> 66,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 24,3% boa identificação no gênero
112.	6-3486/07	6.3	ID-6.3.2	DFI	ISO	-	+	1 205 163	<i>Serratia rubidae</i> 50%, <i>Serratia plymuthica</i> 37,9% identificação aceitável no gênero
113.	6-3486/07	6.3	ID-6.3.3	DFI	ISO	-	+	1 205 163	<i>Serratia rubidae</i> 50%, <i>Serratia plymuthica</i> 37,9% identificação aceitável no gênero
114.	6-3486/07	6.3	ID-6.3.4	DFI	ISO	-	+	1 205 163	<i>Serratia rubidae</i> 50%, <i>Serratia plymuthica</i> 37,9% identificação aceitável no gênero
115.	6-3486/07	6.3	ID-6.3.5	DFI	ISO	-	+	1 205 163	<i>Serratia rubidae</i> 50%, <i>Serratia plymuthica</i> 37,9% identificação aceitável no gênero
116.	7-3487/07	7.5	EBL-7.5.1	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 123	<i>Cedecea davisae</i> 83,5% identificação aceitável
117.	7-3487/07	7.5	EBL-7.5.2	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
118.	7-3487/07	7.5	EBL-7.5.3	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
119.	7-3487/07	7.5	EBL-7.5.4	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
120.	7-3487/07	7.5	EBL-7.5.5	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 523	<i>Enterobacter asburiae</i> 67,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 32,1% muito boa identificação no gênero
121.	7-3487/07	7.5	DBL-7.5.1	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 123	<i>Cedecea davisae</i> 83,5% identificação aceitável
122.	7-3487/07	7.5	DBL-7.5.2	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
123.	7-3487/07	7.5	DBL-7.5.3	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 723	<i>Enterobacter asburiae</i> 82,3%, <i>Enterobacter cloacae</i> 16,1% boa identificação no gênero
124.	7-3487/07	7.5	DBL-7.5.4	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 123	<i>Cedecea davisae</i> 83,5% identificação aceitável
125.	7-3487/07	7.5	DBL-7.5.5	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 323	<i>Cedecea davisae</i> 68%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 14,1%, <i>Enterobacter cloacae</i> 12,2% baixa discriminação
126.	8-3711/07	8.2	EBL-8.2.1	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 523	<i>Enterobacter asburiae</i> 67,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 32,1% muito boa identificação no gênero
127.	8-3711/07	8.2	EBL-8.2.2	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 523	<i>Enterobacter asburiae</i> 67,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 32,1% muito boa identificação no gênero

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
128.	8-3711/07	8.2	EBL-8.2.3	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 523	<i>Enterobacter asburiae</i> 67,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 32,1% muito boa identificação no gênero
129.	8-3711/07	8.2	EBL-8.2.4	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 523	<i>Enterobacter asburiae</i> 67,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 32,1% muito boa identificação no gênero
130.	8-3711/07	8.2	EBL-8.2.5	ESIA	BAX-LST	-	-	3 305 523	<i>Enterobacter asburiae</i> 67,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 32,1% muito boa identificação no gênero
131.	8-3711/07	8.2	DBL-8.2.1	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 323	<i>Cedecea davisae</i> 68%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 14,1%, <i>Enterobacter cloacae</i> 12,2% baixa discriminação
132.	8-3711/07	8.2	DBL-8.2.2	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 323	<i>Cedecea davisae</i> 68%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 14,1%, <i>Enterobacter cloacae</i> 12,2% baixa discriminação
133.	8-3711/07	8.2	DBL-8.2.3	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 323	<i>Cedecea davisae</i> 68%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 14,1%, <i>Enterobacter cloacae</i> 12,2% baixa discriminação
134.	8-3711/07	8.2	DBL-8.2.4	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 323	<i>Cedecea davisae</i> 68%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 14,1%, <i>Enterobacter cloacae</i> 12,2% baixa discriminação
135.	8-3711/07	8.2	DBL-8.2.5	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 323	<i>Cedecea davisae</i> 68%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 14,1%, <i>Enterobacter cloacae</i> 12,2% baixa discriminação
136.	9-3890/07	9.4	IE-9.4.1	ESIA	ISO	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero API 32E = 3427 6763 050 = <i>E. sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
137.	9-3890/07	9.4	ID-9.4.1	DFI	ISO	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero API 32E = 3427 6763 051 = <i>E. sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
138.								3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação
139.	9-3890/07	9.C	IE-9.C.1	ESIA	ISO	+	+	3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação API 32E = 3427 6763 041 = <i>E. sakazakii</i> 99,9% perfil duvidoso
140.	9-3890/07	9.C	ID-9.C.1	DFI	ISO	+	+	3 345 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,1% boa identificação API 32E = 3427 6763 051 = <i>E. sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
141.	9-3890/07	9.C	EBL-9.C.1	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
142.	9-3890/07	9.C	EBL-9.C.2	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
143.	9-3890/07	9.C	EBL-9.C.3	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
144.	9-3890/07	9.C	EBL-9.C.4	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
145.	9-3890/07	9.C	EBL-9.C.5	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
146.	9-3890/07	9.C	DBL-9.C.1	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
147.	9-3890/07	9.C	DBL-9.C.2	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
148.	9-3890/07	9.C	DBL-9.C.3	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
149.	9-3890/07	9.C	DBL-9.C.4	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
150.	9-3890/07	9.C	DBL-9.C.5	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
151.	10-3891/07	10.C	EBL-10.C.1	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
152.	10-3891/07	10.C	EBL-10.C.2	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
153.	10-3891/07	10.C	EBL-10.C.3	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
154.	10-3891/07	10.C	EBL-10.C.4	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
155.	10-3891/07	10.C	EBL-10.C.5	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
156.	10-3891/07	10.C	DBL-10.C.1	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
157.	10-3891/07	10.C	DBL-10.C.2	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
158.	10-3891/07	10.C	DBL-10.C.3	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
159.	10-3891/07	10.C	DBL-10.C.4	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
160.	10-3891/07	10.C	DBL-10.C.5	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
161.	12-4198/07	12..2	IE-12.2.1	ESIA	ISO	-	+	1 205 773	<i>Pantoea</i> sp 42,2%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 38,2%, <i>Serratia ficaria</i> 11,6% baixa discriminação
162.	12-4198/07	12..2	IE-12.2.2	ESIA	ISO	-	+	1 206 773	<i>Serratia ficaria</i> 98,9% boa identificação
163.	12-4198/07	12..2	ID-12.2.1	DFI	ISO	-	+	1 005 773	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 48,1% baixa discriminação
164.	12-4198/07	12..2	ID-12.2.2	DFI	ISO	-	leve	1 005 773	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 48,1% baixa discriminação
165.	12-4198/07	12.C	IE-12.C.1	ESIA	ISO	-	leve	1 205 773	<i>Pantoea</i> sp 42,2%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 38,2%, <i>Serratia ficaria</i> 11,6% baixa discriminação
166.	12-4198/07	12.C	IE-12.C.2	ESIA	ISO	-	+	1 206 773	<i>Serratia ficaria</i> 98,9% boa identificação
167.	12-4198/07	12.C	ID-12.C.1	DFI	ISO	-	+	1 205 773	<i>Pantoea</i> sp 42,2%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 38,2%, <i>Serratia ficaria</i> 11,6% baixa discriminação

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
168.									
169.	12-4198/07	12.C	ID-12.C.2	DFI	ISO	-	-	1 305 773	<i>Enterobacter aerogenes</i> 49,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 39,7%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 6% identificação aceitável no gênero
170.	12-4198/07	12.C	ID-12.C.3	DFI	ISO	-	leve	1 207 773	<i>Serratia ficaria</i> 97,3% boa identificação
171.	14-4200/07	14.1	IE-14.1.1	ESIA	ISO	+	leve	7 345 773	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 84,1% perfil duvidoso API 32E = 0007 6561 053 = <i>Serratia plymuthica</i> 73,7% perfil duvidoso
172.	14-4200/07	14.1	ID-14.1.1	DFI	ISO	+	leve	7 345 773	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 84,1% perfil duvidoso API 32E = 0007 6561 053 = <i>Serratia plymuthica</i> 73,7% perfil duvidoso
173.	16-4269/07	16.4	IE-16.4.2	ESIA	ISO	+	leve	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
174.	16-4269/07	16.4	ID-16.4.2	DFI	ISO	+	leve	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
175.	17-4270/07	17.C	IE-17.C.1	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
176.	17-4270/07	17.C	IE-17.C.2	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
177.	17-4270/07	17.C	ID-17.C.1	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
178.	17-4270/07	17.C	ID-17.C.2	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
179.	18-4271/07	18.C	IE-18.C.1	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
180.	18-4271/07	18.C	IE-18.C.2	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
181.	18-4271/07	18.C	IE-18.C.3	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
182.	18-4271/07	18.C	IE-18.C.4	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
183.	18-4271/07	18.C	IE-18.C.5	ESIA	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
184.	18-4271/07	18.C	ID-18.C.1	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
185.	18-4271/07	18.C	ID-18.C.2	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
186.	18-4271/07	18.C	ID-18.C.3	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
187.	18-4271/07	18.C	ID-18.C.4	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
188.	18-4271/07	18.C	ID-18.C.5	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
189.	19-4272/07	19.C	IE-19.C.1	ESIA	ISO	-	-	3 205 772	<i>Enterobacter cloacae</i> 50%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 38,2% identificação aceitável no gênero
190.	19-4272/07	19.C	IE-19.C.2	ESIA	ISO	-	-	3 205 772	<i>Enterobacter cloacae</i> 50%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 38,2% identificação aceitável no gênero
191.	19-4272/07	19.C	ID-19.C.1	DFI	ISO	-	-	3 205 772	<i>Enterobacter cloacae</i> 50%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 38,2% identificação aceitável no gênero
192.	19-4272/07	19.C	ID-19.C.2	DFI	ISO	-	-	3 205 772	<i>Enterobacter cloacae</i> 50%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 38,2% identificação aceitável no gênero
193.	20-4273/07	20.1	IE-20.1.1	ESIA	ISO	+	+	1 005 173	<i>Pantoea</i> sp 68%, <i>Rahnella aquatilis</i> 19,9% baixa discriminação
194.	20-4273/07	20.1	IE-20.1.2	ESIA	ISO	+	leve	1 017 173	<i>Pantoea</i> sp 95,3% boa identificação
195.	20-4273/07	20.1	IE-20.1.3	ESIA	ISO	+	-	1 004 173	<i>Pantoea</i> sp 64%, <i>Escherichia vulneris</i> 14,6% identificação incorreta
196.	20-4273/07	20.1	IE-20.1.4	ESIA	ISO	+	-	1 005 173	<i>Pantoea</i> sp 68%, <i>Rahnella aquatilis</i> 19,9% baixa discriminação

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Alíquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
197.	20-4273/07	20.1	IE-20.1.5	ESIA	ISO	+	+	1 004 173	<i>Pantoea</i> sp 64%, <i>Escherichia vulneris</i> 14,6% identificação incorreta
198.	20-4273/07	20.1	ID-20.1.1	DFI	ISO	+	+	1 004 173	<i>Pantoea</i> sp 64%, <i>Escherichia vulneris</i> 14,6% identificação incorreta
199.	20-4273/07	20.1	ID-20.1.2	DFI	ISO	+	-	1 007 173	<i>Pantoea</i> sp 95,1% boa identificação
200.	20-4273/07	20.1	ID-20.1.3	DFI	ISO	+	-	1 005 173	<i>Pantoea</i> sp 68%, <i>Rahnella aquatilis</i> 19,9% baixa discriminação
201.	20-4273/07	20.1	ID-20.1.4	DFI	ISO	+	-	1 005 173	<i>Pantoea</i> sp 68%, <i>Rahnella aquatilis</i> 19,9% baixa discriminação
202.	20-4273/07	20.1	ID-20.1.5	DFI	ISO	+	-	1 007 173	<i>Pantoea</i> sp 95,1% boa identificação
203.	20-4273/07	20.C	IE-20.C.1	ESIA	ISO	-	-	3 347 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,7% muito boa identificação
204.	20-4273/07	20.C	IE-20.C.2	ESIA	ISO	-	-	3 347 573	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,7% muito boa identificação
205.	20-4273/07	20.C	ID-20.C.1	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
206.	20-4273/07	20.C	ID-20.C.2	DFI	ISO	-	-	3 305 573	<i>Enterobacter cloacae</i> 95,1% boa identificação
207.	21-4274/07	21.1	IE-21.1.1	ESIA	ISO	+	-	1 005 173	<i>Pantoea</i> sp 68%, <i>Rahnella aquatilis</i> 19,9% baixa discriminação
208.	21-4274/07	21.1	IE-21.1.2	ESIA	ISO	+	leve	1 007 173	<i>Pantoea</i> sp 95,1% boa identificação
209.	21-4274/07	21.1	IE-21.1.3	ESIA	ISO	+	leve	1 005 173	<i>Pantoea</i> sp 68%, <i>Rahnella aquatilis</i> 19,9% baixa discriminação
210.	21-4274/07	21.1	IE-21.1.4	ESIA	ISO	+	leve	1 007 173	<i>Pantoea</i> sp 95,1% boa identificação
211.	21-4274/07	21.1	IE-21.1.5	ESIA	ISO	+	+	1 004 173	<i>Pantoea</i> sp 64%, <i>Escherichia vulneris</i> 14,6% identificação incorreta
212.	21-4274/07	21.1	ID-21.1.1	DFI	ISO	+	-	1 007 173	<i>Pantoea</i> sp 95,1% boa identificação
213.	21-4274/07	21.1	ID-21.1.2	DFI	ISO	+	leve	1 007 173	<i>Pantoea</i> sp 95,1% boa identificação
214.	21-4274/07	21.1	ID-21.1.3	DFI	ISO	+	+	1 004 173	<i>Pantoea</i> sp 64%, <i>Escherichia vulneris</i> 14,6% identificação incorreta
215.	21-4274/07	21.1	ID-21.1.4	DFI	ISO	+	leve	1 007 173	<i>Pantoea</i> sp 95,1% boa identificação
216.	21-4274/07	21.1	ID-21.1.5	DFI	ISO	+	+	1 005 173	<i>Pantoea</i> sp 68%, <i>Rahnella aquatilis</i> 19,9% baixa discriminação
217.	21-4274/07	21.5	IE-21.5.1	ESIA	ISO	-	leve	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
218.	21-4274/07	21.5	IE-21.5.2	ESIA	ISO	-	leve	1 005 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 81% identificação incorreta
219.	21-4274/07	21.5	IE-21.5.3	ESIA	ISO	-	leve	1 005 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 81% identificação incorreta
220.	21-4274/07	21.5	IE-21.5.4	ESIA	ISO	-	leve	1 005 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 81% identificação incorreta
221.	21-4274/07	21.5	IE-21.5.5	ESIA	ISO	-	leve	1 005 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 81% identificação incorreta
222.	21-4274/07	21.5	ID-21.5.1	DFI	ISO	-	leve	1 005 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 81% identificação incorreta
223.	21-4274/07	21.5	ID-21.5.2	DFI	ISO	-	leve	3 107 753	<i>Enterobacter sakazakii</i> 91,8% identificação aceitável
224.	21-4274/07	21.5	ID-21.5.3	DFI	ISO	-	leve	1 005 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 81% identificação incorreta
225.	21-4274/07	21.5	ID-21.5.4	DFI	ISO	-	leve	1 005 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 81% identificação incorreta
226.	21-4274/07	21.5	ID-21.5.5	DFI	ISO	-	leve	1 005 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 81% identificação incorreta
227.	31-5850/07	31.1	EBL-31.1.1	ESIA	BAX-LST	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
228.	31-5850/07	31.1	EBL-31.1.2	ESIA	BAX-LST	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
229.	31-5850/07	31.1	EBL-31.1.3	ESIA	BAX-LST	+	+	3 303 321	<i>Cedecea davisae</i> perfil inaceitável

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
230.	31-5850/07	31.1	EBL-31.1.4	ESIA	BAX-LST	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
231.	31-5850/07	31.1	EBL-31.1.5	ESIA	BAX-LST	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
232.	31-5850/07	31.1	EBB-31.1.1	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
233.	31-5850/07	31.1	EBB-31.1.2	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
234.	31-5850/07	31.1	EBB-31.1.3	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
235.	31-5850/07	31.1	EBB-31.1.4	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
236.	31-5850/07	31.1	EBB-31.1.5	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 307 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
237.	31-5859/07	31.4	IE-31.4.1	ESIA	ISO	-	leve	1 144 173	<i>Kluyvera</i> sp 91,8% baixa discriminação
238.	31-5859/07	31.4	ID-31.4.1	DFI	ISO	-	leve	1 344 173	<i>Kluyvera</i> sp 98% boa identificação
239.	32-5851/07	32.2	IE-32.2.1	ESIA	ISO	+	+	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
240.	32-5851/07	32.2	ID-32.2.1	DFI	ISO	+	+	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
241.	32-5851/07	32.C	IE-32.C.1	ESIA	ISO	+	+	3 345 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
242.	32-5851/07	32.C	ID-32.C.1	DFI	ISO	+	+	3 345 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,9% excelente identificação
243.	36-3167/08	36.4	EBL-36.4.1.	ESIA	BAX-LST	-	-	5 307 561	<i>Serratia marcescens</i> 95,9% excelente identificação no gênero
244.	36-3167/08	36.4	EBL-36.4.2	ESIA	BAX-LST	-	-	5 307 561	<i>Serratia marcescens</i> 95,9% excelente identificação no gênero
245.	36-3167/08	36.4	EBL-36.4.3	ESIA	BAX-LST	-	-	5 307 561	<i>Serratia marcescens</i> 95,9% excelente identificação no gênero
246.	36-3167/08	36.4	EBL-36.4.4	ESIA	BAX-LST	-	-	5 307 561	<i>Serratia marcescens</i> 95,9% excelente identificação no gênero
247.	36-3167/08	36.4	EBL-36.4.5	ESIA	BAX-LST	-	-	5 307 561	<i>Serratia marcescens</i> 95,9% excelente identificação no gênero
248.	36-3167/08	36.4	DBL-36.4.1	DFI	BAX-LST	-	-	5 307 563	<i>Serratia liquefaciens</i> 75,6%, <i>Serratia marcescens</i> 24,2% excelente identificação no gênero
249.	36-3167/08	36.4	DBL-36.4.2	DFI	BAX-LST	-	-	5 307 561	<i>Serratia marcescens</i> 95,9% excelente identificação no gênero
250.	36-3167/08	36.4	DBL-36.4.3	DFI	BAX-LST	-	-	5 307 561	<i>Serratia marcescens</i> 95,9% excelente identificação no gênero
251.	36-3167/08	36.4	DBL-36.4.4	DFI	BAX-LST	-	-	5 307 561	<i>Serratia marcescens</i> 95,9% excelente identificação no gênero
252.	36-3167/08	36.4	DBL-36.4.5	DFI	BAX-LST	-	-	3 305 472	<i>Enterobacter cloacae</i> 97,5% boa identificação
253.	36-3167/08	36.4.Ref	DBB-36.4.1.R	DFI	BAX-LST	-	-	5 307 563	<i>Serratia liquefaciens</i> 75,6%, <i>Serratia marcescens</i> 24,2% excelente identificação no gênero
254.	36-3167/08	36.4.Ref	DBL-36.4.1.R	DFI	BAX-BHI	-	-	5 307 563	<i>Serratia liquefaciens</i> 75,6%, <i>Serratia marcescens</i> 24,2% excelente identificação no gênero
255.	36-3167/08	36.C.Ref	DBL-36.C.1.R	DFI	BAX-LST	-	-	5 307 563	<i>Serratia liquefaciens</i> 75,6%, <i>Serratia marcescens</i> 24,2% excelente identificação no gênero
256.	36-3167/08	36.C.Ref	DBL-36.C.2.R	DFI	BAX-LST	-	-	7 307 563	<i>Serratia liquefaciens</i> 96,9% boa identificação
257.	36-3167/08	36.C.Ref	DBB-36.C.1.R	DFI	BAX-BHI	-	-	5 307 563	<i>Serratia liquefaciens</i> 75,6%, <i>Serratia marcescens</i> 24,2% excelente identificação no gênero
258.	36-3167/08	36.C.Ref	DBB-36.C.2.R	DFI	BAX-BHI	-	-	5 307 563	<i>Serratia liquefaciens</i> 75,6%, <i>Serratia marcescens</i> 24,2% excelente identificação no gênero
259.	37-3168/08	37.1	IE-37.1.1	ESIA	ISO	-	leve	1 204 000	<i>Pseudomonas luteola</i> 69%, <i>Burkholderia cepacia</i> 27,4% baixa discriminação
260.	37-3168/08	37.1	IE-37.1.2	ESIA	ISO	-	leve	1 204 000	<i>Pseudomonas luteola</i> 69%, <i>Burkholderia cepacia</i> 27,4% baixa discriminação

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
261.	37-3168/08	37.3	IE-37.3.1	ESIA	ISO	-	leve	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
262.	37-3168/08	37.3	IE-37.3.2	ESIA	ISO	-	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
263.	37-3168/08	37.3	ID-37.3.1	DFI	ISO	-	leve	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
264.	37-3168/08	37.3	ID-37.3.2	DFI	ISO	-	leve	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
265.	37-3168/08	37..5	IE-37.5.1	ESIA	ISO	-	-	1 204 000	<i>Pseudomonas luteola</i> 69%, <i>Burkholderia cepacia</i> 27,4% baixa discriminação
266.	37-3168/08	37..5	IE-37.5.2	ESIA	ISO	-	leve	1 204 000	<i>Pseudomonas luteola</i> 69%, <i>Burkholderia cepacia</i> 27,4% baixa discriminação
267.	37-3168/08	37..5	ID-37.5.1	DFI	ISO	-	leve	1 204 000	<i>Pseudomonas luteola</i> 69%, <i>Burkholderia cepacia</i> 27,4% baixa discriminação
268.	37-3168/08	37..5	ID-37.5.2	DFI	ISO	-	leve	1 204 000	<i>Pseudomonas luteola</i> 69%, <i>Burkholderia cepacia</i> 27,4% baixa discriminação
269.	37-3168/08	37.3.Ref	IE-37.3.1.R	ESIA	ISO	-	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
270.	37-3168/08	37.3.Ref	IE-37.3.2.R	ESIA	ISO	-	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
271.	37-3168/08	37.3.Ref	ID-37.3.1.R	DFI	ISO	-	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
272.	37-3168/08	37.3.Ref	ID-37.3.2.R	DFI	ISO	-	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
273.	41-3172/08	41.3	DBL-41.3.1	DFI	BAX-LST	-	leve	1 205 773	<i>Pantoea</i> sp 42,2%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 38,2%, <i>Serratia ficaria</i> 11,6% baixa discriminação
274.	41-3172/08	41.3	DBL-41.3.2	DFI	BAX-LST	-	leve	7 305 773	<i>Enterobacter aerogenes</i> 52,8%, <i>Enterobacter cloacae</i> 41,2% perfil duvidoso
275.	41-3172/08	41.3	EBB-41.3.1	ESIA	BAX-BHI	-	leve	1 205 773	<i>Pantoea</i> sp 42,2%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 38,2%, <i>Serratia ficaria</i> 11,6% baixa discriminação
276.	41-3172/08	41.3	EBB-41.3.2	ESIA	BAX-BHI	-	leve	7 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 62,3%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 24,2% perfil duvidoso
277.	41-3172/08	41.3	EBB-41.3.3	ESIA	BAX-BHI	-	leve	5 307 773	<i>Serratia odorifera</i> 68,6%, <i>Serratia liquefaciens</i> 20,9% identificação aceitável no gênero
278.	41-3172/08	41.3	DBB-41.3.1	DFI	BAX-BHI	-	leve	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
279.	41-3172/08	41.3	DBB-41.3.2	DFI	BAX-BHI	-	leve	5 307 773	<i>Serratia odorifera</i> 68,6%, <i>Serratia liquefaciens</i> 20,9% identificação aceitável no gênero
280.	41-3172/08	41.3	DBB-41.3.3	DFI	BAX-BHI	-	leve	5 305 773	<i>Enterobacter aerogenes</i> 96% boa identificação
281.									

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
282.	41-3172/08	41.C	DBL-41.C.1	DFI	BAX-LST	-	leve	5 307 773	<i>Serratia odorifera</i> 68,6%, <i>Serratia liquefaciens</i> 20,9% identificação aceitável no gênero
283.	41-3172/08	41.C	DBL-41.C.2	DFI	BAX-LST	-	leve	7 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 62,3%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 24,2% perfil duvidoso
284.	41-3172/08	41.C	EBB-41.C.1	ESIA	BAX-BHI	-	leve	5 205 753	<i>Raoultella terrigena</i> 51%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 39,6% perfil duvidoso
285.	41-3172/08	41.C	EBB-41.C.2	ESIA	BAX-BHI	-	leve	5 205 753	<i>Raoultella terrigena</i> 51%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 39,6% perfil duvidoso
286.	41-3172/08	41.C	EBB-41.C.3	ESIA	BAX-BHI	-	leve	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
287.	41-3172/08	41.C	DBB-41.C.1	DFI	BAX-BHI	-	leve	5 207 773	<i>Raoultella terrigena</i> 33,9% identificação incorreta
288.	41-3172/08	41.C	DBB-41.C.2	DFI	BAX-BHI	-	leve	1 105 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 27,8%, <i>Enterobacter aerogenes</i> 25,8%, <i>Serratia fonticola</i> 20,8%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 13,7% perfil duvidoso
289.	41-3172/08	41.C	DBB-41.C.3	DFI	BAX-BHI	-	leve	5 025 753	<i>Raoultella terrigena</i> 80,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> 16,3% perfil duvidoso
290.	41-3172/08	41.3.Ref	EBL-41.3.1.R	ESIA	BAX-LST	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
291.	41-3172/08	41.3.Ref	EBL-41.3.2.R	ESIA	BAX-LST	-	+	3 215 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 44,8%, <i>Enterobacter cloacae</i> 35,8%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 10,6% perfil duvidoso
292.	41-3172/08	41.3.Ref	EBL-41.3.3.R	ESIA	BAX-LST	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
293.	41-3172/08	41.3.Ref	DBL-41.3.1.R	DFI	BAX-LST	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
294.	41-3172/08	41.3.Ref	DBL-41.3.2.R	DFI	BAX-LST	-	+	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta
295.	41-3172/08	41.3.Ref	DBL-41.3.3.R	DFI	BAX-LST	-	+	3 305 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 68%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 18% identificação aceitável no gênero
296.	41-3172/08	41.3.Ref	EBB-41.3.1	ESIA	BAX-BHI	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
297.	41-3172/08	41.3.Ref	EBB-41.3.2	ESIA	BAX-BHI	-	+	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta
298.	41-3172/08	41.3.Ref	EBB-41.3.3	ESIA	BAX-BHI	-	+	1 215 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 97,8% boa identificação
299.	41-3172/08	41.3.Ref	DBB-41.3.1	DFI	BAX-BHI	-	+	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta
300.	41-3172/08	41.3.Ref	DBB-41.3.2	DFI	BAX-BHI	-	+	3 215 753	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 44,8%, <i>Enterobacter cloacae</i> 35,8%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 10,6% perfil duvidoso
301.	41-3172/08	41.3.Ref	DBB-41.3.3	DFI	BAX-BHI	-	+	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
302.	41-3172/08	41.C.Ref	EBL-41.C.1.R	ESIA	BAX-LST	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
303.	41-3172/08	41.C.Ref	EBL-41.C.2.R	ESIA	BAX-LST	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
304.	41-3172/08	41.C.Ref	EBL-41.C.3.R	ESIA	BAX-LST	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
305.	41-3172/08	41.C.Ref	DBL-41.C.1.R	DFI	BAX-LST	-	+	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta
306.	41-3172/08	41.C.Ref	DBL-41.C.2.R	DFI	BAX-LST	-	+	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta
307.	41-3172/08	41.C.Ref	DBL-41.C.3.R	DFI	BAX-LST	-	+	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta
308.	41-3172/08	41.C.Ref	DBB-41.C.1.R	DFI	BAX-BHI	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
309.	41-3172/08	41.C.Ref	DBB-41.C.2.R	DFI	BAX-BHI	-	+	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta
310.	41-3172/08	41.C.Ref	DBB-41.C.3.R	DFI	BAX-BHI	-	+	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
311.	59-5685/08	59.3	IE-59.3.1	ESIA	ISO	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
312.	59-5685/08	59.3	ID-59.3.1	DFI	ISO	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
313.	59-5685/08	59.4	IE-59.4.1	ESIA	ISO	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
314.	59-5685/08	59.4	ID-59.4.1	DFI	ISO	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
315.	59-5685/08	59.5	IE-59.5.1	ESIA	ISO	+	-	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
316.	59-5685/08	59.5	ID-59.5.1	DFI	ISO	+	-	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
317.	59-5685/08	59.C	IE-59.C.1	ESIA	ISO	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
318.	59-5685/08	59.C	ID-59.C.1	DFI	ISO	+	-	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
319.	59-5685/08	59.1	EBL-59.1.1	ESIA	BAX-LST	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
320.	59-5685/08	59.1	DBL-59.1.2	DFI	BAX-LST	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
321.	59-5685/08	59.3	EBB-59.3.1	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 307 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,1% muito boa identificação
322.	59-5685/08	59.3	DBB-59.3.1	DFI	BAX-BHI	+	+	3 307 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,1% muito boa identificação

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
323.	59-5685/08	59.C	EBL-59.C.1	ESIA	BAX-LST	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
324.	59-5685/08	59.C	DBB-59.C.1	DFI	BAX-BHI	+	+	3 307 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 99,1% muito boa identificação
325.	60-5686/08	60.1	IE-60.1.1	ESIA	ISO	+	+	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
326.	60-5686/08	60.1	ID-60.1.1	DFI	ISO	+	+	3 305 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
327.	60-5686/08	60.2	IE-60.2.1	ESIA	ISO	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
328.	60-5686/08	60.2	ID-60.2.1	DFI	ISO	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
329.	60-5686/08	60.3	IE-60.3.1	ESIA	ISO	+	leve	3 205 373	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98% boa identificação
330.	60-5686/08	60.3	ID-60.3.1	DFI	ISO	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
331.	60-5686/08	60.4	IE-60.4.1	ESIA	ISO	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
332.	60-5686/08	60.4	ID-60.4.1	DFI	ISO	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
333.	60-5686/08	60.5	IE-60.5.1	ESIA	ISO	+	leve	7 305 173	<i>Enterobacter cloacae</i> 69%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 18,7% perfil duvidoso
334. +	60-5686/08	60.5	ID-60.5.1	DFI	ISO	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
335.	60-5686/08	60.C	IE-60.C.1	ESIA	ISO	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
336.	60-5686/08	60.C	ID-60.C.1	DFI	ISO	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
337.	60-5686/08	60.1	EBL-60.1.1	ESIA	BAX-LST	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
338.	60-5686/08	60.1	DBL-60.1.1	DFI	BAX-LST	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
339.	60-5686/08	60.2	EBB-60.2.1	ESIA	BAX-BHI	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
340.	60-5686/08	60.2	DBB-60.2.1	DFI	BAX-BHI	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
341.	60-5686/08	60.3	EBL-60.3.1	ESIA	BAX-LST	-	leve	1 205 753	<i>Pantoea</i> sp 50,7%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 30,4% baixa discriminação
342.	60-5686/08	60.3	DBL-60.3.1	DFI	BAX-LST	-	leve	3 205 753	<i>Enterobacter cloacae</i> 63,9%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 19% identificação incorreta
343.	60-5686/08	60.4	EBL-60.4.1	ESIA	BAX-LST	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
344.	60-5686/08	60.4	DBL-60.4.1	DFI	BAX-LST	+	leve	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero

Apêndice 3. Continuação

No.	Amostra	Aliquota	Cepa	Placa	Método	Típica ESIA/DFI	Amarela TSA	Perfil API	Identidade
345.	60-5686/08	60.C	EBL-60.C.1	ESIA	BAX-LST	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
346.	60-5686/08	60.C	DBL-60.C.1	DFI	BAX-LST	+	+	3 305 173	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%, <i>Enterobacter amnigenus</i> 31,7%, <i>Enterobacter cloacae</i> 17% excelente identificação no gênero
347.	79-12107/08	79.1	DBB-79.1.1	DFI	BAX-BHI	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
348.	79-12107/08	79.1	EBL-79.1.1	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
349.	79-12107/08	79.1	DBL-79.1.1	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
350.	79-12107/08	79.2	EBL-79.2.1	ESIA	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
351.	79-12107/08	79.2	DBL-79.1.1	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
352.	79-12107/08	79.3	IE-79.3.1	ESIA	ISO	+	+	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
353.	79-12107/08	79.3	ID-79.3.1	DFI	ISO	+	+	3 307 773	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
354.	79-12107/08	79.3	DBL-79.3.1	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
355.	79-12107/08	79.3	DBB-79.3.1	DFI	BAX-BHI	-	-	5 215 773	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 97,6 boa identificação
356.	79-12107/08	79.C	ID-79.C.1	DFI	ISO	+	+	3 305 773	<i>Enterobacter cloacae</i> 59,4%, <i>Enterobacter sakazakii</i> 40,4% excelente identificação no gênero
357.	79-12107/08	79.C	IE-79.C.1	ESIA	ISO	+	+	3 307 773	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,4% boa identificação
358.	79-12107/08	79.C	DBL-79.C.1	DFI	BAX-LST	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
359.	79-12107/08	79.C	EBB-79.C.1	ESIA	BAX-BHI	-	-	5 205 773	<i>Raoultella terrigena</i> 68,9%, <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 26,7% baixa discriminação
360.	79-12107/08	79.C	DBB-79.C.1	DFI	BAX-BHI	-	-	5 215 773	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 97,6 boa identificação