



## ÁGAR CROMOGÊNICO DE ISOLAMENTO DE *CRONOBACTER*

### DETECÇÃO DE *CRONOBACTER*

#### **USO**

O Ágar CCI é usado para a detecção de *Cronobacter* spp. em produtos alimentícios e ingredientes destinados a consumo humanos e rações. Também é utilizado para o controle de amostras ambientais. O Ágar CCI é usado em particular para a detecção de *Cronobacter sakazakii* e outras espécies em leite em pó, produtos desidratados e formulações infantis. O tipo de composição do Ágar Cromogênico de Isolamento *Cronobacter* está em conformidade com a formulação encontrada na diretiva NF EN ISO 22964.

#### **HISTÓRIA**

*Cronobacter sakazakii* (anteriormente *Enterobacter sakazakii*) é um bacilo Gram-negativo, móvel, não esporulado, anaeróbio facultativo, que forma colônias amarelas pigmentadas após 48-72 horas de incubação em meio não seletivo. É um patógeno oportunista, causador de meningite e enterite, particularmente em recém-nascidos e crianças, e embora a frequência seja bastante baixa em 1 em 100.000, a mortalidade é alta em cerca de 20 a 50%. Enquanto cepas desta espécie foram isoladas de diferentes alimentos, apenas aqueles produtos destinados a alimentos infantis são envolvidos nos episódios infecciosos. Estudos têm mostrado que 100% do *Cronobacter sakazakii* foram positivos para  $\alpha$ -glucosidase quando ao mesmo tempo 100% das outras espécies de *Cronobacter* foram negativas para esta enzima. Com base nessas observações, o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-glucopiranosídeo (X- $\alpha$ -glucosídeo) foi proposto para diferenciar esta cepa de outros membros da família *Enterobacteriaceae*.

#### **PRINCÍPIOS**

Triptona estimula o crescimento do *Cronobacter*.

O extrato de levedura é uma fonte de vitamina B complexa.

O cloreto de sódio mantém a pressão osmótica.

O desoxicolato de sódio permite a inibição da flora Gram positiva.

A enzima  $\alpha$ -glicosidase hidrolisa o X- $\alpha$ -glicosídeo e libera a aglicona 5 bromo-4-cloro-indolol.

Na presença de oxigênio, essa aglicona é dimerizada e forma o pigmento bromo-cloro-índigo.

A associação de citrato de amônio férrico e tiosulfato de sódio permite a diferenciação de enterobactérias  $H_2S$  positivas das de *Cronobacter*.

#### **COMPOSIÇÃO TÍPICA**

(A composição pode ser ajustada para atingir o desempenho ideal).

Para 1 litro de meio:

- Triptona .....	7,00g
- Extrato de levedura .....	3,00g
- Cloreto de sódio .....	5,00g
- Desoxicolato de sódio .....	0,25g
- Citrato de amônio e ferro .....	1,00g
- Tiosulfato de sódio .....	1,00g
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil, $\alpha$ -D-glucopiranosídeo .....	150,0mg



- Ágar bacteriológico ..... 14,2g

pH do meio pronto para uso a 25°C: 7,3 ± 0,2.

### **PREPARAÇÃO**

- Dissolver 31,6 g de meio desidratado (BK200) em 1 litro de água destilada ou desmineralizado.
- Lentamente, leve à ebulição, com agitação constante, até a completa dissolução.
- Distribuir em tubos ou frascos.
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar e manter a 47-50°C.
- Despejar em placas de Petri e deixar solidificar em uma superfície fria.

- Reconstituição:  36,1 g/L
- Esterilização: 15 min a 121°C

### **INSTRUÇÃO DE USO**

- Adicionar asepticamente 10 g ou 10 mL da amostra para testar em 90 mL de água peptonada tamponada.
- Usar um misturador mecânico se necessário.
- Incubar o caldo a 36 ± 2°C por 18 ± 2 horas.
- Retirar 0,1 mL do pré-enriquecimento e adicionar em 10 mL de caldo de triagem para *Cronobacter* (BM155).
- Incubar a 41,5 ± 1,0°C por 24 ± 2 horas.
- Inocular 0,1 mL do meio de enriquecimento no meio CCI.
- Incubar a 41,5 ± 1,0°C por 24 ± 2 horas.

- Pré-enriquecimento  Diluição 1:10 18 h a 36°C
- Enriquecimento: 0,1 mL 24 h a 41,5°C
- Detecção: Estriar uma alçada do inóculo 24 h a 41,5°C

#### **NOTAS:**

Para tamanhos de amostra maiores, pré-aqueça a Água Peptonada Tamponada a 36 ± 2°C. Determinada concentração da amostra pode comprometer a recuperação de cepas estressadas de *Cronobacter* na presença de outros microrganismos. O usuário deve determinar protocolo a ser seguido.

### **RESULTADO**

Característica das colônias:

<b>Microrganismos</b>	<b>Característica da colônia</b>
<i>Cronobacter</i> spp.	Colônias azuis a verde-azuladas de 1 a 3 mm
<i>Escherichia coli</i>	Colônias brancas com centro esverdeado
<i>Salmonella</i> spp, <i>Proteus</i>	Colônias com centro preto
Bactérias Gram-positiva	Inibido

Prosseguir com os testes de confirmação.

### **CONTROLE DE QUALIDADE**

**Meio desidratado:** pó bege e homogêneo.

**Meio preparado:** ágar âmbar transparente



Resposta de cultura típica após 24 de incubação a 41,5°C:

Microrganismos		Crescimento	Característica
<i>Cronobacter sakazakii</i>	WDCM 00214	Bom	Colônias verde-azuladas
<i>Cronobacter muytjensii</i>	WDCM 00213	Bom	Colônias verde-azuladas
<i>Enterobacter cloacae</i>	WDCM 00083	Bom	Colônias brancas
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	Inibido	-

#### **ARMAZENAMENTO / VALIDADE**

**Meio desidratado:** 2-30°C.

**Meio pré-derramado em placas de Petri:** 2-8°C.

A data de validade está indicada na etiqueta.

**Meios preparados em placas (\*):** 30 dias a 2-8°C.

(\*) Valor de referência determinado sob condições de preparação padrão, seguindo as instruções do fabricante.

#### **APRESENTAÇÃO**

**Meio desidratado:**

Frasco de 500 g .....BK200HA

**Meio pré-derramado em placas de Petri (Ø 90 mm):**

20 placas .....BM15408

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Muytjens, H.L., van der ROS, van de Repe, J., and van Druten, H.A. 1984. Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *Journal of Clinical Microbiology*, 20:684-686.

Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L., and Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 10:398-401.

Iversen, C., Drugan, P., and Forsythe, S. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 96:133-139.

Lehner, A., and Stephan, R. 2004. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*, 67(12):2850-2857.

Guillaume-Gentil, O., Sànnard, V., Kandhai, M.C., Marugg, J.D., and Joosten, H. 2005. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *Journal of Food Protection*, 68(1):64-69.

Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., and Beuchat, L.R. 2005. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104:1-34.

NF EN ISO 22964. Juin 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire. Méthode horizontale pour la recherche de *Cronobacter* spp.



### **OUTRAS INFORMAÇÕES**

As informações fornecidas nos rótulos têm precedência sobre as formulações ou instruções descritas neste documento e são suscetíveis de modificação a qualquer momento, sem aviso prévio.

Código do documento: CCI AGAR\_EN V5

Criação de data: 03-2016

Data de revisão: 02-2019

Motivo da revisão: Nova embalagem, meio desidratado.