

Qualidade higiênico-sanitária de formulações ministradas a neonatos

Hygienic-sanitary quality of infant formulas given to neonates

ABSTRACT

NIE NOV, A. T.; MACEDO, M. B.; FÉLIX, C.; RAMOS, D.; MOREIRA, Â. N.; SILVA, P. E. A. Hygienic-sanitary quality of infant formulas given to neonates. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 34, n. 2, p. 127-138, ago. 2009.

Premature babies hospitalized at the Neonatal Intensive Care Units, particularly those with low weight and that are not allowed to be normally fed, often need nutritional support of Infant Formulas (IF). These formulas, when contaminated, can be the source of nosocomial infections, the most probable way of contamination being the inadequate handling and storage of these formulas. Evaluate the Hygienic-Sanitary quality and the susceptibility profile of the bacteria isolated from IFs prepared in the lactary in the city of Rio Grande-RS to antimicrobial agents. IF samples were collected during 6 months by hospital employees working in the morning (Group A) and afternoon (group B) shifts, totalizing 72 analyzed samples. The Most Probable Number method (MPN/ml) was utilized to measure the amount of thermo-resistant and total coliforms. For mesophilic microorganisms the number of Colony-forming Units (CFU/ml) was counted. Also, samples were cultured in Blood and MacConkey Agar media and the isolates were identified by 16S rRNA sequencing and submitted to antibiogram by the Kirby-Bauer method. The samples from groups A and B presented, respectively, 88.9% and 55.5% of contamination by total coliforms and 61.1% e 38.8% by thermo-resistant coliforms. Concerning the count of mesophilic microorganisms, groups A and B presented, respectively, 69.4% and 52.7% of the samples with results above the allowed limit. The identified microorganisms were Escherichia coli, Acinetobacter spp., Pseudomonas spp. and Enterobacter spp. The antimicrobial susceptibility test showed that all isolates presented resistance to at least three tested antimicrobials and that all of the isolates were resistant to tetracycline and one of them was also resistant to a carbapenem (imipinem).

Keywords: Infant Formula. Contamination. Antimicrobial Resistance.

ANA TALITA NIE NOV¹;
MAÍRA BIDART MACEDO¹;
CAROLINA FÉLIX²;
DANIELA RAMOS¹; ÂNGELA
NUNES MOREIRA²; PEDRO
EDUARDO ALMEIDA SILVA¹

¹Universidade Federal
do Rio Grande

²Universidade Federal
de Pelotas

**Endereço para
correspondência:**

Pedro Eduardo
Almeida da Silva
Rua Quinze de Novembro,
1519, Pelotas, RS
CEP 96015-000
Email:
pedrefurg@gmail.com

RESUMEN

Los recién nacidos prematuros hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos, principalmente aquellos con bajo peso y poca habilidad para alimentarse naturalmente, necesitan el soporte nutricional de preparados para lactantes (PL). Los PL, cuando contaminados, son fuente de infecciones hospitalaria, siendo la manipulación y el almacenamiento inadecuados las causas más frecuentes de los brotes de infección. Evaluar la calidad higiénico-sanitaria y el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de bacterias aisladas en PL. Las muestras se recogieron durante el período de 6 meses con dos grupos de trabajo: matutino (Grupo A) y vespertino (grupo B) del lactario del hospital, totalizando 72 muestras analizadas. Se realizó el recuento de número más probable (NMP/ml) de termotolerantes y coliformes totales y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de los microorganismos mesófilos. Las muestras fueron cultivadas en Agar Sangre y MacConkey Agar y los aislados fueron identificados por la secuenciación del 16S rRNA y sometidos al antibiograma por el método Kirby-Bauer. Las muestras de los grupos A y B, presentaron, 88,9 y 55,5% y 61,1 y 38,8% de contaminación por coliformes totales y coliformes termotolerantes respectivamente. En cuanto a los mesófilos el recuento de microorganismos de los grupos A y B, presento, respectivamente, 69,4 y 52,7% de las muestras con valores arriba del límite permitido. Los microorganismos identificados fueron *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Enterobacter spp.* El antibiograma mostró que los aislados presentaban resistencia por lo menos a tres de los antimicrobianos, todos fueron resistentes a tetraciclina y uno de ellos también fue resistente a un carbapenem (imipinem).

Palabras clave: Fórmula infantil.

Contaminación.

Resistencia antimicrobiana.

RESUMO

Prematuros que se encontram em Unidades de Tratamento Intensivo Neonatal, particularmente aqueles com baixo peso e com dificuldades para receber a alimentação natural, necessitam frequentemente de suporte nutricional por meio de fórmulas infantis (FI). As FI, quando contaminadas, podem ser fontes de infecção hospitalar, sendo a manipulação e o armazenamento inadequados os prováveis meios de contaminação. O estudo objetivou avaliar a qualidade higiênico-sanitária e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das bactérias isoladas em FI preparadas no lactário de um hospital da cidade de Rio Grande-RS. Amostras de FI reconstituídas por lactaristas do turno da manhã (grupo A) e da tarde (grupo B) foram coletadas durante 6 meses, totalizando 72 amostras analisadas. Foi realizada a contagem do Número Mais Provável (NMP/ml) de coliformes totais e termotolerantes e a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml) de microrganismos mesófilos. Além disso, amostras foram semeadas em Agar Sangue e MacConkey e os isolados foram identificados por meio de sequenciamento do 16S rRNA e submetidos ao antibiograma através de método de Kirby-Bauer. As amostras dos grupos A e B apresentaram, respectivamente, 88,9 e 55,5% de contaminação por coliformes totais e 61,1 e 38,8% por coliformes termotolerantes. Na contagem de microrganismos mesófilos, os grupos A e B apresentaram, respectivamente, 69,4 e 52,7% das amostras com contagem acima do limite permitido. Os microrganismos identificados foram *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Enterobacter spp.* O teste de suscetibilidade antimicrobiana mostrou que todos os isolados apresentavam resistência a pelo menos três antimicrobianos testados e que todos foram resistentes à tetraciclina e um também foi resistente a um carbapenem (imipinem).

Palavras-chave: Fórmula infantil.

Contaminação.

Resistência antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

O leite materno é um alimento natural e seguro para a alimentação do recém-nascido, fornecendo uma complexa combinação de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, vitaminas e enzimas, além de benefícios imunológicos, psicológicos e econômicos (KUNZ et al., 1999; PICCIANO, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Frequentemente, os recém-nascidos prematuros, especialmente aqueles hospitalizados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI's) Neonatais, não recebem o leite materno, seja por incapacidade do bebê em sugar o leite materno ou insucesso da retirada deste pela mãe. Dessa forma, é necessário introduzir fórmulas infantis (FI) na alimentação deste recém-nascido (MA et al., 2009; POWERS; NAYLOR; WESTER, 1994).

A imaturidade imunológica e a antibioticoterapia a que são frequentemente submetidos, tornam os recém-nascidos um importante grupo de risco para a aquisição de infecção hospitalar (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005; VIEIRA et al., 1999). A contaminação de fórmulas nutricionais, nestas incluídas as FI usadas como substitutas do leite materno, tem sido implicada na etiologia das infecções hospitalares, especialmente quando administradas a pacientes imunocomprometidos (AIDDO et al., 2000; LEVY et al., 1989; MATLOW et al., 2003; MENG; DOYLE, 2000; NAVAJAS et al., 1992; PATCHELL et al., 1994; SALLES; GOULART, 1997; SANTOS et al., 2004; THURN et al., 1990).

A presença de microrganismos nas FI pode originar-se a partir da matéria-prima contaminada, durante a armazenagem ou transporte inadequado ou pela contaminação durante a preparação (PATCHELL, 1998). Entre os prováveis agentes contaminantes das fórmulas infantis, o grupo de coliformes ocupa lugar de destaque (NOVAK et al., 2001). Bacilos Gram-negativos, tais como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Serratia marcescens* e *Salmonella* spp, têm sido identificados (NAVAJAS et al., 1992; PATCHELL et al., 1994; THURN et al., 1990).

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade higiênico-sanitária e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das bactérias isoladas em FI preparadas no lactário de um hospital da cidade de Rio Grande-RS.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

As amostras de FI foram preparadas no lactário do Hospital Universitário de Rio Grande-RS em dois turnos, pelos profissionais do turno da manhã (grupo "A") e da tarde (grupo "B"). O volume total da FI (variável conforme as necessidades dos pacientes) produzido pelo grupo "A" foi utilizado das 08 às 18h do mesmo dia, enquanto que o volume da FI produzida pelo grupo "B", foi utilizado das 20:00 às 6:00h do dia seguinte. A FI ficou acondicionada nas mamadeiras de plástico, segundo as doses individuais de cada recém-nascido, e armazenada em geladeira (4°C) até o horário da distribuição. O volume

excedente produzido ficou armazenado em recipiente de vidro, na mesma geladeira. A temperatura foi avaliada utilizando-se termômetro de escalas máxima e mínima para verificar possível variação térmica da geladeira nesse período.

COLETA

De julho de 2006 a janeiro de 2007 foram realizadas 18 coletas de amostras de FI produzida por cada grupo em dois horários, imediatamente após o preparo e após seis horas de estocagem a 4°C, totalizando 72 amostras. Cada coleta de amostra consistiu da retirada de 10ml da FI, por meio de seringa descartável, sendo a amostra em seguida transportada para o laboratório em recipiente isolante e imediatamente processada.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Foram realizadas análises quantitativas para enumeração de coliformes totais, coliformes termotolerantes e microrganismos mesófilos de acordo com a metodologia da American Public Health Association (1992). Os resultados para coliformes foram avaliados de acordo com os limites estabelecidos pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2001), que preconiza um número mais provável (NMP) de bactérias coliformes totais $\leq 10/\text{ml}$ e ausência de coliformes termotolerantes. Para os microrganismos mesófilos, os resultados foram avaliados de acordo com Bostford et al. (1985) e Patchell et al. (1994), que descrevem como aceitável a contagem de até 10^2 UFC ml^{-1} .

IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO DE REGIÃO DO GENE 16S rRNA

Após a observação de que havia amostras de FI contaminadas, buscou-se isolar os microrganismos mais frequentes, procedendo-se oito coletas de FI. Foram semeados 75µl de cada amostra em placas de Petry contendo meio de cultivo Agar Sangue e MacConkey e as placas foram incubadas a 37°C por 24-48h. Estas análises, assim como as anteriores, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FURG (RS). Após o isolamento dos microrganismos, foi realizada a extração de DNA e a amplificação de uma região do gene 16S rRNA (WOO et al., 2001). O sequenciamento da região do gene do 16S rRNA foi realizado pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (RS), utilizando-se o sequenciador de DNA automático Mega BACETM 1000 (GE HEALTHCARE) e o kit de sequenciamento “DYEenamic ET DYE Terminator Cycle” (GE HEALTHCARE), de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações. Foi realizada uma reação de PCR em cada cavidade de placas de 96 cavidades utilizando entre 100 e 500ng de produto purificado da PCR citada anteriormente, 5pmol de cada um dos oligonucleotídeos para amplificação do 16S rRNA (FD1, RP2 e S33) e 2µl da mistura para sequenciamento “DYEenamic ET terminator reagente premix”, em um volume final de 5µl. A amplificação

ocorreu em um termociclador automático (Eppendorf) utilizando-se 25 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto. Os produtos das reações foram purificados com etanol (0,5 volume de acetato de amônia 7,5M e 2,5 volumes de etanol absoluto), lavados com etanol 70%, secos e submetidos à eletroforese no Sequenciador Automático de DNA. As amostras foram injetadas em capilares contendo a matriz, utilizando a voltagem de 1 a 2 KV por 120 a 75 segundos e foram corridas a 9KV por, aproximadamente, 130 minutos. As sequências dos produtos da PCR foram analisadas utilizando-se o programa Vector NI e comparadas com sequências de genes 16S rRNA, depositadas no GeneBank database por meio de alinhamento de sequências, utilizando-se o programa BLASTN do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

ANTIBIOGRAMA

O teste de suscetibilidade antimicrobiana foi realizado por meio do método de Kirby-Bauer segundo as normas da CLSI M100-S15 (CLSI, 2005). Os antimicrobianos testados foram: Amicacina (30µg), Amoxicilina/Clavulanato (30µg), Ampicilina (10µg), Aztreonam (30µg), Cefaclor (30µg), Cefalotina (30µg), Ceftriaxona (30µg), Cloranfenicol (30µg), Estreptomicina (10µg), Imipinem (10µg), Nitrofurantoína (300µg), Norfloxacin (10µg), Ofloxacin (05µg), Sulfametoxazol/Trimetropim (25µg) e Tetraciclina (30µg).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados estatisticamente a partir do Teste t de *Student*. Este teste foi realizado para comparar as contagens entre as amostras coletadas imediatamente após o preparo e seis horas após a estocagem a 4°C e o número de amostras de FI contaminadas em cada grupo e em cada horário. Foi realizada análise de variância dos resultados quantitativos com significância estatística como inferência para comparações quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Do total de 36 amostras por grupo, 32 (88,9%) do grupo A (16 coletadas imediatamente após o preparo e 16 coletadas após seis horas de estocagem a 4°C) e 20 (55,5%) do grupo B (12 coletadas imediatamente após o preparo e 08 coletadas após seis horas de estocagem a 4°C), apresentaram contagem de coliformes totais acima de 10NMP/ml (Tabela 1). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram encontradas, em ambos os grupos, quando se comparou o valor do NMP/ml de coliformes totais imediatamente após o preparo da fórmula infantil e seis horas após esse preparo (Figura 1). Vinte e duas amostras (61,1%) do grupo A (11 coletadas imediatamente após o preparo e 11 coletadas após seis horas de estocagem a 4°C) e 14 (38,8%) do grupo B (07 coletadas imediatamente após o preparo e 07 coletadas após seis horas de estocagem a 4°C) apresentaram presença de coliformes termotolerantes (Tabela 1).

Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram igualmente encontradas em ambos os grupos, quando se comparou o NMP/ml de coliformes termotolerantes imediatamente após o preparo da FI e seis horas após esse preparo (Figura 2).

Tabela 1 – Porcentagem de amostras de FI reconstituídas pelos profissionais do turno da manhã (grupo A) e da tarde (grupo B) impróprias para o consumo, segundo os padrões da Legislação Brasileira^{a,b,c}, em relação ao período de estocagem a 4°C

	0h ^d (n=36)		6h ^e (n=36)	
	A ^f	B ^g	A	B
Bactérias Mesófilas	77,7	61,1	50,0	55,5
Coliformes Totais a 37°C	88,9	66,6	88,9	44,4
Coliformes Termotolerantes a 45.5°C	61,1	38,8	61,1	38,8

^aContagem de Bactérias Mesófilas $\leq 10^2$ UFC ml⁻¹;

^bContagem de Coliformes Totais ≤ 10 NMP/ml;

^cContagem de Coliformes Termotolerantes: ausência;

^dColetado e analisado imediatamente após o preparo das FI;

^eColetado e analisado após 6h de estocagem a 4°C;

^fGrupo que trabalhou no preparo das FI no turno da manhã;

^gGrupo que trabalhou no preparo das FI no turno da tarde.

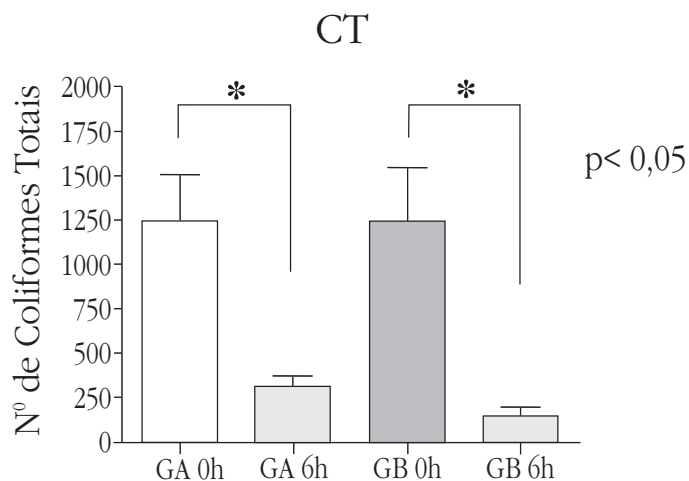


Figura 1 – Contagens (NMP/ml) de coliformes totais (CT) em amostras de FI reconstituídas por lactaristas do turno da manhã (GA) e tarde (GB) após os diferentes períodos de estocagem (0h; 6h)

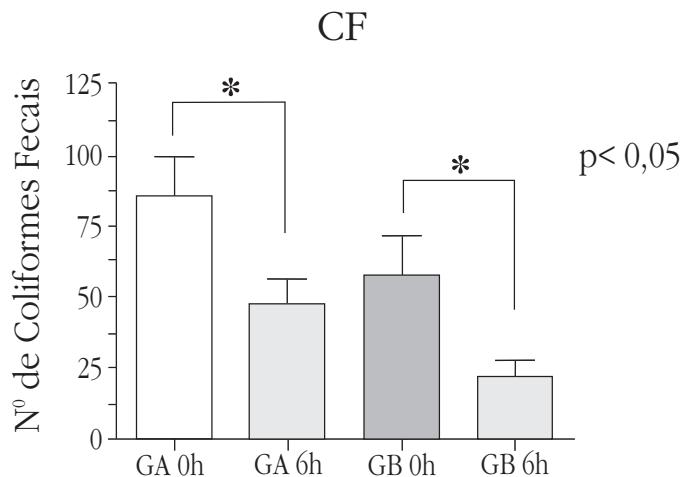


Figura 2 – Contagens (NMP/ml) de coliformes termotolerantes (CF) em amostras de FI reconstituídas por lactaristas do turno da manhã (GA) e tarde (GB) após os diferentes períodos de estocagem (0h; 6h)

Do total de 36 amostras por grupo, 23 (63,9%) do grupo A e 21 (58,3%) do grupo B apresentaram contagem positiva de microrganismos mesófilos acima de 10^2 UFC ml⁻¹.

As condições higiênico-sanitárias das FI variaram de acordo com o grupo que as preparou, da mesma forma que o índice de contaminação variou de acordo com o tempo de refrigeração (Tabela 1).

Os microrganismos isolados foram identificados como *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Enterobacter spp.* O resultado do teste de susceptibilidade antimicrobiana mostrou que todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos três dos antimicrobianos testados: *Escherichia coli* foi resistente à Ampicilina, Amoxicilina/Clavulanato, Cefalotina, Nitrofurantoína e Tetraciclina; *Acinetobacter spp* foi resistente ao Aztreonam, Cefaclor, Nitrofurantoína; *Pseudomona spp* foi resistente à Ampicilina, Amoxicilina/Clavulanato, Cloranfenicol, Imipinem, Nitrofurantoína, Sulfametoxazol/Trimetropim; *Enterobacter spp* foi resistente ao Cefaclor, Ofloxacina. Todos os isolados foram resistentes à Tetraciclina e suscetíveis à Amicacina, Estreptomina, Ofloxacina e Norfloxacin.

DISCUSSÃO

O papel dos alimentos como uma rota de circulação, manutenção e via de transmissão exógena de microrganismos potencialmente causadores de enfermidades tem sido descrito em diversos estudos (CASEWELL; PHILLIPS, 1978; CURTIS et al., 1989; LEVY et al., 1988; NOVAK et al., 2001; THURN et al., 1990; TODD, 1997).

Considerando os padrões de referência para a presença de microrganismos mesófilos, coliformes totais e coliformes termotolerantes, este estudo encontrou amostras contaminadas, independente do grupo de profissionais envolvidos na preparação das FI. Estes dados sugerem que a manipulação errônea das fórmulas pode ser a provável fonte de contaminação, inclusive sendo apontada como a mais importante entre as possíveis causas contaminantes de formulações, segundo Patchell (1998). A elevada porcentagem de contaminação por bactérias mesófilas ($\geq 50\%$) observada nas amostras analisadas indicam que os manipuladores podem atuar como potenciais propagadores de microrganismos patogênicos, visto que a maioria das bactérias patogênicas caracteriza-se como hábeis em crescer na faixa de mesofilia. Estes achados estão de acordo com outros estudos (FRAZIER, 1976; QUEIROZ et al., 2003; SALLES; GOULART, 1997; SANTOS; TONDO, 2000; SANTOS et al., 2004).

Interessantemente, ocorreu, em todas as amostras, uma redução no número de microrganismos mesófilos após a estocagem a 4°C durante seis horas. Ocorreu, nas amostras do grupo "B", uma redução de coliformes totais após seis horas de estocagem a 4°C . Estudo anterior demonstrou uma redução do número destes mesmos microrganismos após 20 horas de estocagem (QUEIROZ et al., 2003). Pode-se inferir que este decréscimo esteja relacionado a uma possível redução de *fitness*, pela ação da baixa temperatura que já foi observada estar relacionada a morte celular em microrganismos da família das Enterobacteriaceas (IVERSEN; FORSYTHE, 2004). Outra possível causa seria a presença de alta concentração de lactose nas FI cujo transporte para o interior da célula bacteriana, poderia causar a morte do microrganismo devido ao colapso da força quimiosmótica (DYKHUIZEN; HARTL, 1978).

A quantificação de coliformes termotolerantes mostrou que 61,1 e 38,8 % das amostras dos grupos A e B, respectivamente, estavam, segundo a Legislação Brasileira (BRASIL, 2001), inapropriadas para o consumo.

Os sistemas utilizados para identificar os microrganismos dividem-se em fenotípicos e genotípicos, sendo que ambos apresentam limitações. Neste estudo, preferiu-se a utilização do sequenciamento de uma região do gene 16S rRNA em razão de que a diversidade da microbiota possível de contaminar as FI tornaria complexa a realização de uma bateria fenotípica *in house* que pudesse abranger todas as possibilidades, além do que o grupo dispõe de fácil acesso ao sequenciamento de DNA. Os microrganismos identificados neste estudo têm sido relacionados com infecção hospitalar, em particular em pacientes internados em UTI's (BERGOGNE-BEREZIN; TOWER, 1999; MAMMINA et al., 2008; URBAN; SEGALMAURER; RAHAL, 2003).

Encontram-se no ambiente hospitalar numerosos microrganismos que apresentam resistência aos antimicrobianos e biocidas, e em particular, tem sido demonstrado elevadas taxas de resistência antimicrobiana entre germes isolados de UTI's (MENDES; TURNER, 2001; PFALLER et al., 2001; WU et al., 2006). Ao serem transmitidos via alimentação, estes microrganismos podem transferir genes que conferem a resistência antimicrobiana a outras bactérias da própria espécie ou de espécies não-relacionadas, patogênicas ou não (RAPINI; TEIXEIRA; MARTINS, 2004; WITTE, 2000).

A pressão seletiva ocasionada pelo extenso uso de antibióticos no meio hospitalar seleciona cepas resistentes de diferentes microrganismos que podem estar relacionados com infecção hospitalar. O isolamento de quatro microrganismos resistentes à Tetraciclina, um resistente ao Imipenem (*Pseudomonas spp*) e outro resistente ao Aztreonam (*Acinetobacter spp*) indica que o risco de transmissão de potenciais patógenos está crescendo da dificuldade em estabelecer um tratamento em virtude da resistência aos antimicrobianos, principalmente em relação à contaminação por *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter sp*. A resistência antimicrobiana, particularmente entre bactérias Gram-negativas, é um importante problema que causa um impacto direto no tratamento de infecções hospitalares, principalmente quando se trata das β -lactamases de espectro-estendido e cefalosporinas de terceira geração (Amp C) multidroga-resistência, visto que estas são terapêuticas utilizadas quando já houve falha das demais (RAPINI; TEIXEIRA; MARTINS, 2004).

CONCLUSÕES

O uso intensivo de antibióticos no ambiente hospitalar cria uma pressão que resulta na seleção de cepas resistentes. Desta forma, é esperado que microrganismos de origem nosocomial sejam mais resistentes que àqueles oriundos da comunidade, a sua transmissão através de FI deve ser evitada a partir de medidas de higienização adequada. Neste sentido, o estabelecimento de controles microbiológicos periódicos bem como o estabelecimento de boas práticas de manejo, desde o controle da qualidade da matéria-prima até a sua administração ao paciente, passando pela adequada higienização de utensílios e mãos pode possibilitar a obtenção da qualidade higiênico-sanitária das FI.

REFERÊNCIAS/REFERENCES

- AIDDO, K. E.; OLIVEIRA, M. H.; BONELLI, R.; BATISTA, C. R. V. Microbiological quality of reconstituted enteral formulations used in hospitals. *Nutrition*, v. 16, n. 9, p. 729-733, 2000.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for Examination of Dairy Products*. Washington, DC.: American Public Health Association, 1992.
- BERGOGNE-BEREZIN E.; TOWNER K. J. *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin. Micr. Rev.*, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1999.
- BOTSFORD, K. B.; WEINSTEIN, R. A.; BOYER, K. M.; NATHAN, C.; CARMAN, M.; PATON, J. B. Gram-negative bacilli in human milk feedings: quantitation and clinical consequences for premature infants. *J. Pediatr.*, v. 109, n. 4, p. 707-710, 1985.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Regulamento técnico: princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos*. Resolução nº 12. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2001.
- CASEWELL, M. W.; PHILLIPS I. Food as source of *Klebsiella* species for colonization and infection of intensive care patients. *J. Clin. Pathol.*, v. 31, n. 9, p. 841-849, 1978.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Tenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S15*. Villanova, PA, 2005.

CURTIS, P.; FREELAND, D. O.; ROBERT, D.; ROLLER, B. S.; BRUCE, M.; WOLFER, M. D.; FLYNN, N. M. Microbial contamination of continuous drip feedings. *J. Parent. Enteral Nutr.*, v. 13, n. 1, p. 18-22, 1989.

DYKHUIZEN, D.; HARTL, D. Transport by lactose permease of *Escherichia coli* as the basis of lactose killing. *J. Bacteriol.*, v. 135, n. 3, p. 876-882, 1978.

FRAZIER, N. C. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1976. 512 p.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk. *Food Microbiol.*, v. 21, n. 6, p. 771-777, 2004.

JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Bacterial resistance: a worldwide problem. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 31, n. 2, p. 379-388, 1998.

KUNZ, C.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B.; HEBSEBM R. Nutritional and biochemical properties of human milk, part I: general aspects, proteins and carbohydrates. *Clin Perinatol.*, v. 26, n. 2, p. 307-333, 1999.

LEVY, J.; LAERTHEM, Y. V.; VERHAEGEN, G.; PERPETE, C.; BUTZLER, J. P.; WENZEL, R. P. Contaminated enteral nutrition solutions as a cause of nosocomial bloodstream infection: a study using plasmid fingerprinting. *J. Parent. Enteral Nutr.*, v. 13, n. 3, p. 228-234, 1989.

MA, L.; ZHANG, G.; SWAMINATHAN, B.; DOYLE, M.; BOWEN, A. Efficacy of protocols for cleaning and disinfecting infant feeding bottles in less developed communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, n. 1, p. 132-139, 2009.

MAMMINA, C.; DI CARLO, P.; CIPOLLA, D.; CASUCCIO, A.; TANTILLO, M.; PLANO, M. R.; MAZZOLA, A.; CORSELLO, G. Nosocomial colonization due to imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemiologically linked to breast milk feeding in a neonatal intensive care unit. *Acta Pharmacol Sin.*, v. 29, n. 12, p. 1486-1492, 2008.

MATLOW, A.; WRAY, R.; GOLDMAN, C.; STREINTEN BERGER, L.; FREEMAN, R.; KOUACH, D. Microbial contamination of enteral feed administration sets in a pediatric institution. *Am. J. Infect. Control.*, v. 31, n. 1, p. 49-53, 2003.

MENDES, C.; TURNER, P. J. Unit differences in pathogen occurrence among European MYSTIC Program (1997-2000). *Diagn. Microbiol. Dis.*, v. 41, n. 4, p. 191-196, 2001.

MENG, J.; DOYLE, M. Introduction: microbial food safety. *Microbes. Infect.*, v. 4, n. 4, p. 395-397, 2000.

MUSSI-PINHATA, M. M.; REGO, M. A. C. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. *J. Pediatr.*, v. 81, n. 1 Suplemento, p. S59-S68, 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>.

NAVAJAS, M. F. C.; CHACON, D. J.; SOLVAS, J. F.; VARGAS, R. G. Bacterial contamination of enteral feeds as a possible risk of nosocomial infection. *J. Hosp. Infect.*, v. 21, n. 2, p. 111-120, 1992.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; ANSENSI, M. D.; MORAES, B. A.; RODRIGUES, D. P. Resistência Antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. *Cad. Saúde Pública*, v. 17, n. 3, p. 713-717, 2001.

PATCHELL, C. J. Reducing bacterial contamination of Enteral feeds. *Arch. Dis. Child.*, v. 78, n. 2, p. 166-170, 1998.

- PATCHELL, C. J.; ANDERTON, A.; MACDONALD, A.; GEORGE, R. H.; BOOTH, I. W. Bacterial contamination of enteral feeds. *Arch. Dis. Child.*, v. 70, n. 4, p. 327-330, 1994.
- PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; BIEDENBACH, D. J. MYSTIC Program Study Group (USA). Antimicrobial resistance trends in carbapenem prescribing medical units: report of the 1999 and 2000 results from MYSTIC Program (USA). *Diagn. Microbil. Infect. Dis.*, v. 41, n. 4, p. 177-182, 2001.
- PICCIANO, M. F. Human milk: nutritional aspects of a dynamic food. *Biol. Neonate.*, v. 74, n. 2, p. 84-93, 1998.
- POWERS, N. G.; NAYLOR, A. J.; WESTER, R. A. Hospital policies: crucial to breastfeeding success. *Semin. Perinatol.*, v. 18, n. 6, p. 517-524, 1994.
- QUEIROZ, M. L. P.; CARNEIRO, L. M. A.; SILVA, A. P. S.; MERQUIOR, V. L. C. Antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli isolated from infant formulas. *FEMS. Microbiol. Lett.*, v. 228, n. 2, p. 175-179, 2003.
- RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E. Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite cru de cabra, queijo e manipuladores. *Rev. Hig. Alim.*, v. 17, p. 162, 2004.
- RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B.; KUNZ, C.; JENSEN, R. Nutritional and biochemical properties of human milk, part II: lipids, micronutrients and bioactive factors. *Clin. Perinatol.*, v. 26, n. 2, p. 335-359, 1999.
- SALLES, R. K.; GOULART, R. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. *Rev. Saúde Pública.*, v. 31, n. 2, p. 131-139, 1997.
- SANTOS, B. H. C.; SOUZA, E. L.; SOUZA, C. P.; SERRÃO, L. H.; AMARAL, W. C. Manipuladores como Causas Potenciais de Contaminação Microbiana de Alimento Enteral. *Infarma*, v. 15, p. 11-12, 2004.
- SANTOS, M. I. S.; TONDO, E. C. Determinação de perigos e pontos críticos de controle para implantação de sistema de análise de perigos e pontos de controle em lactários. *Rev. Nutr.*, v. 13, n. 3, p. 211-222, 2000.
- THURN, J.; CROSSLEY, K.; GETS, A.; MAK, M. S.; JOHNSON, J. Enteral hyperalimentation as a source of nosocomial infection. *J. Hosp. Infect.*, v. 15, n. 3, p. 203-207, 1990.
- TODD, E. C. Epidemiology of foodborne disease: a worldwide review. *World Health Stat. Q.*, v. 50, n. 1-2, p. 30-50, 1997.
- URBAN, C.; SEGAL-MAURER, S.; RAHAL, J. J. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36, n. 10, p. 1268-1274, 2003.
- VIEIRA, L. A.; CASTRO, E. A. R.; DUARTE, J. L. B.; PINHEIRO, S. R.; SUASSUNA, I.; PEREIRA, J. A. A. Colonização intestinal de recém-natos por enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos em unidade neonatal. *J. Pediatr.*, v. 75, n. 2, p. 83-90, 1999.
- WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.*, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.
- WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int. J. Antimicrobiol. Agents*, v. 14, n. 4, p. 321-325, 2000.
- WOO, P. C. Y.; NG, K. H. L.; LAU, S. K. P.; YIP, K. T.; FUNG, A. M. Y.; LEUNG, K. W.; TAM, D. M. W.; QUE, T. L.; YUEN, K. Y. Usefulness of the microSeq 500 16S ribosomal DNA-Based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 5, p. 1996-2001, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative Study Team on the role of Breastfeeding on the prevention of infant mortality. Effect of breastfeeding infant and child mortality due to infectious disease in less developed countries: a pooled analysis. *Lancet*, v. 355, n. 9202, p. 451-455, 2000.

WU, C. J.; LEE, H. C.; LEE, N. Y.; SHIH, H. I.; KO, N. Y.; WANG, L. R.; KO, W. C. Predominance of Gram-negative bacilli and increasing antimicrobial resistance in nosocomial bloodstream infections at a university hospital in southern Taiwan, 1996-2003J. *Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 39, n. 2, p. 135-143, 2006.

Recebido para publicação em 30/12/08.

Aprovado em 17/07/09.