

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE CEPAS *CRONOBACTER* SPP. ISOLADAS DE ALIMENTOS NO BRASIL POR MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING

P.V. Costa¹, L. Vasconcellos², M.L.L. Brandão³

1-Departamento de Microbiologia – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil – 55 (21) 3865-5161 – Fax: (21) 2260-4727 – e-mail: (paulavasconcelosc@gmail.com)

2-Departamento de Microbiologia – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil – 55 (21) 3865-5161 – Fax: (21) 2260-4727 – e-mail: (luiza.vasconcellos@incqs.fiocruz.br)

3-Departamento de Controle de Qualidade – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil – 55 (21) 3882-7029 – Fax: (21) 2260-4727 – e-mail: (marcelo.brandao@bio.fiocruz.br)

RESUMO – Este estudo avaliou a diversidade genética de cepas de *Cronobacter* isoladas de alimentos no Brasil. Dezoito cepas foram tipificadas por *Multi-Locus Sequence Typing* e outras cepas depositadas no banco de dados foram avaliadas. Das 18 cepas, o Tipo Sequencial (ST) foi determinado em seis, e três STs novos foram descritos: ST738-740. No total, 82 cepas de *Cronobacter* isoladas de alimentos no período de 2007 a 2018 foram identificadas em 56 STs distintos, apresentaram uma proporção de 1,5 cepa/ST. Dos 56 STs, 19 (33,9%) já foram identificados em amostras clínicas no mundo, incluindo cepas ST4, que é reconhecido por causar infecções severas em neonatos, incluindo meningites. Cepas associadas a casos clínicos foram identificados em alimentos como fórmulas infantis e leite em pó, que são consumidos por neonatos. Ingredientes de alimentos e pimenta também apresentaram STs associados a casos clínicos, e o risco destes alimentos para idosos e imunocomprometidos deve ser considerado.

ABSTRACT – This study evaluated the genetic diversity of *Cronobacter* strains isolated from foods in Brazil. Eighteen strains were typified by Multi-Locus Sequence Typing and other strains deposited in the database were evaluated. Of the 18 strains, the Sequence Type (ST) was determined in six, and three new STs were described: ST738-740. In total, 82 strains of *Cronobacter* isolated from foods in the period from 2007 to 2018 were identified in 56 different STs, showing a proportion of 1.5 strains/ST. Of the 56 STs, 19 (33.9%) have already been identified in clinical samples worldwide, including ST4 strains, which are recognized for causing severe infections in neonates, including meningitis. Strains associated with clinical cases have been identified in foods such as infant formulas and powdered milk, which are consumed by neonates. Food ingredients and pepper also had STs associated with clinical cases, can be a risk for the elderly and immunocompromised.

PALAVRAS-CHAVE: *Cronobacter*; MLST; epidemiologia molecular; segurança de alimentos; patógenos emergentes

KEYWORDS: *Cronobacter*; MLST; molecular epidemiology; security of foods; emergent pathogens

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



1. INTRODUÇÃO

Cronobacter é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae* composto por sete espécies (Iversen et al., 2008; Joseph et al., 2012a). As espécies de *Cronobacter* podem ser agrupadas de acordo com sua relevância clínica em três grupos: grupo 1) *C. sakazakii* e *C. malonaticus*, que compreende a maioria dos isolados clínicos em todas as faixas etárias; grupo 2) *C. turicensis* e *C. universalis*, que são raramente reportadas em casos de infecções; e grupo 3) *C. dublinensis*, *C. muytjensii* e *C. condimenti*, que são principalmente comensais ambientais e provavelmente possuem pouco ou nenhum significado clínico (Forsythe, 2018).

Determinadas espécies de *Cronobacter* são consideradas patógenos oportunistas, tendo sido associadas a diversos casos de infecções em neonatos devido ao consumo de fórmulas infantis desidratadas (FID) (FAO/WHO, 2008; Forsythe, 2018). A literatura apresenta relatos de surtos e casos isolados de infecções por *Cronobacter* em diversos países, inclusive no Brasil (FAO/WHO, 2008; Brandao et al., 2018; Chaves et al., 2018). Apesar das infecções estarem, a princípio, associadas a neonatos, já existem relatos de casos em crianças de maior idade e em adultos (Alsonosi et al., 2015; Piper et al., 2018).

As síndromes clínicas das infecções por *Cronobacter* em neonatos incluem a meningite, enterocolite necrosante e bacteremia (Forsythe, 2018). A maioria das crianças que sobrevivem à meningite associada a *Cronobacter* desenvolve sequelas neurológicas irreversíveis como: hidrocefalia, tetraplegia e retardamento do desenvolvimento neurológico (Friedemann et al., 2009; Forsythe, 2018). Em adultos, a maioria dos casos de infecções ocorre em pacientes previamente tratados com antibióticos, idosos, imunocomprometidos, pacientes com implantes médicos ou com alguma doença aguda, crônica ou grave. As infecções neste grupo são muito variadas, já tendo sido descritos casos de conjuntivite, sepse biliar, apendicite, infecções de ferida, pneumonia e infecções urinárias (Alsonosi et al., 2015; Forsythe, 2018).

As fontes de infecções em adultos ainda são desconhecidas, mas podem ocorrer devido ao aumento da suscetibilidade a cepas comensais de *Cronobacter* (Forsythe, 2018). Os alimentos parecem ser uma potencial fonte de colonização e contaminação por *Cronobacter* nestes indivíduos (Brandao et al., 2017; Vasconcellos et al., 2018, Silva et al., 2019; Costa et al., 2020). Além disso, em muitos casos de infecções causados por *Cronobacter* em neonatos, o veículo de contaminação não pode ser identificado e muitos pacientes não ingeriram FID, o que leva a crer que outras fontes poderiam ser o veículo de contaminação destes patógenos (Brandao et al., 2018; Chaves et al., 2018; FAO/WHO, 2008).

Um protocolo de genotipagem pela técnica de *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) foi desenvolvido para o gênero *Cronobacter* (www.pubMLST.org/cronobacter). Esta técnica utiliza uma base de dados que recebe, organiza, compara e disponibiliza informações sobre sequências de DNA para toda a comunidade científica. O banco de dados tem como objetivo prover a identificação precisa e de alta discriminação das cepas do gênero, sendo considerado um método molecular eficiente e robusto para tipificação das cepas e para monitoramento de surtos (Joseph et al., 2012b). O banco de dados já conta com 3.067 estirpes depositadas e 742 tipos sequenciais (ST) descritos (último acesso: 28/07/2020).

Tendo em vista a importância para a saúde pública em se minimizar os casos de infecções por *Cronobacter*, a avaliação molecular para identificação da circulação de clones epidêmicos em amostras de alimentos e sua associação a casos esporádicos ou surtos de origem alimentar é importante. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de cepas de *Cronobacter* spp. isoladas de alimentos no Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas Bacterianas

Foram avaliadas cepas de *Cronobacter* spp. isoladas a partir de amostras de alimentos no Brasil e caracterizadas pela técnica do MLST. Dezoito cepas foram tipificadas no presente estudo (Tabela 1) e outras 76 cepas, previamente tipificadas e depositadas no banco de dados, foram utilizadas para as análises filogenéticas.



2.2 Tipificação pela Técnica do *Multi-locus Sequence Typing* (MLST)

A extração de DNA das cepas foi realizada com o kit *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e a concentração foi dosada em espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA).

Os sete genes do *MLST* (*atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB* e *ppsA*) foram amplificados utilizando os *primers* e condições de PCR disponíveis no protocolo do banco de dados (<http://pubmlst.org/cronobacter/info/protocol.shtml>). Os fragmentos de PCR purificados foram sequenciados com uso do serviço da Plataforma-PDTIS de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Os cromatogramas foram avaliados utilizando o software *BioEdit 709*. As sequências dos genes foram analisadas e os números de alelos e STs foram atribuídos e determinados através das ferramentas disponíveis no banco de dados do MLST (www.pubMLST.org/cronobacter). Os novos alelos encontrados tiveram os seus cromatogramas enviados para o curador do banco de dados (Prof. Stephen Forsythe), que avaliou e designou os novos alelos e conseqüentemente a descrição dos novos STs. O perfil do MLST foi avaliado no Grape Tree (Zhou et al., 2008) utilizando a algoritmo de “*Minimun spanning tree*” (MST).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tipificação pelo MLST das 18 cepas avaliadas neste estudo está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Tipificação das cepas de *Cronobacter* pela técnica do MLST.

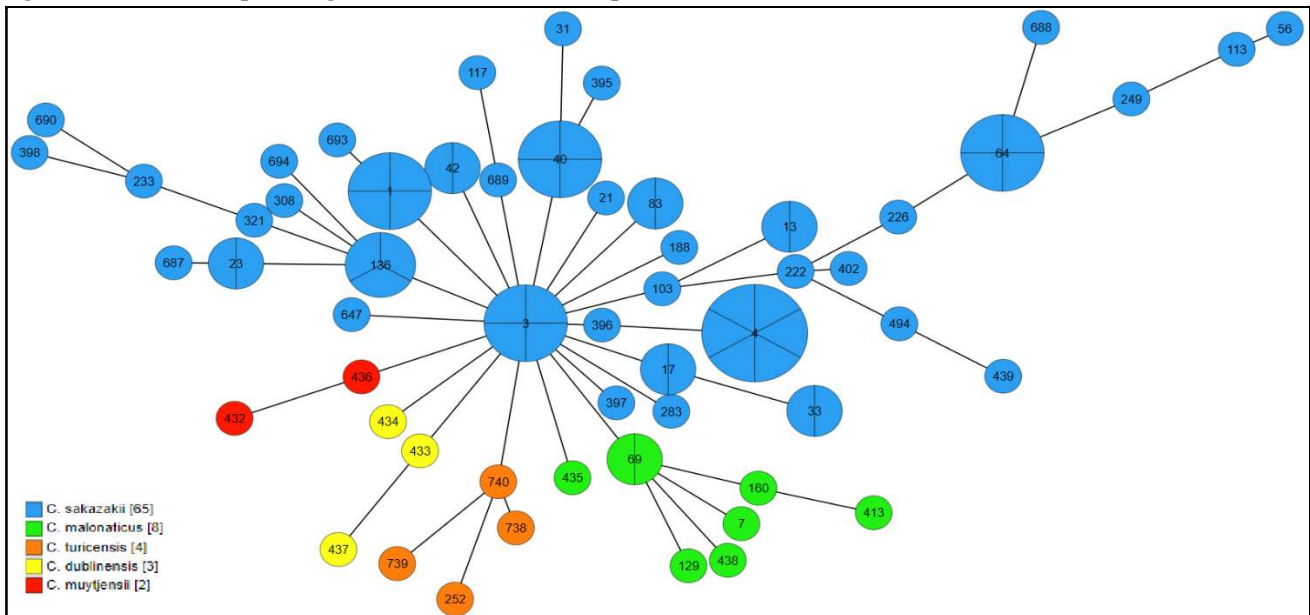
Cepas	Origem	<i>atpD</i>	<i>fusA</i>	<i>glnS</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>	<i>pps</i>	ST
C175	Farinha de arroz	112	173	201	307	NI	130	282	ND
C224	Alimento proveniente da culinária japonesa	15	118	30	32	147	148	159	324
C232	Alimento proveniente da culinária japonesa	157	20	26	308	235	257	NI	ND
C236	Alimento proveniente da culinária japonesa	157	20	262	308	235	257	NI	ND
C256	Aveia em flocos	157	48	34	309	NI	27	NI	ND
C258	Farinha de linhaça	112	99	26	130	NI	258	NI	ND
C259	Farinha de linhaça	86	22	104	120	117	116	152	252
C266	Farinha de linhaça	22	170	57	16	275	259	156	738*
C267	Farinha de linhaça	3	11	13	18	11	17	13	21
C275	Farinha de linhaça	58	63	224	310	82	78	NI	ND
C278	Farinha de linhaça	36	22	42	93	116	49	53	739*
C279	Farinha de linhaça	192	171	43	NI	NI	154	109	ND
C280	Farinha de linhaça	6	49	4	52	52	NI	72	ND
C281	Farinha de linhaça	NI	43	223	161	154	27	196	ND
C283	Farinha de linhaça	193	169	134	NI	80	260	NI	ND
C284	Farinha de linhaça	6	49	4	52	52	NI	72	ND
C286	Farinha de linhaça	NI	100	263	133	211	130	282	ND
C287	Farinha de linhaça	22	22	57	16	275	259	156	740*

NI – Não identificado; ST – *Sequence typing*; *- Novos STs descritos no banco de dados.

Das 18 cepas avaliadas, o ST foi determinado em seis cepas, e três STs novos foram descritos no banco de dados: ST738-740. Nas demais cepas, não foi possível a determinação dos STs devido a problemas no sequenciamento de um ou mais genes. Desta forma, a utilização de iniciadores alternativos ou alterações na metodologia são necessárias para determinação destes alelos.

A avaliação da diversidade genética das cepas *Cronobacter* spp. isoladas de alimentos e depositadas no banco de dados avaliadas pelo MST está apresentada na Figura 1.

Figura 1 - *Minimun spanning tree* dos STs das 82 cepas de *Cronobacter* isoladas de alimentos no Brasil.

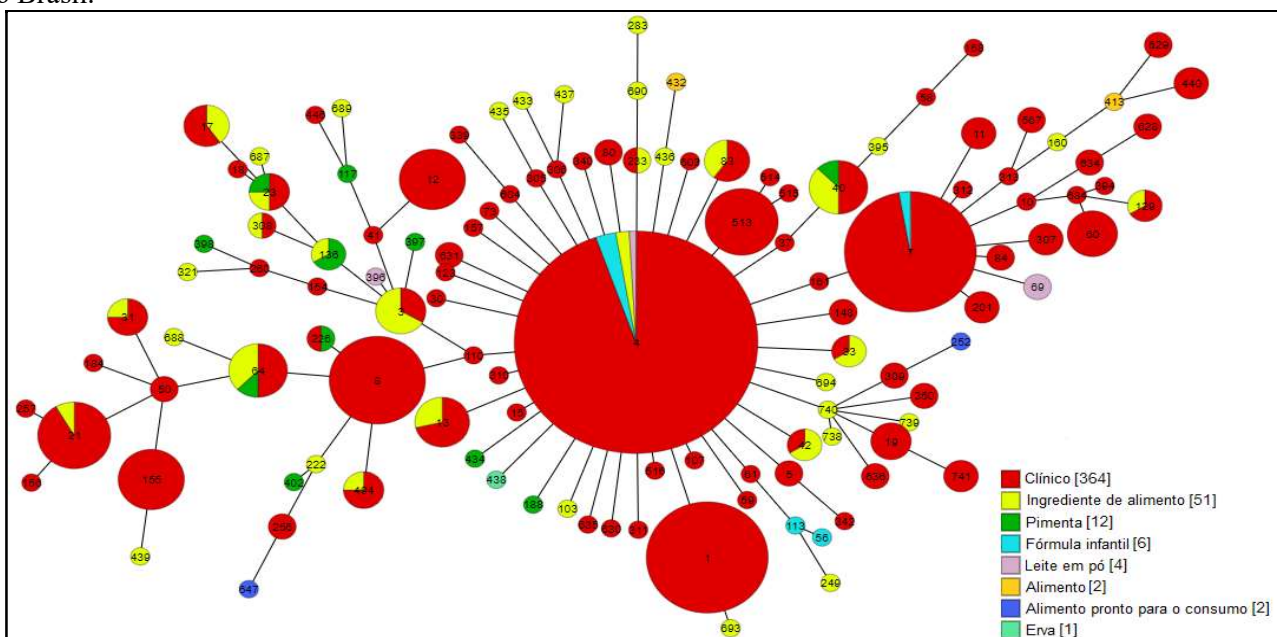


O MST foi construído no *GrapeTree* com os 56 ST e das 82 cepas. O tamanho das esferas é proporcional ao número de cepas deste ST depositado no banco. O número dentro das esferas indica o ST e as cores das esferas indicam as espécies.

As 82 cepas de *Cronobacter* isoladas de alimentos no período de 2007 a 2018 no bando de dados foram identificadas em 56 STs distintos, apresentaram uma grande diversidade genética com proporção de 1,5 cepa /ST. A maioria das cepas (89%) pertence as espécies do Grupo 1: *C. sakazakii* (n=65) e *C. malonaticus* (n=8).

A relação entre os STs identificados em alimentos no Brasil e a distribuição destes STs isolados de amostras clínicas no mundo que se encontram depositadas no banco encontra-se apresentado na Figura 2.

Figura 2 - *Minimun spanning tree* dos STs de *Cronobacter* isolados de amostras clínicas e os isolados de alimentos no Brasil.



O MST foi construído no *GrapeTree* com dos 56 ST e as 442 cepas de origem clínica. O tamanho das esferas é proporcional ao número de cepas deste ST depositado no banco. O número dentro das esferas indica o ST e as cores das esferas indicam a origem do isolamento.



Dos 56 STs isolados de alimentos no Brasil, 19 (33,9%) já foram identificados em amostras clínicas no mundo, incluindo cepas ST4. *C. sakazakii* ST4 é reconhecido por abranger cepas responsáveis um grande número de infecções severas em neonatos, incluindo meningites, em sete continentes num período de 50 anos (Joseph e Forsythe, 2011; Joseph et al., 2012b; Hariri et al., 2013). Cepas associadas a casos clínicos como ST4 e ST7 (Joseph et al., 2012b) foram identificados em alimentos como fórmulas infantis e leite em pó (Figura 2), que são consumidos por neonatos e são o grupo de maior risco para infecções (FAO/WHO, 2008). Uma amostra de ingrediente de alimento (farinha de milho) apresentou contaminação por *C. sakazakii* ST494 (Costa et al., 2020). Este mesmo ST já foi identificado no Brasil causando meningite fatal em um neonato em um hospital do Mato Grosso do Sul (Chaves et al., 2018). Estes achados, indicam que alimentos comercializados no país podem estar atuando como fonte de contaminação em casos de infecções em neonatos. Outras categorias de ingredientes para alimentos e pimentas também apresentaram STs associados a casos clínicos, e o risco do consumo destes alimentos para idosos e imunocomprometidos também deve ser considerado.

4. CONCLUSÕES

As cepas de *Cronobacter* spp. isoladas Brasil foram identificadas em cinco espécies, sendo *C. sakazakii* a espécie mais ocorrente. Dezenove (33,9%) STs identificados já foram associados a casos clínicos no mundo, reforçando a importância da vigilância epidemiológica das cepas de *Cronobacter* circulantes no país para melhor atuação em investigações de surtos de origem alimentar causadas por estes patógenos.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Edital CNPq - bolsa de Iniciação Científica. Ao INCQS/Fiocruz pela infraestrutura e apoio financeiro na compra dos insumos. À Plataforma-PDTIS de Sequenciamento, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Essa publicação fez uso da *Cronobacter multilocus sequence typing database site* (<http://pubmlst.org/cronobacter/>), mantido pela University of Oxford.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alsonosi A., Hariri, S., Kajsík, M., Oriesková, M., Hanulík, V., Roderová, M., Petzelová, J., Kollárová, H., Drahosvá, H., Forsythe, S. J., & Holý, O. (2015). The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalized patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(10), 1979-88.

Brandao, M. L. L., Umeda, N. S., Jackson, E., Forsythe, S. J., & De Filippis, I. (2017). Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. *Food Microbiology*, 63, 129-38.

Brandao, M. L. L., Umeda, N. S., & De Filippis, I. (2018). *Cronobacter* spp.: infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil. *Brazilian Journal of Food Technology* [online], 21. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232018000100301&lng=pt&nrm=iso

Chaves, C., Brandao, M. L. L., Lacerda, M. L. G. G., Rocha, C. A. B. C., Oliveira, S. M. V. L., Parpinelli, T. C., Vasconcellos, L., Forsythe, S. J., & Paniago, A. M. M. (2018). Fatal *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 494 Meningitis in a Newborn. *Emerging Infectious Diseases*, 24 (10), 1948-1950.

Costa, P. V., Vasconcellos, L., da Silva, I. C., Medeiros, V. M., Forsythe, S.J., & Brandão, M. L. L. (2020). Multi-locus sequence typing and antimicrobial susceptibility profile of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* isolated from corn-based farinaceous foods commercialized in Brazil. *Food Research International*, 129, 108805.



- Food and Agricultural Organization/World Health Organization - FAO/WHO. (2008). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae - Meeting Report. Genova: WHO.
- Forsythe, S. J. (2018). Updates on the *Cronobacter* Genus. Annual Review of Food Science and Technology, 9, 23-44.
- Friedemann, M. (2009). Epidemiological of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 28, 1297-1304.
- Hariri, S., Joseph, S., & Forsythe, S. J. (2013). *Cronobacter sakazakii* ST4 Strains and Neonatal Meningitis, United States. Emerging Infectious Diseases, 19(1), 175-177.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., & Joosten, H. (2008). *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, 58, 1442-1447.
- Joseph, S., & Forsythe, S. J. (2011). Predominance of *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 4 in Neonatal Infections. Emerging Infectious Diseases, 17(9), 1713-5.
- Joseph, S., Cetinkaya, E., Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M. J., & Forsythe, S. J. (2012). *Cronobacter condimentii* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from leg infection, water, and food ingredients. Int J Syst Evol Microbiol, 62(6), 1277-83.
- Joseph, S., Sonbol, H., Hariri, S., Desai, P., McClelland, M., & Forsythe, S. J. (2012). Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multi locus sequence typing. Journal of Clinical Microbiology, 50(9), 3031-9.
- Piper, J. D., Mwarumba, S., Ngari, M., Mvera, B., Morpeth, S., & Berkley, J. A. (2018). Invasive *Cronobacter* species infection in infants and children admitted to a rural Kenyan hospital with a high prevalence of malnutrition. Paediatrics and International Child Health, 13, 1-5.
- Silva, J. N., Vasconcellos, L., Forsythe, S. J., De Filippis, I., & Brandao, M. L. L. (2019). Molecular and phenotypical characterization of *Cronobacter* species isolated with high occurrence from oats and linseeds. FEMS Microbiology Letters, 366(1).
- Vasconcellos, L., Carvalho, C. T., Tavares, R. O., Madeiros, V. M., Rosas, C. O., Silva, J. N., Lopes, S. M. R., Forsythe, S. J., & Brandao, M. L. L. (2018). Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. Food Research International, 107, 353-9.
- Zhou, Z., Alikhan, N. F., Sergeant, M. J., Luhmann, N., Vaz, C., Francisco, A. P., Carriço, J.A., & Achtman, M. (2018). GrapeTree: Visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. Genome Research, 28(9), 1395-1404.