

Virulencia, perfil y genes de resistencia a antibióticos de *Cronobacter sakazakii* aisladas de leche en polvo mediante análisis de genoma completo (WGS)

Parra Flores, J.¹, Maury Sintjago, E.¹, Rodríguez, A.¹, E.¹ Holý, O.², Lepuschitz, S.³,

¹Departamento de Nutrición y Salud Pública, Universidad del Bío-Bío, Andrés Bello 720, Chillán, Chile, (56)422463032, juparra@ubiobio.cl

²Department of Public Health, Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic.

³Austrian Agency for Health and Food Safety, Vienna, Austria.

Palabras clave: *Cronobacter sakazakii*, resistencia a antibióticos, virulencia, genoma completo

Introducción

El 2 de junio de 2017, el Ministerio de Salud de Chile emitió una alerta alimentaria nacional e internacional como resultado de la presencia de *Cronobacter sakazakii* en dos muestras de leche en polvo para niños menores de 10 años. Esta medida preventiva se adoptó debido al riesgo de enfermedad asociada con *Cronobacter* spp. y *Cronobacter sakazakii* en grupos de población hipersensibles.

Cronobacter spp. es un género de patógenos bacterianos que anteriormente se conocía como *Enterobacter sakazakii* y que ahora está conformada por siete especies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. universalis*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* y *C. condimentii* [1]. Los grupos de población más afectados son los recién nacidos y los adultos mayores. Los brotes generalmente han sido la causa más común de infección. El perfil clínico es principalmente meningitis, septicemia o enterocolitis necrotizante (EN) con una mortalidad de 15 a 80%. La enfermedad se asocia con el consumo de fórmula infantil en polvo (LP) como portador de patógenos con la posible participación de utensilios y equipos como reservorios. Es posible aislar el patógeno además de LP, leche rehidratada (LPR), cereales infantiles, diversos alimentos, agua, superficies entre otros. Su fuente de contaminación está fuertemente asociada con las plantas de fabricación de LP y los subproductos utilizados en su producción [2]. A nivel internacional la incidencia de *Cronobacter* spp en LP oscila entre el 3% y el 30%. En Chile, en 2008 se encontró una incidencia en LP de 5%, aumentando a 9.5% en 2015 y a 35% en 2017 [3].

El género *Cronobacter* ha experimentado una amplia diversificación en el curso de su evolución, con algunas especies claramente patógenas para los humanos y otras especies aún con un impacto desconocido o incierto en la salud humana. Desafortunadamente, la información sobre la diversidad, patogenicidad y virulencia de las especies de *Cronobacter* obtenidas de diversas fuentes es todavía relativamente escasa y fragmentada.

Aspectos claves para el pronóstico y desarrollo de la enfermedad es la presencia de factores de virulencia y de genes de resistencia a antibióticos. Los genes *ompA*, *cpa*, *fliC*, *hly*, *sip*, *aut*, *plas* e *inv* se encuentran entre los genes de virulencia que se han evaluado en *C. sakazakii*. Además, se ha demostrado que *C. sakazakii* presenta resistencia a antibióticos betalactámicos como la cefalotina, la cefotaxima y la ceftazidima [4].

Los estudios iniciales con secuenciación del genoma completo (WGS) han demostrado una alta discriminación del contenido de la información lo que genera una visión más precisa de las diferencias taxonómicas entre las cepas patógenas. Se utiliza tanto para identificar un patógeno como para generar identidad y detectar los genes asociados con antibióticos o resistencia a la virulencia lo que permite establecer vínculos epidemiológicos más precisos [5].

Por tal motivo, se ha diseñado un estudio para evaluar la presencia de factores de virulencia y el perfil de resistencia a los antibióticos de las cepas de *Cronobacter sakazakii* aislados en leche en polvo con metodología tradicional y molecular mediante análisis de genoma completo (WGS).

Metodología

Cepas

Las 8 cepas utilizadas en los ensayos fueron aisladas en 2017 de LP y previamente identificadas como *C. sakazakii*.

Confirmación de *C. sakazakii*

Se utilizó MALDI-TOF Biotyper como screening de identificación y protocolo previa a la secuenciación de genoma completo [6].

Perfil de resistencia a antibióticos

Se utilizó el método de difusión en disco de acuerdo con las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Se utilizaron discos comerciales de antibióticos que consisten en ampicilina (10 µg), amikacina (30 µg), levofloxacina (5 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), cefepime (30 µg) y sulfametoxazol / trimetoprim (25 µg). La caracterización de los perfiles de resistencia/susceptibilidad se determinó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cepa de *E. coli* ATCC 25922 se utilizó como referencia.

Detección de factores de virulencia

Se detectaron 6 genes mediante reacción de la polimerasa en cadena (RPC). Los genes evaluados fueron activador del plasminógeno (*cpa*), presencia de hemolisina (*hly*), siderophore-interacting protein (*sip*), flagelina (*fliC*), autotransportador (*aut*) y outer membran protein (*ompA*) [7]. Todos los productos amplificados se visualizaron en agarosa al 1.5%.

Secuenciación genoma completo (WGS)

Se utilizó la plataforma MiSeq system (Illumina, Inc.) en Instituto de Microbiología Médica e Higiene de la Agencia de Austria de Salud e Inocuidad de los Alimentos. Las secuencias de consenso fueron ensambladas mediante SPAades versión 3.9.0 y posteriormente analizadas con SeqSphere+software (Version 5.1.0) [7].

Detección genes de virulencia y de resistencia a antibióticos en WGS

La existencia de genes de virulencia se confirmó mediante el uso de la función de plantilla de tarea en SeqSphere + para los datos de WGS y ResFinder tool del Center of Genomic Epidemiology (CGE) (<http://www.genomicepidemiology.org>). Los umbrales para el procedimiento de escaneo objetivo se establecieron con una identidad requerida de $\geq 90\%$ a la secuencia de referencia y una secuencia de referencia alineada $\geq 99\%$. Para los genes de resistencia a los antimicrobianos se usó la base de datos integral de resistencia a los antibióticos (CARD) con la configuración predeterminada "perfecta" y "estricta" para el análisis de secuencias [6].

Resultados y discusión

De las 8 cepas evaluadas, solo 7 resultaron ser *C. sakazakii* mediante la identificación por MALDI-TOF y luego por WGS (Tabla 1). La cepa restante fue identificada como *Franconibacter helveticus*, especie estrechamente relacionada con *Cronobacter* spp y *Cronobacter helveticus* [8]. Todas las cepas de *C. sakazakii* presentaron la secuencia tipo ST1, la que ha sido asociada a casos de enfermedad en niños lactantes.

Se estableció la similitud genética entre las cepas aisladas de productos lácteos elaborado en Chile (CH44) y Singapur (CH65), situación que ya había sido observada al realizar electroforesis en gel por campos pulsados (datos no mostrados). Esta situación debe ser analizada con profundidad debido a la comercialización internacional cada más creciente de leche en polvo como producto base para elaborar otros productos lácteos. Actualmente en Chile, está en discusión la necesidad de legislar respecto de informar por parte de las empresas elaboradoras de cuál es el origen de las leches en polvo que son utilizados para preparar leches fluidas, quesillos, quesos y otros productos. Esto con la finalidad de mantener un registro activo de información para la autoridad y de información visible en la etiqueta del producto puesto a la venta para una mejor selección por parte del consumidor.

Tabla 1. Identificación de cepas mediante MALDI-TOF y Whole genome sequencing (WGS)

Cepa	Identificación previa	MALDI-TOF	WGS
CH42	<i>C. sakazakii</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
CH43	<i>C. sakazakii</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
CH44	<i>C. sakazakii</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
CH45	<i>C. sakazakii</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
CH50	<i>C. sakazakii</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
CH65	<i>C. sakazakii</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
CH84	<i>C. sakazakii</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
CH85	<i>C. sakazakii</i>	<i>Franconibacter heleveticus</i>	<i>Franconibacter helveticus</i>

En referencia a los factores de virulencia, el 100% de las cepas de *C. sakazakii* fueron positivas a 5 genes evaluados, resultado muy similar a estudios recientes [9]. El gen *inv* que es un mediador de la adhesión bacteriana fue negativa en todas las cepas evaluadas. *Franconibacter helveticus* fue negativo a todos los factores de virulencia evaluados.

Tabla 2. Presencia de factores de virulencia en las cepas de *C. sakazakii* aisladas en la alerta alimentaria de 2017

Cepa/Gen	<i>hlyA</i>	<i>ompA</i>	<i>aut</i>	<i>fliC</i>	<i>inv</i>	<i>plas</i>
CH42	+	+	+	+	-	+
CH43	+	+	+	+	-	+
CH44	+	+	+	+	-	+
CH45	+	+	+	+	-	+
CH50	+	+	+	+	-	+
CH65	+	+	+	+	-	+
CH84	+	+	+	+	-	+
CH85	-	-	-	-	-	-
823 (ATCC BAA-894)	+	+	+	+	+	+

En relación al perfil de resistencia a antibióticos, un 62,5% de las cepas de *C. sakazakii* evaluadas fueron resistentes a cefalotina, un 50% a ampicilina y 30% a ceftazidima. Estos resultados concuerdan con los resultados de otras investigaciones con valores cercanos entre 30 y 60% para estos antibióticos [10]. Luego del análisis del genoma completo con la base de datos CARD, se encontraron diversos genes de resistencia como *CRP*, *emrB*, *marA*, *H-NS*, *msbA*, *vgaC*, *adeF* entre otros, cuyos mecanismos principales son el sistema efflux de excreción, reducción a la permeabilidad de la acción de los antibióticos y protección del efecto de los antibióticos. Al realizar el análisis para genes de virulencia mediante ResFinder, se encontraron diversos genes de virulencia como *espY3*, *bapA*, *exsD* que pertenecen a el sistema de secreción tipo III, el que es utilizado para transportar los factores de virulencia desde el patógeno directamente a la célula huésped activándose cuando la bacteria entra en contacto cercano con ella. Además, *lpg2323*, *fimV*, *ravP* considerados como genes tipo IV, que son grandes complejos de proteínas que atraviesan la envoltura celular de muchas bacterias y contienen un canal a través del cual se pueden traslocar proteínas. También se encontraron el gen *flhA* asociados a la síntesis de proteínas flagelares y *hap* que es una proteína asociada a la adhesión y penetración para transporte de proteínas. Ambos aspectos relacionados a los genes *fliC* y *aut* detectados mediante RPC encontrados recientemente en cepas clínicas de *C. sakazakii* aisladas en República Checa [10].

Considerando que las LP son consumidas por grupos considerados vulnerables, la presencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos en cepas de *C. sakazakii* aisladas de estos productos deben ser

observados con mayor detención por la relación directa que tienen con la severidad de la enfermedad asociada a este patógeno. Por ello, es necesario que las autoridades de salud realicen más actividades de controles preventivos de estos alimentos y campañas enfatizadas a utilizar agua de rehidratación de las LP a 70°C, tal como lo indica la Organización Mundial de la Salud que informa que esta temperatura tiene un efecto comprobado de disminuir significativamente el riesgo de enfermedad por *C. sakazakii* en las leches ya reconstituidas.

Conclusiones

Las cepas de *C. sakazakii* presentan variados factores de virulencia y resistencia a antibióticos betalactámicos. Al evaluar los genomas completos se identificaron múltiples genes de resistencia a antibióticos y de virulencia. Los usos de metodologías moleculares combinadas mejoran la identificación del patógeno y entregan información relevante para las decisiones que deben adoptar las autoridades en salud pública para la protección de la salud de la población infantil que consume LP.

Bibliografía

1. Iversen C, N Mullane, B Mc Cardell, B Tall, A Lehner, S Fanning, R Stephan, H Joosten. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58:1442–1447.
2. Holý O, Forsythe S. *Cronobacter* spp as emergent causes of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect.* 2014; 86(3): 169-177.
3. Parra-Flores J, F. Cerda-Leal, A. Contreras, N. Valenzuela-Riffo, A. Rodríguez, J. Aguirre. *Cronobacter sakazakii* and microbiological parameters in dairy formulas associated with a food alert in Chile. *Front. Microbiol.* 2018;9:1708
4. Kleiman M, S Allen, P Neal, J Reynolds. Meningoencephalitis and Compartmentalization of the Cerebral Ventricles Caused by *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol.* 2001; 14(3):352-354
5. Leopold S, R Goering, A Witten, D Harmsen, A Mellmann. Bacterial Whole-Genome Sequencing Revisited: Portable, Scalable, and Standardized Analysis for Typing and Detection of Virulence and Antibiotic Resistance Genes. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(7):2365-2370
6. Lepuschitz, S, W Ruppitsch, S Pekard-Amenitsch, SJ. Forsythe, M Cormican, RL. Mach, D Piérard, F Allerberger, and the EUCRONI Study Group. Multicenter Study of *Cronobacter sakazakii* Infections in Humans, Europe, 2017. *Emerg Infect Dis.* 2019 Mar; 25(3): 515–522.
7. Cruz A, J Xicohtencatl, B Gonzalez, M Bobadilla, C Eslava, I Rosas. Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources. *Can J Microbiol.* 2011; 7:735-744.
8. Stephan R, C Grim, G Gopinath, M Mammel, V Sathyamoorthy, L Trach, H Chase, S Fanning, B Tall. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 10: 3402-3410.
9. Molloy C, C Cagney, S O'Brien, C Iversen, S Fanning, G Duffy. Surveillance and characterization by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Cronobacter* spp in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int J Food Microbiol.* 2009; 136:198-238
10. Holy O, A Cruz-Cordova, J Xicohtencatl-Cortés, I Hochel, J Parra-Flores, J Petrzalova, K Facevicova, S Forsythe, A Alsonosi. Occurrence of virulence factors in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* originated from clinical samples. *Microb Pathog.* 2019; 127:250-256