

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Luiza Vasconcellos

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR E PERFIL
DE SUSCETIBILIDADE DE *CRONOBACTER* SPP. EM SALADAS PRONTAS PARA
O CONSUMO E ALIMENTOS DA CULINÁRIA JAPONESA**

Rio de janeiro

2018

Luiza Vasconcellos

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR E PERFIL
DE SUSCETIBILIDADE DE *CRONOBACTER* SPP. EM SALADAS PRONTAS PARA
O CONSUMO E ALIMENTOS DA CULINÁRIA JAPONESA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, referente à Residência Multiprofissional em Saúde na área de Vigilância Sanitária, com ênfase em Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

Tutora: Silvia Maria dos Reis Lopes

Preceptor: Marcelo Luiz Lima Brandão

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Vasconcellos, Luiza

Isolamento, caracterização fenotípica e molecular e perfil de suscetibilidade de *cronobacter* spp. em saladas prontas para o consumo e alimentos da culinária japonesa. / Luiza Vasconcellos. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2018.

45 f., il., tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Residência em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2018.

Tutora: Sílvia Maria dos Reis Lopes.

Preceptor: Marcelo Luiz Lima Brandão.

1. Cronobacter. 2. Fast Foods. 3. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex. 4. Testes de Sensibilidade Microbiana. I. Título

Luiza Vasconcellos

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR E PERFIL
DE SUSCETIBILIDADE DE *CRONOBACTER* SPP. EM SALADAS PRONTAS PARA
O CONSUMO E ALIMENTOS DA CULINÁRIA JAPONESA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, referente à Residência Multiprofissional em Saúde na área de Vigilância Sanitária, com ênfase em Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

Aprovada em: 20/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor) - Presidente
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Gisele Olivieri Soares Meier (Mestre)
UFRRJ

Carla de Oliveira Rosas (Mestre) - Suplente
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus e aos amigos espirituais por todas as conquistas que realizei até o momento.

À minha mãe e irmãos por todo o apoio, conselhos e torcida.

Ao meu marido Filipe por me incentivar em todos os meus projetos. Essa é só mais uma conquista de muitas que estão por vir em nossa família.

Ao meu grande amigo Fi que tanto me incentivou desde o processo seletivo para a Residência e durante todo o curso, sempre acreditando no meu potencial.

Ao programa de Pós-Graduação do INCQS.

À Carla Rosas, nossa querida chefe do Setor, por todo o carinho, conselhos e auxílio durante os dois anos da minha residência.

À Silvia Lopes por ter sido minha tutora, por todas as correções, sugestões e ensinamentos nestes anos.

Ao Marcelo Brandão, meu preceptor, por todos os ensinamentos, paciência e troca de conhecimentos. Você tem o dom de ensinar! Evolui muito como profissional graças a você. Obrigada!

À Valéria Medeiros por toda a amizade, ajuda, risadas e parceria. As coisas foram mais leves com você por perto! Muito obrigada, Val!

À toda turma de residência (2016-2018) pela amizade e laços formados, comemorações, comilanças, aulas, seminários e parceria durante o treinamento na SUBVISA. Melhor turma! Desejo muito sucesso a todos!

A todo o departamento de Microbiologia do INCQS onde concluí meus experimentos com êxito, em especial ao pessoal do Meio de Cultura e central de Esterilização por todo o suporte.

À Plataforma-PDTIS de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) pelas reações de sequenciamento das minhas cepas.

Ao Professor Stephen Forsythe, curador do banco de dados de *Cronobacter* spp., por todas as dúvidas sanadas, cepas depositadas e correções no meu artigo final.

RESUMO

O gênero *Cronobacter* pertencente à família Enterobacteriaceae, são considerados microorganismos oportunistas, podendo causar meningite, enterocolite necrosante e bacteremia/septicemia em neonatos; e infecções pulmonares, urinárias e outras em idosos, indivíduos imunossuprimidos ou com alguma doença prévia. Esta bactéria pode ser isolada a partir de diversos produtos alimentícios, incluindo alimentos prontos para o consumo. Este trabalho teve como objetivo pesquisar *Cronobacter* spp. em alimentos prontos para o consumo (alimentos provenientes da culinária japonesa e saladas) oriundas do comércio do município do Rio de Janeiro. No total, foram analisadas 60 amostras utilizando a metodologia de enriquecimento-seletivo descrita na ISO 22964:2017. As colônias suspeitas foram isoladas no *Chromogenic Cronobacter Isolation Agar* (CCI) e a confirmação dos isolados foi realizada no sistema semi-automatizado Vitek 2.0. A identificação molecular do gênero *Cronobacter* foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com alvo no gene *dnaG*. A identificação das espécies se deu através do protocolo de reação em cadeia da polimerase múltipla (M-PCR) com alvo no gene *cgcA* e sequenciamento do gene *fusA*. Os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (n=12), utilizando o método de difusão em ágar segundo os critérios do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Trinta isolados de 28 amostras foram identificados como *Cronobacter* spp. através de qPCR e destas, 29 foram identificadas como “*Cronobacter sak* group” pelo Vitek 2.0, pois uma cepa (INCQS00786) foi identificada como “*Enterobacter* spp.”. Após o sequenciamento do gene *fusA*, 18 (62,1%) cepas foram identificadas como *C. sakazakii*, oito (27,6%) como *C. malonaticus* e três (10,3%) como *C. dublinensis*. Foram identificados 11 alelos distintos, incluindo o alelo *fusA* 172 identificado neste estudo e incluído no banco de dados. A cepa INCQS00786 foi identificada como *Enterobacter* spp. e apresentou um alelo novo (*fusA* 168) que foi incluído no banco de dados. Foi constatado 10 resultados errôneos na identificação das espécies de *Cronobacter* com o uso da técnica M-PCR comparada com o sequenciamento do alelo *fusA*, atualmente considerada uma técnica padrão ouro para identificação das espécies do gênero. Quanto ao perfil de suscetibilidade, 25 cepas (86,2%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Dois (6,9%) isolados de *C. malonaticus* apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, dois (6,9%) isolados de *C. sakazakii* apresentaram resistência à tetraciclina, um (3,4%) isolado de *C. malonaticus* apresentou resistência ao aztreonam e um (3,4%) isolado de *C. sakazakii* apresentou resistência à ampicilina-sulbactam. Conclui-se que os alimentos provenientes da culinária japonesa e

saladas prontas para o consumo podem apresentar contaminação por *Cronobacter*, e algumas cepas podem apresentar resistência a diferentes grupos de antimicrobianos. As Agências de Vigilância Epidemiológica e Sanitária devem realizar uma análise de risco de forma a avaliar o risco que esses alimentos possam representar se ingeridos por indivíduos do grupo de risco, como idosos e imunossuprimidos.

Palavras-chave: *Cronobacter* spp. Alimentos prontos para o consumo. Múltipla-PCR. *fusA*. Antibiograma.

ABSTRACT

The *Cronobacter* genus belonging to the Enterobacteriaceae family, is an opportunistic pathogen that may cause meningitis, necrotizing enterocolitis and bacteremia/sepsis in neonates; lung, urinary and other types of infections in the elderly and immunosuppressed individuals or with some previous pathology. This bacterium has already been isolated from several food products, including ready-to-eat (RTE) foods. The current study aims to isolate *Cronobacter* in RTE foods (salads and foods from Japanese cookery) from retailers located in Rio de Janeiro. In total, 60 samples were analyzed using the selective-enrichment technique described in the methodology ISO/TS 22964:2017. The suspect colonies isolated in Chromogenic Cronobacter Isolation Agar (CCI) were submitted to identification by VITEK 2.0 for confirmation. The molecular identification of the genus *Cronobacter* was realized by real time polymerase chain reaction (qPCR) targeting the *dnaG* gene. The identification of the species was performed by multiple polymerase chain reaction (M-PCR) targeting the *cgcA* gene and *fusA* gene sequencing. The isolates were submitted to the antimicrobial susceptibility test (n=12), using the agar disc diffusion method following the instructions of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Thirty isolates of the 28 samples were identified as *Cronobacter* spp. by qPCR and 29 were identified as “*Cronobacter sak* group” by VITEK 2.0, and one strain (INCQS00786) that was identified as “*Enterobacter* spp.”. After *fusA* gene sequencing, 18 (62.1%) strains were identified as *C. sakazakii*, eight (27.6%) as *C. malonaticus* and three (10.3%) as *C. dublinensis*. Eleven different *fusA* alleles were identified, including the allele *fusA*-172 identified in this study and included in database. The strain INCQS00786 was identified as *Enterobacter* spp. and presented a new allele (*fusA* 168) which was included in database. The M-PCR failure to identify the species of 10 *Cronobacter* isolates comparing to *fusA* gene sequencing, currently considerate the gold standard method for speciation. Regarding the resistance profile, 25 strains (86.2%) were sensitivity to all tested antimicrobials. Two strains (6.9%) of *C. malonaticus* showed resistance to nalidixic acid, two strains (6.9%) of *C. sakazakii* showed resistance to tetracycline, one (3.4%) strain of *C. malonaticus* showed resistance to aztreonam and one (3.4%) strain showed resistance to ampicillin-sulbactam. It was concluded that foods from Japanese cookery and RTE salads may present contamination by *Cronobacter*, and some strains can show resistance to different groups of antimicrobials. The Agencies of Epidemiological Surveillance should be aware of the risk that these foods can represent if ingested by individuals in the risk group, such as the elderly and immunosuppressed.

Key-words: *Cronobacter* spp. Ready-to-eat foods. Multiplex-PCR. *fusA*. antibiogram.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras de saladas prontas para o consumo e alimentos da culinária japonesa.....24

Tabela 2. Caracterização fenotípica e molecular dos isolados.....26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Iniciadores e condições de amplificação utilizada nos ensaios moleculares realizados neste estudo.....	19
Quadro 2. Protocolo de reação de qPCR para identificação do gênero <i>Cronobacter</i> spp. com alvo no gene <i>dnaG</i>	20
Quadro 3. Protocolo de reação de M-PCR para identificação das espécies de <i>Cronobacter</i> spp.....	21
Quadro 4. Protocolo de reação de amplificação do gene <i>fusA</i> para identificação das espécies de <i>Cronobacter</i> spp.....	22
Figura 1. Árvore Filogenética dos isolados de <i>Cronobacter</i> spp. de acordo com o sequenciamento do alelo <i>fusA</i>	28

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AMC – Amoxicilina – Clavulanato

AMP – Ampicilina

APT – Água peptonada tamponada

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATM – Aztreonam

BHI – *brain heart infusion* - caldo infusão cérebro-coração

CMRVS – Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária

CCI - *Chromogenic Cronobacter Isolation Agar*

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CRO – Ceftriaxona

CSB/v – *Cronobacter screening broth* contendo vancomicina

ESIA - *Enterobacter sakazakii Isolation Agar*

EUA – Estados Unidos da América

FAO/WHO - *Food and Agricultural Organization/World Health Organization*

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

g- gramas

GEN – gentamicina

h - horas

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

ISO – *International Organizations for Standardization*

LMG – *Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection*

MER – Meropenem

MLST – *Multi Locus Sequence Typing*

NAL – Ácido Nalidíxico

NCTC – *National Collection of Type Cultures*

NIT – Nitrofurantoína

min – Minutos

mL – mililitro

M-PCR - Reação em cadeia pela polimerase múltipla

ng – nanogramas

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

PDTIS - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

pmol – pico-mol

qPCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real

SAM – Ampicilina/ sulbactam

ST – *Sequence Typing*

SXT – Trimetoprim/sulfametoxazola

TE – Tetraciclina

TSA - Ágar tripitona de soja

°C – Graus Centígrados

% - Porcentagem

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micro-mol

V – Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.2 JUSTIFICATIVA.....	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Amostras.....	17
3.2 Isolados, cepas de referência e condições de cultivo	17
3.3 Análise microbiológica	18
3.4 Caracterização molecular	20
3.4.1 Extração de DNA	20
3.4.2 Identificação das espécies por M-PCR e sequenciamento do gene <i>fusA</i>	21
3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Isolamento de <i>Cronobacter</i> spp.....	24
4.2 Caracterização fenotípica e molecular dos isolados de <i>Cronobacter</i> spp.	24
5. DISCUSSÃO	29
5.1 Ocorrência de <i>Cronobacter</i> spp. nos alimentos obtidos no comércio	29
5.2 Caracterização fenotípica e molecular dos isolados de <i>Cronobacter</i> spp.	30
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
APÊNDICE A - PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS DURANTE A RESIDÊNCIA.....	41

1 INTRODUÇÃO

Cronobacter spp. são micro-organismos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Apresentam-se como bastonetes gram-negativos e possuem flagelo peritríquio. A temperatura ótima de crescimento varia de 37 a 44°C, tolerando uma faixa de pH de 4,5 a 10. Geralmente são móveis, reduzem o nitrato, utilizam citrato, hidrolisam a esculina e arginina e produzem a enzima ornitina descarboxilase. Produzem ácidos através da sacarose e possuem atividade α -glicosidase, que é uma característica importante utilizada nos meios seletivos-indicadores (IVERSEN et al, 2008).

O gênero *Cronobacter* é composto por sete espécies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter universalis* e *Cronobacter condimenti* (IVERSEN et al, 2008; JOSEPH et al, 2012), mas apenas as espécies *C. sakazakii*, *C. malonaticus* e *C. turicensis*, foram associadas a infecções em humanos (BRANDAO et al, 2015; FAO/WHO, 2008; FORSYTHE; DICKINS; JOLLEY, 2014). *Cronobacter* spp. emergiu a partir da associação de casos de infecções em neonatos por conta do uso de fórmulas infantis desidratadas contaminadas pelo patógeno (FAO/WHO, 2008) e, desde então, surtos têm sido reportados em diversos países, inclusive no Brasil (BARREIRA et al, 2003; BRANDAO et al, 2015, BRANDAO; UMEDA; DE FILLIPIS, 2018). Atualmente, já existem relatos de casos de infecção em crianças com mais de seis meses e adultos (SANTOS et al, 2000; BHAT et al, 2009; PATRICK et al, 2014; TSAI et al, 2013).

É um micro-organismo considerado oportunista, podendo levar a sérias complicações clínicas. Em neonatos pode causar enterocolite necrosante, bacteremia/septicemia e meningite, com uma taxa de mortalidade variando de 10-41,9% e os sobreviventes podem apresentar sequelas graves (FRIEDEMANN, 2009). Em idosos, indivíduos imunossuprimidos ou adultos que apresentem alguma doença prévia, as principais síndromes clínicas são as infecções pulmonares e urinárias (ALSONOSI et al, 2015; PATRICK et al, 2014; TSAI et al, 2013).

Uma revisão da literatura mostrou que casos de infecções por *Cronobacter* já foram reportados no Brasil de 1997 a 2013, com maior ocorrência em neonatos que em adultos (BRANDAO; UMEDA; DE FILLIPIS, 2018). Em adultos, existem apenas dois casos reportados. Eles ocorreram em uma Unidade de Terapia Intensiva para adultos no Estado do Rio de Janeiro (SANTOS et al, 2000). Contudo, o número real de casos de infecções por *Cronobacter* é provavelmente subestimado, uma vez que a correta identificação destes

patógenos nos serviços de assistência à saúde é prejudicado pela falta de métodos confiáveis para identificação do patógeno em muitos laboratórios clínicos (HOLY; FORSYTHE, 2014; JACKSON; FORSYTHE, 2016; WARNKEN et al, 2012).

A epidemiologia destes casos sugere que os alimentos prontos para o consumo são fontes potenciais de contaminação, como os alimentos obtidos no comércio pelos consumidores (FORSYTHE; DICKINS; JOLLEY, 2014; HOCHÉL et al, 2012; IVERSEN et al, 2008; MOLLOY et al, 2009; MOZROVÁ et al, 2014; XU et al, 2015). *Cronobacter* já foi isolada a partir de diversos produtos alimentícios, incluindo os alimentos prontos para o consumo (AKINEDEN et al, 2017; AKSU et al, 2016; BAUMGARTNER et al, 2009; BERTHOLD-PLUTA et al, 2017; BRANDÃO et al, 2018; HOCHÉL et al, 2012; MOLLOY et al, 2009; MOZROVÁ et al, 2014; UEDA, 2017; XU et al, 2015). No Brasil, o patógeno já foi isolado a partir de amostras de fórmulas infantis desidratadas, queijo tipo Minas frescal, alimentos destinados a alimentação infantil, temperos/condimentos e produtos farináceos, e mais recentemente, de alimentos funcionais (aveia e linhaça) (BRANDAO; UMEDA; DE FILLIPIS, 2018; SILVA; CAPASSO; BRANDAO, 2017). Contudo, nenhum trabalho voltado para pesquisa do patógeno em alimentos prontos para o consumo que apresentam maior consumo pela população adulta no Brasil, como alimentos provenientes da culinária japonesa e saladas, foi encontrado na literatura.

As saladas são alimentos ricos em fibras e vitaminas e recomendados em diversas dietas para redução da incidência de doenças cardiovasculares e câncer. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda o consumo de alimentos naturais como verduras e legumes como base de uma alimentação saudável e rica em nutrientes (BRASIL, 2014), o que levou ao aumento do consumo destes alimentos por parte da população, visando uma melhora na qualidade de vida.

O consumo de alimentos proveniente da culinária japonesa também obteve um significativo aumento nos últimos anos (BROTHERHOOD; MOTTA; SILVESTRE, 2006). De acordo com a revista *Food Magazine* (2014), em São Paulo existem mais restaurantes especializados em comida japonesa do que churrascarias, o que prova claramente o aumento significativo do consumo por parte da população. Acredita-se que a comida conquistou os brasileiros por ser um alimento considerado saudável, além da peculiaridade e requinte.

1.2 JUSTIFICATIVA

A Vigilância Sanitária atua sobre diversos fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, ambientes, transportes, cargas e pessoas visando à promoção, a proteção, a recuperação e a reabilitação da saúde. Tendo em vista a escassez de dados sobre a ocorrência de *Cronobacter* nas classes de alimentos prontos para consumo, que vem apresentando um aumento no consumo por parte da população adulta, a pesquisa do patógeno nestes alimentos se faz necessária. A pesquisa e identificação das espécies de *Cronobacter* e a avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos irá gerar dados sobre a ocorrência deste patógeno no país, podendo subsidiar ações de Vigilância Sanitária, como revisões de legislações normativas voltadas para a segurança dos alimentos no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Pesquisar *Cronobacter* spp. em alimentos prontos para o consumo (saladas e alimentos provenientes da culinária japonesa), identificar as espécies e determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados.

2.2 Objetivos específicos

- Pesquisar *Cronobacter* spp. pela técnica de enriquecimento-seletivo em amostras de alimentos prontos para o consumo (saladas e alimentos provenientes da culinária japonesa) oriundas do comércio do município do Rio de Janeiro;
- Identificar o gênero *Cronobacter* pelo sistema semi-automatizado Vitek 2.0;
- Identificar o gênero *Cronobacter* por reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) com alvo no gene *dnaG*;
- Identificar as espécies de *Cronobacter* por reação em cadeia pela polimerase múltipla (M-PCR) e sequenciamento do gene *fusA*;
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados de *Cronobacter* frente a antimicrobianos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

No período de abril a outubro de 2016 foram analisadas 30 amostras de alimentos provenientes da culinária japonesa - sashimi [peixe cru com arroz e outros ingredientes] (J1-J30) e 30 de saladas prontas para o consumo (S1-S30). As amostras foram adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais (praças de alimentação de shoppings centers e em restaurantes do tipo *self-service*) localizados no município do Rio de Janeiro. As amostras foram mantidas sob refrigeração e levadas para o laboratório para análise. As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

3.2 Isolados, cepas de referência e condições de cultivo

Vinte e nove cepas de *Cronobacter* spp. e uma cepa de *Enterobacter* spp. foram isoladas de alimentos prontos para o consumo do município do Rio de Janeiro e depositadas na Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do INCQS/Fiocruz com as seguintes numerações: INCQS 00770, INCQS 00771, INCQS 00772, INCQS 00773, INCQS 00774, INCQS 00775, INCQS 00776, INCQS 00777, INCQS 00778, INCQS 00779, INCQS 00780, INCQS 00783, INCQS 00784, INCQS 00785, INCQS 00786, INCQS 00787, INCQS 00788, INCQS 00789, INCQS 00790, INCQS 00791, INCQS 00792, INCQS 00793, INCQS 00794, INCQS 00795, INCQS 00796, INCQS 00797, INCQS 00798, INCQS 00799, INCQS 00800 e INCQS 00801.

As cepas de referência: *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578), *C. malonaticus* LMG 23826 (INCQS 00619), *C. muytjensii* ATCC 51329 (INCQS 00579), *C. universalis* NCTC 9529 (INCQS 00599), *C. turicensis* LMG 23827 (INCQS 615), *C. dublinensis* subsp. *dublinensis* LMG 23823 (INCQS 00618), e *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS0033) foram utilizadas nos ensaios como cepas-controle e obtidas da CMRVS do INCQS/Fiocruz.

Os criotubos foram preparados e mantidos à -70°C em caldo infusão cérebro-coração (BHI; Merck, Alemanha) contendo 20% de glicerol (Merck, Alemanha). Para realização dos experimentos, uma alçada desta cultura foi semeada em caldo BHI e em ágar nutriente (Merck, Alemanha) e incubados a 35 ± 2 °C/24 h.

3.3 Análise microbiológica

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada de acordo com a metodologia de enriquecimento-seletivo descrita na ISO 22964:2017 – *Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection of Cronobacter spp.*

Vinte e cinco gramas da amostra foram pesadas em um saco plástico estéril *Whirl-Pak* (Nasco, EUA), e enriquecido com 225 mL de água peptonada tamponada (APT; Merck, Alemanha), homogeneizado em aparelho *Stomacher* (Seward, Reino Unido) durante 1 min e incubado a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Após o período de incubação, uma alíquota de 100 µL foi adicionada à 10 mL de caldo *Cronobacter Screening Broth* contendo vancomicina (CSB/v; Oxoid, Inglaterra) e este incubado a 42 ± 2 °C por $24-48 \pm 2$ h. Posteriormente, as amostras que apresentaram alteração da coloração do meio púrpura para amarelo foram semeadas por esgotamento no meio *Chromogenic Cronobacter Isolation Agar* (CCI) e as placas incubadas a 42 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Após a visualização das colônias típicas no CCI, caso necessário, as colônias foram reisoladas em *Enterobacter sakazakii Isolation Agar* (ESIA; AES Laboratories) e incubadas a 42 ± 2 °C por 24 ± 2 h para redução da microbiota contaminante e melhor isolamento do micro-organismo. Três colônias características obtidas no CCI ou ESIA (esverdeadas com ou sem borda branca) foram isoladas em ágar triptona de soja (TSA, BD) e submetidas à confirmação bioquímica no sistema semi-automatizado Vitek 2.0 (bioMérieux, França) com o uso dos cartões GN TEST KIT VTK2, de acordo com as instruções do fabricante. A confirmação molecular do gênero foi realizada por qPCR com alvo no gene *dnaG*, presente no operon de síntese macromolecular, que codifica uma DNA primase envolvida na replicação inicial do cromossomo (CHEN et al, 2012). No Quadro 1 estão descritos os iniciadores e condições de amplificação. As colônias foram submetidas à extração de DNA por fervura e 5,0 µL foram utilizados como DNA molde em cada reação. O protocolo de reação do qPCR encontra-se no Quadro 2. Amostras em que pelo menos um isolado foi confirmado por qualquer uma das técnicas foi considerado positivo. As cepas foram posteriormente submetidas aos ensaios moleculares e ao antibiograma conforme descrito posteriormente.

Quadro 1 - Iniciadores e condições de amplificação utilizada nos ensaios moleculares realizados neste estudo.

Gene alvo	Micro-organismo alvo	Iniciadores	Condições de amplificação	Tamanho (pb)	Referência
<i>dnaG</i>	<i>Cronobacter</i> spp.	Crono F: GGGATATTCTCCCCTGAAACAG Crono R: CGAGAATAAGCCGCGCATT Crono P: FAM ₂ GAGTAGTAGTTGTAGAGGCCGTGCTTCCGAAAG-TAMRA	50 °C – 2 min; 95 °C – 3min; 40x (95 °C – 15s, 52 °C – 40s, 72 °C – 15s)	58	Chen et al, 2012
<i>cgcA</i>	<i>C. dublinensis</i> <i>C. muytjensii</i> <i>C. turicensis</i> <i>C. universalis</i> <i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i>	Cdub-40F: GATACCTCTCTGGGCCGCAGC Cdm-469R ^a : CCACATGGCCGATATGCACGCC Cmuy-209F: TTCTTCAGGCCGAGCTGACCT Cmstu-825F ^b : GGTGGCSGGGTATGACAAAGAC Ctur-1036R: TCGCCATCGAGTGCAGCGTAT Cuni-1133R: GAAACAGGCTGTCCGGTCACG Csak-1317R: GCGGACGAAGCCTCAGAGAGT Cmal-1410R:GGTGACCACACCTTCAGGCAGA	94°C-3 min; 25x (94°C-30 s, 58°C-30 s, 72°C-1 min); 72°C-5 min	430 260 211 308 492 585	Carter et al, 2013
<i>fusA</i>	<i>Cronobacter</i> spp.	Amplificação fusA-F: GAAACCGTATGGCGTCAG fusA-R: AGAACCGAAGTGCAGACG Sequenciamento S-fusA-F: GCTGGATGCGGTAATTGA S-fusA-R: CCCATACCAGCGATGATG	96°C-1 min; 30x (96°C-1 min, 58°C-1 min, 72°C-2 min); 72°C-5 min 40x (94°C-10 s, 50°C-5 s, 60°C-4 min)	1377 438	Baldwin et al, 2009

Fonte: Do autor, 2018.

Quadro 2 - Protocolo de reação de qPCR para identificação do gênero *Cronobacter* spp. com alvo no gene *dnaG*.

Reagentes[concentração]	Volume (μL)
Universal Master Mix [2X] ^a	12,5
CronoF [10 pmol/μL] ^b	1,0
CronoR [10 pmol/μL] ^b	1,0
CronoP [100 μM] ^a	0,075
DNA molde	2,0
Água DNase/RNase livre ^c	8,425
Volume total	25,0

Fonte: Do autor, 2018.

^a- Applied Biosystems, EUA; ^b- Integrated DNA Technologies, EUA; ^c- BioBasic, Canadá.

As cepas de *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) e de *E. coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas. A cepa de *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) foi utilizada como controle positivo no Vitek 2.0. O DNA extraído das cepas de *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) e de *E. coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, no qPCR.

3.4 Caracterização molecular

Os iniciadores e sondas, genes alvo, condições de reação e tamanho dos produtos da PCR utilizados neste estudo estão descritos no Quadro 1 com suas respectivas referências.

Para cada rodada de reações, controles negativos (água livre de DNA/RNA, BioBasic, Canadá) e controles positivos (DNA extraídos das cepas de referência descritas na seção 3.2) foram utilizados. Todas as reações, com exceção da qPCR, foram realizadas em *SimpliAmp ThermalCycler* (Applied Biosystems, Singapore). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 100 V/50min. O gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 μg/mL (Sigma, EUA) por 15 min e visualizado em analisador de imagens (GE-Healthcare, Inglaterra).

3.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de cultivos das cepas em caldo BHI incubado a 35 ± 2 °C/24 h utilizando o kit *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA foram avaliadas em

espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA) e o DNA extraído foi estocado a -20 ± 5 °C até o momento do uso.

3.4.2 Identificação das espécies por M-PCR e sequenciamento do gene *fusA*

O M-PCR com alvo no gene *cgcA*, que codifica a diguanilato ciclase, (CARTER et al, 2013), para diferenciar as espécies de *Cronobacter*, com exceção da espécie *C. condimenti*, foi aplicado nos isolados. As misturas de reação de amplificação do M-PCR foram preparadas conforme descrito no Quadro 3.

Quadro 3 - Protocolo de reação de M-PCR para identificação das espécies de *Cronobacter* spp.

Reagentes [concentração]	Volume (µL)
Master Mix [2 X] ^a	12,5
Iniciador Cdm-469R [10 pmol/µL] ^a	0,5
Iniciador Cdub-40F [10 pmol/µL] ^a	0,5
Iniciador Cmuy-209F [10 pmol/µL] ^a	0,5
Iniciador Cmstu-825F [10 pmol/µL] ^a	0,5
Iniciador Ctur-1036R [10 pmol/µL] ^a	0,5
Iniciador Cuni-1133R [10 pmol/µL] ^a	0,5
Iniciador Csak-1317R [10 pmol/µL] ^a	0,5
Iniciador Cmal-1410R [10 pmol/µL] ^a	0,5
Água DNase/RNase livre ^b	3,5
DNA molde [5-20 ng]	5,0
Volume total	25,0

Fonte: Do autor, 2018.

^a- ThermoScientific, EUA, ^b- BioBasic, Ontario, Canadá.

O sequenciamento do gene *fusA* foi realizado seguindo o protocolo descrito por Baldwin e colaboradores (2009), considerado como o padrão-ouro para identificação das espécies. As misturas de reação para amplificação foram preparadas conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 - Protocolo de reação de amplificação do gene *fusA* para identificação das espécies de *Cronobacter* spp.

Reagentes [concentração]	Volume (µL)
Master Mix [2 X] ^a	12,5
Iniciador fusA-F [10 pmol/µL] ^a	1,0
Iniciador fusA-R [10 pmol/µL] ^a	1,0
Água DNase/RNase livre ^b	8,5
DNA molde[5-20 ng/µL] ^a	2,0
Volume total	25,0

Fonte: Do autor, 2018.

^a- ThermoScientific, EUA; ^b- BioBasic, Canadá.

Após a PCR para amplificação dos fragmentos, os produtos foram purificados utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de sequenciamento foram realizadas pela Plataforma-PDTIS de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) com o kit *Big Dye® Terminator Direct Sequencing v3.1* (Applied Biosystems, EUA) utilizando os iniciadores descritos no Quadro 1. Os produtos purificados foram enviados em microtubos com capacidade de 1,5 mL (Eppendorf, Alemanha contendo: 2,0 µL do iniciador a 1,6 pmol e 5,5 µL do produto de DNA purificado, previamente dosados e ajustados para concentrações entre 10-40 ng. Posteriormente foi realizada a eletroforese capilar utilizando Sequenciador Automático *ABI Prism 3730XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA) segundo o protocolo descrito por Otto e colaboradores (2008).

Para identificar as espécies de *Cronobacter* das cepas avaliadas neste estudo, as sequências do gene *fusA* foram alinhadas e submetidas ao banco de dados (www.pubMLST.org/cronobacter) para determinação dos alelos. A análise das sequências (438 pb) foi realizada utilizando o algoritmo *ClustalW* do programa BioEdit 709 (Informer Technologies Inc., Shingle Springs, CA, EUA) (HALL, 1999).

Para identificação das espécies de *Cronobacter*, foi construída uma árvore filogenética utilizando o método *Neighbour-joining* do programa MEGA 7.1 (versão beta 7.0) (TAMURA et al, 2013) com 1000 *bootstrap replicates*. As cepas *C. sakazakii* ATCC 29544^T, *C. malonaticus* LMG 23826^T, *C. turicensis* LMG 23827^T, *C. muytjensii* ATCC 51329^T, *C. dublinensis* LMG 23823^T, *C. universalis* NCTC 9529^T, *C. condimenti* LMG 26250^T, *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316^T, *Enterobacter mori* LMG 25706^T, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047^T, e *Enterobacter hormaechei* ATCC 49162^T do banco de dados do

MLST foram incluídas para avaliação das relações destas espécies com os isolados identificados neste estudo.

3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram avaliados quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) acrescidos de discos com antimicrobianos, seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). As suspensões bacterianas foram preparadas ajustando à turvação correspondente a 0,5 na escala de McFarland. *E. coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) foi utilizada como controle dos discos de antibióticos. Foram testados os antimicrobianos (BIO-RAD Laboratories Inc, França) recomendados para avaliação de cepas da família *Enterobacteriaceae*, nas seguintes concentrações: ampicilina-sulbactam (SAM; 10/10 µg), amoxicilina-clavulanato (AMC; 20/10 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), trimetoprim-sulfametoxazola (SXT; 1,25/23,75 µg), ampicilina (AMP; 10 µg), meropenem (MER; 10 µg), gentamicina (GEN; 10 µg), ácido nalidíxico (NAL; 30 µg), aztreonam (ATM; 30 µg) e nitrofurantoína (NIT; 300 µg). Após a incubação das placas a 35°C/24 h o diâmetro da zona de inibição foi mensurado e as cepas classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes de acordo com as recomendações do CLSI.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento de *Cronobacter* spp.

Cronobacter spp. foi isolado em 27 (45,0%) das 60 amostras analisadas, sendo 14 (23,3%) de alimentos provenientes da culinária japonesa e 13 (21,7%) de saladas prontas para o consumo (Tabela 1).

Tabela 1 - Ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras de saladas prontas para o consumo e alimentos da culinária japonesa.

Produto	Saladas prontas para o consumo	Comida Japonesa	Total
CSB/v ^a	30/30	30/30	60/60
CCI ^b	14/30	14/30	28/60
Vitek 2.0 ^c	13/14	14/14	27/28
qPCR <i>dnaG</i> ^d	14/14	14/14	28/28
<i>fusA</i> ^e	13/14	14/14	27/28
No. de amostras positivas (%)	13/30 (43,3)	14/30 (46,7)	27/60 (45,0)

Fonte: Do autor, 2018.

a- n.º de amostras em que houve viragem da coloração do meio para amarelo/n.º total de amostras analisadas; b- n.º de amostras que apresentaram colônias características/n.º amostras semeadas; c- n.º de amostras confirmadas como *Cronobacter sakazakii* group /n.º amostras testadas; d- n.º de amostras confirmadas como *Cronobacter* spp. no qPCR /n.º amostras testadas. e- No.de amostras identificadas como *Cronobacter* spp. no sequenciamento do gene *fusA*/No. de amostras testadas.

4.2 Caracterização fenotípica e molecular dos isolados de *Cronobacter* spp.

Os resultados dos testes de caracterização dos isolados estão apresentados na Tabela 2. Isolados oriundos da mesma amostra que apresentaram a mesma sequência do alelo *fusA* foram considerados clones, e apenas uma cepa clonal foi selecionada de cada amostra. Com isso, 30 isolados únicos foram selecionados das 28 amostras para os estudos posteriores. Duas cepas variantes da espécie *C. sakazakii* (*C. sakazakii* INCQS00785-*fusA* 12 e *C. sakazakii* INCQS00784-*fusA* 17) e uma da espécie *C. malonaticus* foram isolados a partir da amostra J2 (Tabela 2).

O qPCR com alvo no gene *dnaG* detectou todas as colônias α -glicosidase positivas como *Cronobacter* spp. (Tabela 1). Todas as cepas de referência foram positivas no qPCR. As

30 cepas foram identificadas em três espécies de *Cronobacter* e uma cepa foi identificada como *Enterobacter* spp. baseado no sequenciamento do gene *fusA* (Tabela 2 e Figura 1). Das cepas identificadas como *Cronobacter*, a maioria foi identificada como *C. sakazakii* (n=18), seguido de *C. malonaticus* (n=8) e *C. dublinensis* (n=3). Foram identificados 10 alelos distintos: *fusA* 1, *fusA* 3, *fusA* 7, *fusA* 8, *fusA* 12, *fusA* 13, *fusA* 17, *fusA* 20, *fusA* 36, e *fusA* 118. Duas sequências novas, uma referente à cepa *Enterobacter* spp. INCQS00786 e outra referente à cepa *C. malonaticus* INCQS00789, foram avaliadas pelo curador do banco de dados PubMLST (Stephen James Forsythe) e designadas como novos alelos *fusA* 168, e *fusA* 172, respectivamente. Os alelos mais frequentemente encontrados foram: *fusA* 1 (7/29; 24,1%), *fusA* 7 (6/29; 20,7%), *fusA* 8 (5/29; 17,2%), *fusA* 20 (3/29; 10,3%) e *fusA* 12 (2/29; 6,9%). Os alelos *fusA* 3, *fusA* 13, *fusA* 17, *fusA* 36, *fusA* 118 e *fusA* 172 foram atribuídos a apenas um (3,4%) isolado cada. O protocolo de M-PCR com alvo no gene *cgcA* falhou na identificação correta de 10 isolados, devido a não amplificação, ampliações inespecíficas ou divergência dos resultados obtidos pelo sequenciamento do alelo *fusA*, considerado como padrão-ouro neste estudo (Tabela 2).

Após a caracterização fenotípica pelo sistema semi-automatizado Vitek 2.0, foram identificados 22 fenótipos distintos codificados de 'A' a 'V'. Os isolados de *C. sakazakii* foram agrupados em 14 fenótipos distintos (A, C, D, G, H, I, J, K, L, M, N, O, S, T). As cepas INCQS00784 e INCQS00794 (C), INCQS00785 e INCQS00790 (D), INCQS00787, INCQS00778 e INCQS00776 (J) apresentaram o mesmo perfil fenotípico. Os isolados de *C. malonaticus* foram agrupados em cinco fenótipos (B, E, Q, S, U) sendo o isolado INCQS00780 o mesmo fenótipo (S) da cepa INCQS00798 identificada como *C. sakazakii*. Os isolados de *C. dublinensis* foram agrupados em três fenótipos (M, P, R), sendo a cepa INCQS00793 o mesmo fenótipo (M) da cepa INCQS00789 identificada como *C. sakazakii*. A cepa não confirmada isolada da amostra S2 (INCQS00786) identificada como *Enterobacter* spp. - Bionúmero 0627634553433010 foi identificada com um fenótipo (V) distinto de todas as demais cepas de *Cronobacter*.

O perfil de susceptibilidade das 30 cepas isoladas aos 12 antimicrobianos testados está apresentada na Tabela 3. Das 29 cepas de *Cronobacter*, 25 (86,2%) apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Dois (6,9%) isolados de *C. malonaticus* (INCQS00783 e INCQS00771) apresentaram resistência ao NAL e um (3,4%) isolado de *C. malonaticus* (INCQS00783) apresentou resistência ao ATM. Um (3,4%) isolado de *C. sakazakii* (INCQS00784) apresentou resistência intermediária à SAM e resistência à TE. Um (3,4%) isolado de *C. sakazakii* (INCQS00794) apresentou resistência intermediária à TE.

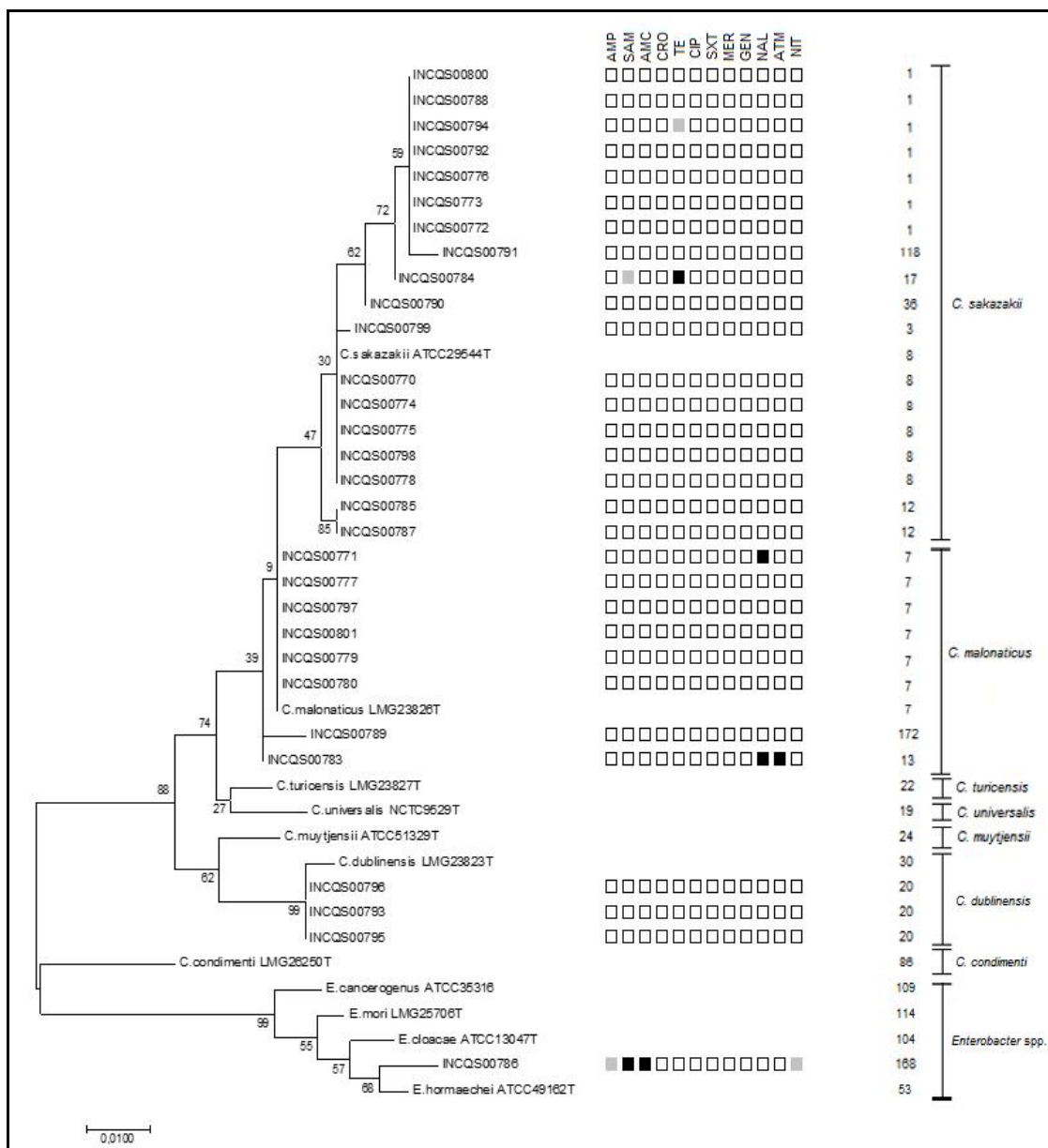
Tabela 2 - Caracterização fenotípica e molecular dos isolados.

Amostra	Identificação do Isolado	Caracterização fenotípica			Caracterização molecular	
		Vitek 2.0 (Bionúmero)[Fenótipo]	Antibiograma	qPCR <i>dnaG</i>	M-PCR <i>cgcA</i>	Espécie (alelo <i>fusA</i>)
J1	INCQS00770	<i>C. sak</i> ^a group (0625734153222010)[A]	Sen ^b	+ ^c	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (8)
J2	INCQS00783	<i>C. sak</i> group (0625734153722010)[B]	NAL ^d (R ^e), ATM ^f (R)	+	NI ^g	<i>C.malonaticus</i> (13)
	INCQS00784	<i>C. sak</i> group (0623734151622011)[C]	TE ^h (R), SAM ⁱ (RI),	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (17)
	INCQS00785	<i>C. sak</i> group (0625734151622011)[D]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (12)
J3	INCQS00771	<i>C. sak</i> group (0625734153722210)[E]	NAL(R)	+	NI	<i>C.malonaticus</i> (7)
J4	INCQS00787	<i>C. sak</i> group (0625734151722210)[J]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (12)
J5	INCQS00772	<i>C. sak</i> group (0627734151722011)[G]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (1)
J6	INCQS00790	<i>C. sak</i> group (0625734151622011)[D]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (36)
J7	INCQS00791	<i>C. sak</i> group (0625734151622010)[N]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (118)
J10	INCQS00792	<i>C. sak</i> group (0627736051222010)[O]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (1)
J11	INCQS00794	<i>C. sak</i> group (0623734151222010)[C]	TE(RI ^j)	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (1)
J12	INCQS00793	<i>C. sak</i> group (0607734151722011)[M]	Sen	+	<i>C.dublinensis</i>	<i>C.dublinensis</i> (20)
J14	INCQS00795	<i>C. sak</i> group (0627734151222010)[P]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.dublinensis</i> (20)
J17	INCQS00800	<i>C. sak</i> group (0605734151622210)[T]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (1)

Continuação	Tabela 2					
J25	INCQS00778	<i>C. sak group</i> (0625734151722210)[J]	Sen	+	NI	<i>C.sakazakii</i> (8)
J28	INCQS00779	<i>C. sak group</i> (0625734153622210)[F]	Sen	+	<i>C.malonaticus</i>	<i>C.malonaticus</i> (7)
S1	INCQS00775	<i>C. sak group</i> (0625734051622010)[K]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (8)
S2	INCQS00786	<i>Enterobacter clocae</i> complex (0627634553433010)[V]	SAM(R), AMC ^k (R), AMP ^l (R), NIT ^m (RI)	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>Enterobacter spp.</i> (168)
S3	INCQS00788	<i>C. sak group</i> (0625734150720210)[L]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (1)
S5	INCQS00773	<i>C. sak group</i> (0627734151722210)[H]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (1)
S6	INCQS00789	<i>C. sak group</i> (0607734151722011)[M]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.malonaticus</i> (172)
S8	INCQS00774	<i>C. sak group</i> (0625734051222010)[I]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (8)
S12	INCQS00776	<i>C. sak group</i> (0625734151722210)[J]	Sen	+	NI	<i>C.sakazakii</i> (1)
S18	INCQS00777	<i>C. sak group</i> (0627734153222010)[Q]	Sen	+	NI	<i>C.malonaticus</i> (7)
S23	INCQS00796	<i>C. sak group</i> (0627734151722010)[R]	Sen	+	<i>C.dublinensis</i>	<i>C.dublinensis</i> (20)
S24	INCQS00797	<i>C. sak group</i> (0627734153222010)[Q]	Sen	+	NI	<i>C.malonaticus</i> (7)
S25	INCQS00798	<i>C. sak group</i> (0627734153722210)[S]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (8)
S26	INCQS00799	<i>C. sak group</i> (0625734151622010)[N]	Sen	+	<i>C.sakazakii</i>	<i>C.sakazakii</i> (3)
S29	INCQS00780	<i>C. sak group</i> (0627734153722210)[S]	Sen	+	<i>C.malonaticus</i>	<i>C.malonaticus</i> (7)
S30	INCQS00801	<i>C. sak group</i> (0627735153722210)[U]	Sen	+	NI	<i>C.malonaticus</i> (7)

^a-*Cronobacter sakazakii* group; ^b-Sensível a todos os antimicrobianos testados; ^c-Positivo; ^d-Ácido Nalidíxico; ^e-Resistente; ^f-Aztreonam; ^g-Não Identificado; ^h-Tetraciclina; ⁱ-Ampicilina/Sulbactam; ^j-Resistência Intermediária; ^k-amoxicilin-clavulanato; ^l-Ampicilina; ^m-Nitrofurantoína. Novos alelos *fusA* descritos neste estudo estão em negrito.

Figura 1 - Árvore Filogenética *Neighbor-joining* dos 30 isolados e cepas de referência de *Cronobacter* e outras *Enterobacter* spp. baseado no gene *fusA* (438 pb) do banco de dados do Multilocus Sequence Typing e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. Essa árvore foi gerada utilizando software MEGA 7 (v.7.0) com 1000 *bootstrap*. AMC- ampicilina, SAM- ampicilina-sulbactam, AMX- amoxicilina-clavulanato, CRO- ceftriaxona, TE- tetraciclina, CIP- ciprofloxacina, SXT- trimetoprim-sulfametoxazola, MER- meropenem, GEN- gentamicina, NAL- ácido nalidíxico, ATM- aztreonam, NIT- nitrofurantoina, □-sensível, ■-resistência intermediária, ■-resistente.



Fonte: Do autor, 2018.

5. DISCUSSÃO

5.1 Ocorrência de *Cronobacter* spp. nos alimentos obtidos no comércio

Considerando que *Cronobacter* spp. é um potencial patógeno oportunista causador de infecções em adultos mais vulneráveis, a avaliação da contaminação de alimentos prontos para o consumo por espécies de *Cronobacter* é importante para avaliar sua possível atuação como veículo de colonização e transmissão. Neste estudo, foram analisados alimentos provenientes da culinária japonesa e saladas, uma vez que estes alimentos têm apresentado um aumento significativo no consumo por parte da população adulta no Brasil. Em um estudo realizado na Suíça, Baumgartner e colaboradores (2009) relataram que 8,9% das amostras de alimentos prontos para o consumo apresentaram contaminação por *Cronobacter* spp. Molloy e colaboradores (2009) isolaram *Cronobacter* spp. em 15/92 (16,3%) de alimentos obtidos do varejo em Dublin, Irlanda. Xu e colaboradores (2015) analisaram 280 amostras de alimentos prontos para o consumo na China, e destas, 52 (18,6%) foram positivas para *Cronobacter* spp. Na República Checa, estudos apontaram uma ocorrência de *Cronobacter* spp. variando entre 6,9-13,3% em amostras de alimentos do varejo (HOCHÉL et al, 2012; MOZROVÁ et al, 2014; VOJKOVSKA et al, 2016). No presente estudo, foram analisadas 60 amostras de alimentos e foi detectada a contaminação por *Cronobacter* spp. em 27 amostras (45,0%), o que demonstra uma maior ocorrência deste micro-organismo em alimentos prontos para o consumo de acordo com o já relatado em outros países.

A contaminação em saladas prontas para o consumo pode vir da própria matéria prima, visto que o isolamento de *Cronobacter* spp. em produtos e matéria-prima de origem vegetal já foi reportado em vários estudos (BAUMGARTNER et al, 2009; BRANDAO et al, 2017; CHON et al, 2012; HOCHÉL et al, 2012; MOLLOY et al, 2009; MOZROVÁ et al, 2014; VOJKOVSKA et al, 2016; XU et al, 2015). Em uma revisão sistemática e meta-análise conduzida por Sani e Odeyemi (2015), que avaliaram 916 artigos, foi observado que fontes de origem vegetal atuam como reservatório e rotas de contaminação por *Cronobacter*. A matéria-prima também pode ser responsável pela contaminação dos alimentos da culinária japonesa, já que *Cronobacter* spp. já havia sido isolado de amostras de arroz (CHON et al, 2012; HUANG et al, 2015) e produtos aquáticos secos, como camarão, peixe, marisco e farinha de peixe (CHON et al, 2012; YE et al, 2012). Além disso, para ambos os produtos, a contaminação por *Cronobacter* spp. pode ocorrer de forma extrínseca, através da falta de higiene na manipulação destes alimentos. Utensílios contaminados, como liquidificadores ou colheres, e

várias áreas de cozinhas domésticas (pias, bancadas, talheres, alças de geladeira, gavetas de carne e esponjas) podem ser fontes de contaminação extrínseca, uma vez que *Cronobacter* já foi isolada a partir destes sítios (KILONZO-NTHENGE et al, 2012; MOLLOY et al, 2009; MOZROVÁ et al, 2014).

5.2 Caracterização fenotípica e molecular dos isolados de *Cronobacter* spp.

No presente estudo, foi realizada a identificação do gênero *Cronobacter* através da identificação fenotípica utilizando equipamento Vitek 2.0 e identificação genotípica através de qPCR com alvo no gene *dnaG*, porém foi obtida uma discordância entre os métodos na identificação do isolado INCQS00786 (Tabela 2). A utilização do equipamento Vitek 2.0 está inclusa na metodologia do FDA como método alternativo para identificar colônias presuntivas a partir dos meios de cultura cromogênicos (CHEN et al, 2012). Neste estudo, o Vitek 2.0 foi capaz de identificar corretamente os isolados de *Cronobacter* spp. provenientes dos alimentos prontos para o consumo, o que não aconteceu com o qPCR, considerando um resultado falso-positivo. Considerando que o Vitek 2.0 é, atualmente, muito utilizado em hospitais e laboratório clínicos para identificar bactérias a partir de espécimes clínicos, é de suma importância uma confiabilidade nos resultados, principalmente para prosseguir com o tratamento correto dos pacientes, especialmente nos casos em que é utilizada antibioticoterapia empírica. Contudo, resultados falso-positivos utilizando o Vitek 2.0 já foram reportados devido a identificação errônea de cepas de *Franconibacter helveticus* e *Franconibacter pulveris* como *Cronobacter* (JACKSON; FORSYTHE, 2016). Problemas na utilização da metodologia de qPCR já foram descritos em outros estudos, com resultados falso-positivos e falso-negativos (CHEN et al, 2012; BRANDAO et al, 2017), o que indica uma necessidade de desenvolvimento de novos métodos para identificação do gênero *Cronobacter*. Jackson e Forsythe (2016) avaliaram *in silico* uma metodologia de PCR com alvo no gene *ompA* e predisseram que a amplificação apenas ocorreria com cepas de espécies de *Cronobacter* e que este método seria uma alternativa aos testes bioquímicos.

A identificação das espécies de *Cronobacter* spp. isoladas neste estudo foram realizadas utilizando o sequenciamento do gene *fusA*, que é um dos sete genes do *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) e é considerado padrão ouro de identificação das espécies de *Cronobacter* spp. O gene *fusA* é o único entre os sete genes preconizados na técnica do MLST que não é compartilhado entre as espécies de *Cronobacter*, sendo então, um gene espécie-específico (FORSYTHE; DICKINS; JOLLEY, 2014). Porém, o sequenciamento requer

conhecimentos específicos e plataformas que não se encontram disponíveis em muitos dos laboratórios no Brasil, o que acaba limitando os laboratórios ao uso das metodologias convencionais. Outra metodologia utilizada neste estudo foi o M-PCR, uma vez que este método é considerado rápido e menos oneroso, uma vez que identifica seis das sete espécies de *Cronobacter* em uma única reação (CARTER et al, 2013). Entretanto, o M-PCR falhou na identificação de 10 isolados do presente estudo (Tabela 2). Estes resultados estão em desacordo com um estudo que identificou corretamente 45 isolados de *Cronobacter* spp. de amostras de alimentos ao mesmo tempo em que utilizou o sequenciamento do gene *fusA* como padrão ouro para comparação (BRANDAO et al, 2017). Contudo, no estudo realizado por Jackson e colaboradores (2014) foi relatado que o gene *cgcA* pode não ser suficiente para a correta identificação de todas as espécies de *Cronobacter* spp., pois na análise do genoma total de cepas de *C.sakazakii* e *C.dublinensis*, observou-se que o gene não estava presente em todas as cepas destas espécies. Considerando que o método foi desenvolvido antes de várias revisões taxonômicas deste micro-organismo, é necessário tomar algumas precauções ao utilizar este protocolo, principalmente porque algumas cepas com atividade α -glicosidase positiva dos gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Franconibacter* e *Siccibacter* podem levar a resultados falso-positivos. Este fato foi observado no presente estudo, uma vez que o isolado *Enterobacter* spp. INCQS00786 seria identificado incorretamente como *C. sakazakii* se apenas o qPCR fosse utilizado para identificação do gênero e o M-PCR para identificação da espécie (Tabela 2).

A diversidade genética dos isolados deste estudo pode ser visualizada na Figura 1. Uma alta diversidade foi observada, uma vez que as 29 cepas de *Cronobacter* foram classificadas em 11 alelos *fusA* distintos, uma taxa de 2,6 cepas por alelo *fusA* encontrado. Estudos prévios realizados no Brasil identificaram um grande número de novos tipos de seqüências (ST) de *Cronobacter*, e isto foi atribuído à localização geográfica, uma vez que existem proporcionalmente menos isolados da América do Sul depositados no banco de dados em comparação a outras regiões (BRANDAO et al, 2017). O isolado INCQS00789 apresentou um novo alelo denominado *fusA* 172, o que conseqüentemente representa um novo ST ainda não depositado no banco de dados de *Cronobacter*. Com base nas análises das seqüências dos genes *fusA*, foram identificadas três espécies distintas (*C.sakazakii*, *C.malonaticus* e *C. dublinensis*) nos alimentos prontos para o consumo analisados neste estudo, sendo *C. sakazakii* e *C. malonaticus* as de maior prevalência. Esse resultado é semelhante a outros estudos que isolaram *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos (BAUMGARTNER et al, 2009; BRANDAO et al, 2017; CHON et al, 2012; HOCHERL et al,

2012; MEIER et al, 2016; MOLLOY et al, 2009; MOZROVÁ et al, 2014; VOJKOVSKA et al, 2016; XU et al, 2015). Além disso, essas espécies também são as mais frequentemente isoladas de amostras clínicas e associadas a casos de infecções em humanos (ALSONOSI et al, 2015; BRANDAO et al, 2015; BROGE, LEE, 2013; FORSYTHE; DICKINS; JOLLEY, 2014; TAMIGNIAU et al, 2015; TSAI et al, 2013).

Estudos observaram o isolamento de diferentes espécies de *Cronobacter* em uma mesma amostra de alimento (BRANDAO et al, 2017; CENTINKAYA et al, 2013). No presente estudo foram identificadas duas espécies (*C. sakazakii* e *C. malonaticus*) e dois clones distintos da espécie *C. sakazakii* (*fusA* 12 e *fusA* 17) de uma mesma amostra de alimento proveniente da culinária japonesa (J2) (Tabela 2). Este fato demonstra a importância de selecionar várias colônias de uma mesma placa de isolamento primária, especialmente em casos de investigações de surtos.

Na avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, a maioria dos isolados de *Cronobacter* spp provenientes deste estudo (25/29; 86,2%) apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Estes resultados foram semelhantes a outros estudos que encontraram sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados nas cepas de *Cronobacter* spp. provenientes de amostras de alimentos (BRANDAO et al, 2016, 2017; CHON et al, 2012; HUANG et al, 2015; MEIER et al, 2016; MOLLOY et al, 2009). No entanto, alguns autores encontraram resistência em isolados de *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos, meio ambiente ou material clínico, como: CIP (KILONZO-NTHENGE et al, 2012; MEIER et al, 2016); GEN (XU et al, 2015); sulfonamida (VOJKOVSKA et al, 2016) e NIT (MOHAMMED et al, 2016). No presente estudo, dois isolados provenientes de alimentos da culinária japonesa apresentaram resistência ao NAL (INCQS00771 e INCQS00783) e ATM (INCQS00783), um isolado (INCQS00784) apresentou resistência à TE e resistência intermediária à SAM e um isolado também proveniente de alimento da culinária japonesa (INCQS00794) apresentou resistência intermediária à TE (Tabela 2; Figura 1). Hochel e colaboradores (2012) reportaram que 3,8% das cepas de *Cronobacter* isoladas a partir de amostras de alimentos comercializados na República Tcheca apresentaram resistência à TE, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Kilonzo-Nthenge e colaboradores (2012) relataram resistência ao NAL em 47,6% dos isolados de *C. sakazakii* provenientes de cozinhas domésticas nos EUA, porcentagem maior do que os achados neste estudo, onde dois isolados (6,9%) de *C. malonaticus* apresentaram resistência a este mesmo antimicrobiano. Vale ressaltar que para o tratamento empírico das infecções suspeitas causadas por *Cronobacter* spp. são utilizados os seguintes antimicrobianos: AMP combinada com o uso da

GEN, Cefepima ou CRO (BARREIRA et al, 2003; BOWEN et al, 2017; BROGE; LEE, 2013). No presente estudo não foram encontradas resistência a esses antimicrobianos, porém existem estudos com esses achados (BROGE; LEE, 2013; KIM et al, 2008; LAI, 2001). Cepas resistentes a outros antimicrobianos já foram identificadas, como: cefalotina (ASATO et al, 2013), cefoxitina (KIM et al 2008), ceftazidima (BARREIRA et al, 2003) e eritromicina (HOCHÉL et al, 2012). Estes dados demonstram que existe variabilidade no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos entre as cepas de *Cronobacter* spp., destacando a importância de se conhecer este perfil de resistência, de forma a identificar as classes de antimicrobianos que apresentem ação rápida e eficiente no tratamento das infecções causadas por *Cronobacter* spp.

6. CONCLUSÃO

Três espécies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus* e *C. dublinensis* foram isoladas de alimentos prontos para o consumo (saladas e alimentos da culinária japonesa) com uma maior prevalência da espécie *C. sakazakii* e a maioria das cepas apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. As cepas de *Cronobacter* isoladas destes alimentos apresentaram alta diversidade genética utilizando o sequenciamento do gene *fusA*. O sequenciamento dos outros seis genes do MLST é necessário para determinar o ST destas cepas. O M-PCR falhou na identificação correta das espécies de *Cronobacter*. A presença de *Cronobacter* em alimentos provenientes da culinária japonesa e saladas prontas para o consumo podem representar um perigo à saúde humana e sinaliza a necessidade de maior higiene na manipulação e preparo destes alimentos, principalmente se estes forem destinados a idosos e imunossuprimidos. É recomendado que as agências de Vigilância Epidemiológica avaliem o risco que esses alimentos possam representar, principalmente se ingeridos por indivíduos do grupo de risco.

REFERÊNCIAS

AKINEDEN, Ö. et al. Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. **Food Microbiology**, v. 65, p. 44-50, 2017.

AKSU, F. et al. Prevalence and identification by multiplex polymerase chain reaction patterns of *Cronobacter* spp. isolated from plant-based food. **Food Science Technology Campinas**, v. 36, n.4, p. 730-6, 2016.

ALSONOSI, A. et al. The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalized patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n.10, p.1979-88, 2015.

ASATO, V.C. et al. First clinical isolates of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Argentina: Characterization and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.45, n.3, p.160-4, 2013.

BALDWIN, A. et al. Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. **BMC Microbiology**, v. 9 n. 1 p. 223, 2009.

BARREIRA, E. R., et al. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatria (São Paulo)**, v. 25, n. 1/2, p. 65-70, 2003.

BAUMGARTNER, A., et al. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter Sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 2, p. 189-92, 2009.

BERTHOLD-PLUTA, A. et al. Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. **Food Microbiology**, v. 65, p. 221-30, 2017.

BHAT, G. K., et al. Urinary tract infection due to *Enterobacter sakazakii*. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 430-1, 2009.

BOWEN, A., et al. Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* Infection Associated with Feeding Extrinsicly Contaminated Expressed Human Milk to a Premature Infant - Pennsylvania, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 28, p. 761-2, 2017.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Investigação de um surto causado por *Cronobacter malonaticus* em um hospital maternidade em Teresina, Piauí: caracterização e tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado. **Vigilância Sanitária em Debate: sociedade, ciência & tecnologia**, v. 3, n. 3, p. 91-6, 2015.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Identification of *Cronobacter* spp. in cheeses and the antimicrobial susceptibility profile. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, n.1697, 2016.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retails foods. **Food Microbiology**, v. 63, p. 129-38, 2017.

BRANDÃO, M. L. L.; UMEDA, N.S.; FILIPPIS, I. *Cronobacter* spp.: infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, secretaria de atenção à saúde, departamento de atenção Básica**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p.

BROGE, T.; LEE, A. Case of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) bacteremia in a breastfed infant. **Journal of Pediatric Infectious Disease Society**, v. 2, n. 4, p. 1-2, 2013.

BROTHERHOOD, R. M., et al. Gastronomia e Culinária Japonesa: das tradições às proposições atuais (inclusivas). **Revista Cesumar - Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v. 11, n. 1, p. 41-57, 2006.

CARTER, L. et al. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 734-737, 2013.

CETINKAYA, E et al. Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. **Molecular and cellular probes**, v. 27, n. 1, p. 60-64, 2013.

CHEN, Y.; LAMPEL, K.; HAMMACK, T. *Cronobacter*. In: **Bacteriological analytical manual**. 8. ed. Revision A. United States: Food and Drug Administration, 2012. Chapter 29. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm>>.
Acesso em: 20 jul. 2017.

CHON, J. W. et al. Isolation and characterization of *Cronobacter* from desiccated foods in Korea. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. 354-8, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 27th ed. Wayne, PA, 2017. CLSI supplement M100.

COMIDA Japonesa. **Food Magazine**, ano 1, p. 10-13, 2014. Disponível em: <<http://www.foodmagazine.com.br/food-magazine-edicoes>>. Acesso em: 16 de out. 2017.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). ***Enterobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formulae**: meeting report. Genova, 2008. 90 p. (Microbiological Risk Assessment, 15).

FORSYTHE, S. J.; DICKINS, B.; JOLLEY, K. A. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age: MLST and whole genome sequence analysis. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1121, 2014.

FRIEDEMANN, M. Epidemiological of invasive *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 18, n. 11, p. 1297-304, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v. 41, p. 95-8, 1999.

HOCHERL, I. et al. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. **Journal of applied microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1257-65, 2012.

HOLY, O.; FORSYTHE, S. J. *Cronobacter* species as emerging causes of healthcare-associated infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 86, n. 3, p.169-177, 2014.

HUANG, Y. et al. Occurrence and Characterization of *Cronobacter* spp. in Dehydrated Rice Powder from Chinese Supermarket. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. 131-53, 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 22964**: microbiology of the food chain – horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. Geneva, 2017.

IVERSEN, C. 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 muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter 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.1442-7, 2008.

JACKSON, E. et al. Genotypic and phenotypic characteristics of *Cronobacter* species, with particular attention to the newly reclassified species *C. helveticus*, *C. pulveris* and *C. zurichensis*. **Food Microbiology**, v. 44, p. 226-35. 2014.

JACKSON, E. E.; FORSYTHE, S. J. Comparative study of *Cronobacter* identification according to phenotyping methods. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 146, 2016.

JOSEPH, S. et al. *Cronobacter condimenti* 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. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1277-83, 2012.

KILONZO-NTHENGE, A. et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Cronobacter sakazakii* Isolated from Domestic Kitchens in Middle Tennessee, United States. **Journal of food protection**, v. 75, n. 8, p. 1512-7, 2012.

KIM, J. B. et al. Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. **Yonsei medical journal**, v. 49, n. 6, p. 1017-22, 2008.

LAI, K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults: case reports and a review of the literature. **Medicine**, v. 80, n. 2, p. 113-22, 2001.

MEIER, G. O. S. et al. Pesquisa, identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 01-09, 2016.

MOHAMMED, M. A. et al. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of bacterial strains isolated from patients with urinary tract infection in Messalata Central Hospital, Libya. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 771-6, 2016.

MOLLOY, C. et al. Surveillance and characterization by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 2, p. 198-203, 2009.

MOZROVÁ, V. et al. Surveillance and characterisation of *Cronobacter* spp. in Czech retail food and environmental samples. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 1, p. 63-8, 2014.

OTTO, T. D. et al ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p. 861-71, 2008.

PATRICK, M. E. et al Incidence of *Cronobacter* spp. Infections, United States, 2003-2009. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 9, p. 1520-3, 2014.

SANI, N. A.; ODEYEMI, O. A. Occurrence and prevalence of *Cronobacter* spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 545, 2015.

SANTOS, M. et al. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 2, p. 140, 2000.

SILVA, J. N. et al. Pesquisa de *Cronobacter* spp. em Alimentos Funcionais, Identificação das Espécies por Multiplex-PCR e Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos. In: JORNADA CIENTÍFICA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 5., 2016, RIO DE JANEIRO. **Resumo da V Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**. Rio de Janeiro: INCQS, 2016. 28 p.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

TSAI, H. Y. et al. *Cronobacter* Infections Not from Infant Formula. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 167-9, 2013.

TAMIGNIAU, A.; VANHAECKE, J.; SAEGEMAN, V. *Cronobacter sakazakii* bacteremia in a heart transplant patient with polycystic kidney disease. **Transplant Infectious Disease**, v. 17, n. 6, p. 921-5, 2015.

UEDA, S. Occurrence of *Cronobacter* spp. in dried foods, fresh vegetables and soil. **Biocontrole Science**, v. 22, n. 1, p. 55-9, 2017.

VOJKOVSKA, H. et al. Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected from farms and from supermarkets in the Czech Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 130-6, 2016.

XU, X. et al. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 17-23, 2015.

WARKEN, M. B. et al. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 21-31, 2012.

YE, Y. et al. Detection of viable *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) by one-step RT-PCR in dry aquatic product. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 11, p. 616-9, 2012.

APÊNDICE A - PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS DURANTE A RESIDÊNCIA

Artigos Científicos

Autores/Título	Revista	Status
SILVA, D.A.F; CARVALHO, C. T.; BRANDAO, M. L. L.; ROSAS, C. O; MEDEIROS, V.M.; TAVARES, R. D. O; VASCONCELLOS, L. ; LOPES, S. M. R. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> e identificação dos sorovares em alimentos prontos para o consumo comercializados no estado do Rio De Janeiro	Revista Científica do Centro Universitário de Barra Mansa	Publicado. v.19 p 47-60, 2017.
VASCONCELLOS, L. ; CARVALHO, C. T.; TAVARES, R. O.; MEDEIROS, V. M.; ROSAS, C. O.; SILVA, J. N.; LOPES, S. M.; FORSYTHE, S. J.; BRANDÃO, M. L. L. Isolation, molecular and phenotypic characterization of <i>Cronobacter</i> spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cookery commercialized in Brazil	Food Reasearch International	Publicado. v.107 p 353-359, 2018.
VOLPE,C.; VASCONCELLOS, L. FORSYTHE, S. J.; BRANDÃO, M. L. L. A case of <i>Cronobacter sakazakii</i> ST494 bacteremia and cerebral empyema in a premature newborn occurred at a Maternity-Hospital in Brazil: case report	Emerging Infectious Diseases	Aceito para publicação, 2018.

Apresentação de trabalhos em eventos científicos

Título	Evento	Ano
VASCONCELLOS, L.; LOPES, S. M. R.; BRANDAO, M. L. L. Isolamento, caracterização fenotípica e molecular e perfil de suscetibilidade de <i>cronobacter</i> spp. em saladas prontas para o consumo e alimentos da culinária japonesa	VI Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	2017
SILVA, J.N.; VASCONCELLOS, L.; FILLIPIS, I.; BRANDAO, M.L.L. Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em alimentos funcionais, identificação das espécies, e avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos	VI Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Trabalhos premiados no ENAAL	2017
ROSAS, C. O; LOPES, S. M. R.; MEDEIROS, V.M.; BRANDAO, M. L. L.; VASCONCELLOS, L.; SILVA, D.A.F; SILVA, C. C.; TAVARES, R. D. O; LA CRUZ, M.H.C; FILLIPIS, I. Desenvolvimento de material de referência para o controle interno de ensaios em microbiologia de alimentos	XX Encontro Nacional e VI Congresso Latino americano de Analistas de Alimentos - ENAAL	2017
Silva, J.N. ; VASCONCELLOS, L. ; MEDEIROS, V.M. ; ROSAS, C. O ; LOPES, S. M. R. ; FILLIPIS, I. ; BRANDAO, M. L. L. Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em alimentos funcionais, identificação das espécies, e avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos	XX Encontro Nacional e VI Congresso Latino americano de Analistas de Alimentos - ENAAL	2017
MEDEIROS, V.M. ; CARVALHO, C. T. ; SILVA, D.A.F ; VASCONCELLOS, L. ; TAVARES, R. D. O ; ROSAS, C. O ; LOPES, S. M. R. ; BRANDAO, M. L. L. Research of <i>Listeria monocytogenes</i> in ready-to-eat foods commercialized in the state of Rio de Janeiro	29º Congresso Brasileiro de Microbiologia - CBM	2017
VASCONCELLOS, L.; LOPES, S. M. R. ; BRANDAO, M. L. L. Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em Alimentos Prontos para o Consumo e Determinação do Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos	V Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	2016

Resumos de trabalhos publicados em anais de eventos científicos

Autores/Título	Evento	Ano
VASCONCELLOS, L.; LOPES, S. M. R.; BRANDAO, M. L. L Isolamento, caracterização fenotípica e molecular e perfil de suscetibilidade de <i>cronobacter</i> spp. em saladas prontas para o consumo e alimentos da culinária japonesa	VI Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	2017
COIMBRA, P. T.; VASCONCELLOS, L.; SILVA, I. C.; LOPES, S. M. R.; MEDEIROS, V.M.; ROSAS, C. O; BRANDAO, M. L. L. Preparo de itens de Ensaio de Proficiência para contagem de bactérias mesófilas em matriz água e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> em água	VI Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	2017
VASCONCELLOS, L.; LOPES, S. M. R.; BRANDAO, M. L. L Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em Alimentos Prontos para o Consumo e Determinação do Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos	V Jornada Científica do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	2016

Relatórios de Ensaio de Proficiência

Autores/Título	Ano
NOBREGA, A. W. ; LA CRUZ, M.H.C ; CARDOSO, M. H. W. M. ; ROSAS, C. O ; SILVA, I. C. ; VASCONCELLOS, L. ; BRANDAO, M. L. L. ; COIMBRA, P. T. ; LOPES, S. M. R. ; MEDEIROS, V.M. Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 25ª Rodada – Contagem de Bactérias Mesófilas em Água	2017
NOBREGA, A. W. ; LA CRUZ, M.H.C ; CARDOSO, M. H. W. M. ; ROSAS, C. O ; SILVA, I. C. ; VASCONCELLOS, L. ; BRANDAO, M. L. L. ; COIMBRA, P. T. ; LOPES, S. M. R. ; MEDEIROS, V.M. Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 26ª Rodada – Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> em Água	2017
NOBREGA, A. W. ; LA CRUZ, M.H.C ; CARDOSO, M. H. W. M. ; ROSAS, C. O ; SILVA, I. C. ; VASCONCELLOS, L. ; BRANDAO, M. L. L. ; COIMBRA, P. T. ; LOPES, S. M. R. ; MEDEIROS, V.M. Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 27ª Rodada – Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em Frango	2017
	2017

NOBREGA, A. W. ; LA CRUZ, M.H.C ; CARDOSO, M. H. W. M. ; ROSAS, C. O ; SILVA, I. C. ; VASCONCELLOS, L. ; BRANDAO, M. L. L. ; COIMBRA, P. T. ; LOPES, S. M. R. ; MEDEIROS, V.M. Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 28ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Frango.	
NOBREGA, A. W. ; LA CRUZ, M.H.C ; CARDOSO, M. H. W. M. ; ROSAS, C. O ; SILVA, I. C. ; VASCONCELLOS, L. ; BRANDAO, M. L. L. ; COIMBRA, P. T. ; LOPES, S. M. R. ; MEDEIROS, V.M. Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 29ª Rodada – Enumeração de Coliformes Termotolerantes em Frango	2017