

***Cronobacter* spp. – původce nozokomiálních nákaz**



Lékařská
fakulta

**RNDr. Ondřej Holý, Ph.D.
Ústav preventivního lékařství**

Klasifikace

- **Před rokem 2007**

- *Enterobacter sakazakii*



- **Od roku 2007**

- *Enterobacter sakazakii*
= *Cronobacter* spp.
 - *C. sakazakii*
 - *C. turicensis*
 - *C. muytjensii*
 - *C. dublinensis*
 - *C. malonaticus*
 - *C. universalis*
 - *C. condimentii*

Cronos - Kronos

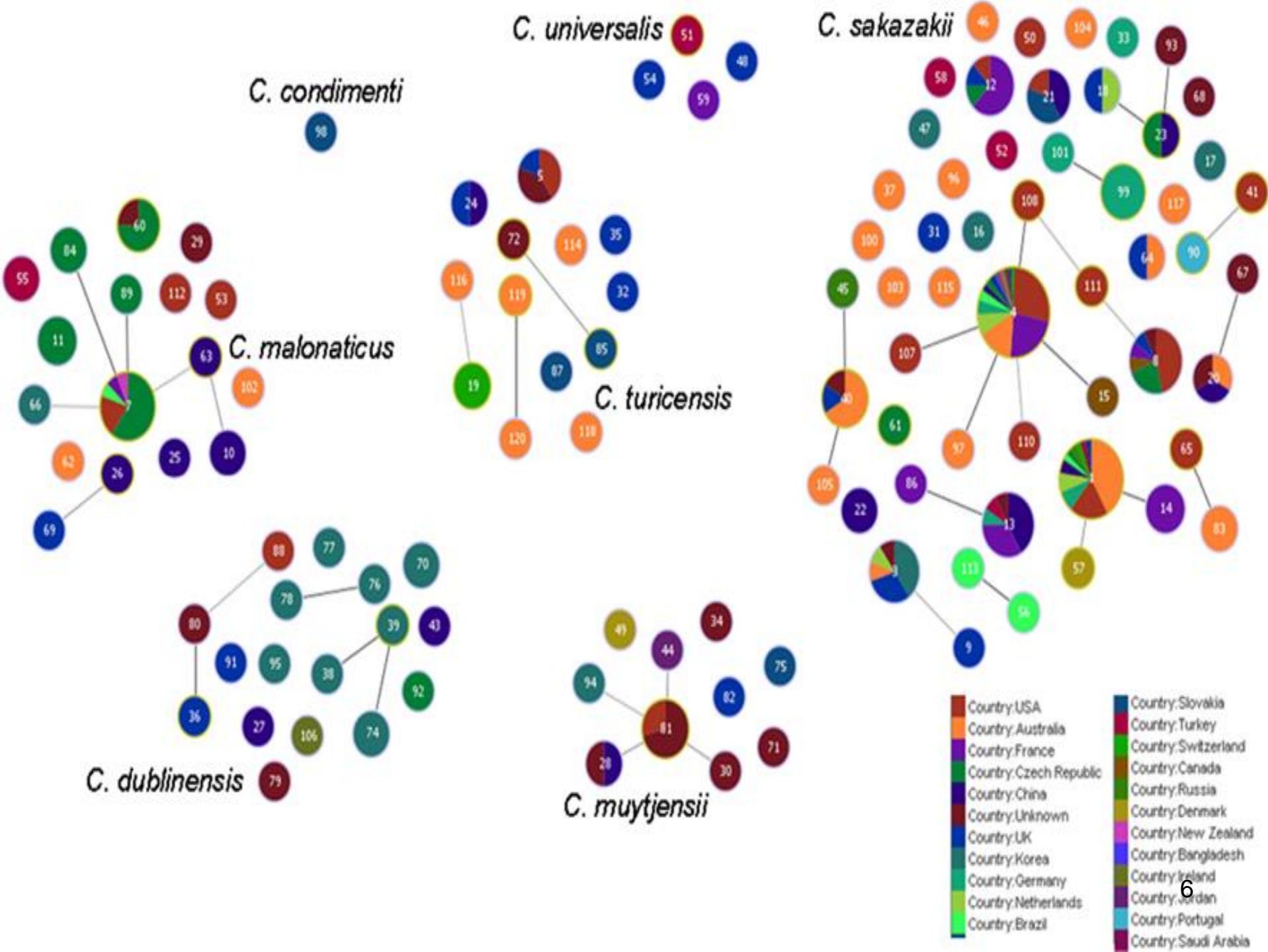


Vlastnosti

- ***Cronobacter* spp.**
- pohyblivá gramnegativní tyčka
- teplotní rozmezí růstu 6-45°C, **optimum 37-43°C**, některé kmeny rostou při 47°C
- **tepelná tolerance**
- dobře snáší nízké pH (3,9-4,1)
- tvorba **biofilmu**

Výskyt

- ubikviterní mikroorganismus
- vehikulum – celosvětově
 - kontaminovaná mléčná **kojenecká strava**
- **2002 – ICMSF** (International Commission on Microbiological Specification for Food)
 - velmi nebezpečné infekční agens, pro určitou část populace
 - patří mezi nebezpečné potravinové patogeny -
 - *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella*
- vyvolává **život ohrožující infekce novorozenců a kojenců**
 - meningitidy, sepse a nekrotizující enterokolitidy
 - smrtnost 40 – 80%
- WHO – průnik přes hematoencefalickou bariéru





Genomic dissection of the 1994 *Cronobacter sakazakii* outbreak in a French neonatal intensive care unit.

Masood N¹, Moore K², Farbos A², Paszkiewicz K², Dickins B¹, McNally A¹, Forsythe S³.


Author information

Abstract

BACKGROUND: *Cronobacter sakazakii* is a member of the genus *Cronobacter* that has frequently been isolated from powdered infant formula (PIF) and linked with rare but fatal neonatal infections such as meningitis and necrotising enterocolitis. The *Cronobacter* MLST scheme has reported over 400 sequence types and 42 clonal complexes; however *C. sakazakii* clonal complex 4 (CC4) has been linked strongly with neonatal infections, especially meningitis. There have been a number of reported *Cronobacter* outbreaks over the last three decades. The largest outbreak of *C. sakazakii* was in a neonatal intensive care unit (NICU) in France (1994) that lasted over 3 months and claimed the lives of three neonates. The present study used whole genome sequencing data of 26 isolates obtained from this outbreak to reveal their relatedness. This study is first of its kind to use whole genome sequencing data to analyse a *Cronobacter* outbreak.

METHODS: Whole genome sequencing data was generated for 26 *C. sakazakii* isolates on the Illumina MiSeq platform. The whole genome phylogeny was determined using Mugsy and RaxML. SNP calls were determined using SMALT and SAMtools, and filtered using VCFtools.

RESULTS: The whole genome phylogeny suggested 3 distant clusters of *C. sakazakii* isolates were associated with the outbreak. SNP typing and phylogeny indicate the source of the *C. sakazakii* could have been from extrinsic contamination of reconstituted infant formula from the NICU



[CDC Home](#) | [Search](#) | [Health Topics A-Z](#)

MMWR™

Weekly

April 12, 2002 / 51(14);298-300

Enterobacter sakazakii Infections Associated with the Use of Powdered Infant Formula --- Tennessee, 2001

Enterobacter sakazakii, a gram-negative, rod-shaped bacterium, is a rare cause of invasive infection with high death rates in neonates (1,2). This report summarizes the investigation of a fatal infection associated with *E. sakazakii* in a hospitalized neonate, which indicated that the infection was associated with the presence of the organism in commercial powdered formula fed to the infant. The implicated batch of formula has been recalled by the manufacturer. Clinicians should be aware of the potential risk for infection from use of nonsterile enteral formula in the neonatal health-care setting.

Metodika a výsledky

- Celkově zahrnuto 51 kmenů (2007 – 2013)
- **FN Olomouc** a **Nemocnice Prostějov**
- Nejčastěji z interní a dětské kliniky
- Nejčastějším klinickým materiálem
 - sputum a výtěr krku
- Genotypizace pomocí **MLST - Multi Locus Sequence Typing**
- Provedena pulzní gelová elektroforéza (**PFGE**) pro zjištění klonality
- Testování citlivostí k ATB
- Faktory virulence

FN Olomouc

Table 1. Isolation of *Cronobacter* spp. from throat swabs of patients according to age group

Tabulka 1. Izolace *Cronobacter* spp. z výtěru z krku u pacientů podle věkových skupin

Year	Patient age (years)								Total
	< 1	1-4	5-9	10-14	15-44	45-64	65-74	> 75	
2005	1	5	1	1(1)	2	0	2	0	12(1)
2006	(1) ^a	1(2)	0	5	2	0	(3)	(2)	8(8)
2007	2	9	0	2	2(1)	(1)	(1)	(1)	15(4)
2008	0	1(1)	2	2(1)	0	0	(2)	(1)	5(5)
2009	(2)	4	1	2	1	(2)	1	(1)	9(5)
2010	0	5	2(1)	0	(2)	1(1)	(2)	2	10(6)
2011	(1)	0	2	0	0	0	0	0	2(1)
Total number of <i>Cronobacter</i> isolates	3(4)	25(3)	8(1)	12(2)	7(3)	1(4)	3(8)	2(5)	61(30)
% of isolates/age group	7.7	30.7	9.9	15.4	11.0	5.5	12.1	7.7	100.0
Number of patients sampled ^b	808	3404	2651	1867	18223	10744	3888	3538	45123
Incidence <i>Cronobacter</i> isolates/1000 patients sampled	8.7	8.2	3.4	7.5	0.5	0.5	2.8	2.0	2.0

^aNumbers in parenthesis indicate additional isolates from normally sterile sites, sampled according to the clinical presentation of the patient.

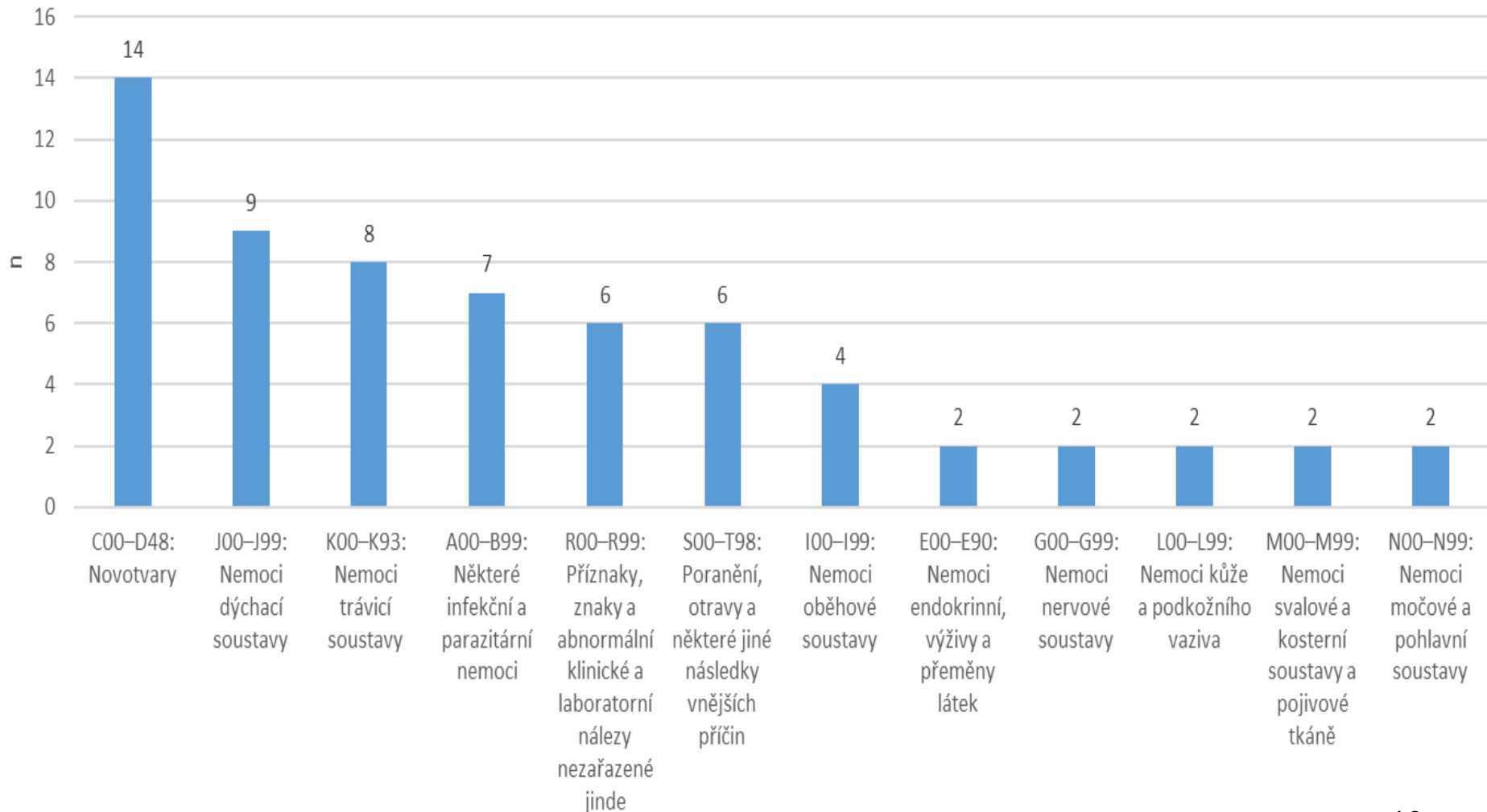
^bTotal number during period 2005-2011.

^cČísla v závorkách představují další izoláty z míst, která jsou normálně sterilní a z nichž byly vzorky odebrány na základě klinického stavu pacienta.

^dCelkový počet za období 2005-2011.

Klinické kmeny

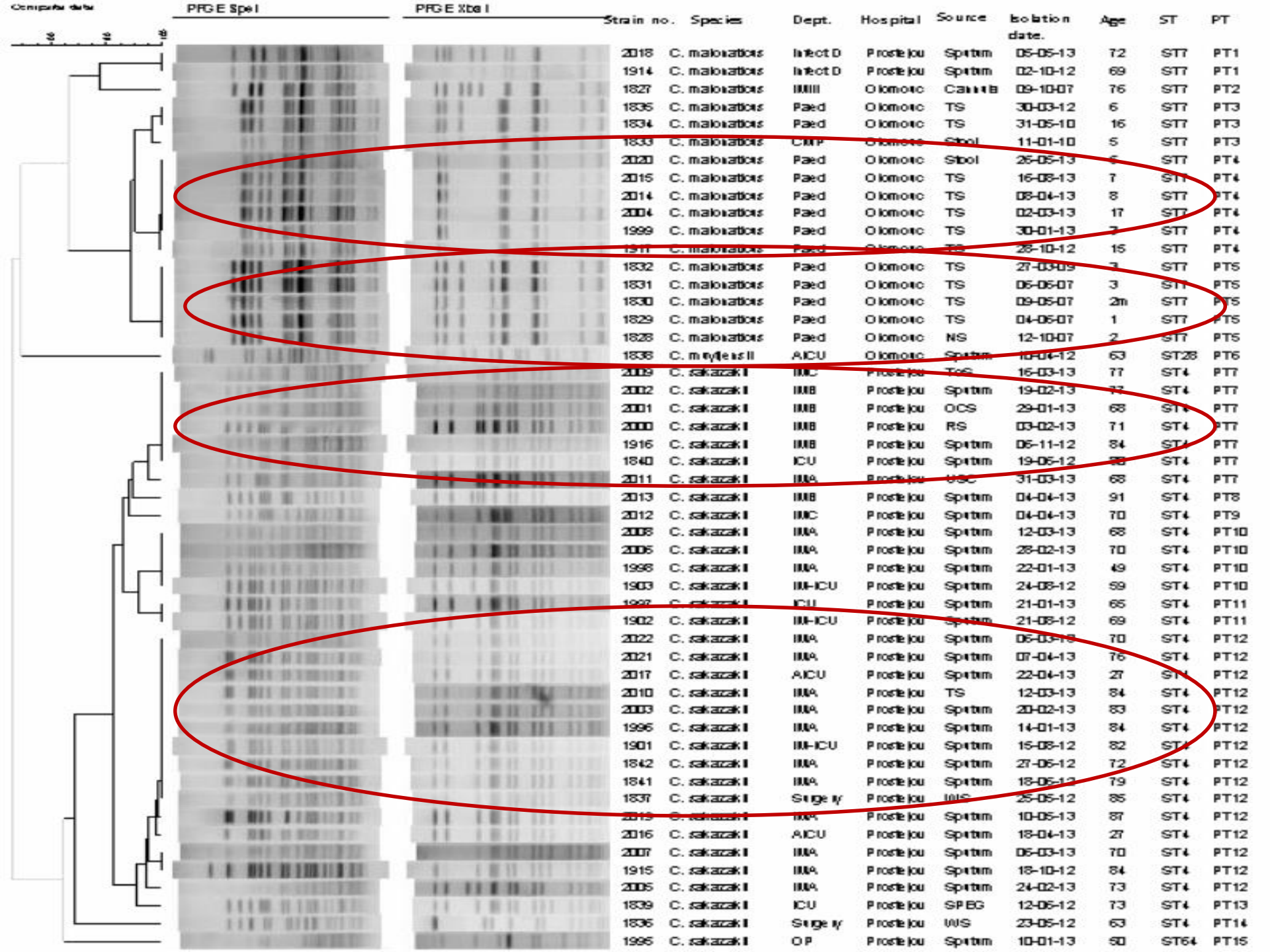
Výskyt *Cronobacter* spp. dle diagnóz



skupiny dg.

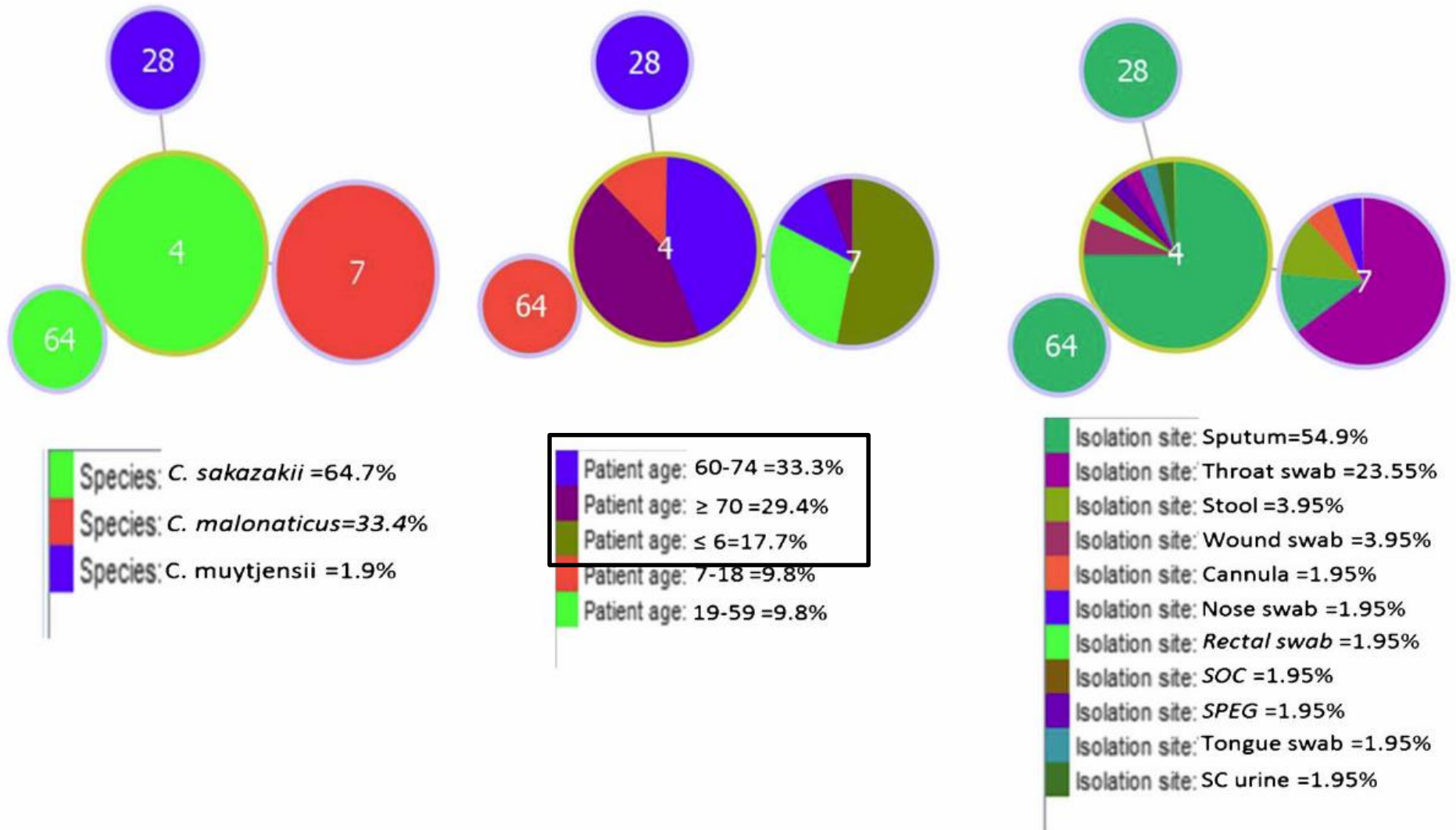
Table 1 Source of *Cronobacter* strains used in this study

Strain number	Hospital	Department	Patient age (years)	Patient sex	Isolation date	Isolation site
1830	Olomouc	Paediatrics	<1	Male	09/05/2007	Throat swab
1829	Olomouc	Paediatrics	1	Male	04/06/2007	Throat swab
1828	Olomouc	Paediatrics	2	Male	12/10/2007	Nose swab
1831	Olomouc	Paediatrics	3	Male	06/06/2007	Throat swab
1832	Olomouc	Paediatrics	3	Female	27/03/2009	Throat swab
1999	Olomouc	Paediatrics	3	Male	30/01/2013	Throat swab
2020	Olomouc	Paediatrics	5	Female	26/05/2013	Stool
1835	Olomouc	Paediatrics	6	Male	30/03/2012	Throat swab
2015	Olomouc	Paediatrics	7	Female	16/08/2013	Throat swab
2014	Olomouc	Paediatrics	8	Male	08/04/2013	Throat swab
1917	Olomouc	Paediatrics	15	Male	28/10/2012	Throat swab
1834	Olomouc	Paediatrics	16	Male	31/05/2010	Throat swab
2004	Olomouc	Paediatrics	17	Female	02/03/2013	Throat swab
1827	Olomouc	Internal Medicine III	76	Female	09/10/2007	Cannula
1833	Olomouc	CMP ^a	5	Male	11/01/2010	Stool
1838	Olomouc	ACU ^b	63	Female	10/04/2012	Sputum
1998	Prostějov	Internal Medicine (A)	49	Female	22/01/2013	Sputum
2008	Prostějov	Internal Medicine (A)	68	Male	12/03/2013	Sputum
2011	Prostějov	Internal Medicine (A)	68	Male	31/03/2013	USC ^d
2006	Prostějov	Internal Medicine (A)	70	Female	28/02/2013	Sputum
2007	Prostějov	Internal Medicine (A)	70	Female	06/03/2013	Sputum
2022	Prostějov	Internal Medicine (A)	70	Female	06/03/2013	Sputum
1842	Prostějov	Internal Medicine (A)	72	Female	27/06/2012	Sputum
2005	Prostějov	Internal Medicine (A)	73	Female	24/02/2013	Sputum
2021	Prostějov	Internal Medicine (A)	76	Female	07/04/2013	Sputum
1841	Prostějov	Internal Medicine (A)	79	Female	18/06/2012	Sputum
2003	Prostějov	Internal Medicine (A)	83	Male	20/02/2013	Sputum
1915	Prostějov	Internal Medicine (A)	84	Female	18/10/2012	Sputum
1996	Prostějov	Internal Medicine (A)	84	Female	14/01/2013	Sputum
2010	Prostějov	Internal Medicine (A)	84	Female	12/03/2013	Throat swab
2019	Prostějov	Internal Medicine (A)	87	Male	10/05/2013	Sputum
2001	Prostějov	Internal Medicine (B)	68	Male	29/01/2013	SOC ^e
2000	Prostějov	Internal Medicine (B)	71	Male	03/02/2013	Rectal Swab
2002	Prostějov	Internal Medicine (B)	77	Male	19/02/2013	Sputum
1916	Prostějov	Internal Medicine (B)	84	Male	06/11/2012	Sputum
2013	Prostějov	Internal Medicine (B)	91	Female	04/04/2013	Sputum
2012	Prostějov	Internal Medicine (C)	70	Male	04/04/2013	Sputum
2009	Prostějov	Internal Medicine (C)	77	Female	16/03/2013	Tongue swab
1903	Prostějov	Internal Medicine—ICU	59	Male	24/08/2012	Sputum
1902	Prostějov	Internal Medicine—ICU	69	Male	21/08/2012	Sputum
1901	Prostějov	Internal Medicine—ICU	82	Male	15/08/2012	Sputum
1997	Prostějov	ICU ^c	65	Male	21/01/2013	Sputum
1839	Prostějov	ICU	73	Female	12/06/2012	SPEG ^f
1840	Prostějov	ICU	80	Female	19/06/2012	Sputum
1836	Prostějov	Surgery	63	Male	23/05/2012	Wound swab
1837	Prostějov	Surgery	85	Female	25/05/2012	Wound swab
1914	Prostějov	Infectious Diseases	69	Male	02/10/2012	Sputum
2018	Prostějov	Infectious Diseases	72	Male	05/05/2013	Sputum
2016	Prostějov	ACU	27	Male	18/04/2013	Sputum
2017	Prostějov	ACU	27	Male	22/04/2013	Sputum
1995	Prostějov	Outpatient	50	Male	10/01/2013	Sputum

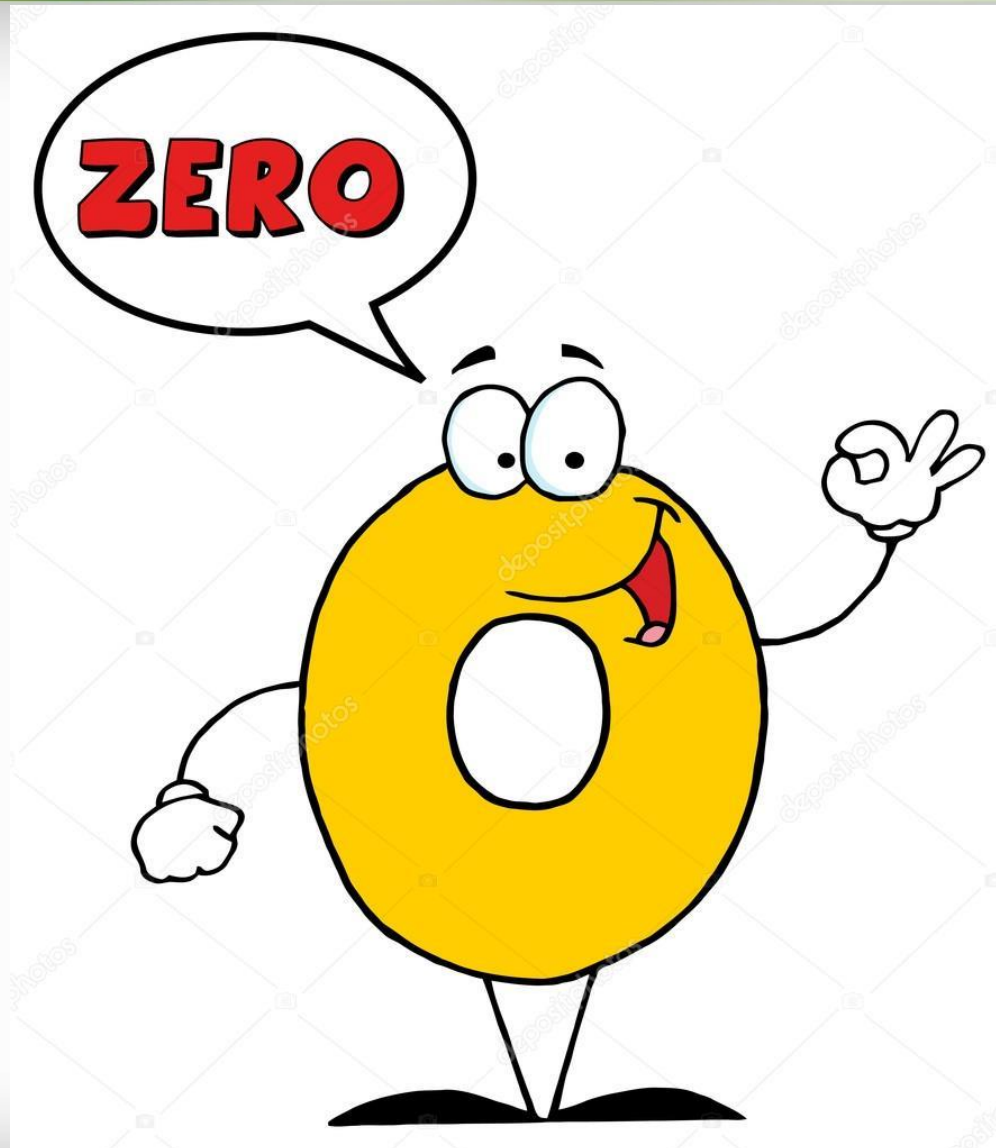


Strain	Hospital	Species	Pulsotype	rpoB allele	Serotype	Sequence type
2021	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
2022	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
1901	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
1915	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
1996	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
1837	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
1841	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
1842	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
2003	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
2005	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
2007	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
2010	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
2016	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
2019	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
2017	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	12	1	CS O:2	ST4
1916	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	7	1	CS O:2	ST4
1840	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	7	1	CS O:2	ST4
2000	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	7	1	CS O:2	ST4
2001	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	7	1	CS O:2	ST4
2002	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	7	1	CS O:2	ST4
2009	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	7	1	CS O:2	ST4
2011	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	7	1	CS O:2	ST4
1917	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	4	18	CMa O:2	ST7
1999	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	4	18	CMa O:2	ST7
2004	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	4	18	CMa O:2	ST7
2015	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	4	18	CMa O:2	ST7
2014	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	4	18	CMa O:2	ST7
2020	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	4	18	CMa O:2	ST7
1828	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	5	18	CMa O:2	ST7
1829	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	5	18	CMa O:2	ST7
1830	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	5	18	CMa O:2	ST7
1831	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	5	18	CMa O:2	ST7
1832	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	5	18	CMa O:2	ST7
1903	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	10	1	CS O:2	ST4
1998	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	10	1	CS O:2	ST4
2006	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	10	1	CS O:2	ST4
2008	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	10	1	CS O:2	ST4
1833	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	3	18	CMa O:2	ST7
1834	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	3	18	CMa O:2	ST7
1835	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	3	18	CMa O:2	ST7
1902	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	11	1	CS O:2	ST4
1997	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	11	1	CS O:2	ST4
1914	Prostějov	<i>C. malonaticus</i>	1	18	CMa O:2	ST7
2018	Prostějov	<i>C. malonaticus</i>	1	18	CMa O:2	ST7
1827	Olomouc	<i>C. malonaticus</i>	2	18	CMa O:2	ST7
2013	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	8	1	CS O:2	ST4
2012	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	9	1	CS O:2	ST4
1839	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	13	1	CS O:2	ST4
1836	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	14	1	CS O:2	ST4
1995	Prostějov	<i>C. sakazakii</i>	15	35	CS O:2	ST64
1838	Olomouc	<i>C. morytjensii</i>	6	36	No PCR product	ST28

GoeBurst analýza kmenů *Cronobacter* spp.



Rezistence k ATB



Rezistence k ATB

- Obecně **citlivější** než ostatní enterobakterie.
- V poslední době rezistence na **ampicilin**.
- V roce 1980 byly všechny testované kmeny na ampicilin citlivé.
- V roce 2001 popsána zvýšená prevalenci produkce **β -laktamáz**.
- Popsáno také pět případů infekce *Cronobacter* spp., kdy kmeny byly rezistentní vůči ampicilinu a většinu **cefalosporinů první a druhé generace**.
- Retrospektivně bylo zjištěno, že dvě úmrtí ve Francii v roce 1994 byly způsobeny producenty širokospektrých β -laktamáz (**ESBL kmeny**).

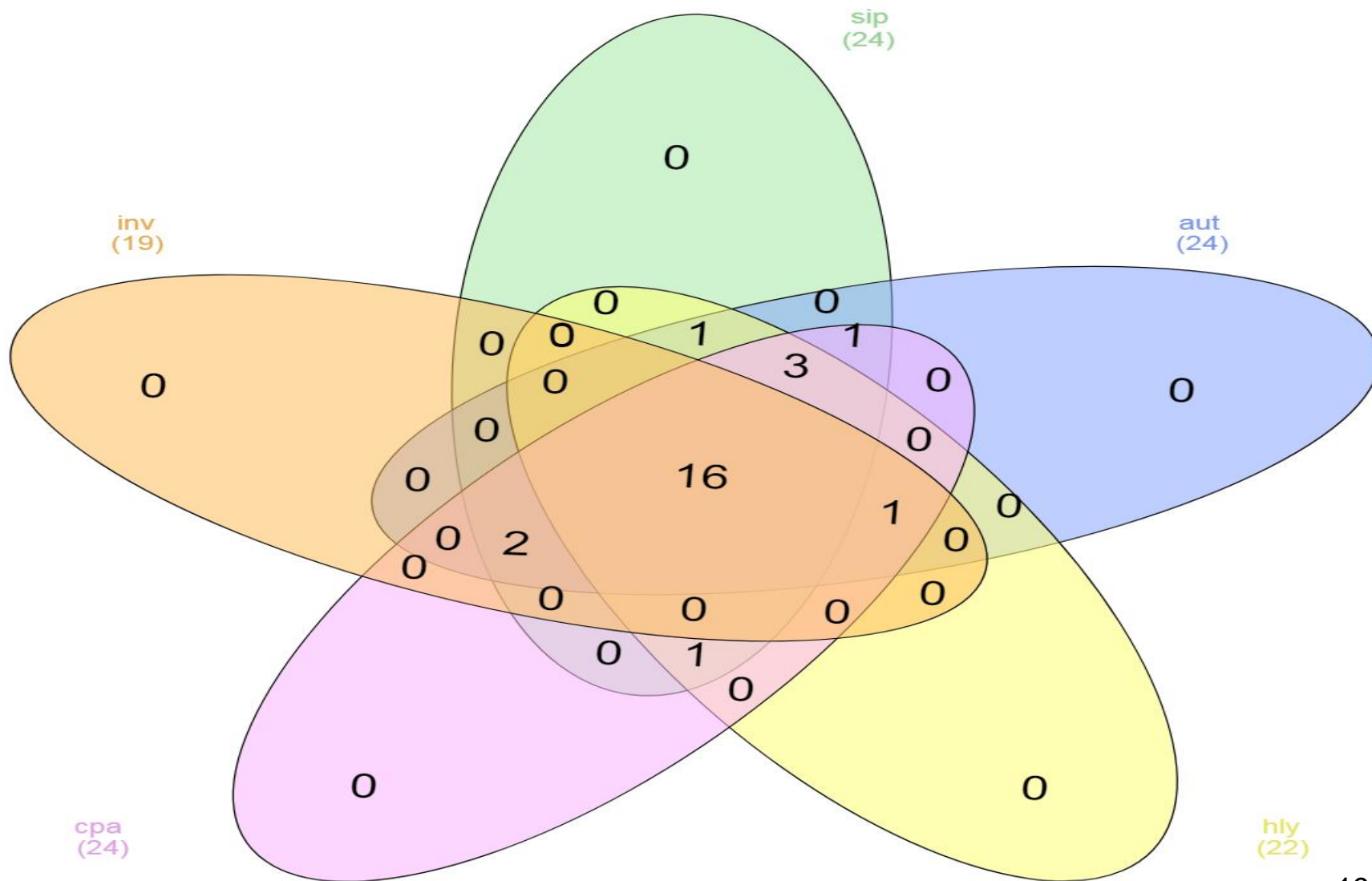
Virulence

- Mohou **invadovat** intestinální buňky, replikovat se v makrofázích a **pronikat hematoencefalickou bariérou**.
- **WHO** popsalo jasnou epidemiologickou souvislost u *Cronobacter* a salmonel, právě při vyvolání **meningitid**.
- Při průniku hematoencefalickou bariérou se uplatňují ompA a ompX povrchové proteiny. Nicméně mechanismus destrukce neurobuněk zůstává neznámý.
- **Produkce** enterotoxinů, hemolyzinů, termostatických endotoxinů.
- *C. sakazakii* je unikátní v rámci rodu *Cronobacter* svou schopností **utilizovat kyselinu sialovou**, což může mít klinickou signifikanci.
- Dáno evoluční adaptací na nového hostitele, jelikož kys. sialová se vyskytuje např. v mateřském mléce.
- Je součástí počáteční kojenecké stravy - nutnost pro správný vývoj mozku.

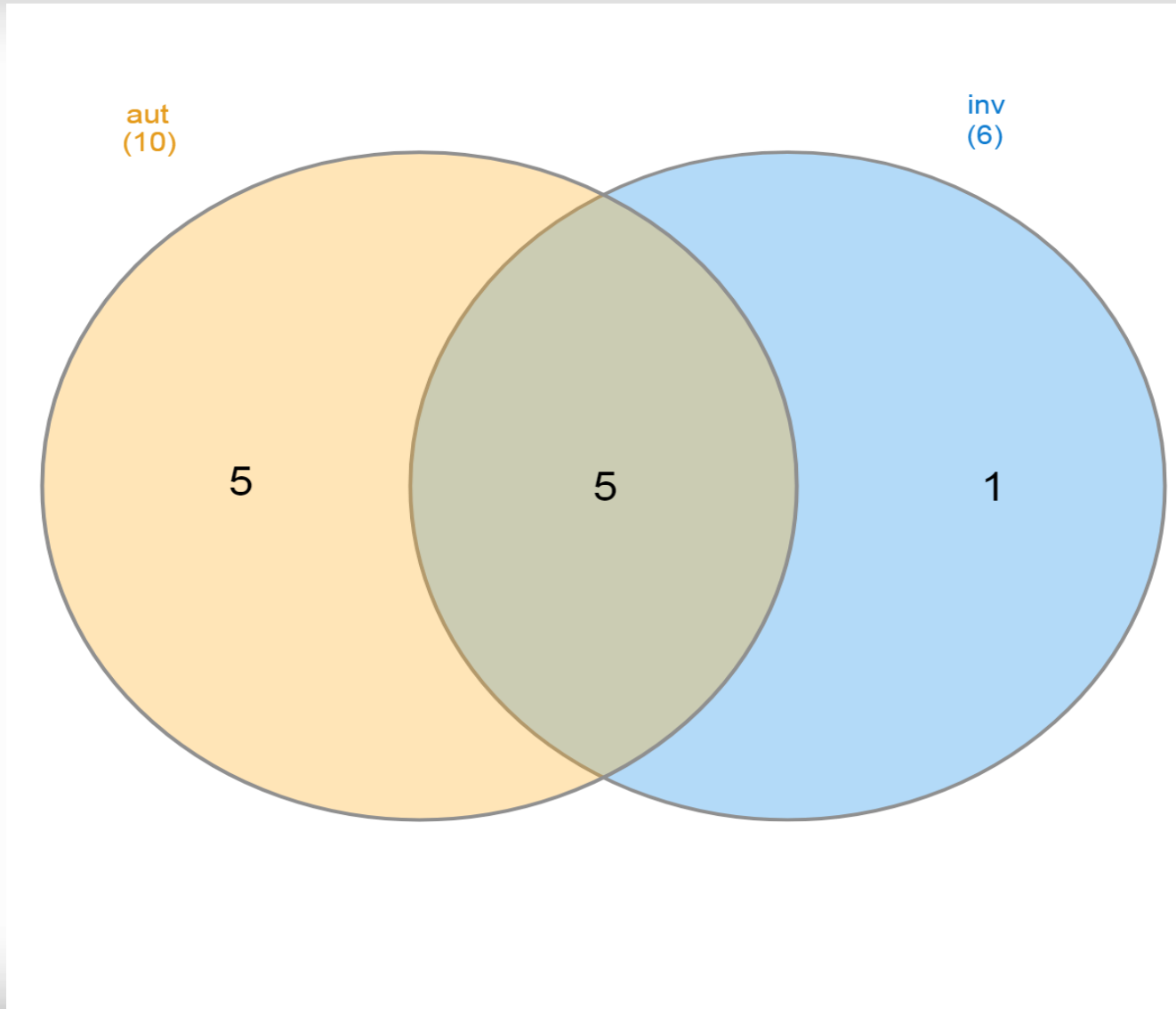
Faktory virulence

- Flagellin gene (*fliC*)
- hemolysin gene (*hly*),
- siderophore-interacting protein gene (*sip*);
- plasminogen gene (*cpa*),
- outer membrane protein gene (*ompA*),
- invasin/intimin gene (*inv*),
- autotransporter gene (*aut*).

Prevalence *inv*, *sip*, *aut*, *hly*, *cpa* genů u *C. sakazakii* (n=25).
 Všechny kmeny byly pozitivní na *ompA* and *fliC* geny.



Prevalence *inv* a *aut* genů u *C. malonaticus* (n=11). Všechny kmeny byly pozitivní na *ompA*, *sip*, *hly* a *fliC* geny. Všechny kmeny byly negativní na *cpa* gen.



Závěry

- *Cronobacter* spp. přítomen v různých **potravinách** – čerstvých i sušených
- Velmi rizikové pro **imunosuprimované jedince**
 - Novorozenci
 - Vyšší věkové skupiny
- Byla pozorována **vysoká klonalita**
- **Nebyla** popsána závislost na **pohlaví** a **věku** pacientů
- Zajímavostí je téměř kompletní shoda mezi typizací O-antigenu a MLST analýzou

Děkuji za pozornost

