

## Sequenciação de estirpes de *Clostridium botulinum* tipo B isoladas em Portugal

### Sequencing of *Clostridium botulinum* type B strains isolated in Portugal

Margarida Saraiva<sup>1</sup>, Teresa Teixeira Lopes<sup>1</sup>, António Castro<sup>2</sup>, Cláudia Pena<sup>1</sup>, Conceição Costa Bonito<sup>1</sup>, Isabel Bastos Moura<sup>1</sup>, Isabel Campos Cunha<sup>1</sup>, Isabel Sousa<sup>1</sup>, Maria Manuel Toscano<sup>1</sup>, Maria Antónia Calhau<sup>1</sup>

[margarida.saraiva@insa.min-saude.pt](mailto:margarida.saraiva@insa.min-saude.pt)

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto/Lisboa, Portugal.

(2) Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

#### \_Resumo

O *Clostridium botulinum* é um bacilo Gram-positivo esporulado anaeróbio, produtor de neurotoxinas botulínicas (BoNT) que são causa de botulismo, uma doença neurológica que afeta humanos e animais. Com o objetivo de investigar a relação genética entre estirpes isoladas no decurso da investigação de casos de botulismo que ocorreram em Portugal, o gene codificador da toxina de 8 estirpes de *Clostridium botulinum* neurotoxigénico isoladas no âmbito de 4 casos/surtos foi sequenciado pelo método de Sanger. Os resultados obtidos indicam que todas as estirpes pertencem ao grupo II (não proteolítico) e são produtoras de neurotoxina botulínica (BoNT) B4. A sequência molecular de 7 estirpes é idêntica, sendo de realçar que em todas as estirpes há uma base que diferencia as sequências obtidas da sequência padrão.

#### \_Abstract

*Clostridium botulinum* is an anaerobic Gram-positive bacillus, producer of botulinum neurotoxins (BoNT) that causes botulism, a neurological disease that affects humans and animals. In order to investigate the genetic relationship between strains isolated during the investigation of botulism cases that occurred in Portugal, the toxin gene from 8 neurotoxicogenic *Clostridium botulinum* strains isolated in the frame of 4 cases/outbreaks was sequenced by the Sanger method. The results indicate that all the strains belong to group II (non-proteolytic) and produce botulinum neurotoxin (BoNT) B4. The sequence of 7 strains is the same, it being noted that in all there is a base which differentiates the sequences obtained from the standard sequence.

#### \_Introdução

O *Clostridium botulinum* é um bacilo Gram-positivo esporulado anaeróbio, produtor de neurotoxinas botulínicas (BoNT) que são causa de botulismo, uma doença neurológica que afeta humanos e animais (1,2). Historicamente, a produção de neurotoxina botulínica constituía o único critério para a nomenclatura das estirpes, sendo todos os clostrídios produtores de neurotoxina botulínica considerados *Clostridium*

*botulinum* (2,3). Hoje em dia, pelo menos seis bactérias fisiológica e geneticamente distintas são conhecidas por formarem neurotoxinas botulínicas.

As estirpes de *C. botulinum* do Grupo I produzem BoNT/A, BoNT/B e/ou BoNT/F (3), sendo variável o número de genes codificadores de neurotoxinas localizados nos genomas do Grupo I e o número de neurotoxinas produzidas (1-5). Existem estirpes que possuem até três genes codificadores de neurotoxina e produzem uma ou, mais raramente, duas ou três neurotoxinas distintas (1). Estas estirpes são proteolíticas, mesófilas (temperatura mínima de crescimento de 10-12 °C) e os esporos são muito resistentes a temperaturas elevadas (121 °C/3 minutos) (2,4-6). As estirpes de *C. botulinum* do Grupo II (*C. botulinum* não proteolítico) são psicotróficas (temperatura mínima de crescimento de 3 °C) e formam esporos com resistência moderada ao calor (1,4-6). A segurança alimentar associada a alimentos minimamente processados refrigerados, prontos a consumir, com extensos prazos de validade é uma preocupação, uma vez que surtos de botulismo têm estado associados ao abuso nas temperaturas a que são conservados estes produtos (4-6). Estas bactérias formadoras de esporos são ubiqüitárias pelo que, para prevenir o botulismo alimentar é necessário identificar e aplicar medidas de controlo para a destruição dos esporos, ou prevenir a sua germinação, multiplicação celular ou a formação da neurotoxina (1,5,6). A existência de falhas na aplicação de medidas adequadas para destruição dos esporos de *C. botulinum*, ou que impeçam o seu desenvolvimento, durante a produção e/ou durante a conservação de alimentos comercializados ou mesmo na preparação doméstica, pode originar surtos de botulismo (1,4-6).

As estirpes de *C. botulinum* do Grupo II produzem BoNT/B4, BoNT/E ou BoNT/F6. Estas estirpes são conhecidas por não produzirem múltiplas toxinas. No entanto, a sequenciação dos genomas das estirpes BoNT/F6 do Grupo II revelou que contêm genes de neurotoxina do tipo E (3-5). Estão descritos casos de estirpes de *C. botulinum* do Grupo I e II não tóxicas (3-5). Os genes codificadores de neurotoxinas de *C. botulinum* Grupos I e II estão localizados no cromossoma ou num plasmídeo (2-5).

As estirpes de *C. botulinum* do Grupo III são mesófilas e causam botulismo em várias espécies animais. Estas estirpes produzem BoNT/C ou BoNT/D, embora mais frequentemente sejam produzidas as neurotoxinas de BoNT/CD ou BoNT/DC (3).

O *C. botulinum* do Grupo IV (também conhecido como *C. argentinense*) produz BoNT/G, que não foi associada a botulismo humano ou animal (3). Algumas estirpes de *C. baratii* formam neurotoxina do tipo F7 e algumas estirpes de *C. butyricum* formam neurotoxinas do tipo E4 ou E5, estando ambas associadas ao botulismo humano (3).

A vigilância epidemiológica de casos de doença é fulcral para prevenir surtos e a transmissão cruzada de microrganismos. O Despacho n.º 15385-A/2016 (7) atualiza a lista de doenças de notificação obrigatória publicada no Despacho n.º 5681-A/2014 (8) e determina que essas doenças estão sujeitas a notificação clínica e laboratorial obrigatória. Nesse enqua-

dramento, estabelece o botulismo como doença de notificação obrigatória, definindo como critérios epidemiológicos “Pelo menos uma das duas ligações epidemiológicas seguintes: a) Exposição à mesma fonte de infeção de um ou mais casos confirmados (...); b) Exposição a alimentos/água confirmadamente contaminados” (7). A investigação epidemiológica e laboratorial é indispensável para a identificação de “Caso provável Pessoa que preenche os critérios clínicos e epidemiológicos.” e de “Caso confirmado Pessoa que preenche os critérios clínicos e laboratoriais”. Por este facto, a comunicação precoce de casos prováveis à autoridade de saúde facilitará a identificação de casos.

### \_Objetivos

Investigar a relação genética entre estirpes isoladas no decurso da investigação de 4 casos/surtos de botulismo que ocorreram em Portugal e sequenciar o gene da toxina de 8 estirpes de *Clostridium botulinum* neurotoxigénico tipo B, pelo método de Sanger.

### \_Material e métodos

Em casos de suspeita de botulismo, o Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem capacidade laboratorial para analisar amostras alimentares e amostras biológicas. Os tipos de amostras e as condições de conservação estão indicados no quadro 1.

Quadro 1: Tipos de amostras e condições de conservação.

▪ Soro para pesquisa de toxina (mínimo: 7 mL)
▪ Fezes para cultura, pesquisa de genes de BoNT e para pesquisa de toxina (mínimo: 20 g)
▪ Aspirado de ferida para cultura, pesquisa de genes de BoNT e pesquisa de toxina
▪ Biópsia de abcesso para cultura, pesquisa de genes de BoNT e para pesquisa de toxina
▪ Vômito, lavado gástrico, aspirado gástrico ou conteúdo intestinal, para cultura, pesquisa de genes de BoNT e para pesquisa de toxina (mínimo: 20 g)
▪ Alimentos suspeitos para cultura, pesquisa de genes de BoNT e para pesquisa de toxina

Todas as amostras devem ser mantidas refrigeradas após colheita, mas não devem ser congeladas

De 2015 a 2017, em 4 casos/surtos confirmados de botulismo tipo B, o Laboratório de Microbiologia do DAN isolou 8 estirpes de *Clostridium botulinum*, que caracterizou geneticamente (tabela 1).

Tabela 1: Amostras onde se isolaram estirpes de *Clostridium botulinum* por surto/caso confirmado.

Surto/caso confirmado	Ano	Amostras	
		Alimentares	Biológicas
1	2015	Chouriço	---
2	2015	Presunto	Fezes
3	2016	Presunto, alheira, chouriço	---
4	2017	Presunto	Fezes

Após deteção por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), dos genes codificadores de BoNT no meio de enriquecimento Trypticase-Peptide-Glucose-Yeast e/ou Cooked Meat Medium (CM0081, Oxoid), isolou-se a estirpe em Columbia Agar Sangue (bioMérieux). As estirpes foram isoladas de fezes e de alimentos suspeitos de serem a causa da doença, colhidos após inquérito epidemiológico.

Após isolamento das estirpes, efetuou-se a extração de DNA utilizando o QIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen) e a deteção dos genes codificadores de BoNT A, B, E, e F por PCR, de acordo com a Metodologia 1 da ISO/TS 17919 (9). Posteriormente, o produto de PCR obtido com os primers para o gene codificador da BoNT/B foi purificado utilizando ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life-Sciences). Os produtos purificados foram sujeitos a um PCR assimétrico e purificou-se o produto do PCR assimétrico com o kit DyeEx 96 (Quiagen), para obter DNA em condições de ser sequenciado. O produto de PCR purificado foi enviado para a Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Departamento de Genética Humana do INSA, onde foi submetido a sequenciação para o gene codificador da toxina, pelo método de Sanger.

Procedeu-se à pesquisa de homologias através da ferramenta informática “Nucleotide BLAST” do U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI).

## \_Resultados

Os resultados obtidos indicam que todas as amostras correspondem a *Clostridium botulinum* tipo B, tendo todos os produtos de PCR sequenciados a mesma sequência, com exceção da amostra de presunto do surto 3. Esta sequência tem homologia máxima (99%) com as estirpes de *C. botulinum* tipo B: *C. botulinum* strain Templin (Sequence ID: MG545727.1); *C. botulinum* strain IFR\_05/025 (Sequence ID: KJ776581.1); *C. botulinum* strain CDC5900 (Sequence ID: KJ776580.1); *C. botulinum* strain CDC3875 (Sequence ID: KJ776578.1).

A estirpe isolada na amostra de presunto do surto 3 apresentou homologia máxima (99%) com a sequência ID: X71343.1 de *C. botulinum* tipo B.

## \_Conclusões e recomendações

Todas as estirpes pertencem ao grupo II (não proteolítico) BoNT/B4.

A segurança alimentar exige que a toxina botulínica não seja produzida em géneros alimentícios, pelo que se devem adotar procedimentos e estabelecer medidas de controlo que previnam o desenvolvimento de todos os tipos de *Clostridium botulinum*.

O tratamento pelo calor é o método mais utilizado para inibir esporos de bactérias, mas a sua inativação vai depender do binómio tempo/temperatura, do pH, da  $a_w$  (atividade da água) e do conteúdo em gordura do alimento (1,6). Têm sido usados aditivos alimentares, como o nitrito de sódio, para impedir o desenvolvimento do *C. botulinum* (1,6). No entanto, uma lenta descida do pH ou da  $a_w$  na produção de produtos fermentados, tais como queijos maturados, iogurtes ou carnes fermentadas, pode permitir a ocorrência de condições favoráveis à produção de BoNT (6).

A extensão do tempo de conservação de produtos em refrigeração pode aumentar o risco do desenvolvimento de estirpes não proteolíticas, recomendando-se que as condições que previnem o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* do Grupo II sejam tidas em atenção (quadro 2) (1,6).

Quadro 2: ⚓ Condições que previnem o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* do Grupo II.

Condições	Crescimento
Conservação a temperaturas <3,3 °C	Não se desenvolve
Conservação a temperaturas <5 °C	Não se desenvolve nos primeiros 10 dias
Conservação a temperaturas ente 5-10 °C	Não se desenvolve nos primeiros 5 dias
Aquecimento a 90 °C, durante 10 minutos e conservação a temperatura <10 °C	Não se desenvolve
pH do género alimentício <5,0 e conservação a temperatura <10 °C	Não se desenvolve
NaCl >3,5% e conservação a temperatura <10 °C	Não se desenvolve
a <sub>w</sub> 0,97 e conservação a temperatura <10 °C	Não se desenvolve

Adaptado do Advisory Committee Microbiological Safety of Food (ACMF, 1992) (1).

Torna-se de primordial importância que a população tenha conhecimento que as temperaturas de refrigeração habitualmente utilizadas em frigoríficos domésticos (5-10 °C) não inibem o desenvolvimento do *Clostridium botulinum* (1,6).

#### Agradecimento:

À Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do INSA, responsável pelos ensaios de sequenciação.

#### Referências bibliográficas:

- (1) D'Aoust J-Y, Barnes R, Carter M, et al. Food Safety Handbook: Microbiological Challenges. Montreal: bioMérieux, 2007.
- (2) Dahlsten E, Lindström M, Korkeala H. Mechanisms of food processing and storage-related stress tolerance in *Clostridium botulinum*. Res Microbiol. 2015;166(4):344-52. Epub 2014 Oct 7.
- (3) Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. Toxins (Basel). 2017;9(1). pii: E38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5308270/>
- (4) Carter AT, Peck MW. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. Res Microbiol. 2015;166(4):303-17. Epub 2014 Nov 4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430135/>
- (5) Peck MW, van Vliet AH. Impact of *Clostridium botulinum* genomic diversity on food safety. Curr Opin Food Sci. 2016;10:52-59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5181784/>
- (6) Chilled Food Association Lda. Guidelines for Setting Shelf Life of Chilled Foods in Relation to Non-proteolytic *Clostridium botulinum*. 1st ed, July 2018. <https://www.chilledfood.org/wp-content/uploads/2018/07/Non-proteolytic-Clostridium-botulinum-shelf-life-guidance-FINAL-1st-Ed-9-7-18.pdf>
- (7) Despacho n.º 15385-A/2016, 19 de dezembro. DR 2ª Série (1º Supl.) nº 243, 2016-12-21:37142-(2-22). Estabelece as Doenças de Notificação Obrigatória. <https://dre.pt/application/conteudo/105574339>
- (8) Despacho n.º 5681-A/2014, 21 de abril. DR 2ª Série (1º Supl.) nº 82, 2014-04-29:11374-(2-20). Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. <https://dre.pt/application/file/a/25697650>
- (9) ISO/TS 17919:2013. Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia.