

**IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES DE LOTES DE NUTRIÇÃO
PARENTERAL TOTAL AVALIADOS NO PERÍODO DE 2000 A 2016**

**IDENTIFICATION OF CONTAMINANTS IN TOTAL PARENTERAL NUTRITION
BATCHES ASSESSED BETWEEN 2000 AND 2016**

Mariana Bruno Rodrigues Benitez*

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0003-1370-8545>
mariana.benitez@fiocruz.br

Veronica Viana Vieira

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0001-8344-8369>
veronica.vieira@fiocruz.br

Talita Coelho de Souza

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0002-6554-168X>
talita.souza@fiocruz.br

Célia Maria C. Pereira Araujo Romão

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0002-2980-0760>
celia.romao@fiocruz.br

Luciana Veloso da Costa

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ
<https://orcid.org/0000-0003-1873-4056>
luciana.costa@bio.fiocruz.br

***Autor por correspondência.**

Artigo Científico
Submetido em: 20.06.2026
Aprovado em: 15.07.2026

RESUMO

Introdução: A nutrição parenteral (NP) possui grande importância clínica no tratamento e prevenção da desnutrição, que é uma causa relacionada à morbidade e à mortalidade de pacientes imunocomprometidos. Apesar das boas práticas de manipulação de NP estarem bem estabelecidas, a contaminação desses produtos ainda ocorre. **Objetivo:** Realizar a identificação fenotípica e genotípica das cepas provenientes de NPs contaminadas, recebidas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016. **Metodologia:** A identificação das cepas foi realizada por provas bioquímicas convencionais, MALDI-TOF MS, sequenciamento do gene *rrs* e MLSA. **Resultados:** Dentre o total de 134 amostras, 113 foram submetidas ao ensaio de esterilidade, sendo 13% (15 amostras) insatisfatórias. As 26 cepas provenientes de amostras de NPs contaminadas foram identificadas como pertencentes aos complexos *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter cloacae*, e à espécie *Rhizobium radiobacter* pelas provas bioquímicas convencionais. Todas as cepas foram identificadas como pertencentes à família Enterobacteriaceae e *R. radiobacter* pelo MALDI-TOF MS, enquanto pelo sequenciamento do gene *rrs* foram identificados como *Phytobacter diazotrophicus*, *Kosakonia* spp. e *Agrobacterium pusense*, respectivamente. O MLSA confirmou a identificação de *P. diazotrophicus* e *Kosakonia* spp. **Conclusões:** A caracterização fenotípica não foi suficiente para identificar gênero e espécie. O sequenciamento do gene *rrs* se mostrou eficiente para identificação de *P. diazotrophicus*, porém, não foi eficaz para as duas cepas do gênero *Kosakonia*. O MLSA permitiu a identificação precisa das cepas e verificação de uma possível nova espécie de *Kosakonia*.

Palavras-Chave: Nutrição parenteral. Vigilância sanitária. Controle de qualidade. Contaminação. Taxonomia bacteriana.

ABSTRACT

Introduction: Parenteral nutrition (PN) plays an important clinical role in the treatment and prevention of malnutrition, a condition associated with increased morbidity and mortality among immunocompromised patients. Although good manufacturing practices for PN preparation are well established, contamination of these products still occurs. **Objective:** To perform the phenotypic and genotypic identification of strains isolated from contaminated PN samples received by the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) from January 2000 to December 2016. **Methods:** Strain identification was performed using conventional biochemical tests, MALDI-TOF MS, *rrs* gene sequencing, and multilocus sequence analysis (MLSA). **Results:** Among a total of 134 PN samples, of the 113 samples submitted to the sterility test, 13% (15 samples) were unsatisfactory. The 26 strains isolated from contaminated PN samples were identified by conventional biochemical tests as belonging to the *Enterobacter agglomerans* complex, the *Enterobacter cloacae* complex, and the species *Rhizobium radiobacter*. All strains were identified as belonging to the Enterobacteriaceae family and as *R. radiobacter* by MALDI-TOF MS, while *rrs* gene sequencing identified them as *Phytobacter diazotrophicus*, *Kosakonia* spp., and *Agrobacterium pusense*, respectively. MLSA confirmed the identification of *P. diazotrophicus* and *Kosakonia* spp. **Conclusions:** Phenotypic characterization alone was insufficient for genus- and species-level identification. The *rrs* gene sequencing proved effective for the identification of *P. diazotrophicus*; however, it was not effective for the two strains belonging to the genus *Kosakonia*. MLSA enabled accurate strain identification and indicated the possible existence of a novel *Kosakonia* species.

Keywords: Parenteral nutrition. Health surveillance. Quality control. Contamination. Bacterial taxonomy.

1 INTRODUÇÃO

A nutrição parenteral (NP) possui grande importância clínica no tratamento e prevenção da desnutrição, que é uma causa relacionada à morbidade e à mortalidade de pacientes imunocomprometidos. Por ser administrada por via intravenosa, deve obrigatoriamente atender a altos padrões de esterilidade, exigindo controle rigoroso em todas as etapas de manipulação. Apesar das normas estabelecidas, a contaminação microbiológica ainda representa um desafio significativo, estando associada a surtos de infecção hospitalar e aumento da mortalidade de pacientes em UTI (Williams *et al.*, 1985; Gonçalves *et al.*, 2000; Tresoldi *et al.*, 2000; Van Rostenberghe *et al.*, 2006; Vonberg, R.P.; Gastmeier *et al.*, 2007; Kôse *et al.*, 2016; Pillionetto *et al.*, 2018; Garza-González *et al.*, 2021). A contaminação pode ocorrer em diversas etapas de produção, sendo agravada pela dificuldade de identificação microbiológica (Boszczowski, *et al.*, 2012; Pillionetto *et al.*, 2018; Benitez; Vieira; Romão, 2020). Nesse contexto, a implementação de sistemas de qualidade e o cumprimento rigoroso das boas práticas são fundamentais para minimizar riscos. O estudo teve como objetivo realizar a identificação fenotípica e genotípica das cepas provenientes de NPs contaminadas, recebidas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2016.

2 METODOLOGIA

Foram encaminhadas ao INCQS 134 amostras de NP na modalidade de análise fiscal e de orientação para apoiar ações de apreensão da vigilância sanitária e detecção de possível fonte dos surtos. Das 113 amostras submetidas ao ensaio de esterilidade, realizado pelo Setor de Produtos Estéreis do Departamento de Microbiologia do INCQS (DM/INCQS) em 2007 e 2013, 15 amostras (13%) foram insatisfatórias, resultando em 26 cepas bacterianas isoladas (Benitez; Vieira; Romão, 2020).

2.1 PROVAS BIOQUÍMICAS

Foram estudadas 26 cepas, provenientes de 14 amostras de NP. Essas cepas foram identificadas pelo Setor de Bactérias e Arqueas do DM/INCQS por meio do sistema automatizado VITEK®2 Compact (Bio Mérieux Inc., Durham, North Carolina, USA) como: *Pantoea* spp. (n = 20), *Kluyvera intermedia* (n = 2), *Rhizobium radiobacter* (n = 2) e *Enterobacter cloacae* (n = 2). Após identificação, essas cepas foram preservadas e depositadas

na Coleção de Bactérias Patogênicas (CBP) do INCQS. Todas as cepas foram submetidas a provas bioquímicas convencionais descritas no *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* (2005), no *Manual of Clinical Microbiology* (2015) e no livro Koneman Diagnóstico Microbiológico (WINN *et al.*, 2012) para bactérias da família Enterobacteriaceae e para bastonetes Gram negativos não fermentadores.

As provas bioquímicas foram: coloração pelo método de Gram, teste da produção da citocromo oxidase, catalase, redução de nitrato a nitrito em caldo nitrato, produção de indol, motilidade, hidrólise de esculina, gelatina e ureia, produção de H₂S, teste de oxidação-fermentação da glicose, reação de Voges-Proskauer e vermelho de metila em meio de cultura caldo Vermelho de metila-Voger Proskauer (MR-VP), fenilalanina desaminase, utilização de citrato e malonato, lisina e ornitina descarboxilases, arginina diidrolase, produção de gás a partir de D-glicose, DNase (Desoxirribonuclease) e fermentação de carboidratos (lactose, sacarose, frutose, galactose, D-manitol, dulcitol, salicina, adonitol, myo-inositol, D-sorbitol, L-arabinose, rafinose, L-ramnose, maltose, D-xilose, trealose, celobiose, α -metilglicosídeo, eritritol, melibiose, melizitose, D-arabitol, glicerol, D-manose). Os testes foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por até 1 semana, realizando-se leituras a cada 24 horas. As provas para DNase e gelatinase foram executadas em temperatura de 25°C . Após a incubação, o teste da gelatinase permaneceu sob refrigeração (2 a 8°C) por 28 dias.

2.2 IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA

As cepas do estudo foram cultivadas em ágar sangue para a obtenção de colônias isoladas, que foram transferidas para um poço (spot) da lâmina (slide), modelo Flexi-Mass-DS TO-430 (BioMérieux), utilizada para a técnica de MALDI-TOF/MS. Utilizou-se $1\ \mu\text{L}$ da matriz ácido α -hidroxicinâmico do VITEK®MS RUO (BioMérieux). Após a cristalização da matriz, os slides foram inseridos no equipamento VITEK MS® RUO (MALDI-TOF/MS, modelo AXIMA, Kratos/Shimadzu), localizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz). O equipamento possui um laser de nitrogênio no comprimento de onda de 337 nm. Os resultados obtidos foram analisados pelo software SARAMIS Premium (Database version 4.10 e System version 4.0.0.4, 2010). Após a leitura, foi construída a árvore de similaridade. O dendrograma foi montado de acordo com o algoritmo interno do software SARAMIS Premium, baseando-se na similaridade entre os espectros das cepas. O equipamento considera um percentual de 70% de confiança de similaridade entre a cepa isolada e cepas cadastradas em seu banco de dados para que sejam considerados da mesma espécie.

2.3 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

Após realização da caracterização fenotípica e confirmação da pureza, as cepas foram submetidas à identificação taxonômica por métodos genotípicos. A partir de uma cultura pura, foi realizada a extração do DNA genômico através do *Kit DNAeasy Blood & Tissue* (Qiagen®), utilizando-se o protocolo para bactérias Gram negativas, seguindo as recomendações do fabricante. A enzima Proteinase K foi utilizada na concentração de 20 mg/mL. A quantificação do DNA obtido foi feita no equipamento Nanodrop™ 2000C (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Após a dosagem, o DNA foi diluído a concentração final entre 10 e 20 ng/μL.

A amplificação do gene *rrs* pela PCR foi realizada para todos as 26 cepas do estudo, utilizando-se os iniciadores universais PAF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1492R (5'TACCTTGTTACGACTT3') descritos por Watts *et al.* (2000) e Lane *et al.* (1991), respectivamente. As reações de amplificação foram preparadas com 10 μL de tampão verde 5X (Promega®), 6 μL do MgCl₂ a 25 mM, 0,3 μL da *Taq* polimerase a 5 U/μL (Promega®), 1 μL de dNTP a 10 mM, 1 μL de cada iniciador (Invitrogen®) a 100 ng/μL, 3 μL de DNA diluído e água livre de DNase e RNase suficiente para completar um volume de 50 μL de reação por microtubo. As amplificações foram realizadas em termociclador Gene Amp – PCR System 9700 da Applied Biosystems®, programado com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Cada ciclo foi composto pelas seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e meio (GUO *et al.*, 2008).

A amplificação dos genes *atpD*, *infB*, *gyrB* e *rpoB* na técnica de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) foi baseada no protocolo adaptado de Brady *et al.* (2008), utilizando os seguintes iniciadores: *gyrB* 01-F (5'TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAGT3'), *gyrB* 02-R (5'CMCCYTCCACCARGTAMAGTT3'), *rpoB* CM7-F (5'AACCAGTTCCGCGTTG GCCTG3'), *rpoB* CM31b-R (5'CCTGAACAACACGCTCGGA3'), *atpD* 01-F (5'RTAATYGGMGCSGTRGTNGAYGT3'), *atpD* 02-R (5'TCATCCGCMGGWA CRTAWAYNGCCTG3'), *infB* 01-F (5'ATYATGGGHCAYGTHGAYCA3') e *infB* 02-R (5'ACKGAGTARTAACGCAGATCCA3').

O MLSA foi feito em 16 cepas, selecionadas com base nos resultados da espectrometria de massa em MALDI-TOF. A amplificação foi realizada em termociclador Amplitherm – Thermal cyclers TX96 da Bellatri Biotecnologia®, programado com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 3 ciclos: desnaturação a 95°C por 1 minuto,

anelamento de 50°C, 57 °C ou 60°C por 2 minutos e 15 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 15 segundos; seguidos de 30 (*gyrB*), 35 (*atpD* e *rpoB*) ou 40 ciclos (*infB*) de: desnaturação a 95°C por 35 segundos, anelamento de 50°C (*gyrB*), 57 °C (*atpD* e *rpoB*) ou 60°C (*infB*) por 1 minuto e 15 segundos (de acordo com o iniciador utilizado), alongamento a 72°C por 1 minuto e 15 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit Qiaquick® PCR Purification (Qiagen®) e visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) em tampão TAE 1X. Para cada cepa, foram realizadas seis reações de sequenciamento do gene *rrs*. Os fragmentos foram sequenciados com um iniciador utilizado na amplificação do gene *rrs* e mais cinco iniciadores diferentes: 1492R (5'TACCTTGTTACGACTT3'), 1831F (5'GAGGAACACCGATGGCGAAGG3'), 1832R (5'GCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT3'), 519R (5'GTATTACCGCGGCGGCTG3'), 321R (5'AGTCTGGACCGTGTCTCAGT3'), 1112F (5'GCAACGAGCGCAACCC3') e 1093R (5'GTTGCGCTCGTTGCGGGA3') (LANE *et al.*, 1991; WATTS *et al.*, 2000; GERHARDT *et al.*, 1994, RAINEY *et al.*, 1996).

Para as reações de sequenciamento dos genes do MLSA, foram utilizados os mesmos iniciadores descritos por Brady *et al.* (2008): *gyrB* 07-F (5'GTVCGTTTCTGGCCVAG3'), *gyrB* 08-R (5'CTTTACGRGCGKGTCAWTAC3'), *rpoB* CM81-F (5'CAGTTCCGCGTTGGCCTG3'), *rpoB* CM81b-F (5'TGATCAACGCCAAGCC3'), *rpoB* CM32b-R (5'CGGACCGGCCTGACGTTGCAT3'), *atpD* 03-F (5'TGCTGGAAGTKCAGCARCAG3'), *atpD* 04-R (5'CCMAGYARTGCGGATACTTC3'), *infB* 03-F (5'ACGGBATGATYACSTTCCTGG3'), *infB* 04-R (5'AGYTTAGATTTCTGCTGACG3').

O sequenciamento foi feito pelo método de Sanger *et al.* (1977) e realizado no equipamento Applied Biosystems ABI Prism 3730, um sequenciador de DNA automatizado da Plataforma de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ.

As sequências consenso de cada gene foram analisadas e editadas no programa SeqMan NGen v. 7.00 do *software* DNASTAR Lasergene. As sequências do gene *rrs* foram analisadas frente ao banco de dados da plataforma online EzBioCloud (CHALITA *et al.*, 2024). As sequências dos genes *atpD*, *gyrB*, *infB* e *rpoB* foram comparadas ao banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) via BLAST.

Para a elaboração de árvores filogenéticas, as sequências consenso foram alinhadas no *software* Clustal X 2.1. As árvores filogenéticas foram geradas no programa MEGA versão 12.1.2, utilizando-se o método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) para inferir a história evolutiva. A robustez das topologias foi realizada através da análise de *bootstrap* (1.000

réplicas) e a distância evolutiva foi calculada com base no método Kimura dois-parâmetros (KIMURA, 1980).

Posteriormente o relacionamento filogenético foi determinado utilizando as espécies mais próximas, determinadas de acordo com resultados obtidos em comparação com sequências de cepas tipo depositadas no BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no EzBioCloud.

2.4 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de difusão em ágar, segundo recomendações do CLSI (CLSI, 2012), para os seguintes antimicrobianos: Cefuroxina (30 µg); ciprofloxacina (5 µg); gentamicina (10 µg); trimetopima/sulfametoxazol (25 µg); meropenem (10 µg); imipenem (10 µg); cefazolina (30 µg); amoxicilina/ácido clavulânico (20 µg/ 10 µg); ampicilina (10 µg); aztreonam (30 µg); amicacina (30 µg); cefoxitina (30 µg); cefepima (30 µg); ceftazidima (30µg); ceftriaxona (30 µg); tetraciclina (30 µg); ertapenema (10 µg); piperaciclina/tazobactam (100 µg/ 10 µg); tobramicina (10 µg); levofloxacina (5 µg); cloranfenicol (30 µg). Os resultados foram interpretados segundo o CLSI (CLSI, 2023).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os contaminantes de NP isolados no INCQS, buscando elucidar a identificação das espécies envolvidas. Para tal, vários métodos foram empregados. Foi obtido um total de 26 cepas, nas quais 24 estavam relacionadas a um surto ocorrido em 2013 (3878, 3879, 3880, 3881, 3888, 3889, 3890, 3891, 3892, 3893, 3894, 3895, 3896, 3897, 3898, 3899, 3900, 3901, 3902, 3903, 3904, 3905, 3909 e 3910) e duas cepas provenientes de um surto ocorrido em 2007 (3379 e 3381). As cepas com numeração entre 3878 e 3905 foram identificadas como pertencentes ao Complexo *Erwinia herbicola* - *E. agglomerans*, as cepas 3379 e 3381, como Complexo *E. cloacae* e as cepas 3909 e 3910, como *R. radiobacter* segundo o *Manual of Clinical Microbiology*, *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* e o livro Koneman Diagnóstico Microbiológico, divergindo de algumas provas (Bergey's, 2005a; Bergey's, 2005b; Winn *et al.*, 2012; Forsythe; Abbptt; Pitout, 2015). Na Tabela 1, estão descritos os resultados das provas bioquímicas convencionais (identificação fenotípica).

Tabela 1 – Resultado das provas bioquímicas convencionais.

Provas bioquímicas	Cepas 3878 a 3905	Cepa 3379	Cepa 3381	Cepas 3909 e 3910
OF glicose	O/F	O/F	O/F	O ^a
Agar esculina	+	+	+	+
Caldo VP	+	+	+	–
Caldo VM-VP	+	+	+	–
SIM – motilidade	+	+	+	+
SIM – H ₂ S	–	–	–	–
SIM – Indol	+	–	–	–
Descarboxilase lisina	–	–	–	–
Hidrolase arginina	–	+*	+	+
Descarboxilase ornitina	–	–	–	–
Utilização de malonato	+	+	+	–
Utilização de citrato	+	+	+	–
Hidrólise da ureia	–	–	–	+
Fenilalanina	+ ^a	–	–	+
Nitrato	+	+ ^a	+	–
Gelatinase	+ ^b	+ ^b	+ ^b	–
Oxidase	–	–	–	+
Catalase	+	+	+	+
Produção de DNase	+*	+*	+*	+*
Fermentação:				
Glicose (com tubo de Duhan)	+	–	+	NE
Adonitol	–	–	–	NE
Arabinose	+	+	+	NE
Frutose	+	+	+	NE
Lactose	+	+*	+*	NE
Maltose	+	+	+	NE
Manitol	+	+	+	NE
Manose	+	+	+	NE
Melibiose	–	–	–	NE
Melizitose	–	–	–	NE
Ramnose	+	+	+	NE
Sacarose	+	+	+	NE
Trealose	+	+	+	NE
Xilose	+	+	+	NE
Galactose	+	+	+	NE
Rafinose	+	+	+	NE
Salicina	+	+	+	NE
Eritritol	–	–	–	NE
Inositol	–	–	–	NE
Dulcitol	+	+	+	NE
MGP	+*	+*	+*	NE

Legenda: *provas com resultado após 48 horas de incubação; + positivo; ^a reação fraca em mais de 24 h; ^b reação positiva após 28 dias; MGP: metil- α -D-glicopiranosídeo. NE: não executado.

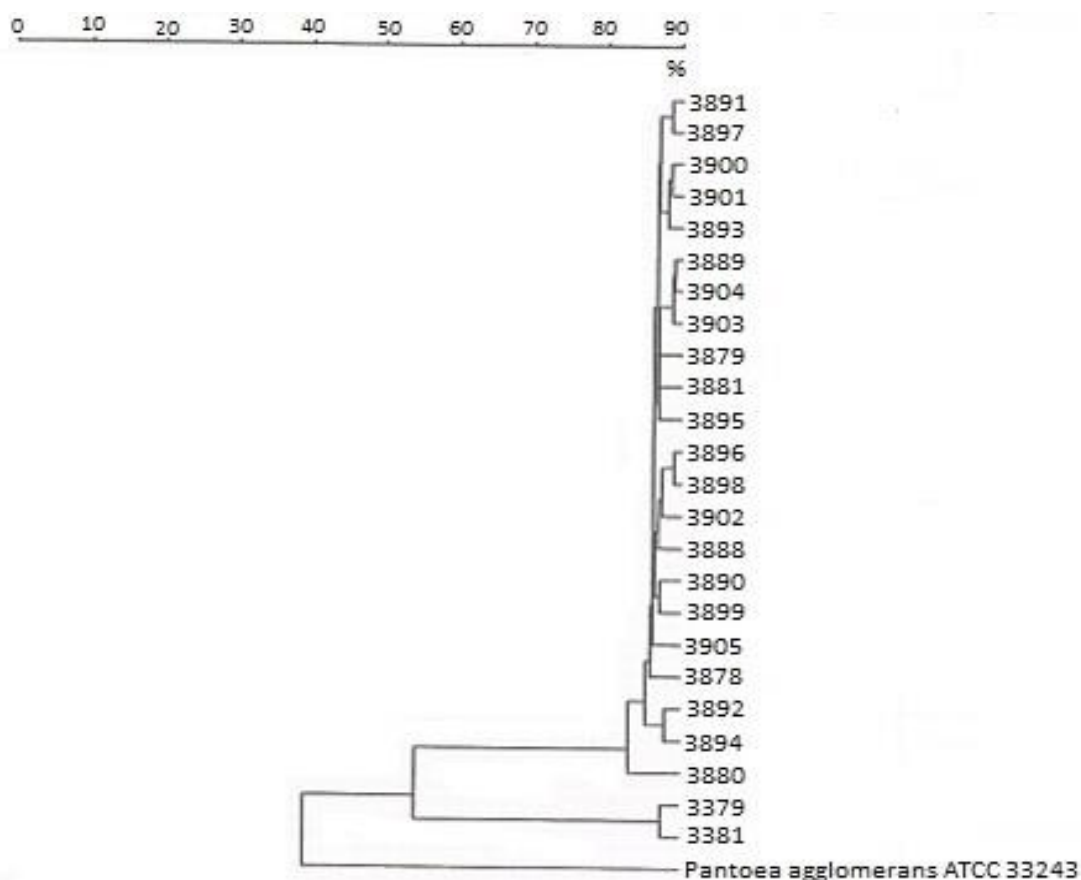
Fonte: Do autor, 2026.

A identificação das cepas pelos métodos fenotípicos convencionais e pelo sistema automatizado VITEK®2 *Compact* apresentou limitações na determinação correta dos gêneros e espécies bacterianas. As cepas 3878 a 3905 foram inicialmente identificadas pelo VITEK®2 *Compact* como pertencentes ao gênero *Pantoea* ou à espécie *Kluyvera intermedia*, enquanto as provas bioquímicas convencionais as aproximaram do complexo *Enterobacter agglomerans*. De forma semelhante, as cepas 3379 e 3381 apresentaram perfil bioquímico próximo ao complexo *E. cloacae*, porém com resultados divergentes em algumas provas descritas na literatura. Essas inconsistências demonstram a dificuldade de identificação de enterobactérias ambientais por métodos fenotípicos, especialmente devido à variabilidade bioquímica entre cepas filogeneticamente relacionadas. Além disso, a acurácia do VITEK®2 *Compact* depende diretamente das espécies disponíveis em seu banco de dados, o qual possui cobertura limitada para espécies ambientais e recentemente descritas da família Enterobacteriaceae. Dessa forma, os resultados reforçam a necessidade da utilização de métodos moleculares complementares para identificação taxonômica mais precisa.

A análise por espectrofotometria de massa MALDI-TOF MS identificou apenas duas das 26 cepas em nível de espécie. As cepas 3909 e 3910 foram identificadas com 99,9% de confiança como *R. radiobacter*, corroborando os resultados obtidos pelo VITEK®2 *Compact*. As demais 24 cepas foram classificadas apenas como pertencentes à família Enterobacteriaceae. O dendrograma gerado a partir dos espectros de massa (Figura 1) agrupou as cepas 3878 a 3905 em um grupo com similaridade entre 85% e 90%, enquanto as cepas 3379 e 3381 formaram um segundo agrupamento distinto. A cepa referência *Pantoea agglomerans* ATCC 33243 apresentou baixa similaridade com o grupo I (Figura 1), em torno de 35%, reforçando a hipótese de que essas cepas não pertenciam ao gênero *Pantoea*.

Os resultados evidenciam limitações da espectrofotometria de massa em MALDI-TOF na identificação de enterobactérias ambientais e de gêneros recentemente descritos, uma vez que o método depende diretamente da representatividade dos espectros presentes no banco de dados do equipamento. Além disso, o agrupamento obtido pelo dendrograma não possui caráter filogenético, dificultando a diferenciação entre táxons intimamente relacionados. Apesar dessas limitações, a técnica demonstrou utilidade na avaliação da similaridade entre as cepas e na triagem inicial dos isolados.

Figura 1- Dendrograma elaborado pelo *software* interno do equipamento VITEK®MS RUO, considerando o percentual de semelhança entre os espectros obtidos.



Legenda: Grupo I: 3878 a 3905; Grupo II: 3379 e 3381

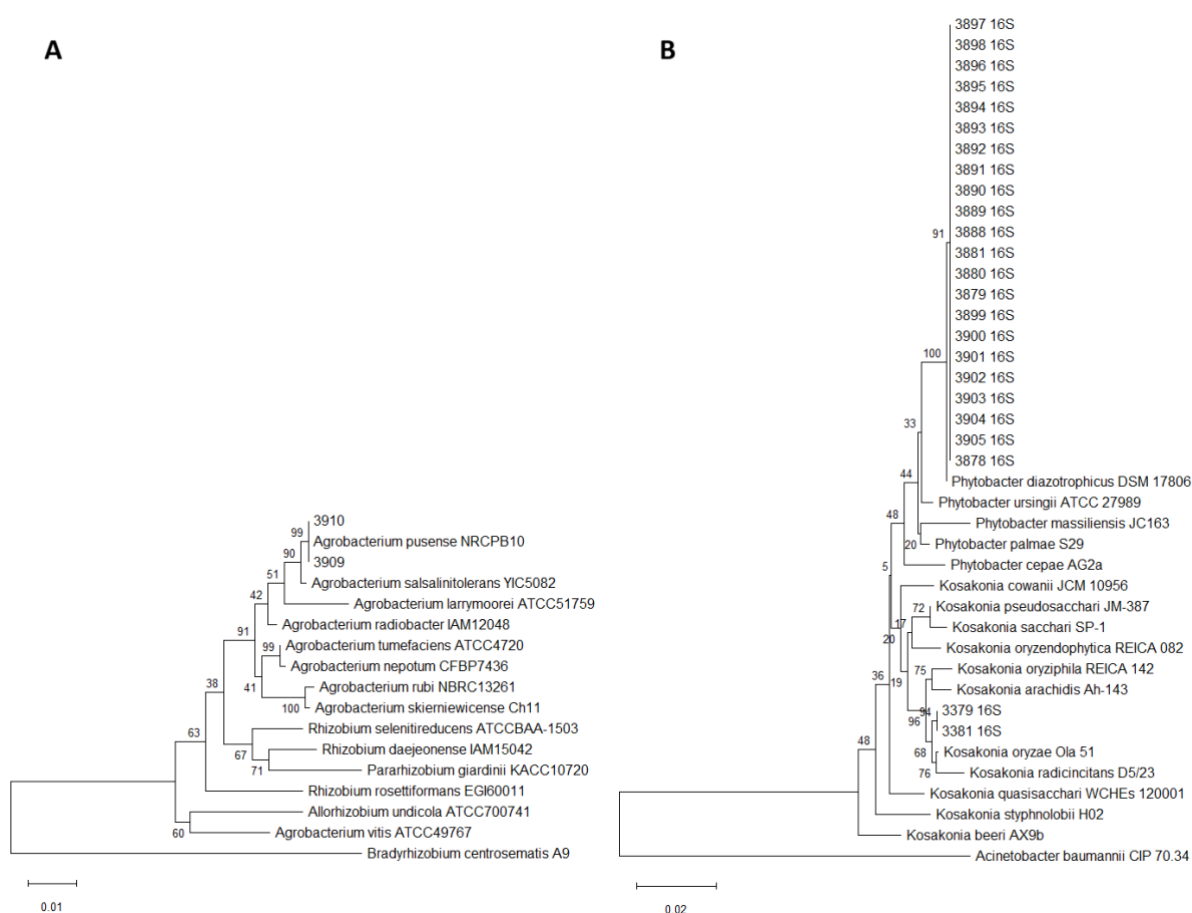
Fonte: Do autor, 2026.

Pelos métodos fenotípicos e proteômico, não foi possível chegar a uma identificação conclusiva das cepas estudadas, sendo necessária a aplicação de métodos genotípicos. O gene *rrs* foi sequenciado para todas as 26 cepas do estudo. Além disso, 14 das 22 cepas, previamente identificadas como *Pantoea* spp. ou *Kluyvera intermedia*, foram submetidas à análise de MLSA, com sequenciamento dos genes *atpD*, *infB*, *gyrB* e *rpoB*. Os micro-organismos isolados de NP no INCQS, que foram identificados nesse estudo utilizando a análise da sequência do gene *rrs* e MLSA, são: *A. pusense*, *Kosakonia* spp. e *P. diazotrophicus* (Figuras 2 e 3).

O gene *rrs* foi sequenciado em um tamanho de, aproximadamente, 1500 pb e as sequências foram submetidas ao banco de dados EZBioCloud (Chalita *et al.*, 2024). As cepas 3909 e 3910 foram identificadas como: *Agrobacterium pusense*, com 100% de identidade; *Agrobacterium salinitolerans*, com 99,72 % de identidade, *R. radiobacter*, com 99,15 % de identidade. A confirmação da existência dessas espécies foi consultada no site LSNP (FREESE, 2026) e depois foi calculada a similaridade com as espécies tipo mais próximas, utilizando o

BLASTn. As cepas apresentaram os seguintes resultados: *A. pusense*, com 99,93 % de similaridade; *A. salinitolerans*, com 99,64 % de similaridade, *Agrobacterium radiobacter*, com 99,08 % de similaridade. Foi construída também uma árvore filogenética com base no gene *rrs* com essas cepas (Figura 2).

Figura 2 – Árvore filogenética derivada de sequências parciais do gene *rrs* e determinada pelo método de *Neighbor-joining*, utilizando o modelo Kimura-2. A significância do arranjo dos ramos foi avaliada por análise de *bootstrap* com 1000 réplicas e os números na árvore indicam a ocorrência (%) destes arranjos.



Legenda: **Parte A:** Cepas 3909 e 3910, com identificação prévia de *Rhizobium radiobacter*. **Parte B:** Cepas 3878 a 3905, com identificação prévia de *Pantoea* spp. ou *Kluyvera intermedia*. Cepas 3379 e 3381, com identificação prévia de Complexo *Enterobacter cloacae*. Foram utilizadas na análise filogenética cepas de todas as espécies descritas dentro desses gêneros. As sequências do gene *rrs* das espécies *Bradyrhizobium centrosematis* e *Acinetobacter baumannii* foram utilizadas como “out group”.

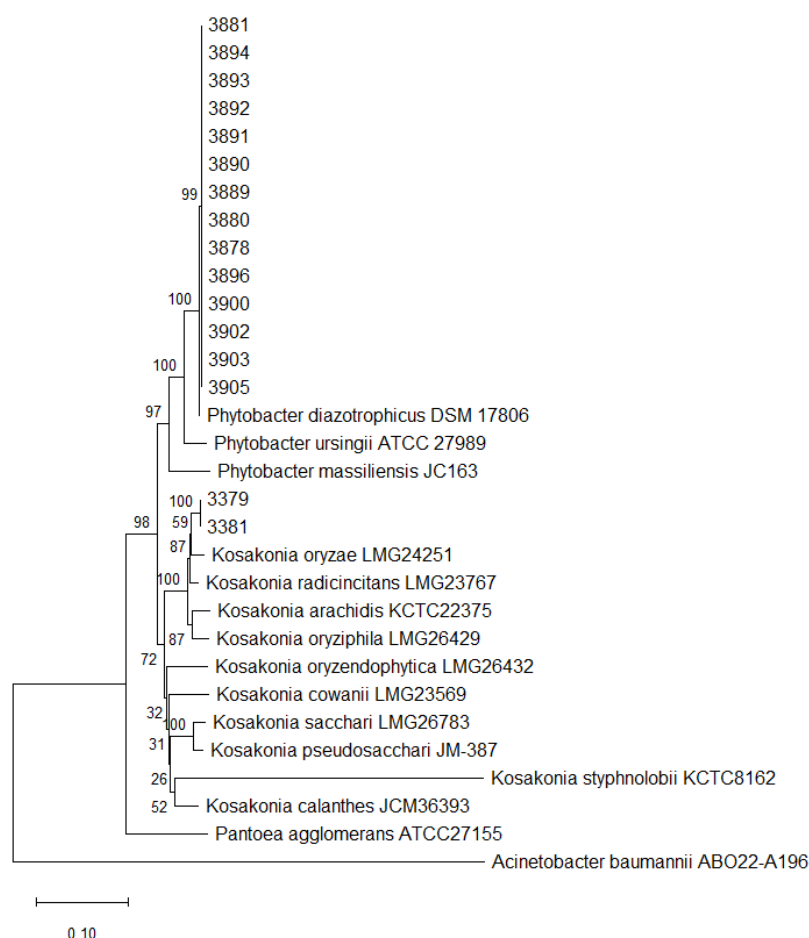
Fonte: Do autor, 2026.

As cepas com numeração 3379, 3381 e 3878 a 3905 tiveram a sequência do gene *rrs* também submetidas ao banco de dados EzBioCloud (Chalita *et al.*, 2024). As sequências das bactérias 3878 a 3905 apresentaram 99,71% de identidade com a cepa tipo de *P. diazotrophicus*, e 99,04% com a de *Phytobacter ursingii*; com exceção das cepas 3897 e 3898, que apresentaram 99,64% de identidade com a cepa tipo de *P. diazotrophicus*, e 98,97% com a de *Phytobacter*

ursingii; As cepas 3379 e 3381 apresentaram as seguintes porcentagens de identidade na base de dados: 99,73% com *Kosakonia oryzae*, 99,59% com *Kosakonia radicincitans*, 99,52% com *Kosakonia arachidis* e 99,07% com *Kosakonia oryziphila*. A análise realizada não diferenciou as espécies das cepas avaliadas. Também foi construída a árvore filogenética para essas cepas com base no gene *rrs* (Figura 2).

A fim de se confirmar a identificação das cepas de *P. diazotrophicus* e para elucidar a espécie das cepas de *Kosakonia*, a técnica de MLSA foi realizada. Esta técnica confirmou a identificação das 22 cepas (3878 a 3905) como *P. diazotrophicus* (Figura 3) e de uma possível nova espécie de *Kosakonia*, já que as cepas 3379 e 3381 não formaram um grupo monofilético com nenhuma espécie desse gênero.

Figura 3 – Árvore filogenética derivada de sequências concatenadas dos genes *atpD*, *gyrB*, *infB* e *rpoB* e determinada pelo método de *Neighbor-joining*, utilizando o modelo Kimura-2. A significância do arranjo dos ramos foi avaliada por análise de bootstrap com 1000 réplicas e os números na árvore indicam a ocorrência (%) destes arranjos.



Legenda: No MLSA foram utilizadas cepas de referência de todas as espécies descritas e validadas dos gêneros *Phytobacter* e *Kosakonia*. A cepa de referência da espécie *Phytobacter palmae* não foi incluída na análise porque as sequências de alguns genes não estavam disponíveis no GenBank. A espécie *Acinetobacter baumannii* foi utilizada como “out group”.

Fonte: Do autor, 2026.

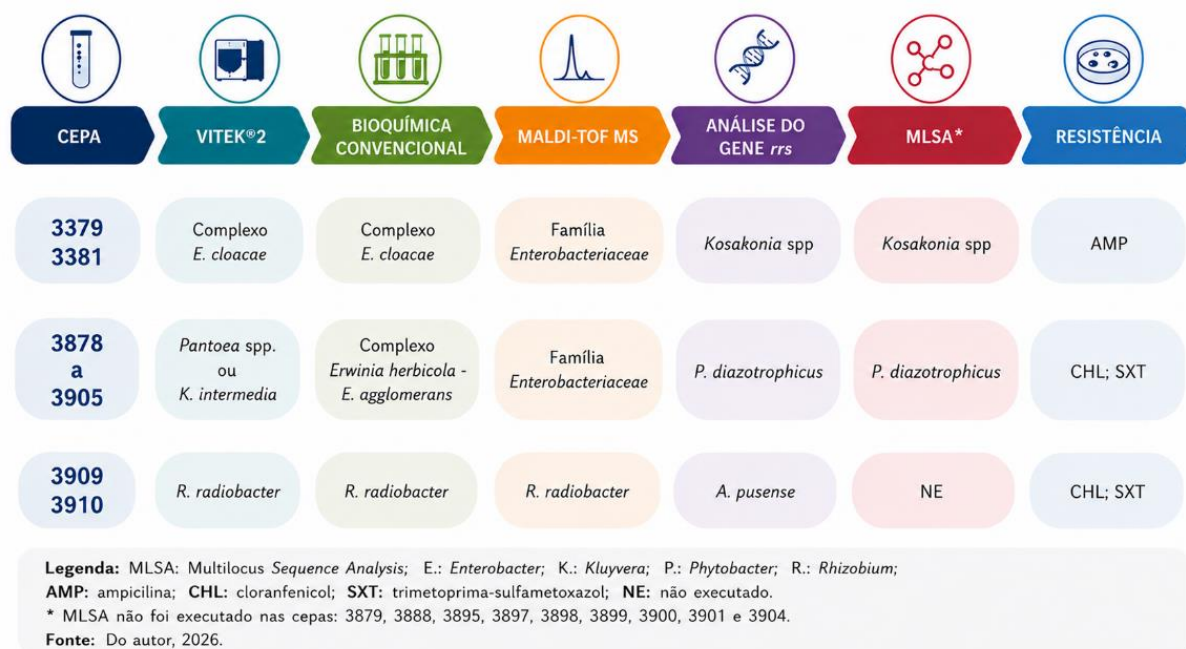
A cepa *P. diazotrophicus* 5020RM foi isolada por Pillonetto *et al.* (2018) de amostras de hemocultura de um paciente que recebeu NP contaminada e a cepa 5110RM, de uma bolsa de NP. No trabalho publicado, os autores afirmam que as cepas 5020RM e 5110RM tratam de um mesmo clone. Estas duas cepas (5020RM e 5110RM), quando comparada no BLASTn com todas as cepas 3878 a 3905 (*P. diazotrophicus*, deste estudo), apresentaram 100% de similaridade entre si, utilizando-se as sequências de todos os genes sequenciados (*rrs*, *atpD*, *infB*, *gyrB*, *rpoB*). Isso corrobora com o trabalho de Pillonetto *et al.* (2018) e mostra que pode se tratar do mesmo clone envolvido no surto de NP contaminada ocorrido em 2013.

Cepas provenientes das amostras de NP foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos frente aos antimicrobianos mais utilizados na prática médica. As cepas mostraram-se sensíveis a todos os antimicrobianos, com exceção de ampicilina, cloranfenicol e trimetopim-sulfametoxazol (Figura 4). As cepas identificadas como *P. diazotrophicus* e de *A. pusense* apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados, sendo resistentes ao cloranfenicol e trimetopim-sulfametoxazol. As cepas identificadas como *Kosakonia* spp. possuem resistência à ampicilina.

A caracterização das cepas associadas à contaminação de NP evidenciou a participação de bactérias emergentes, como *P. diazotrophicus*, *Kosakonia* spp. e *A. pusense*, cujas classificações taxonômicas foram recentemente revisadas por abordagens polifásicas (Brady *et al.*, 2013; Mousavi *et al.*, 2015; Pillonetto *et al.*, 2017). Embora originalmente descritos como micro-organismos ambientais, especialmente associados a plantas e fixação de nitrogênio, estudos recentes demonstram sua relevância clínica, incluindo associação a surtos e infecções oportunistas (Pillonetto, 2018; Smits *et al.*, 2022). Espécies de *Phytobacter* já haviam sido isoladas na década de 70 nos Estados Unidos e nos anos 2000 no Brasil em amostras de fluidos intravenosos e foram identificadas como *P. agglomerans* (Maki; Matin, 1975; Gonçalves, *et al.*, 2000; Boszczowski, *et al.*, 2012; Pillonetto *et al.*, 2017; Smits *et al.*, 2022). A limitada disponibilidade de dados sobre virulência reforça a necessidade de investigações genômicas adicionais.

Os resultados, compilados e de acordo com os métodos de identificação utilizados, estão descritos na Figura 4 e demonstram limitações importantes dos métodos fenotípicos convencionais e automatizados na identificação de bactérias ambientais ou de espécies recentemente descritas. Tanto o VITEK®2 *Compact* quanto o MALDI-TOF MS dependem diretamente de bancos de dados previamente alimentados com espécies clinicamente relevantes, o que compromete a identificação de micro-organismos emergentes ainda pouco representados nessas bases (Mazzetti *et al.*, 2026).

Figura 4 - Resultado da identificação, de acordo com os métodos utilizados, e do teste de susceptibilidade à antimicrobianos por cepa estudada.



A análise por MLSA demonstrou maior poder discriminatório em relação ao gene *rrs*, permitindo adequada diferenciação entre espécies e sugerindo a existência de possível nova espécie de *Kosakonia*. Além disso, a alta similaridade genética entre as cepas indica a possível ocorrência de um clone associado ao surto, embora técnicas adicionais de tipificação sejam necessárias para confirmação.

Os achados reforçam a importância da taxonomia polifásica e do uso de métodos genotípicos para identificação precisa, especialmente em contextos clínicos e de controle de qualidade. A dificuldade na identificação correta pode comprometer a vigilância epidemiológica e retardar ações de controle sanitário (Smits *et al.*, 2022). Evidências da literatura indicam que espécies previamente identificadas como *P. agglomerans* podem, na realidade, corresponder a *P. diazotrophicus*, sugerindo subnotificação desse agente em surtos anteriores no Brasil (Boszczowski, *et al.*, 2012; Pilonetto *et al.*, 2018).

Em relação ao perfil de susceptibilidade, as cepas de *P. diazotrophicus* e *A. pusense* apresentaram padrões idênticos de resistência, sugerindo uma possível fonte comum de contaminação (Gonçalves *et al.*, 2000; Pilonetto *et al.*, 2018). Já as cepas de *Kosakonia* spp. demonstraram resistência restrita à ampicilina, o que pode estar relacionado à produção de β -lactamases, conforme já foi descrito em outras espécies desse gênero (Berinson *et al.*, 2020; González Espinosa *et al.*, 2023; Fournier *et al.*, 2024). Isso demonstra uma relevância clínica e epidemiológicas dessas cepas de *Kosakonia* spp. Apesar dessas cepas de *P. diazotrophicus* não serem multirresistentes, estudos demonstram que outras cepas pertencentes a esta espécie

possam se tornar resistentes a múltiplos antibióticos quando circulam no meio hospitalar (Pillonetto *et al.*, 2018; Smits *et al.*, 2022; Tumeo *et al.*, 2026). Esses resultados destacam a relevância do monitoramento da resistência antimicrobiana, considerando o potencial dessas bactérias em causar infecções graves, como sepse, além de já ter sido descrito na literatura um caso de surto associado à NP contaminada com uma bactéria multirresistente (Garza-González *et al.*, 2021).

Por fim, o estudo reforça que a contaminação de NP está frequentemente associada a enterobactérias ou micro-organismos fenotipicamente semelhantes, evidenciando a necessidade de métodos robustos de identificação microbiológica para garantir a segurança do paciente e aprimorar estratégias de vigilância epidemiológica.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos métodos utilizados na identificação dos contaminantes bacterianos de NP deste estudo mostraram que: o VITEK®2 *Compact* e as provas bioquímicas convencionais são métodos com limitações, podendo apresentar um resultado equivocado de identificação; o VITEK® MS RUO, apesar de direcionar a identificação para a família Enterobacteriaceae e identificar outras cepas como *Rhizobium radiobacter*, teve sua análise limitada pelo banco de dados disponível; o sequenciamento do gene *rrs* se mostrou eficaz para identificação do gênero das enterobactérias estudadas e espécie de *Agrobacterium*; e o MLSA possibilitou a confirmação da identificação da espécie de *Phytobacter* e sugestão de nova espécie pertencente ao gênero *Kosakonia*. Diante disso, a melhoria dos protocolos de identificação de bactérias de origem ambiental e de patógenos emergentes é necessária e deve ser implementada em laboratórios clínicos e de referência, visto que estas podem acometer pacientes através do uso de medicamentos e provocar surtos de infecção. Dessa forma, o controle microbiológico torna-se um elemento fundamental para garantir a segurança do paciente e a eficácia da terapia.

REFERÊNCIAS

BENITEZ, M. B. R.; VIEIRA, V. V.; ROMÃO, C. M. C. P. A. Nutrição parenteral: panorama das amostras analisadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **Rev Epidemiol Control Infec**, v. 10, n. 3, 2020.

BERGEY'S Manual of systematic Bacteriology. 2. ed. Michigan: Springer, 2005. v. 2, pt. A.

BERGEY'S Manual of systematic Bacteriology. 2. ed. Michigan: Springer, 2005. v. 2, pt. B.

BERINSON, B. *et al.* Identification of *Kosakonia cowanii* as a rare cause of acute cholecystitis: case report and review of the literature. **BMC Infect Dis**, v. 20, p. 366, 2020.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. Michigan: Springer, 2005. v. 2, pt. B, p. 587-607.

BOSZCZOWSKI, Í. *et al.* Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* bacteraemia associated with contaminated anticoagulant citrate dextrose solution: new name, old bug? **J Hosp Infect**, v. 80, n. 3, p. 255-258, 2012.

BRADY, C. *et al.* Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). **Syst Appl Microbiol**, v. 31, n. 6-8, p. 447-460, 2008.

BRADY, C. *et al.* Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA). **Syst Appl Microbiol**, v. 36, n. 5, p. 309-319, 2013.

CHALITA, M.; *et al.* EzBioCloud: a genome-driven database and platform for microbiome identification and discovery. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 74, n. 6, 2024.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 11. ed. M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023.

FORSYTHE, S. J.; ABBPTT, S. L.; PITOUT, J. *Klebsiella, enterobacter, citrobacter, cronobacter, serratia, plesiomonas*, and other enterobacteriaceae. In: **MANUAL of Clinical Microbiology**. 11. ed. Washington: ASM Press, 2015. p. 714 - 737.

FOURNIER, C. *et al.* KSA-1, a naturally occurring Ambler class A extended spectrum β -lactamase from the enterobacterial species *Kosakonia sacchari*. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 39, p. 6-11, 2024.

FREESE, H. M.; *et al.* TYGS and LPSN in 2025: a Global Core Biodata Resource for genome-based classification and nomenclature of prokaryotes within DSMZ Digital Diversity. **Nucleic Acids Res**, v. 54, p. D884-D891, 2026.

GARZA-GONZÁLEZ, E. *et al.* Molecular investigation of an outbreak associated with total parenteral nutrition contaminated with NDM-producing *Leclercia adecarboxylata*. **BMC Infect Dis**, v. 21, n. 235, 2021.

GERHARDT, P. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1994. 690p.

GONÇALVES, C. R. *et al.* Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2000.

GONZÁLEZ ESPINOSA, J. *et al.* *Kosakonia cowanii* Ch1 isolated from Mexican chili powder reveals growth inhibition of phytopathogenic fungi. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1758, 2023.

GUO, Y. *et al.* A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus rrs* gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, p.149–159, 2008.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KÔSE, S. *et al.* *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in neonatal intensive care unit due to contaminated total parenteral nutrition solution. **J Pediatr Research**, v. 3, n. 2, p. 109-112, 2016.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In*: STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW, M. (ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

MAKI, D. G.; MARTIN, W. T. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated infusion products. IV. Growth of microbial pathogens in fluids for intravenous infusion. **J Infect Diseases**. Atlanta, v. 131, n. 3, p. 267-272, 1975.

MAZZETTI, A. *et al.* Construction of a superspectrum for rapid identification of opportunistic human pathogens belonging to the genus *Phytobacter* using whole-cell MALDI-TOF MS. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 115, n. 1, 2026.

MOUSAVI, S. A. *et al.* Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. **Syst Appl Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 84–90, 2015.

PILLONETTO, M. *et al.* Emended description of the genus *Phytobacter*, its type species *Phytobacter diazotrophicus* (Zhang 2008) and description of *Phytobacter ursingii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 68, n. 1, p. 176-184, 2017.

PILLONETTO, M. *et al.* Molecular investigation of isolates from a multistate polymicrobial outbreak associated with contaminated total parenteral nutrition in Brazil. **BMC Infect Dis**, v. 18, n. 397, 2018.

RAINEY, F. A. *et al.* The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardiopsaceae fam. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 46, n. 4, p. 1088-1092, 1996.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, n. 406-425, 1987.

SANGER *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Nati Acad Sci USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SMITS, T. H. M.; AREND, L. N. V. S.; CARDEW, S. *et al.* Resolving taxonomic confusion: establishing the genus *Phytobacter* on the list of clinically relevant *Enterobacteriaceae*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 41, p. 547-558, 2022.

TRESOLDI, A. T. *et al.* *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. **Am J Infect Control**, v. 28, n. 3, p. 258-261, 2000.

TUMEO, A. *et al.* Patient colonization with *Phytobacter* spp. co-harboring *blaIMP-4*, *blaSHV-12*, and *mcr-9.1* highlights its role as an under-recognized reservoir of antimicrobial resistance. **Int J Infect Dis**, v. 167, p. 108562, 2026.

VAN ROSTENBERGHE, H. *et al.* The clinical picture of neonatal infection of *Pantoea* species. **Jpn J Infect Dis**, v. 59, n. 2, p. 120-121, 2006.

VONBERG, R.P.; GASTMEIER, P. Hospital-acquired infections related to contaminated substances. **J Hosp Infect**, v. 65, n. 1, p. 15-23, 2007.

WATTS, J. L. *et al.* Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. **J Dairy Sci**, v. 83, n. 10, p. 2373-2379, 2000.

WILLIAMS, W. *et al.* Infection Control during Parenteral Nutrition Therapy. **J of Parenter Enteral Nutr**, v. 9, n. 6, 1985, 735-746, 1985.

WINN, W. C. *et al.* **Koneman diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos profissionais do Setor de Produtos Estéreis do Departamento de Microbiologia do INCQS pela execução do ensaio de esterilidade (Ana Paula Alcides, Luciana Mansur, Marcia Guimarães, Rafael Vasconcellos), à Claudia Ribeiro Souto pelo apoio durante o início do projeto, à Coleção de Bactérias em Ambientes e Saúde (CBAS) e Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz pelo suporte nas análises, a Bio-Manguinhos por possibilitar a análise em MALDI-TOF MS e à Coleção de Bactérias Patogênicas (CBP) pelo depósito das cepas do estudo