

***Cronobacter* spp y *Salmonella* spp en fórmulas lácteas en polvo consumidas por niños menores de 12 meses en Chile**

Parra Flores, J.¹, Maury Sintjago, E.¹, Rodríguez, A.¹, Alarcón Lavín, M.¹, Saavedra, M.², Silva, B.², Contreras, A.³

¹Departamento de Nutrición y Salud Pública, Universidad del Bío-Bío, Andrés Bello 720, Chillán, Chile.

²Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad del Bío-Bío.

³Laboratorio de Experimentación y Certificación de la Calidad de los Alimentos, Universidad del Bío-Bío.

juparra@ubiobio.cl

Palabras clave: *Cronobacter sakazakii*, fórmulas lácteas en polvo, Reglamento Sanitario de los alimentos, *Salmonella* spp.

Introducción

La Lactancia Materna (LM) es el primer y más importante alimento para los recién nacidos. Aporta toda la energía y los nutrientes que el niño necesita en sus primeros meses de vida, cubriendo además más de la mitad de las necesidades nutricionales requeridas por los lactantes durante el segundo semestre de vida. A pesar de los múltiples beneficios que posee la LM, los indicadores de su consumo a nivel mundial presentan valores cercanos al 90% en los primeros días, con un descenso progresivo hasta 43% de LM a los 6 meses de vida. Dentro de las principales razones de esta prevalencia está la inserción de la mujer al mundo laboral, baja escolaridad de las madres y en menor medida contraindicaciones médicas por enfermedad de la madre o el niño [1].

En los casos en que la alimentación con LM no es viable, es necesario complementar o sustituirla por una fórmula láctea (FL). Que, si bien no entrega la misma calidad ni beneficios que la LM, cubren los requerimientos nutricionales básicos del lactante para asegurar su crecimiento y desarrollo. Dentro de ellas, encontramos Fórmulas Lácteas Líquidas (FLL) y Fórmulas Lácteas en Polvo (FLP), siendo la última mencionada la más utilizada, pero no estéril con probabilidad cierta de presencia de microorganismos patógenos los que pueden causar enfermedades al lactante [2].

Debido a la necesidad de asegurar la inocuidad las FLP, la FAO/OMS ha realizado reuniones de expertos estudiando casos de enfermedades relacionadas a su consumo, ya sea epidemiológica o microbiológicamente. Se identificaron tres categorías de microorganismos con base en la solidez de las pruebas de una relación causal entre su presencia en estos alimentos y la enfermedad de éstos: A) microorganismos con claras pruebas de causalidad, *Salmonella* entérica y *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*); B) microorganismos para los cuales la causalidad es posible pero que no ha sido demostrada todavía, principalmente de la familia *Enterobacteriaceae*, y C) microorganismos en los cuales la causalidad es menos probable o no ha sido demostrada todavía, y que no han sido identificados en ellos. Por ello, la OMS recomendó la ausencia de *Cronobacter* spp., *Salmonella* y *Enterobacteriaceae* en productos lácteos [3-8].

Cronobacter spp. es un patógeno emergente y oportunista. La enfermedad está asociada con el consumo de FLP rehidratada como portador del patógeno y con la eventual participación de utensilios y equipos como reservorios. Los síntomas clínicos se encuentran principalmente en meningitis, septicemia o enteritis necrosante en recién nacidos, pero también afectando a adultos mayores [4].

Salmonella es el microorganismo más ampliamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos y también en FLP. Su hábitat natural es el contenido intestinal de los animales, incluido el hombre. Muestra capacidad para sobrevivir a diversas condiciones ambientales, cualidad que favorece su aislamiento de diversos materiales. Se le ha aislado del medio ambiente, hortalizas, animales silvestres, domésticos, de explotación, humanos enfermos, asintomáticos o convalecientes, de equipo y utensilios, y de fomites [5].

A finales de noviembre de 2017, el Centro Nacional de Referencia de Francia (NRC) para *Salmonella*, observó un aumento inusual de *Salmonella* Agona con 22 casos identificados en niños menores de seis meses entre agosto y noviembre de 2017. Posteriormente se identificaron dos casos más en Inglaterra y

España ligada a la misma FLP. Finalmente hubo 35 contagiados y millones de kilos de FLP retirados del mercado afectando a más de 80 países [6].

En el año 2017 se modifica el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) en Chile incorporando a *Cronobacter* spp. Se incluye un criterio de ausencia en 10 g en 30 muestras de FLP para menores de 12 meses [10]. Debido a que no se ha evaluado esta incorporación al RSA, este trabajo tiene por objetivo evaluar el cumplimiento de RSA de Chile para *Cronobacter* spp y *Salmonella* en FLP consumidas por niños menores de 12 meses.

Metodología

Selección de muestra

Se empleó un muestreo no probabilístico con fórmulas lácteas en polvo obtenidas en 2 ciudades de Chile y analizadas en el laboratorio LECYCA (Laboratorio Experimental de Control y Calidad de Alimentos) de la Universidad del Bío-Bío con un total de 95 muestras.

Microorganismos indicadores

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos (BAM), *Enterobacteriaceae* (ENT) y *E. coli* se hará mediante metodología oficial NCh 2659 (2002) para BAM, NCh 2676 (2002) para ENT y NCh 2636 (2002) para *E. coli*. La categoría del plan de muestreo fue 5 y 6 respectivamente y con los límites microbiológicos establecidos en el criterio 9.1 destinados a fórmulas de uso infantil para menores de 12 meses establecida en el RSA de Chile.

Preparación de la muestra de la fórmula láctea en polvo

De manera aséptica, se obtuvieron 25 g de cada lata de FLP de acuerdo al método descrito por Parra y cols. [2]. Se enriquecieron en Caldo EE Mossel (BD Difco, Sparks, MD, USA) y posteriormente se estrió en Agar Cromogénico DFI (CM 1055, Oxoid Thermo-Fisher, UK). Las colonias presuntivas (color verde y azul) se purificaron en Agar Soya Trypticaseína (BD Difco, Sparks, MD, USA).

Aislamiento de patógenos en la leche en polvo

Se realizó de acuerdo a la norma vigente NCh 2675 (2002) para *Salmonella* y según Parra y cols. [2] para *Cronobacter* spp. Para el preenriquecimiento, se obtuvo de forma aséptica 25 g de cada lata de leche en polvo y se mezclaron con 225 ml de agua peptonada tamponada estéril. Se homogeneizó a velocidad media por 60 s y se incubó a 35°C por 20-24 horas. Posteriormente se enriqueció en caldos selectivos, luego en agares diferenciales y cromogénicos para su identificación. Se seleccionó 5 colonias sospechosas de cada muestra y se purificaron en agar soya tripticaseína (AST) para su posterior uso.

Identificación de patógenos mediante PCR

Purificadas las cepas se realizó un enriquecimiento a 35°C por 24 h en caldo soya tripticaseína. El ADN genómico se extrajo y purificó con el kit UltraClean® (MOBIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se cuantificó el DNA mediante el espectrofotómetro MestroNano Pro (Mestrogen-TW). El DNA fue mezclado con el producto comercial GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI) y los con los oligonucleótidos específicos establecidos en Tabla 1. Se realizó la amplificación del ADN en un termociclador TCL (Fermelo BIOTEC) de acuerdo con las características particulares del patógeno. Terminada la amplificación, se realizó la electroforesis en gel de agarosa 1.5% con condiciones de 100 V, 90 mA y por 120 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (pares de bases) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para determinar el peso de los productos amplificados. El gel de agarosa se reveló utilizando SYBR®Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher INC) por 20 minutos y la imagen se capturó con un sistema de foto documentación.

Análisis bioinformático

Posteriormente, los amplificados fueron enviados a secuenciar a MACROGEN (Korea). Las secuencias generadas fueron analizadas mediante bioinformática utilizando el software de acceso libre GENTle y alineando las secuencias con los softwares ClustalW y PrabiDua [9]. Los contigs fueron alineados en secuencias múltiples en el Software Mega 7.

Tabla 1. Genes utilizados para la identificación de patógenos en el estudio.

Patógeno	Gen	Primer sequence	Referencia
<i>Cronobacter spp.</i>	<i>OmpA</i>	F: GGATTTAACCGTGAACTTTTCC R: CGCCAGCGATGTTAGAAGA	Mohan-Nair y cols., 2006 [2]
<i>Salmonella spp</i>	<i>orgC</i>	F: CTTTATGATGCATTCTACCAACGACTG R:CCGAATCACCACTGTTAGGA	Day y cols., 2009 [9]

Perfil de resistencia a antibióticos

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

Resultados y discusión

Un 52,7% de las muestras analizadas presentaron un valor aceptable de recuentos de RAM ($<10^3$ UFC/g), un 10,5% un valor medianamente aceptable ($>10^3$ y $<10^4$ UFC/g) y un 36,8% un valor rechazable según los criterios microbiológicos del RSA de Chile ($>10^4$ UFC/g). Además, en el estudio se encontró una relación estadísticamente significativa (Test Kruskal-Wallis: $p<0,0001$) entre RAM y países de origen (Tabla 2). Parra y cols. [2] encontraron en FLP destinados a niños menores de 10 años que el 72 % de las muestras analizadas contenían menos de 3 log UFC de BAM no existiendo diferencias entre productos líquidos y en polvo ($p>0,05$). Sin embargo, fue preocupante encontrar en nuestro estudio FLP con recuentos por sobre 5 log UFC/g en todas las FLP independiente de país de origen. Recientemente, Heperkan y cols. [7] en su estudio con 80 muestras de FLP encontraron valores entre 1.7 y 4.99 log UFC/g para FLP, recuentos similares a los comparados con los resultados descritos en la literatura, pero inferiores a los encontrados por nuestro estudio. Por ello, es necesario que las empresas controlen de mejor forma las fuentes de contaminación de las FLP debido al amplio rango de microorganismos presentes en el por la mayor susceptibilidad de infección que tienen los niños que consumen estos alimentos lácteos.

Otro indicador utilizado fue ENT que, aunque no está indicado en el RSA, si es recomendado por el Codex Alimentarius como indicador de control postproceso [4]. Aun cuando, la asociación de riesgo de enfermar con la ingesta de FLP contaminados con ENT aún no se ha establecido con certeza, su ausencia en el FLP proporciona una protección adicional a los recién nacidos, especialmente para prematuro, inmunocomprometidos, y recién nacidos de bajo (<2 500 g) y muy bajo (<1 500 g) peso al nacer, durante la preparación, almacenamiento, o la administración de la alimentación infantil con FLP [2]. En nuestro estudio encontramos que en todas las marcas analizadas contenían ENT en diversos rangos y en algunos casos muy por sobre lo permitido según norma Codex CAC RPC 66, que exige ausencia de este indicador en 10 g. La alta positividad de ENT es compatible con la presencia de varios microorganismos oportunistas y patógenos asociados a enfermedad en lactantes en diversas publicaciones [8]. Por lo que estos hallazgos deben ser analizados en términos del riesgo asociado al consumo de FLP en lactantes, del poco control que estarían realizando las empresas elaboradoras (Tabla 1).

Se confirmó la presencia en 2 muestras de *Cronobacter spp* y que posteriormente fueron confirmadas como *Cronobacter sakazakii* mediante la amplificación del gen *fusA* (Tabla 2). Esta situación es relevante en términos que en los últimos años se ha detectado en forma continua de *Cronobacter spp* en diversas muestras de FLP elaboradas en Chile. Por ello, es recomendable realizar un estudio para establecer origen y relaciones genotípicas entre las cepas aisladas. Inclusive con una alerta nacional e internacional en 2017.

Tabla 2. Recuento de mesófilos aerobios (RAM) y *Enterobacteriaceae* (ENT) por país.

País	Recuento	
	RAM log UFC Mediana (P25-P75)	ENT log UFC Mediana (P25-P75)
Chile	1.5 (<0.1-5.4)	3.9 (<0.1-5.0)
España	5.1 (4.2-5.6)	4.0 (1.5-4.9)
Inglaterra	5.1 (1.2-5.4)	4.1 (<0.1-4.8)
México	4.6 (<0.1-5.8)	2.9 (<0.1-4.3)
p-value *	0.0001	0.0001

*p-value: Kruskal-Wallis test

Esta alta positividad es motivo de preocupación y por ende debería originar una mayor fiscalización por parte del fabricante y de las autoridades de salud debido a la alta letalidad, secuelas neurológicas asociadas y riesgo de enfermar por *C. sakazakii*. Además, se confirmó que estas cepas fueron resistentes a cefalotina, ampicilina y ceftazidima. Es primera vez que se detecta *Salmonella* spp., en 2 muestras de FLP para niños menores de 6 meses. Esta situación es de suma gravedad por lo que fue informado oportunamente a las autoridades de salud y a la empresa elaboradora cuyo origen es de México. Además, se encontró que estas cepas eran resistentes a Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina y, por tanto, de preocupación en la Salud Pública. Estas cepas ya fueron enviadas a secuenciar el genoma completo para obtener mayor información. Ya que debemos recordar que fueron aisladas de FLP para niños menores de 6 meses y por tanto considerados hipersensibles. Comentar, que además se encontró *E. coli* genérica (> 3NMP/g) en 2 muestras de FLP elaboradas en Chile.

Tabla 3. Positividad de *Cronobacter* spp y *Salmonella* en FLP según país de origen

País de origen	n	<i>Cronobacter</i> spp en FLP		<i>Salmonella</i> spp	
		n	%	n	%
Chile	40	2	5	0	0
España	15	0	0	0	0
Inglaterra	15	0	0	0	0
México	25	0	0	2	8
Total	95	2	2.1	2	2.1

Conclusiones

Se aisló *C. sakazakii* y *Salmonella* spp de FLP listas para el consumo lo que es un riesgo para la Salud Pública en el país. Se sugiere utilizar agua de rehidratación de las FLP a 70°C, tal como lo indica la OMS que plantea que esta temperatura tiene un efecto comprobado en disminuir significativamente el riesgo de enfermedad por *C. sakazakii* y *Salmonella* spp en FLP ya reconstituidas.

Referencias

- Vargas-Leguás H, Rodríguez V, Lorite R, Pérez-Portabella C, Redecillas S, Campins M. (2009). Guía para la elaboración de fórmulas infantiles en polvo en el medio hospitalario. Sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico. *An. Pediatr.* **70**(6): 586-93.
- Parra-Flores J., Cerda-Leal F., Contreras A., Valenzuela-Riffo N., Rodríguez A., Aguirre J. (2018). *Cronobacter sakazakii* and microbiological parameters in dairy formulas associated with a food alert in Chile. *Front. Microbiol.* **9**:1708
- Jackson EE, Parra Flores J., Fernandez Escartin E., Forsythe SJ. (2015). Re-evaluation of a suspected *Cronobacter sakazakii* outbreak in Mexico. *J. Food Prot.* **78**(6); 1191-1196.

4. Holý O., Forsythe S. (2014). *Cronobacter* spp as emergent causes of healthcare-associated infection. *J. Hosp. Infect.* **86**(3): 169-177.
5. Fernández E. (2008). *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. 2° edición. 1-962. Universidad Autónoma de Querétaro.
6. Jourdan-da Silva N., Fabre L., Robinson E., Fournet N., Nisavanh A., et al. (2018). Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Euro Surveill.* **23**(2):1-5.
7. Heperkan D., Dalkilic-Kaya G., Juneja V. (2017). *Cronobacter sakazakii* in baby foods and baby food ingredients of dairy origin and microbiological profile of positive samples. *LWT-Food Sci. Tech.* **75**: 402-407.
8. FAO/OMS. 2008. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp) in powdered follow-up formulae. Microbiological Risk Assessment Series No.15. Rome.
9. Day J., Basavanna U., Sharma S. (2009). Development of a Cell Culture Method To Isolate and Enrich *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis from Shell Eggs for Subsequent Detection by Real-Time PCR. *App Env Microbiol.* **75**(1): 5321-5327.