IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Cronobacter sakazakii* EN FÓRMULAS INFANTILES HIDRATADAS

Carbajal Valenzuela C. L.; Parra Flores J.; Fernández Escartín E.

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro.

RESUMEN

En esta investigación se realizó la identificación y posterior cuantificación, así como el aislamiento del microorganismo *Cronobacter*, por medio de indicadores y la técnica tradicional y PCR, en dos fórmulas infantiles hidratadas provenientes del lactario de un hospital de la ciudad de Santiago de Querétaro. La identificación se mostró positiva en 3 de 8 muestras recolectadas, incluyendo fórmulas infantiles y materia fecal de los neonatos consumidores y asintomático ,la cuantificación se llevó a cabo con la técnica NMP, el recuento de BMA y Enterobacteriaceae, por medio de la técnica vaciado en placa mostrandO una media de 297 ufc/ml para BMA, < 10 ufc x ml de *Enterobacteriaceae* y para incidencia de *Cronobacter* 50% en leche hidratada, con valores que oscilan entre 0.0058-0.013 NMP/ml y 25% en materia fecal.

Se puede ver la necesidad de seguir investigando la prevalencia de Cronobacter en las fórmulas infantiles por su gran impacto en la salud de la población sobre todo en países en vías de desarrollo.

INTRODUCCIÓN

Los individuos mayores a 60 años, las mujeres embarazadas y los neonatos menores a 28 días de nacidos son especialmente susceptibles a enfermedades, incluidas las del tipo gastrointestinal, en los pequeños debido a que su estomago es menos ácido que el de los adultos (OMS, 2004), por tanto es un factor importante que contribuye con la supervivencia de microorganismos ajenos a la flora intestinal, que de igual forma no está completamente desarrollada (AEP, 2008).

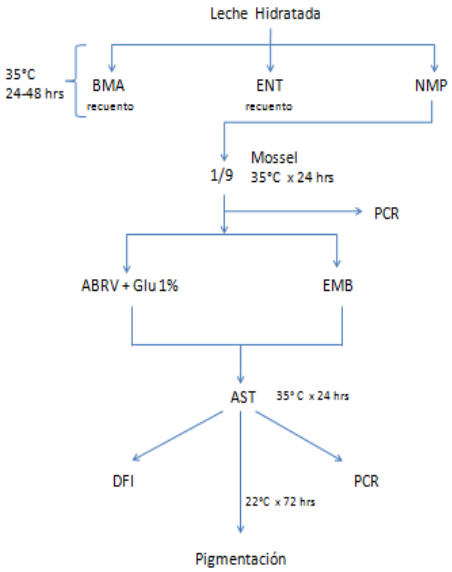
El género de bacterias llamado Cronobacter, contiene especies de importancia sanitaria, como lo es Cronobacter sakazakii, relacionada con enfermedades de interés neurobiológico, tales como meningitis, cerebritis, así como enterocolitis necrotizante, teniendo una letalidad del 20 al 40%, quedando los sobrevivientes con secuelas en el sistema nervioso (OMS, 2004).

Se han establecido los preparados en polvo para lactantes como fuente y vehículo de infección de dicha bacteria (Biering et. al., 1989; Simmons et. al., 1989; Van Acker et. al., 2001; CDC 2002).

METODOLOGÍA

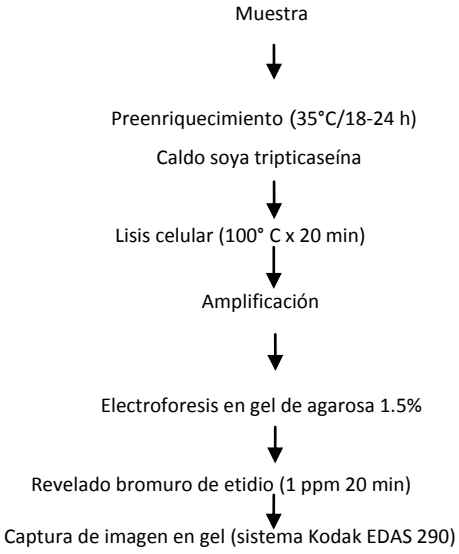
Se evaluó la calidad microbiológica de las fórmulas lácteas a través de microorganismos indicadores como son bacterias mesófilas aerobias (BMA) y *Enterobacteriaceae*. La presencia de *Cronobacter* en leche en polvo hidratada y en materia fecal a través de técnica tradicional y molecular. Para la técnica tradicional se siguió el esquema de la FDA, 2002 (diagrama 1). Se confirmó la positividad mediante Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) (diagrama 2) con los iniciadores Esakf y Esakr (Lehner y Tassara, 2004), que reconocen el gen 16S rRNA, validado con la cepas ATCC 51329, 12868, 29004, 825COC 1058-77 y CF5237 LMG 23823. La cuantificación en fórmulas lácteas hidratadas listas para el consumo se realizó mediante la técnica de Numero Más Probable (NMP) (Thomas,1942).

Diagrama 1. Aislamiento e identificación de *Cronobacter* spp.



Fuente:Modificado FDA, 2002

Diagrama 2. Técnica de PCR



Fuente: Liu et al, 2002

RESULTADOS

Detección de *Cronobacter* spp. por PCR

Tabla 1. Detección de *Cronobacter* spp. por PCR

Muestra	n*	Positivos	%
Leche hidratada	4	2	50%
Materia fecal	4	1	25%

En cuanto a la detección de *Cronobacter* spp, se obtuvo un alto porcentaje de positividad. Al realizar la cuantificación de número de células de *Cronobacter* en una muestra de leche de prematuros (LPP) y otra de iniciación (LMP) los valores fueron de 0.013 NMP/ ml y 0.0058 NMP/ ml respectivamente para las muestras positivas.

Calidad microbiológica de formulas infantiles hidratadas listas para el consumo.

Tabla 2. Bacteria Mesofilas Aerobias (BMA) en formulas infantiles hidratadas (ufc)

	n*	Mínima	Media	Mediana	Máxima
Leche hidratada (ml)	4	10	297.5	130	920

Tabla 3. *Enterobacteriaceae* en formulas infantiles hidratadas (ufc)

	n*	Mínima
Leche hidratada (ml)	4	<10

n* .- numero de muestras analizadas

El análisis de la calidad microbiana de las formulas hidratadas utilizando como indicadores las bacterias mesófilas aerobias y las *Enterobacteriaceae* nos dio como resultado valores muy heterogéneos. Estos rangos de valores están dentro de lo esperado para la leche LPP si lo comparamos con los valores previos de la leche en polvo que fue de 100 ufc/gr. En la leche en polvo LMP de 200 ufc/gr, aumenta a 920 ufc/ml en la leche hidratada lista para consumir.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

No se puede hacer una analogía con la legislación debido a que no hay una normativa de valores de microorganismos indicadores en fórmulas infantiles hidratadas, sin embargo, podemos hacer observación de los datos arrojados con el análisis previo del contenido microbiológico de las leche en polvo para prematuros (LPP) e iniciación (LMP) en condiciones controladas de esterilidad, éstas presentaron como flora de origen 20 y 110 ufc/ml de BMA. Por tanto, se puede inferir que el aumento de los valores de BMA en ambas las leches hidratadas se debe a una contaminación discreta en algún punto del proceso de rehidratación por medio del agua, utensilios o personal, o inadecuado proceso de enfriamiento.

Se puede establecer una relación entre la sepa de *Cronobaceter* de la leche hidratada con la sepa del mismo en la materia fecal, debido al seguimiento que se llevó a cabo; esto confirma también que la cantidad ingerida del microorganismo no es la necesaria para causar enfermedad en el neonato, infiriendo así que la cantidad contaminante no es el principal aspecto para determinar la enfermedad, dando lugar a la virulencia o a la dosis respuesta como aspecto principal.

El producto se puede advertir como no estéril a pesar de las altas temperaturas que se manejan en el proceso comprobándolo con la alta incidencia que se muestra en la tabla 1.

Aunque no es un estudio terminado se puede decir que los valores presentados como presencia del patógeno (1 célula/100 ml de leche), aun que dichos bajos, representan un riesgo, si es que la relación tiempo/temperatura no se respeta, es decir que el producto se suministre antes de las 3 horas de que se preparó.

CONCLUSION

La gran incidencia del microorganismo en la leche que se consume en el lactario del hospital en cuestión, es un motivo de preocupación, ya que aumenta el riesgo de que los neonatos presenten ETA's, debido a los estudios mencionados se observó que la contaminación se daba en algún punto de la rehidratación, por tanto se puede recomendar la implementación del sistema HAPPC.
Por su importancia sanitaria y la poca información que se tiene al respecto, se mantienen investigaciones con la finalidad de desarrollar estrategias para la identificación de *Cronobacter sakazakii* de manera rápida y con alta sensibilidad, de igual forma, información sobre su dosis respuesta, la capacidad de resistencia a ciertos antibióticos entre otras de las características de principal importancia para su conocimiento pleno.

La inocuidad de los alimentos es uno de los temas que el tecnólogo en alimentos debe tener más en cuenta y con mayor información ya que compromete la salud de los consumidores y como profesionista se tiene un compromiso con la sociedad para aplicar los conocimientos adquiridos que puedan favorecer a la población en general.

BIBLIOGRAFÍA

Chap, J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C,. Park, J., Osaili, T., Shaker, T., Jaradat, Z., Hartantyo, S., Abdulla Sani, N., Estuningsih, S. and Forsythe, S. 2009. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. In follow up formulas and infant foods. J.Food Microbiology.136: 185-188

Chenu, J. and Cox, J. 2009. Cronobacter (Enterobacter sakazakii´): current status and future prospects. Applied Microbiology 49: 153-159

El-Sharoud, W., O´Brien, S., Negredo, C., Iversen, C., Fanning, S. and Healy, B. 2009. Characterization of Cronobacter recovered from dried milk and related products. BMC Microbiology. 9:24

Fernández y Escartín , E. 2008. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Editorial Universidad Autónoma de Querétaro, 2° edición.

Iversen, C.,Lehner, A.,Mullane, N., Bidlas, E., Cllenwerck, I., Marugg,J., Fanning, S., Stephan, R., Hoosten, H. 2007. The taxonomy of Enterobacter sakazakii: proposal of a new genus Cronobacter gen. nov. and descriptions of Cronobacter sakazakii comb.nov. Cronobacter sakazakii subsp. Sakazakii, comb. nov., Cronobacter Turicensis sp. Nov., Cronobacter muytjensii sp. Nov., Cronobacter dublinensis sp. and Cronobacter genomospecies I. J.BMA. BMC Evolutionary Biology 2007, 7:64

Lehner,A; Tasara, T; Stephan, R. 2004. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. BMC Microbiology 4:43

Liu, T., Liljebjelke, K.,Bartlett, E., hofrace, C.,Sanchez, S and Maurer,J. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of Salmonella in poultry environment. J.Food Prot. 65:1227-1232