

Primer aislamiento de *Cronobacter spp* (*Enterobacter sakazakii*) en fórmula láctea en polvo producida en Chile

RESUMEN

La familia *Enterobacteriaceae* contempla agentes comunes en las enfermedades transmitidas por los alimentos. De esta familia *Cronobacter spp*, es considerado un patógeno que afecta principalmente a recién nacidos, los que pueden adquirirla a través de fórmulas lácteas infantiles en polvo contaminadas. **Objetivo:** Pesquisar *Cronobacter spp*, en una fórmula láctea en polvo producida en Chile. **Material y método:** En julio de 2008, se obtuvieron 80 muestras desde una planta ubicada en la Región de Los Lagos. Para el aislamiento de *Cronobacter spp*, se utilizó el método descrito en la norma ISO/TS 22964. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Alimentos del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad Austral de Chile. **Resultados:** Del total de muestras analizadas, el 5% (4 / 80) fueron confirmadas como *Cronobacter spp*, constituyendo así el primer reporte de esta bacteria en Chile. **Conclusión:** *Cronobacter spp*, está presente en una fórmula láctea en polvo producida en Chile. Su presencia en este producto representa un riesgo que no es considerado en el actual Reglamento Sanitario de los Alimentos de nuestro país.

Palabras clave: *Enterobacter sakazakii*, *Cronobacter spp*, fórmulas lácteas infantiles en polvo, aislamiento, Chile.

FIRST ISOLATION OF CRONOBACTER SPP (ENTEROBACTER SAKAZAKII) IN POWDERED BABY FORMULA IN CHILE

ABSTRACT

The family *Enterobacteriaceae* includes agents that are commonly transmitted through food. Within this family, *Cronobacter spp*, is considered to be a pathogen that primarily affects newborns, which can acquire it through contaminated powdered formula.

Objective: Isolate *Cronobacter spp*, in a powdered milk formula produced in Chile. **Material and method:** In July of 2008, 80 samples were obtained from a factory in the Los Lagos Region. To isolate *Cronobacter spp*, the methods described in the ISO/TS 22964 specifications were used. The samples were analyzed at the Food Laboratory at the Institute of Preventative Veterinary Medicine and the Universidad Austral de Chile. **Results:** Of all analyzed samples, 5% (4/80) were contaminated with *Cronobacter spp*, which constitutes the first report of this bacterium in Chile. **Conclusion:** *Cronobacter spp* is present in powdered baby formula produced in Chile. It's presence in this product represents a risk that is not considered in the current food safety standards in this country.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, *Cronobacter spp*, powdered baby formula, isolation, Chile.

MÓNICA SÁEZ⁽¹⁾,
SILVIA LLANOS⁽¹⁾ y
RAFAEL TAMAYO⁽¹⁾

⁽¹⁾Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Campus Isla Teja. Valdivia. Chile. msaez@uach.cl

INTRODUCCIÓN

Cronobacter spp., es una bacteria gram-negativa móvil, no formadora de esporas, anaerobia facultativa, que se comporta como patógeno oportunista y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*¹. En la actualidad, *Cronobacter spp* (*Enterobacter sakazakii*) ha sido clasificado como un nuevo género que consiste en 6 especies diferentes *Cronobacter sakazakii*, *C. malonicus*, *C. dublinensis*, *C. mytjensii*, *C. turinensis* y *C. genomspecie*^{1,2}. *Cronobacter spp.* se ha aislado de fórmulas lácteas infantiles en polvo³. La infección por *Cronobacter spp* puede resultar en serias enfermedades, tales como bacteremia, septicemia, meningitis, enterocolitis necrotizante y muerte en recién nacidos inmunocomprometidos^{2,3}. La Organización Mundial de la Salud recomendó que para reducir el riesgo de contraer la enfermedad por *Cronobacter spp*, las fórmulas lácteas infantiles deberían ser reconstituidas con agua a temperaturas superiores a 70°C y que fueran consumidas como máximo hasta 2 horas después de su preparación⁴. Si bien las infecciones por *Cronobacter spp*, son poco frecuentes, pueden llegar a presentar una tasa de mortalidad elevada que fluctúa entre el 40-80%⁵. Existe información acerca de la relación epidemiológica entre los casos clínicos causados por *Cronobacter spp*, y el consumo de fórmulas lácteas infantiles en polvo (FIP)^{3, 4, 6}. Los individuos más susceptibles a la infección por *Cronobacter spp*, lo constituyen lactantes. Dentro de este grupo los recién nacidos (menores de 28 días de edad) -en particular los prematuros, con bajo peso al nacer (menos de 2.500 g.) e inmunocomprometidos (VIH positivos)- son quienes se encuentran mayormente expuestos^{1, 3, 7, 8}.

En los últimos años, *Cronobacter spp*, ha sido considerado un patógeno de importancia mundial, donde inclusive la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos lo clasificó como un peligro severo para determinada parte de la población, capaz de causar riesgo vital, enfermedades a largo plazo o considerables secuelas crónicas⁹⁻¹⁰. El objetivo de esta comunicación es reportar el primer aislamiento en Chile de *Cronobacter*

spp, en muestras de FIP provenientes de una planta elaboradora de productos lácteos en la Región de Los Lagos.

MATERIAL Y MÉTODO

Se recolectaron 80 muestras de una marca comercial nacional de fórmula láctea en polvo (producto en base a leche semidescremada con cereales y fortificada con minerales y vitaminas), en envases de 1 kg, proveniente de una planta elaboradora de productos lácteos ubicada en la Región de Los Lagos. La obtención de las muestras se realizó mediante un procedimiento aleatorio de 16 lotes, de los cuales se recogieron 5 muestras por lote. El muestreo en la planta se efectuó bajo la supervisión del personal del Servicio de Salud de Osorno. Las muestras fueron posteriormente trasladadas, procesadas y analizadas en el Laboratorio de Alimentos del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad Austral de Chile.

El proceso de aislamiento e identificación de *Cronobacter spp*, se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por la norma ISO/TS 22964¹¹. Brevemente, se hizo un pre-enriquecimiento, con 25 g de la muestra y 225 ml de agua peptonada tamponada. Los tubos fueron incubados por 18 ± 2 h a 37°C. Posteriormente se traspasaron 0,1 ml a un tubo con 10 ml de medio caldo lauril sulfato triptosa modificado/vancomicina. Luego se incubó por 24 h a 44°C. De estos tubos se sembró una alícuota en agar cromogénico ESIA® y en agar triptosa de soya (TSA) por 24 h a 44°C. Las placas que presentaron colonias azul verdosas se consideraron presumiblemente positivas a *Cronobacter spp*, en el medio cromogénico ESIA® (Figura 1). Para el caso del agar TSA la confirmación se llevó a cabo mediante la presencia de colonias con pigmentación amarilla (Figura 2) y posterior confirmación bioquímica mediante las pruebas de Oxidasa, descarboxilación de aminoácidos (lisina, ornitina, y arginina), fermentación de carbohidratos (sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa y amigdalina) e hidrólisis de citrato. El control positivo fue la cepa *Enterobacter sakazakii* ATCC 51329.

RESULTADOS

De las 80 muestras de fórmula láctea infantil en polvo (FIP) se obtuvo que el 5% (4/80) fueron

confirmadas con presencia de *Cronobacter spp*,



Figura 1. *Cronobacter spp*, en medio cromogénico ESIA®



Figura 2. *Cronobacter spp*, en medio TSA

DISCUSIÓN

El aislamiento e identificación de *Cronobacter spp* se realizó a partir de fórmulas lácteas en polvo correspondientes a una misma empresa, por lo cual pudiera tratarse de un mismo clon bacteriano, sin embargo, la importancia de este trabajo radica en que constituye el primer reporte de esta bacteria en Chile.

Existen varios estudios en distintos países que señalan la presencia de *Cronobacter spp*. Así, en Canadá se analizaron 120 muestras de FIP de diferentes empresas, el 6,7% contenían *E. sakazakii* en concentraciones de 0,36 ufc/100 g¹².

En 2004, en Inglaterra se muestrearon 82 muestras de FIP provenientes de diferentes países aislándose *E. sakazakii* en 2,4% de las muestras¹³. En un estudio realizado por la FAO/OMS en 8 laboratorios de 7 países se analizaron 136 muestras de FIP aislándose *Cronobacter spp* sólo en 1% de las muestras¹⁴. En Bangladesh de 32 muestras de FIP sólo una resultó positiva a *C. sakazakii*¹⁵. En Australia, se recolectaron 298 muestras del medio ambiente en cinco fábricas de procesamiento de FIP, aislándose un 32% de *Cronobacter spp*. De ese estudio, un 49% de aislamientos se produjo en zonas de procesamiento y 29% en las zonas de elaboración, aunque la mayor incidencia fue en áreas de cierre de leche en polvo (81%) y la me-

nor (6%) después de la reincorporación de las prácticas de higiene de la producción¹⁶.

Actualmente la metodología ISO/TS 22964 utilizada en este estudio, se encuentra cuestionada, ya que la adición de diversos agentes selectivos para neutralizar posibles competidores afecta también el crecimiento de algunas cepas de *Cronobacter spp*. que parecen ser más sensibles y que, sin bien son excepciones, pueden dar lugar a falsos negativos, con el riesgo para la salud pública que esto significa. Se ha demostrado que algunas cepas de *Cronobacter spp* no crecen en caldo lauril sulfato triptosa ni en caldo bilis verde brillante a ninguna temperatura¹⁹. Tampoco en caldo lauril sulfato triptosa modificado o en caldo de enriquecimiento para enterobacterias^{13,20,21}. También existen cepas que se ven afectadas por el cristal violeta y el desoxicolato de sodio, ambos agentes selectivos presentes en el medio ESIA® usado como medio cromogénico²¹. Además, algunas cepas han sido incapaces de crecer a 44°C mientras que otras no producen pigmento amarillo sobre TSA, característica citada en el aislamiento según la ISO/TS 22964¹⁸⁻²¹. Por lo anteriormente expuesto y con el fin de evitar resultados falsos negativos, se ha desarrollado un nuevo caldo para aislar *Cronobacter spp*, y propuesto cambios que permitan perfeccionar la actual ISO/TS 22964¹⁸. Por lo tanto, existe el riesgo de que los resultados obtenidos con este método sean menores a los reales. Sin embargo, este es el método que actualmente describe la ISO/TS 22964(2006) y que recomienda la Unión Europea²².

Las FIP no son productos estériles, y de acuerdo a las especificaciones establecidas por el Codex Alimentarius, este tipo de preparados deben tener un recuento de coliformes < 3/g⁸. La Unión Europea y la norma oficial de Codex Alimentarius²³ especifica la ausencia de *E. sakazakii* en 30 muestras de 10 gramos para todos los preparados deshidratados destinados a lactantes menores de 6 meses²².

En Chile, el Reglamento Sanitario de los Alimentos no señala especificaciones microbiológicas respecto a este microorganismo, además no existen estudios en cuanto a la prevalencia de *C. sakazakii*. Es por este motivo que se hace necesario realizar estudios epidemioló-

gicos y adoptar las normas propuestas por la Unión Europea en cuanto a la búsqueda de este microorganismo.

REFERENCIAS

- Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies 1*, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008 Jun;58(Pt 6):1442-7.
- Healy B, Huynh S, Mullane N, O'Brien S, Iversen C, Lehner A, et al. Microarray-based comparative genomic indexing of the *Cronobacter* genus (*Enterobacter sakazakii*). *Int J Food Microbiol*. 2009 Dec 31;136(2):159-64.
- Richardson AN, Lambert S, Smith MA. Neonatal mice as models for *Cronobacter sakazakii* infection in infants. *J Food Prot*. 2009 Nov;72(11):2363-7.
- Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes: directrices [en línea]. Suiza: OMS: 2007 [citado en enero de 2011]. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines_sp.pdf
- Lampel KA, Chen Y. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. *Int J Food Microbiol*. 2009 Dec 31;136(2):179-84.
- Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science & Technology*. 2003;14(11):443-54.
- Lenati RF, O'Connor DL, Hébert KC, Farber JM, Pagotto FJ. Growth and survival of *Enterobacter sakazakii* in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;122(1-2):171-9.
- Food and Agriculture Organization, World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series, N°10. Italy, Rome: FAO/OMS; 2006.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microbiological testing in Food Safety Management. Microorganisms in foods 7*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.
- Shaker R, Osaili T, Al-Omary W, Jaradat Z, Al-Zuby M. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*. 2007;18(10):1241-5.
- International Organization for Standardization. *Milk and milk products: detection of Enterobacter sakazakii*. ISO/TS 22964:2006 (IDF/RM 210: 2006). Gêneva: ISO.
- Nazarowec-White M, Farber JM. Incidence, Survival, and Growth of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. *Journal of Food Protection*. 1997;60(3):226-30.
- Iversen C, Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol*. 2004; 21:771-777.
- Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J, et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol*. 2009 Dec 31;136(2):185-8.
- Hoque A, Ahmed T, Shahidullah M, Hossain A, Mannan A, Noor K, et al. Isolation and molecular identification of *Cronobacter* spp. from powdered infant formula (PIF) in Bangladesh. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;142(3):375-8.
- Craven HM, McAuley CM, Duffy LL, Fegan N. Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. *J Appl Microbiol*. 2010 Sep;109(3):1044-52.
- Ye Y, Wu Q, Zhang J, Lu J, Lin LIN. Detection of *Cronobacter* in infant formula and phylogenetic analysis on α -glucosidase genes. *Journal of Food Safety* 2011; 31: 185–189
- Iversen C, Druggan P, Schumacher S, Lehner A, Feer C, Gschwend K, et al. Development of a novel screening method for the isolation of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl Environ Microbiol*. 2008 Apr;74(8):2550-3.
- Iversen C, Lane M, Forsythe SJ. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett Appl Microbiol*. 2004;38(5):378-82.
- Guillaume-Gentil O, Sonnard V, Kandhai MC, Marugg JD, Joosten H. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J Food Prot*. 2005 Jan;68(1):64-9.
- Iversen C, Forsythe SJ. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Jan;73(1):48-52.

22. European Union. Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union. 2007; L 322, 12-29.
23. Food and Agriculture Organization, World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) in powdered follow-up formulae. Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 15. Rome: FAO/OMS; 2008.

Recibido: 27 de julio de 2011
Aprobado: 7 de marzo de 2012

Nota del Editor

El muestreo es una disciplina que se preocupa del diseño, cálculo del tamaño de muestra y obtención de información a nivel poblacional.

La muestra constituye la materia prima del quehacer de una investigación. En estadística una muestra es la materia prima con la cual los investigadores pueden estudiar las propiedades y estructura de una población, pero a una escala menor dado que evaluar la población en su totalidad es difícil dado el tiempo, recursos financieros, personal involucrado, etc.

Gran parte de la investigación realizada en salud pública se caracteriza por utilizar información levantada mediante encuestas o entrevistas mediante la aplicación de un cuestionario. Estas estrategias corresponden a una aproximación metodológica que permiten medir un objeto de estudio, como por ejemplo una persona entrevistada. Las respuestas son representativas de la población en estudio u objetivo y el muestreo estadístico las utiliza para explorar, describir o explicar las propiedades de la población que dio origen a la muestra y analizar dicha información.

El sustento teórico del muestreo radica en el concepto de la ley de los grandes números, que implica que al aumentar el tamaño de muestra, la probabilidad teórica respecto a la probabilidad empírica se diferencian lo menos posible. El cálculo se orienta a que dicha diferencia sea menor que un cierto valor prefijado por el investigador.

Existen dos tipos de aproximación al muestreo. El primero hace referencia al muestreo de

tipo poblacional y su objetivo radica en otorgar representatividad a las unidades de análisis; el segundo, privilegia el carácter aleatorio de la muestra y el objetivo es poder hacer comparaciones mediante pruebas o contrastes de hipótesis estadísticas.

La determinación del tamaño de muestra en el diseño de una encuesta por muestreo probabilístico es una de las etapas más importantes en el contexto de un estudio epidemiológico, dado que las conclusiones que se obtengan afectan y modifican notablemente la calidad de vida de aquellas personas o grupos de personas en donde se implementen políticas públicas o de salud derivadas de la información levantada. Una buena muestra reproduce las características de interés que existen en la población de la manera más cercanamente posible.

Si el muestreo es de tipo poblacional una buena muestra se entiende como aquella representación reducida de la población y que privilegie la "representatividad", entendiéndose por representatividad la capacidad de reproducir la diversidad que existe en una población. El diseño de muestreo y la estimación del tamaño de muestra requerido se deben afrontar teniendo en vista las consideraciones de carácter técnico de la teoría estadística inferencial, así como a los objetivos de la investigación propuesta.

(Sergio Alvarado)