

Carta al editor / Letter to Editor

Importancia del uso de métodos actualizados en el control microbiológico de las fórmulas lácteas en ambientes hospitalarios

Importance of the use of updated methods in the microbiological control of powdered infant formula in hospital environments

Sr. Editor:

Hemos leído con mucha atención el artículo titulado "Contaminación microbiológica en fórmulas infantiles en polvo en dos hospitales de Honduras", publicado en el volumen 46 de su prestigiosa revista (Rev Chil Nutr. 2019; 46: 571-578). De él, han surgido varias inquietudes que creemos debemos comentar con usted. *Cronobacter* spp. (inicialmente *Enterobacter sakazakii*) es un género patógeno cuyos primeros casos clínicos datan de 1989, cuando se asoció por primera vez a las leches en polvo (LP) con las infecciones por éste patógeno en neonatos¹. Luego de ello, entre 2007 y 2014 se realizaron cinco reclasificaciones taxonómicas basadas en pruebas fenotípicas y genómicas con el fin de tener una mejor identificación y caracterización de *Cronobacter* spp. y evitar falsos positivos debido a su similitud con otras enterobacterias. Actualmente, se conocen 7 especies de *Cronobacter* spp., de las cuales solo *C. sakazakii* y *C. malonaticus* han sido asociados a cuadros clínicos². El riesgo de enfermar por *Cronobacter* spp como género patógeno y especialmente *C. sakazakii*, está asociado principalmente al consumo de LP destinada a lactantes menores de 6 meses³. La dosis infectiva se ha estimado entre 100 y 10.000 unidades formadoras de colonias (UFC) como una primera aproximación y un riesgo de enfermar de 0,2 y 0,7 con un inóculo de 1 y 50 células, respectivamente^{4,5}.

Un aspecto central del artículo y del cual queremos comentar se refiere al método de aislamiento y confirmación utilizado, el cual en nuestra opinión está muy desactualizado. El método ISO/TS 22964: 2006, fue el primer método para la detección de *Enterobacter sakazakii* en leche en polvo y fórmula infantil en polvo. Éste método utilizaba un caldo de enriquecimiento y agar cromogénico para mejorar la visualización de las colonias aisladas. Sin embargo, posteriormente se demostró que varios aislamientos de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) no crecían bien en las condiciones establecidas en este método. En 2012, la Food and Drug Administration (FDA) modificó su método de aislamiento y enumeración de *Cronobacter* spp. utilizado y que era de 2002. La actualización del método utilizaba pruebas moleculares mediante la reacción de polimerasa

Julio Parra-Flores^{1*}, Eduard Maury-Sintjago¹,
Alejandra Rodríguez¹, Sergio Acuña², Juan Aguirre³,
Miriam Troncoso⁴, Guillermo Figueroa Gronemeyer⁴.

1. Departamento de Nutrición y Salud Pública, Facultad Ciencias de la Salud y de los Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile.
2. Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad Ciencias de la Salud y de los Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile.
3. Departamento Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
4. Laboratorio de Microbiología y Probióticos, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

*Dirigir correspondencia a: Julio Parra-Flores.
Departamento de Nutrición y Salud Pública,
Universidad del Bío-Bío.
juparra@ubiobio.cl

Este trabajo fue recibido el 29 de enero de 2020.
Aceptado con modificaciones: 13 de febrero de 2020.
Aceptado para ser publicado: 10 de marzo de 2020.

en cadena (PCR) y el uso de 2 medios cromogénicos⁶. Posteriormente a ello, en 2014 Stephan et al.⁷, reclasificó especies de *Cronobacter* spp en tres nuevos géneros *Franconibacter helveticus*, *Franconibacter pulveris* y *Siccibacter turicensis*, las cuales estén muy estrechamente relacionadas con *Cronobacter* spp y que producen falsos positivos. Debido a ello, se produce una nueva actualización de los métodos de aislamiento y se publica en 2017 el método ISO 22964: 2017 para detección de *Cronobacter* spp⁸. Por esta razón, para una actualizada y correcta detección, control e identificación de *Cronobacter* spp. en LP, es necesario el uso combinado de un caldo de enriquecimiento selectivo, un agar cromogénico en conjunto con técnicas de identificación basadas en la amplificación y secuenciación del DNA de

Cronobacter spp², situación que no ocurre en el artículo publicado. Por ello, como grupo de investigación tenemos serias dudas de que los *Cronobacter* spp identificados y mencionados en este estudio lo sean, y que lo encontrado sean otras enterobacterias muy estrechamente relacionadas con *Cronobacter* spp. y que generan falsos positivos cuando se utilizan métodos desactualizados.

Otros dos aspectos mencionados en el artículo son que *Cronobacter* spp. es el microorganismo más termoresistente de las enterobacterias y que *Klebsiella* spp. es un peligro en las LP. Estas afirmaciones carecen de fundamento. En primer lugar, la OMS desde el año 2007 ha recomendado usar agua a > 70 °C para rehidratar LP con el objetivo de abatir la presencia y limitar el riesgo de infección por *Cronobacter* spp. Demostrando que *Cronobacter* spp., al igual que otras enterobacterias presentes en la LP son sensibles a temperaturas de pausterización y que utilizando agua igual o superior a 70 °C para rehidratar la LP, se produce una disminución de hasta 4 log UFC de *Cronobacter* spp. Reducción logarítmica muy aceptable considerando que la evidencia científica publicada informa niveles de contaminación de *Cronobacter* spp en LP no superiores a 2 células por gramo³. Respecto a *Klebsiella* spp., la OMS ha clasificado solo a *Klebsiella pneumoniae* en el grupo B, que son microorganismos para los cuales la causalidad de enfermedad es posible pero que no se ha demostrado todavía⁹. Por ello, afirmar que *Klebsiella* spp. es un peligro está sobredimensionado y podría causar una alarma innecesaria en la población. La leche materna y en polvo, son el alimento principal de los recién nacidos. Sin embargo, la LP es factible de ser contaminada por *Cronobacter* spp. en niveles que pueden provocar enfermedad. Por tal motivo, mantener un sistema de evaluación de la calidad microbiológica de las LP elaboradas en los hospitales es fundamental para prevenir infecciones en niños que aún tienen su sistema inmunológico en evolución. Además, adoptar las indicaciones entregadas por la OMS referidas a utilizar agua de rehidratación para las LP a >70 °C, descartar las LP rehidratadas y no consumidas luego de 2 horas y desechar la LP rehidratada que ha sido mantenida refrigerada a < 5°C luego de 24 horas¹⁰. Aunque en este último punto, varios autores han sugerido desechar las LP rehidratada luego de 12 horas almacenada en refrigeración debido a la incapacidad de mantener 5 °C en los sistemas de enfriamiento hospitalario, ya que se ha evidenciado el crecimiento de *Cronobacter* spp. a partir de 6 °C. Por ello, el uso de sistemas preventivos para garantizar la inocuidad

alimentaria y el monitoreo microbiológico permanente con metodologías validadas y actualizadas por parte de los productores de LP y de las autoridades de salud, es fundamental para un control exitoso de *Cronobacter* spp y otros patógenos en las LP utilizadas en ambientes hospitalarios. Además, de favorecer la LME hasta los 6 meses como el primer factor protector de infecciones en los lactantes menores de 6 meses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bierling G, Karlsson S, Clark NC, Jonsdottir KE, Ludvigsson P, Steingrimsdottir O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazkii* in powdered milk. *J Clin Microbiol.* 1989; 29: 2054-2056.
2. Forsythe SJ. Updates on the *Cronobacter* Genus. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2018; 9: 23-44.
3. Parra J, Oliveras L, Rodríguez A, Riffo F, Jackson E, Forsythe S. Risk of *Cronobacter sakazakii* contamination in powdered milk for infant nutrition. *Rev Chil Nutr.* 2015; 42: 83-9.
4. Richardson A, Lambert S, Smith MA. Neonatal mice as models for *Cronobacter sakazakii* infection in infants. *J Food Prot.* 2009; 72: 2363-2367.
5. Parra-Flores J, Juneja V, Garcia De Fernando G, Aguirre J. Variability cell response of *Cronobacter sakazakii* survivors to mild-heat treatments and its impact on food safety. *Front Microbiol.* 2016; 7: 535.
6. Chen Y, Noe KE, Thompson S, Elems CA, Brown EW, Lampel KA, Hammack TS. Evaluation of a revised U.S. Food and Drug Administration method for the detection of *Cronobacter* in powdered infant formula: a collaborative study. *J Food Prot.* 2012; 75: 1144-1147.
7. Stephan R, Grim C, Gopinath G, Mammel M, Sathyamoorthy V, Trach L, Chase H, Fanning S, Tall B. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;10: 3402-3410.
8. International Standards for Organization. 2017. Microbiology of the food chain - horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. ISO 22964:2017. <https://www.iso.org/standard/64708.html>. Access on December 28, 2019.
9. WHO/FAO. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Meeting report. Microbiological risk assessment series. OMS/FAO. Rome. 2004. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43682>. Access on December 18, 2019
10. WHO/FAO. Preparation, storage and handling under hygienic conditions of powder preparations for infants. Guidelines. 2007. 30p. <http://www.who.int/publications/list/9789241595414/es/>. Access on December 18, 2019

Respuesta a Carta al editor/Response Letter to Editor

Importancia del uso de métodos actualizados en el control microbiológico de las fórmulas lácteas en ambientes hospitalarios (Rev Chil Nutr. 2019; 46: 571-578)

Mayra Márquez González¹, Adriana Hernández Santana^{1*},
Omar A. Tejada²

1. Departamento de Agroindustria Alimentaria, Universidad Zamorano,
Tegucigalpa, Honduras.

2. Facultad de Medicina, Universidad Católica de Honduras,
Tegucigalpa, Honduras

*Dirigir correspondencia a: Adriana Hernández Santana.
Universidad Zamorano. Carretera Panamericana rumbo a Danli,
Valle del Yeguaré.
ahernandez@zamorano.edu

Estimado Sr. Editor:

Examinamos los siguientes puntos relevantes señalados a nuestra publicación, a los que respondemos para su consideración y del público de esta prestigiosa revista.

1. Uso de Métodos actualizados

Estamos de acuerdo con los autores de la carta que comentan nuestro trabajo de investigación, sobre la importancia del uso de métodos actualizados. Es importante aclarar que el estudio se realizó en el año 2015, en donde el Método actual ISO 2017, aún no estaba publicado. Conocemos las limitaciones de la metodología utilizada, sin embargo, consideramos importante para Honduras, donde no se cuentan con los recursos necesarios para hacer vigilancia epidemiológica en el sector público, dar a conocer los resultados de la investigación para crear medidas que fomenten la vigilancia en el país así como la adopción de metodologías de diagnóstico apropiadas. Así mismo, es de suma importancia difundir las medidas necesarias para evitar enfermedades asociadas al consumo de FIP contaminadas.

2. Termorresistencia de *Cronobacter*

Como se menciona en el documento de FAO (2004), este patógeno, en ambientes con baja actividad de agua, como la que presentan las FIP, incrementa su resistencia a los tratamientos térmicos. El comportamiento puede ser variado, y su resistencia a temperaturas de 58 °C, es mayor comparado con otras enterobacterias. En ningún momento se menciona en nuestro estudio que *Cronobacter* resista a la pasteurización. Dentro de las recomendaciones del artículo en cuestión, se refuerza la recomendación de utilizar temperaturas >70 °C para hidratar las FIP¹. Existen diversos factores que determinan la sobrevivencia del patógeno durante la hidratación de las FIP y que deben tomarse en cuenta como lo mencionan Parra et al. en su investigación².

3. *Klebsiella* como peligro en las FIP

En la referencia número 35 del artículo original, Parra menciona que además de *Cronobacter sakazakii*, en el

estudio que realizó, identificó la presencia de *Klebsiella* spp. en 8%, y menciona que este microorganismo puede estar presente en fórmulas importadas³, como lo sustentan los estudios de Liu y colaboradores sobre la detección de *Klebsiella pneumoniae* por medio de PCR basada en 16S-23S rDNA, donde se determinó su presencia en 21 aislamientos de 10 diferentes cepas en 63 muestras de FIP⁴.

Otro ejemplo fue el trabajo de tesis "Enterobacterias en preparados de fórmulas infantiles, ocurrencia y perfil microbiano" del post grado de ciencia en alimentos, en el cual el resultado demuestra que *K. pneumoniae*, *Enterobacter cancerogenus* y *Pseudomonas* spp. fueron los microorganismos más frecuentemente aislados en 36.6%, 33.9% y 14.2%, respectivamente en 225 muestras de las cuales 112 mostraron algún tipo de contaminación microbiana. Esta evidencia permite referir que la *Klebsiella* es un peligro en las FIP⁵.

Agradecemos la oportunidad de aclarar estos puntos relevantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edelson-Mammel, S.G., Buchanan, R.L. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J Food Prot.* 2004; 67: 60-63.
2. Parra-Flores J, Juneja V, García De Fernando G, Aguirre J. Variability cell response of *Cronobacter sakazakii* survivors to mild-heat treatments and its impact on food safety. *Front Microbiol.* 2016; 7: 535.
3. Parra J. Microbial Risk Assessment in foods prepared in a Maternal and Child Hospital. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México, 2011, p.192 <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/906/1/RI000075.pdf>
4. Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, Hou Y, Huang X. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer. *Int J Food Microbiol.* 2008; 125: 230-235.
5. Trevisan, AB. Enterobacterias no preparo de fórmulas lácteas infantis: Ocorrência de *Cronobacter sakazakii* e perfil antimicrobiano dos isolados. 2016. Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador. Brazil. http://www.pgalimentos.far.ufba.br/sites/pgalimentos.far.ufba.br/files/dissertacao_adrielle_trevisan.pdf