



Cronobacter sakazakii: **¿A quienes afecta, en que alimentos se presenta?.** **Como se controla**



Prof. Guillermo Figueroa Gronemeyer
Laboratorio de Microbiología y
Probióticos
gfiguero@inta.uchile.cl



Junio 2017 MINSAL alerta brote por consumo de leche com *Cronobacter spp.*

Ministerio de Salud
@elEstadoChileno

Subsecretario @JaimeBurrows indica que los productos no deben ser consumidos y en caso de duda llamar a SaludResponde al 6003607777

2 de junio de 2017

ALERTA ALIMENTARIA EN PRODUCTOS LACTEOS

PEDIASURE POLVO
Lote 1008584 elaborado 09/11/2015.
Vencimiento 29/10/2017 de Abbott.

LECHE PURITA CALO
Lote 176 elaborado 24/06/2016.
Vencimiento 24/06/2017. L-2 de
Watts fabricada en comuna de Osorno.

minsal.cl

600-360-7777

L2.57 - 2 ju. 4. 2017

300 Retweets 41 Me gusta

2008 Primer reporte en Chile

5% *Cronobacter spp* (n=80)

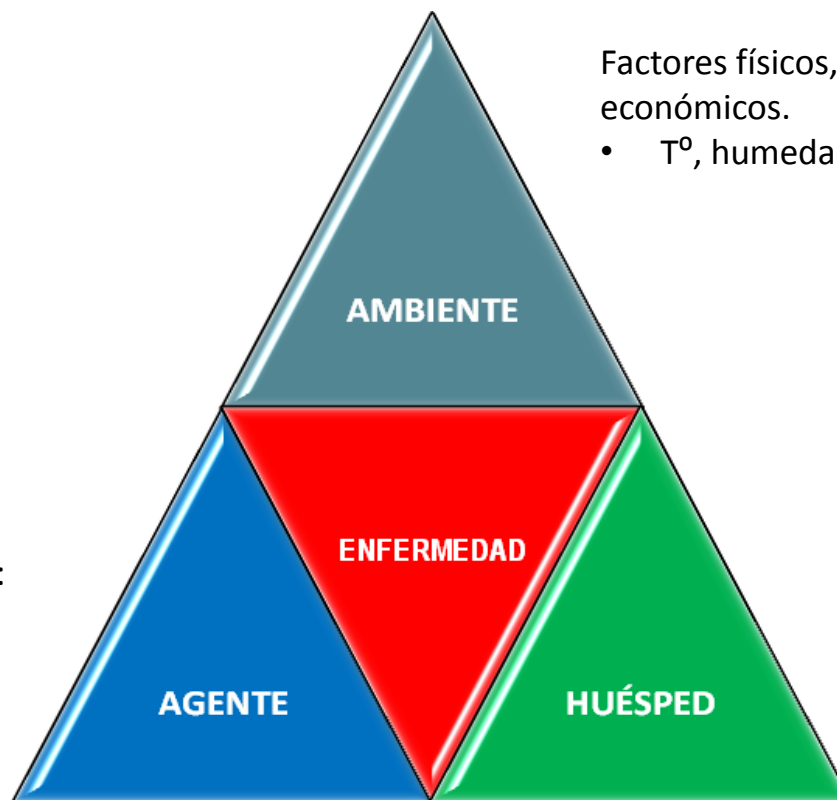
Formulas lácteas en región de Los Lagos.

*Saez M .et al. *Rev Chil Salud Pública* 2012;Vol 16 (1): 11-15





Triada ecológica



Factores físicos, sociales y económicos.

- T° , humedad, etc

Mecanismos patogénicos:

- Forma biofilms
- Resistencia t° y A_w

Inmunidad innata
Inmunidad adquirida





Cronobacter sakazakii

- ✓ **“Bacteria amarilla”** Incluida desde 2004 en el CODEX en **categoría A**
- ✓ Bacilo Gram negativo , no esporulado
- ✓ Patógeno emergente – oportunista
- ✓ **1961** Reporte de primeros casos (**Urmenyi y Franklin**)
- ✓ Brotes asociados a **formulas infantiles en polvo**
- ✓ **2009.** En Symposium en Dublin, se reconoce **género *Cronobacter***.
 - *C. sakazakii*
 - *C. turicensis*
 - *C. muytjensii*
 - *C. malonaticus*
 - *C. dublinensis*
 - *C. genomoespecies*





Cronobacter sakazakii: epidemiología

- Estudios en diversos países muestran aumento de casos o brotes en neonatos alimentados con leche en polvo.
 - *Se ha detectado en diversas Unidades Neonatales de Vigilancia Intensiva (Inglaterra, Países Bajos, Bélgica, Nueva Zelanda, Israel, Francia, Grecia, EEUU y Canadá)*
 - *Muestras positivas tenían niveles aceptables de Coliformes según la Norma Codex.*
- ✓ Afecta a RN y niños <1 año
- ✓ Causa sepsis, meningitis y enterocolitis necrotizante
- ✓ **Alta tasa de mortalidad (hasta 80%).**
- ✓ **Dosis infectiva: 10 UFC**



Se desconoce la magnitud del problema

US FoodNet: tasa 1/100.000 en <1 año y 8.7/100.000 en recién nacidos de bajo peso.



Cronobacter sakazakii: epidemiología

TABLE 1 | Age and diagnoses of all reported infants without underlying disorders, invasively infected with *Cronobacter*, by time period.

	1958–2003	2004–2010	Total	<i>P</i> value ^a
Age at onset of symptoms				
≤30 days/ 1 month old	53/66 (80%)	27/30 (90%)	80/96 (83%)	NS
≤60 days/ 2 months old	65/66 (98%)	30/30 (100%)	95/96 (99%)	NS
Diagnoses^b				
Meningitis	38/68 (56%)	22/30 (73%)	60/98 (61%)	NS
Bacteremia	21/68 (31%)	14/30 (47%)	35/98 (36%)	NS
NEC	22/68 (32%)	1/30 (3%)	23/98 (23%)	<i>P</i> = 0.001
UTI	1/68 (2%)	0/30 (0%)	1/98 (1%)	NS

^aFisher's exact tests and Freeman–Halton extension of the Fisher's exact probability test for a 2 × 3 table. Not significant (NS) if $P \geq 0.05$. Totals percents may not equal 100 due to rounding.

^bSome patients had more than one diagnosis. Specifically, 18 patients with meningitis also had proven bacteremia and 2 also had necrotizing enterocolitis (NEC). One patient with bacteremia also had NEC and one also had a urinary tract infection (UTI). *P* values are for proportion with each individual diagnosis.

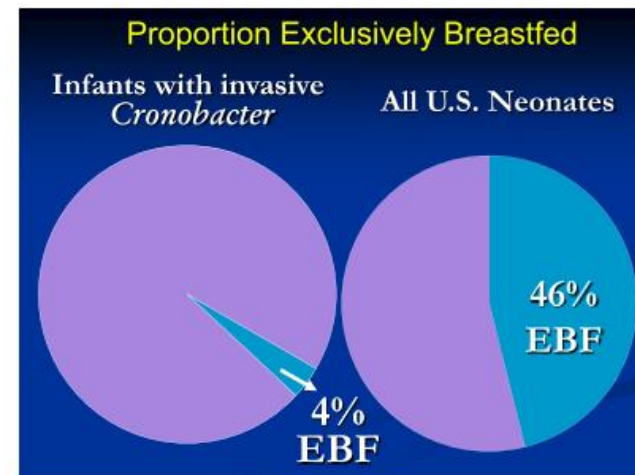


FIGURE 1 | Proportion of infants with invasive *Cronobacter* infection and proportion of all U.S. neonates who are exclusively breastfed.



Grupos de riesgo

Grupo	Cuadros clínicos	Complicaciones
< de 2 meses (mas vulnerables) < de 1 año	Meningitis: 41%	Alta letalidad Secuelas neurológicas Retardo en el desarrollo
	Septicemia, bacteremia: 18%	
	Enterocolitis necrotizante: 16%	
	Otros (abscesos, Conjuntivitis, etc): 25%	
Adultos e inmunodeprimidos	Abscesos: 10% Bacteremias: 20% Osteomielitis: 5% Neumonias: 20% Otros (úlceras, etc): 10%	Letalidad se desconoce



Sobrevida de *Cronobacter spp*

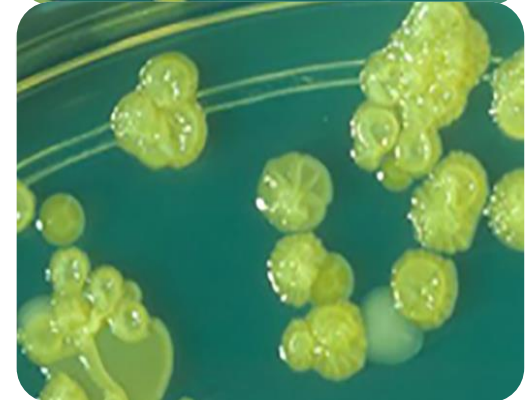
Parámetro	Rango	Optimo	Sobrevivencia
Temperatura	6-45°C	37-43°C	6 meses congelada Resistencia térmica 58°C
Tiempo de generación a 22°C	37-44 minutos	-	Se reproduce a t° de refrigeración -
pH	3.89 - 9	5-9	3.5
Conc . Sal (Aw)	Hasta 9.1%		
Aw	0.25 – 0.69		Aw= 0.2 en formulas Puede sobrevivir hasta 2 años en ambientes secos
Pigmento amarillo			Protege UV solar

MICROORGANISMO OPORTUNISTA



C. sakazakii: factores de virulencia

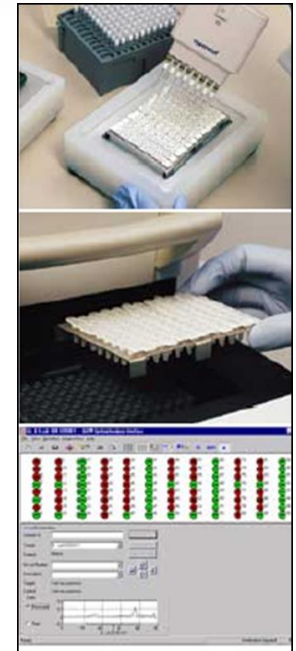
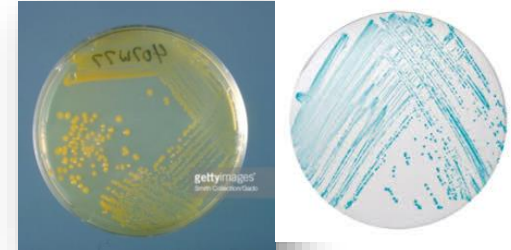
- Adherencia al intestino (Adhesinas específicas)
- Formación de **biofilms**)
- Gran heterogeneidad entre los aislados
- Algunas cepas producen enterotoxinas
- Alta resistencia térmica
- Tolera bajas Aw: 0.25-0.69
- Cápsula rica en heteropolisacaridos





Diagnóstico en el Laboratorio

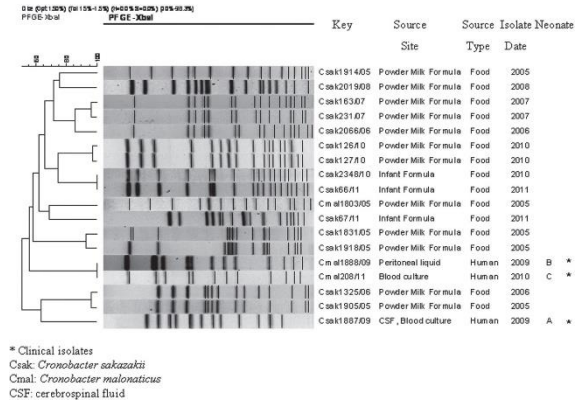
- **Métodos:**
 - ISO 22964:2017
 - BAM-FDA
- **Aislamiento:**
 - ✓ Enriquecimiento
 - ✓ Medios Selectivos: Agar Cromogénico, RF agar, DFI agar
 - ✓ **Colonias amarillas**
 - ✓ Pruebas bioquímicas (diferenciar de *E. cloacae*)
 - API ID 32
 - Vitek Gram negative identification
- **Métodos moleculares:**
 - ✓ PCR automatizado (BAX System)
 - ✓ Molecular detection-Assay 2 (3M)
 - ✓ PCR en tiempo real





Cronobacter: Genotipificación

- Whole Genome Sequencing (WGS)
- Multilocus sequence typing (MLST)
- Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)
- Ribotipificación
- Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)



Cepa **ST4** asociada a meningitis y enterocolitis en neonatos





Tratamiento antibiótico

- *C. sakazakii* es generalmente sensible a los antimicrobianos
- Ampicilina y Gentamicina son referidos como "**gold standard**" para casos de meningitis en neonatos.
- Se ha observado resistencia a: ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol y cefalotina.

Se propone cambiar a carbapenemos o cefalosporinas de tercera generación con aminoglucósidos o trimetoprim con sulfametoxazol .

Se requiere evaluar susceptibilidad a antibióticos



¿Cómo se contaminan las formulas lácteas?

Contaminación intrínseca: Ingredientes contaminados añadidos después del secado y antes del envasado.

- Materias primas usadas en la elaboración de la fórmula.
- Ingredientes agregados después de la pasteurización.

Contaminación externa: reconstitución y mala manipulación
contaminación cruzada

- ✓ No hay evidencia de transferencia de bebé a bebé
- ✓ Existen casos no asociados a formulas infantiles (otras fuentes)
- ✓ Brazil 1º caso vía lactancia materna





Fuentes de contaminación de *C. sakazakii*

Alimentos: Formulas infantiles (50-80% asociado a enfermedad).

Quesos, hierbas secas, arroz, lechuga, carne picada, embutidos, verduras, alfalfa, etc (No asociados a brotes)

Humano: LCR, sangre, deposiciones, heridas, esputo, absceso mamario, heridas, etc.

Animal: moscas (0.2%) y roedores.

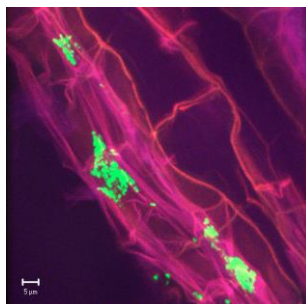
Ambiente: agua, suelo, barro, polvo aspiradoras, etc.



Contaminación de alimentos por *Cronobacter spp.*

Reportes internacionales:

Leches en polvo
Carnes,
Huevos
Granos
Hierbas y especias
Lechuga
Alfalfa
Tomate
Arroz
Te., etc



Cronobacter turicensis 3032-gfp
internalized within tomato root
hair cells

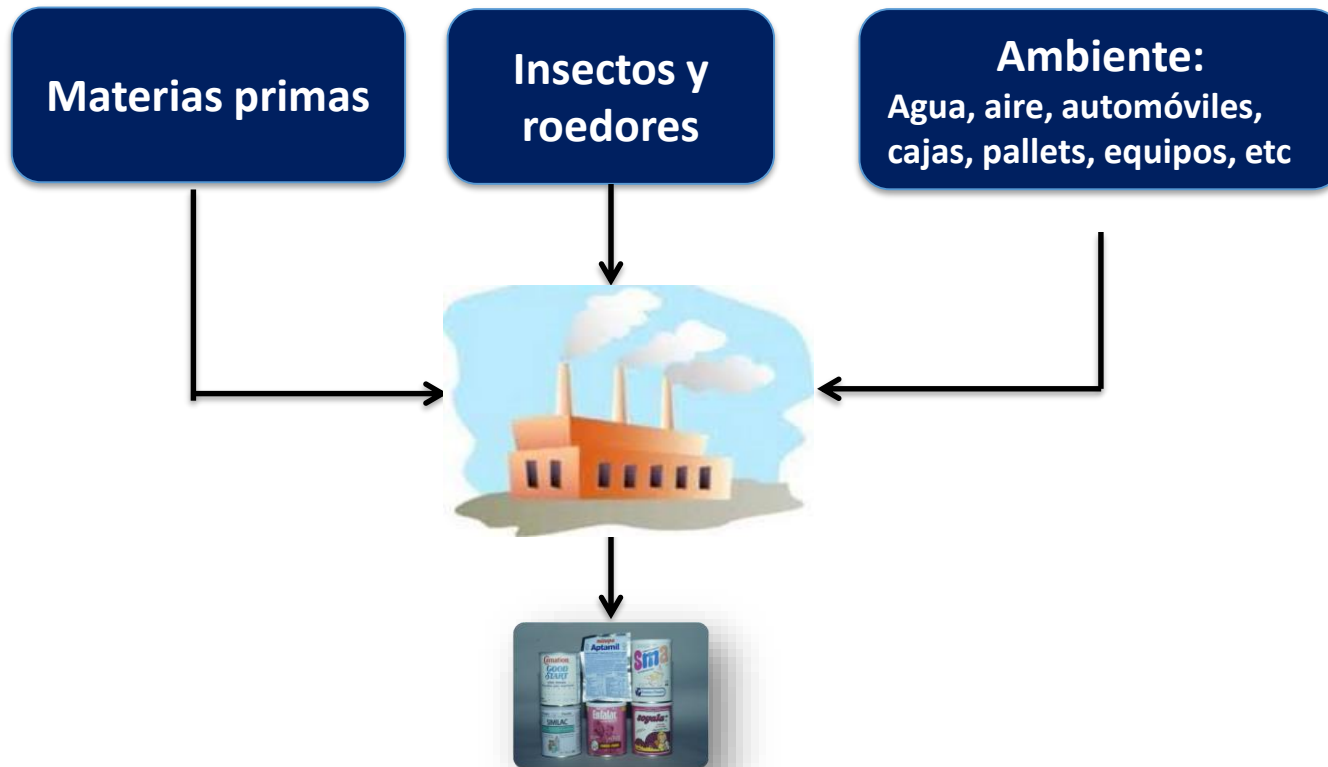
Laboratorio Microbiología y Probióticos INTA, U. de Chile . 2011-2017

Alimento	Nº +
Leche en polvo	19*
Extracto de malta	9
Papas fritas	1
Flan de vainilla	1
Sustituto chocolate	1
Insumo lácteo	1
Aspirado piso	3
Total	35

* 1º aislado , leche Holanda



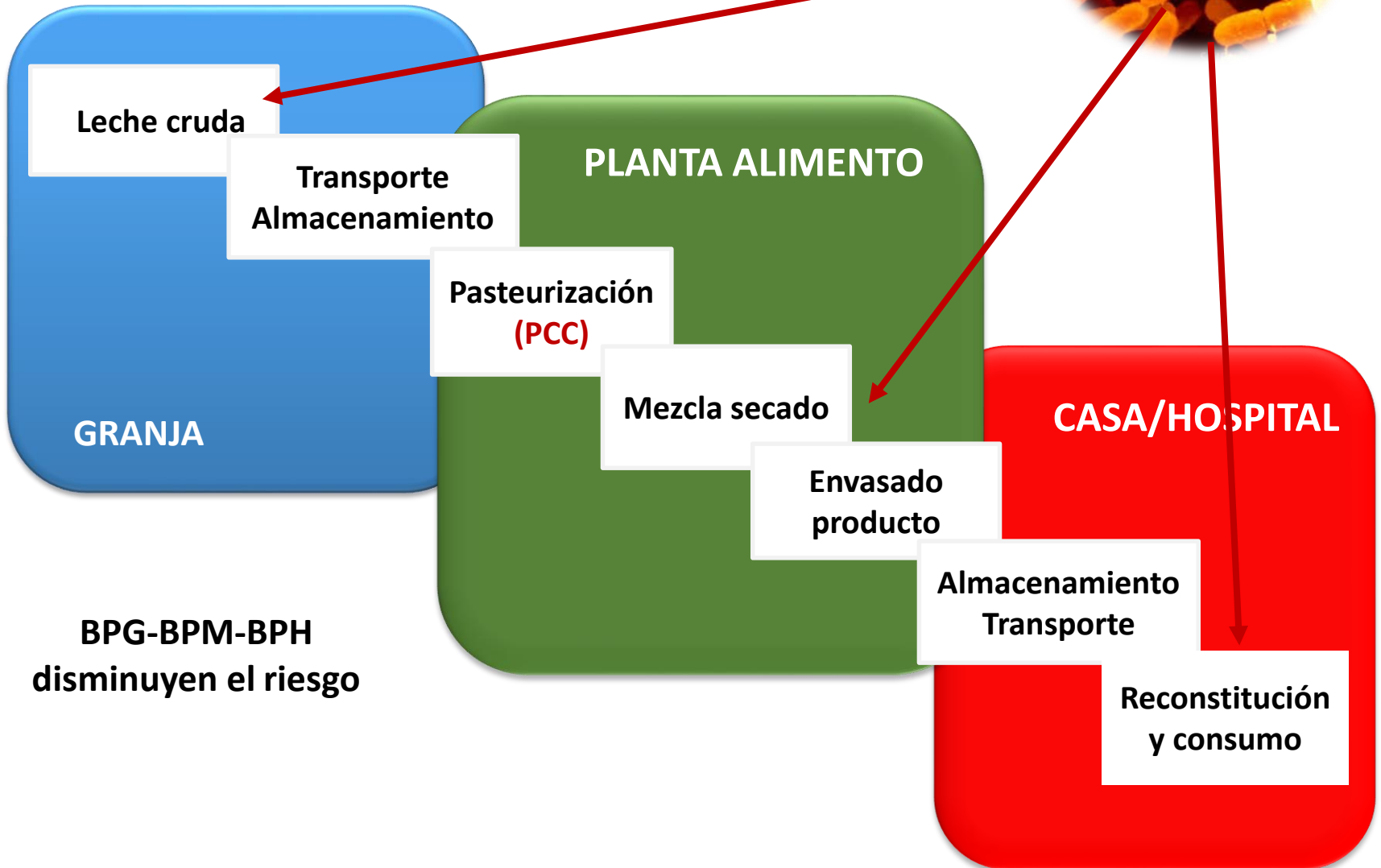
¿Cómo se introduce *Cronobacter* en Planta procesadora de lácteos?



Cronobacter spp. es un microorganismo ambiental



Potenciales sitios de contaminación ambiental



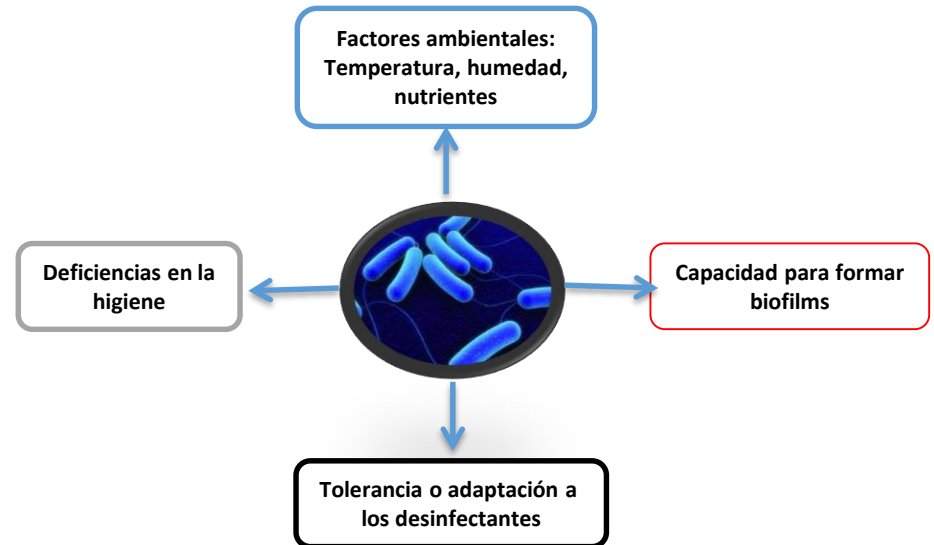


Sanitización en la Industria de Alimentos

- Alcohol
- Compuestos fenólicos
- Amonio cuaternario
- Hipoclorito de Na
- Ac. peracético



Efectividad depende de:



Industria de jugos

Problema: habilidad de *Cronobacter spp*, para sobrevivir y crecer en jugos frescos.

Se requiere evaluar sanitizantes para tomate, manzana y lechuga.

- Dióxido de cloro reduce carga, no elimina

BPM Limpieza adecuada es clave



CONSULTA PÚBLICA PARA LA MODIFICACIÓN DEL ARTÍCULO 173 DEL RS DECRETO SUPREMO N° 977/96 DEL MINISTERIO DE SALUD

ARTÍCULO 173 SE PROPONE

9.1 FÓRMULAS DESHIDRATADAS PARA NIÑOS MENORES A 12 MESES.

Parámetro	Plan de muestreo		Límite por gramo			
	Categoría	Clases	n	c	m	M
Rcto. Aerobios Mesóf. (*)	5	3	5	2	10 ³	10 ⁴
Rcto. Aerobios Mesóf. (*)(**)	5	3	5	2	10 ³	5x10 ⁴
Coliformes	6	3	5	1	<3	20
E. coli	10	2	5	0	<3	---
B. cereus	8	3	5	1	10 ²	10 ³
C. perfringens (***)	8	3	5	1	10 ²	10 ³
S. aureus	8	3	5	1	10	10 ²
Salmonella en 25 g	11	2	10	0	---	---
C. sakazakii en 10 g	14	2	30	0	---	---

(*) Excepto para formulas con cultivos bacterianos.

(**) Considerar estos valores, sólo para formulas deshidratadas que no contienen leche.

(***) Sólo productos con carne.



RSA actual no lo considera

Justificación:

- ✓ 2012 Seremi Región Biobío detectó un 5.9% de *C. sakazakii* en productos infantiles
- ✓ 2015 se detectó 2.7% *C. sakazakii* en formulas infantiles elaborados en Chile.



Legislación Internacional

- Plantas elaboradoras de alimentos deben producir alimentos inocuos (Regulation 178/2002).
 - ✓ Cumplimiento de Prerrequisitos
 - ✓ Implementación HACCP
 - ✓ Buenas Prácticas de Higiene
 - ✓ Producto deben cumplir criterios microbiológicos del Reglamento, según vida útil
 - ✓ Se exige monitoreo ambiental en empresas que producen leche en polvo para menores de 6 meses.

Zoonificación de áreas

Zona de muestreo	Definición	Ejemplos
1 Mayor Riesgo	Contacto directo con el producto	Cintas transportadoras, mesas, tanques, utensilios, guantes, delantales, bombas, válvulas, bandejas
2	Próximo al producto	Paneles de control, exterior de equipos, puntos de lubricación, etc
3	Fuera de la zona 1 y 2, pero dentro del área de procesamiento	Pisos, paredes, unidades de refrigeración, montacargas, tuberías, estaciones de lavado, herramientas de aseo
4	Fuera del área de procesamiento	Área oficinas, baños, vestuarios, cafeterías, pasillos áreas de producción



Medidas de control

- ✓ Monitorear calidad microbiológica de materias primas
- ✓ Reducir nivel de Enterobacterias en el ambiente de producción

Cumplir **PRERREQUISITOS y Monitoreo ambiental.**

Guidance for Industry: Exempt Infant Formula Production: Current Good Manufacturing Practices (CGMPs), Quality Control Procedures, Conduct of Audits, and Records and Reports

<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm384451.htm>

- ✓ Implementación de **HACCP**
- ✓ Cumplir Guías para el manejo y reconstitución de formulas lácteas
Regulations and Information on the Manufacture and Distribution of Infant Formula
<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/InfantFormula/ucm136118.htm>
- ✓ Alentar a los profesionales de la salud a investigar y comunicar las fuentes y vehículos de la infección por *E. sakazakii*.



Medidas propuestas por la FDA

- ✓ Reconstituir pequeñas cantidades de formulaciones en polvo.
- ✓ Usar de preferencia agua a temperaturas mayores de 70 °C
- ✓ Minimizar su tránsito a temperatura ambiente o bien mantener refrigerada
- ✓ Disminuir el tiempo de temperatura de abuso a máximo 4 horas

“Tiempos mas largos deben evitarse para disminuir el riesgo microbiano”.





Es la mejor formula!!

