



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Determinación de la presencia de *Cronobacter* spp en féculas de maíz y de plátano distribuidas en la ciudad de Bogotá

María del Rocío Morato Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2017

Determinación de la presencia de *Cronobacter* spp en féculas de maíz y de plátano distribuidas en la ciudad de Bogotá

María del Rocío Morato Rodríguez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director (a):

Título (Ph.D., Doctor, Ciencias de la Vida y la Salud) Milton Josué Crosby Granados

Codirector (a):

(MD, MSc Epidemiología) Herbert Iván Vera Espitia

Línea de Investigación:

Calidad de los Alimentos

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Salud Pública

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2017

Dedicatoria

La presente tesis está dedicada a Dios, porque gracias a él he logrado concluir mi maestría

A mi familia porque siempre han estado a mi lado brindándome apoyo y sus consejos.

A mi esposo por su confianza, su amor y brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente.

A mis compañeros y amigos quienes, sin esperar nada a cambio, compartieron sus conocimientos, alegrías y dificultades y durante estos años estuvieron a mi lado apoyándome.

Agradecimientos

En primer lugar, al Laboratorio de Salud Pública de Bogotá por respaldar el desarrollo de esta investigación y particularmente a los laboratorios de Microbiología de Alimentos y de Biología Molecular por el apoyo técnico permanente en el desarrollo de esta investigación.

A todos los hospitales de la Red de Hospitales del Distrito Capital Bogotá que participaron en la recolección de la información solicitada para el desarrollo del trabajo.

A la Doctora Sandra Lucía Castañeda y al Doctor Daniel Velandia, profesionales del Laboratorio de Salud Pública de Bogotá por su orientación técnica permanente e incondicional durante el desarrollo de toda la investigación.

A la Doctora Angelika Lehner, Senior Scientist, Institute for Food Safety and Hygiene Vetsuisse, Faculty University Zurich, Zurich Switzerland por donar las cepas de referencia para este trabajo de grado.

Resumen

Los sustitutos de leche materna son usados a nivel mundial desde temprana edad, en Bogotá se usan féculas que reemplazan las fórmulas lácteas infantiles, las cuales no son alimentos estériles y su calidad microbiológica cobra relevancia ya que pueden ser suministrados a menores de un año y en algunos casos a lactantes. Las patologías infecciosas asociadas con *Cronobacter* spp han sido reportadas mundialmente y por la importancia clínica son consideradas un problema de salud pública. El objetivo del trabajo fue, determinar la presencia de *Cronobacter* spp en féculas de maíz y de plátano distribuidas en la ciudad de Bogotá, destinadas a la alimentación infantil. A través de encuestas de consumo se identificaron las principales marcas de estos alimentos vendidos en la ciudad y con la metodología ISO/TS 22964:2006 se verificó la presencia del microorganismo en las féculas. Nuestros resultados muestran que el 71% de las muestras positivas fueron las féculas de plátano con un 35% de prevalencia de *Cronobacter* spp. La identificación de especies se realizó usando el blanco molecular *cgcA* y la distribución de especies fue 74% para *C. sakazakii*, 14% *C. malonaticus* y 12% *C. dublinensis*. Se concluyó, por primera vez, que existe el riesgo por consumo para *Cronobacter* spp en los alimentos seleccionados y que tiene la misma tendencia de distribución mundial.

Palabras clave: *Cronobacter* spp, fórmulas lácteas infantiles, fécula de maíz, fécula de plátano.

Abstract

Breastmilk substitutes are used globally at an early age to replace infant formula. The ones distributed in the city of Bogotá are mainly composed of maize and banana starches. The objective of this work was to determine the presence of *Cronobacter* spp in maize and banana starches, destined to infant feeding. Through consumer surveys the main brands of these foods sold in the city were identified and analyzed following the methodology ISO / TS 22964: 2006, to evaluate the presence of the microorganism in the starches.

Our results showed that 71% of the positive samples were banana starches, with a 35% prevalence of *Cronobacter* spp. A detailed species identification was performed using the molecular target *cgcA* and the species distribution was 74% for *C. sakazakii*, 14% for *C. malonaticus* and 12% for *C. dublinensis*.

These findings revealed by the first time the existence of a consumption risk for *Cronobacter* spp in breastmilk substitutes consumed in the city of Bogota, that follows the same trend of *Cronobacter* global distribution previously reported.

Keywords: *Cronobacter*, infant formulas, *Zea mays*, *Musa*

Contenido

PÁG.

AGRADECIMIENTOS.....	VII
RESUMEN IX	
CONTENIDO XI	
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABLAS	XIV
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 LACTANCIA MATERNA	19
2.2 PRODUCCIÓN DE LOS PREPARADOS EN POLVO	21
2.3 LAS FÉCULAS DE MAÍZ Y DE PLÁTANO	22
2.4 PARÁMETROS NORMATIVOS COLOMBIANOS PARA ALIMENTOS INFANTILES	24
2.5 RIESGO MICROBIOLÓGICO DE LOS PREPARADOS EN POLVO.	24
2.6 CLASIFICACIÓN DE CRONOBACTER	26
2.6.1 <i>Hábitat de Cronobacter spp</i>	28
2.6.2 <i>Caracterización y tipificación de Cronobacter</i>	28
2.6.3 <i>Epidemiología y sintomatología de la infección por Cronobacter</i>	32
3. METODOLOGÍA	35
3.1 TIPO DE ESTUDIO.....	35
3.2 SELECCIÓN DE LAS MARCAS DE FÉCULAS DE MAÍZ Y DE PLÁTANO (MUESTREO)	35
3.2.1 <i>Encuesta</i>	35
3.2.2 <i>Muestreo</i>	36
3.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO E INVESTIGACIÓN DE CRONOBACTER SPP	37
3.3.1 <i>Evaluación según al parámetro de alimentos infantiles en Colombia</i>	37
3.3.2 <i>Investigación de Cronobacter spp de acuerdo con la metodología ISO/TS 22694:2006</i>	38
3.4 TIPIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE CRONOBACTER SPP RECUPERADOS	39
3.4.1 <i>Evaluación in-silico de los iniciadores</i>	40
3.4.2 <i>Extracción de ADN genómico</i>	41
3.4.3 <i>Evaluación de condiciones experimentales de amplificación</i>	42

3.4.4	<i>Análisis de muestras</i>	43
4.	RESULTADOS	45
4.1	IDENTIFICACIÓN DE LAS MARCAS DE FÉCULAS DE MAÍZ Y PLÁTANO DE MAYOR COMERCIALIZACIÓN.....	45
4.1.1	<i>Información de Consumo</i>	45
4.1.2	<i>Información De Frecuencia De Consumo</i>	46
4.1.3	<i>Información De Marcas</i>	47
4.1.4	<i>Muestreo</i>	48
4.2	RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO	49
4.2.1	<i>Concepto de calidad microbiológico de las féculas evaluadas con respecto al parámetro para alimentos infantiles</i>	49
4.2.2	<i>Verificación de metodología ISO 22694:2006</i>	50
4.2.3	<i>Investigación de Cronobacter spp en féculas de maíz y de plátano</i>	52
4.3	TIPIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE CRONOBACTER SPP RECUPERADOS	53
4.3.1	<i>Análisis in_silico de los primers</i>	53
4.3.2	<i>Evaluación del ADN extraído para los controles y los aislamientos recuperados.</i>	54
4.3.3	<i>Estandarización de la PCR</i>	55
4.3.4	<i>Especies de Cronobacter spp</i>	60
5.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
5.1	ANÁLISIS DE INFORMACIÓN DE CONSUMO VS LOCALIDADES SELECCIONADAS PARA MUESTREO DE FÉCULAS DE MAÍZ Y DE PLÁTANO.	63
5.2	EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS CON LOS PARÁMETROS NORMATIVOS COLOMBIANOS	64
5.3	VERIFICACIÓN DE METODOLOGÍA DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CRONOBACTER SPP	66
5.4	INVESTIGACIÓN DE CRONOBACTER EN FÉCULAS DE MAÍZ Y DE PLÁTANO	67
5.5	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE CRONOBACTER SPP	69
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
6.1	CONCLUSIONES.....	71
6.2	RECOMENDACIONES	71

Lista de figuras

PÁG.

FIGURA 2-1: TIPOS DE ALIMENTOS QUE RECIBIERON EN 24 HORAS NIÑOS AMAMANTADOS DE 0 A 5 MESES Y DE 6 A 9 MESES DE EDAD (3).....	20
FIGURA 2-2: TIPOS DE ALIMENTOS QUE RECIBIERON EN 24 HORAS NIÑOS NO AMAMANTADOS DE 0 A 5 MESES Y DE 6 A 9 MESES DE EDAD (3).....	21
FIGURA 2-3: DISTRIBUCIÓN DE LOS BIOTIPOS Y CLUSTERS EN LA TAXONOMÍA DE CRONOBACTER (21) ...	27
FIGURA 4-1: NÚMERO DE ENCUESTAS DE CONSUMO DE FÉCULAS APLICADAS EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ 2014.	45
FIGURA 4-2. DISTRIBUCIÓN DE MATRICES CON MÁXIMA FRECUENCIA DE CONSUMO IDENTIFICADAS	46
FIGURA 4-3: FRECUENCIAS DE CONSUMO POR MATRIZ.....	47
FIGURA 4-4: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE CRONOBACTER SPP POR MATRICES ANALIZADAS	53
FIGURA 4-5: EVALUACIÓN INICIADORES EN MULTIPLEX BAJO CONDICIONES DE BAJA ASTRINGENCIA CON ENZIMA MAXIMA HOT START TAQ DNA POLYMERASE	56
FIGURA 4-6: EVALUACIÓN INICIADORES CON TITULACIÓN DE MGCL2 A 65°C EN MULTIPLEX CON ENZIMA MAXIMA HOT START TAQ DNA POLYMERASE.....	56
FIGURA 4-7: EVALUACIÓN INICIADORES A 0.2UM, A 65°C EN MULTIPLEX CON ENZIMA MAXIMA HOT START TAQ DNA POLYMERASE.....	57
FIGURA 4-8: COMPARACIÓN DEL TRES ADN POLIMERASAS.....	58
FIGURA 4-9: EVALUACIÓN DE LOS INICIADORES DE MANERA INDIVIDUAL CON LA ENZIMA PLATINUM® BLUE PCR SUPERMIX	60
FIGURA 4-10: ESPECIES ENCONTRADAS DE CRONOBACTER SPP USANDO LA METODOLOGÍA PCR CGCA..	61

Lista de tablas

PÁG.

TABLA 2-1: INFECCIONES POR CRONOBACTER SPP EN NEONATOS E INFANTES (9).....	24
TABLA 2-4. PROTOCOLOS DE DETECCIÓN DE CRONOBACTER SPP EN FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTILES (20).	29
TABLA 2-5A. GENES BLANCO Y NÚMEROS DE ACCESO A SECUENCIAS USADAS PARA BÚSQUEDA DE GENOMA (24)	30
TABLA 2-5B. BLANCOS GENÉTICOS USADOS PARA LA DETECCIÓN DE CRONOBACTER SPP Y ESPECIES RELACIONADAS (20).....	31
TABLA 3-1. VARIABLES DE LA ENCUESTA APLICADA PARA SUSTITUTOS DE LECHE MATERNA EN EXPENDIOS DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ.	35
TABLA 3-2: CODIFICACIÓN DE CEPAS DE REFERENCIA.....	39
TABLA 3-3: INICIADORES ESPECIES- ESPECIFICO DE CRONOBACTER CGCA REPORTADOS POR L. CARTER, ET AL 2014 (25).....	40
TABLA 4-1: DISTRIBUCIÓN DE MUESTREO POR LOCALIDAD Y POR MATRIZ	48
TABLA 4-2: EVALUACIÓN DE CONCEPTO MICROBIOLÓGICO SEGÚN RESOLUCIÓN 11488/84.....	49
TABLA 4-3: EVALUACIÓN DE LA CAUSA DE NO CUMPLIMIENTO VS LA MATRIZ.....	49
TABLA 4-4: RECUPERACIÓN EN AGUA PEPTONA TAMPONADA (BWP) DE LAS FÉCULAS DE MAÍZ Y DE PLÁTANO.	51
TABLA 4-5: CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PARA LA METODOLOGÍA ISO 22964:2006	51
TABLA 4-6: PROPIEDADES DE LOS INICIADORES DE PCR CGCA PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE CRONOBACTER SPP.....	54
TABLA 4-7: CONDICIONES ESTANDARIZADAS DEL TERMOGRAMA DE AMPLIFICACIÓN CON ENZIMA PLATINUM® BLUE PCR SUPERMIX	59
TABLA 5-1: COMPOSICIÓN POR ESTRATO SOCIOECONÓMICO REPORTADO POR LA SECRETARIA DISTRITAL DE PLANEACIÓN DE BOGOTÁ (35).....	63

Introducción

Las enfermedades transmitidas por los alimentos representan uno de los problemas de salud pública más generalizados, creando una carga social y económica además de sufrimiento humano, que las convierte en un motivo de preocupación del que tienen que ocuparse todos los países (1)

Una gran cantidad de niños en el mundo son alimentados con fórmula láctea por algún tiempo de su vida durante el primer año, para algunos como única fuente de alimento y para otros como complemento de la leche materna y otras preparaciones caseras (2). En Colombia, la complementación es progresiva desde el nacimiento con un 27% y hasta los nueve meses, donde alcanza un 76%, lo cual sugiere que un gran número de niños puede utilizar alimentación complementaria y probablemente biberón. (3)

Las féculas de maíz y de plátano son usadas popularmente como alimentos reemplazantes de las fórmulas lácteas infantiles y en ocasiones como sustitutos de leche materna. La importancia de la calidad microbiológica de estos alimentos radica en que son suministrados a niños lactantes o menores de un año, los cuales tienen sistemas inmunes inmaduros que los hacen vulnerables a infecciones, debido principalmente, al no establecimiento de la microbiota intestinal.

Por otra parte, dado que las fórmulas lácteas infantiles no son consideradas alimentos estériles, es posible recuperar algunos patógenos causantes de gastroenteritis, dentro de los cuales *Salmonella* spp y *Cronobacter* spp han sido catalogados por la OMS/Codex Alimentarius como patógenos de alto riesgo (4).

Existen fuertes evidencias de que lactantes alimentados con fórmulas artificiales presentan mayor probabilidad de desarrollo de procesos infecciosos, los cuales son más graves y generan hospitalizaciones (5). Las patologías infecciosas asociadas con *C. sakazakii* en los lactantes, hacen que sea considerado actualmente como un problema de salud pública (6).

Cronobacter spp es un género conformado por 7 especies, cuyo reservorio natural ha sido identificado en las plantas y en derivados de plantas y cereales. Es también una bacteria patógena oportunista causante de infección en recién nacidos y responsable de meningitis, diarrea hemorrágica, gastroenteritis, bacteremia entre otras (7) (8).

La investigación de la infección de lactantes por *Cronobacter* spp y la contaminación de fórmulas alimenticias para niños, son temas que no han sido ampliamente estudiados. No obstante, aunque existen reportes desde el año 1983 de asociación de *Cronobacter* spp con fórmulas lácteas infantiles, el más conocido es el caso de 2001 en Tennessee, Estados Unidos; un brote causado por *Cronobacter* spp en la unidad de cuidado intensivo neonatal donde 10 casos fueron identificados, con la muerte de al menos un paciente y el microorganismo fue recuperado del lote de fórmula láctea con que habían sido alimentados los niños (9). Epidemiológicamente, se han vinculado las fórmulas lácteas infantiles como la causa de brotes por especies de *Cronobacter* spp (10).

En la ciudad de Bogotá, ha sido demostrada la presencia de *Cronobacter* spp (antes *Enterobacter sakazakii*) en los lactarios de 8 entidades promotoras de salud (EPS) dentro de la ciudad y uno fuera de la ciudad (11), pero no hay reportes de relación entre casos clínicos y muestras de alimentos. Por otra parte, *Cronobacter* spp no es un microorganismo de notificación obligatoria, razón por la cual, en este contexto no ha sido desarrollado un programa de vigilancia activa.

Debido al amplio uso de féculas de maíz y de plátano distribuidas en la ciudad de Bogotá como reemplazantes de las fórmulas lácteas infantiles en la alimentación de niños lactantes y menores de un año, es importante determinar la presencia *Cronobacter* spp en este tipo de alimentos, dados los efectos negativos que puede generar en la salud de poblaciones vulnerables.

De igual forma, es de relevancia epidemiológica conocer cuáles son las especies de *Cronobacter* spp circulantes en nuestro país, ya que se conoce que *C. sakazakii*, *C. turicensis* y *C. malonaticus* están asociados a infecciones en humanos (10).

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar la presencia de *Cronobacter* spp en féculas de maíz y de plátano destinadas a la alimentación infantil, distribuidas en la ciudad de Bogotá.

1.2 Objetivos específicos

1. Identificar las principales marcas de féculas de maíz y de plátano destinadas a la alimentación infantil distribuidas en la ciudad de Bogotá.
2. Verificar la presencia de *Cronobacter* spp en las muestras de féculas de maíz y de plátano analizadas en el Laboratorio de Salud Pública de Bogotá.
3. Caracterizar y tipificar los aislamientos de *Cronobacter* spp en las muestras analizadas.

2. Marco Teórico

2.1 Lactancia Materna

La Organización Mundial de la Salud recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de vida y en combinación con otros alimentos, hasta los 2 años (12). La duración óptima de la lactancia materna y la adecuada introducción de los alimentos complementarios son uno de los temas cruciales dentro de la salud pública.

La composición nutricional de la leche materna es específica para el ser humano en sus diversas etapas de desarrollo y crecimiento (3). Las tasas de lactancia materna exclusiva difieren de un país a otro. En los países escandinavos, por ejemplo, el 95% de los niños se alimentan de leche materna durante un breve período tras el nacimiento, reduciéndose a casi el 75% a los seis meses. En países europeos, las tasas de lactancia materna son inferiores al 30%, disminuyendo a casi cero después de los seis meses (1).

En Colombia, según la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010 (ENSIN 2010), el porcentaje de niños con lactancia materna exclusiva descendió rápidamente durante los primeros 6 meses de vida de 63,6% en los primeros dos meses a 6,0% entre los seis y siete meses. La complementación de leche materna con otra leche y alimentos semisólidos y sólidos es progresiva desde el nacimiento (27%) hasta los nueve meses (76%), y luego, decrece a mayor edad hasta los 3 años (11%), debido a la suspensión de la lactancia materna (3).

Mientras que la leche materna es protectora, los métodos alternativos de alimentación infantil aumentan el riesgo de infección, debido sobre todo a la posible contaminación de fórmulas infantiles por organismos patógenos (13).

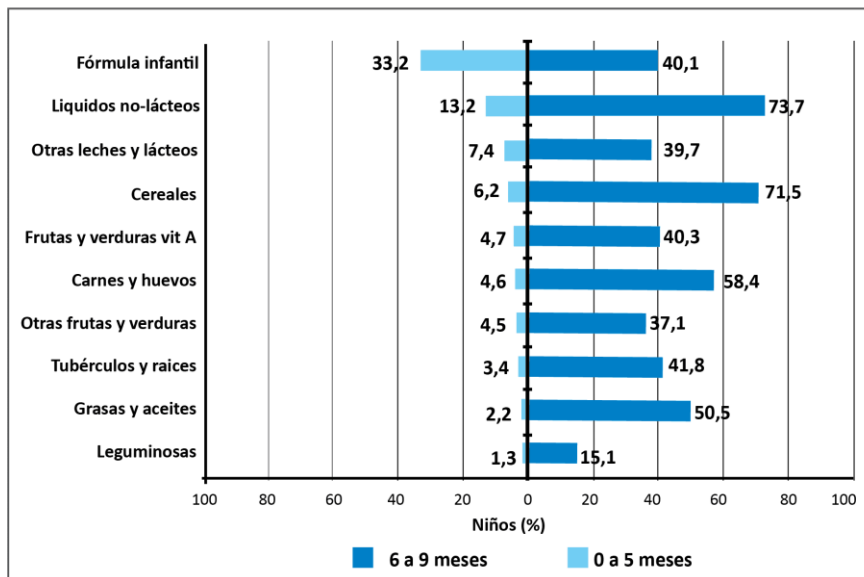
La alternativa más común a la lactancia materna es la alimentación con biberón, regularmente se hace con fórmulas lácteas infantiles (4), sin embargo, las féculas de

plátano y de maíz son sustitutos de estas fórmulas por su bajo costo y facilidad de acceso a familias de escasos recursos, además de ser considerados alimentos con alto poder nutritivo. Los purés de plátano puede ser un excelente alimento para bebés a partir de los 6 meses de edad como complemento a la leche materna y también pueden ser suministrados a adultos mayores (14)

En países de bajos recursos, las harinas de cereales son suministradas a los bebés en forma de papillas o en tetero preparadas en casa (15). Así como en el resto del mundo, en Bogotá también son popularmente usados y comercializados alimentos infantiles derivados de plátano, de maíz y de cereales y son suministrados a lactantes y a niños de corta edad por igual. Algunas madres utilizan leche de vaca, fórmula para bebé o papillas para alimentar a sus bebés lactantes.

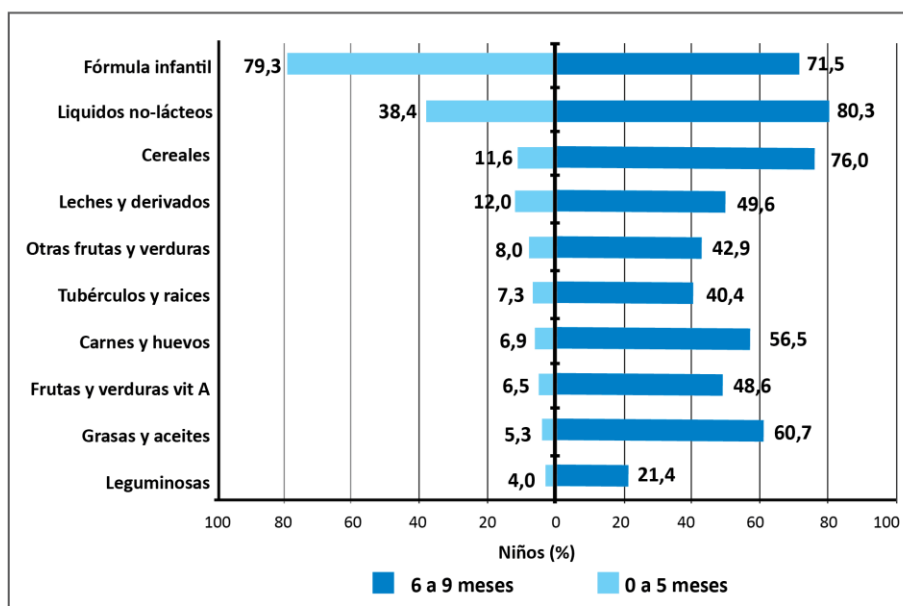
Según la ENSIN 2010, el grupo de alimentos que se ofreció con más frecuencia fue el de los cereales, seguido por otros líquidos no-lácteos, carnes, pollo o pescado y huevo y alimentos preparados con aceite o grasa (Figuras 2-1 y 2-2)(3). La composición de la alimentación suministrada varía entre los niños amamantados y los que no lo son.

Figura 2-1: Tipos de alimentos que recibieron en 24 horas niños amamantados de 0 a 5 meses y de 6 a 9 meses de edad (3)



Fuente: ENSIN, 2010

Figura 2-2: Tipos de alimentos que recibieron en 24 horas niños no amamantados de 0 a 5 meses y de 6 a 9 meses de edad (3)



Fuente: ENSIN, 2010

2.2 Producción de los preparados en polvo

La leche obtenida de bovinos es la base de casi todas las fórmulas lácteas, sin embargo tiene altos contenidos de grasa, minerales y proteínas comparada con la leche humana, así que debe ser previamente descremada y diluida para acercarse a la composición de la leche humana (16). La composición de las formulas está establecida por el Codex Alimentarius Commission (CAC 1979).

Los preparados en polvo para lactantes se pueden producir de diversas maneras, hay tres tipos de procesos: Mezcla en húmedo; donde todos los alimentos se mezclan en una fase líquida, luego son sometidos a tratamiento térmico y finalmente un secado. Mezcla en seco; donde los ingredientes se preparan por separado, se someten a tratamiento térmico según convenga, se secan y finalmente se mezclan en seco. Por último, el proceso combinado; donde se utilizan los dos métodos citados anteriormente (1). Hay también a base de soya pero no son muy recomendadas por la presencia de fitoestrógenos que pueden provocar efectos negativos en los bebés (16).

En 2007, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en colaboración con la Autoridad de Inocuidad Alimentaria de Irlanda (FSAI) y la Organización de las Naciones Unidas para los Alimentos y la Agricultura (FAO) entregaron una guía para la preparación, manipulación y almacenamiento seguro de las fórmulas lácteas, debido a que su proceso de producción no puede asegurar que sean alimentos estériles(16).

Los principales puntos, motivo de preocupación en salud pública en los preparados en polvo, se refiere a la presencia de microorganismos como *Salmonella* spp, *Cronobacter* spp y otras Enterobacterias. Un trabajo conjunto de la FAO y la OMS entre 2004 y 2006 identificó los principales microorganismos asociados a contaminación en las fórmulas lácteas, el resultado fue: *Cronobacter* spp, *Salmonella Enteritidis*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Serratia* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus* sp (16).

De los anteriores, *Cronobacter* spp. y *Salmonella enterica* fueron identificados como patógenos de mayor preocupación en esos alimentos, pero la contaminación con cualquiera de los anteriores organismos ha sido asociada con serias enfermedades y hasta la muerte.

La presencia de estas bacterias puede ser debido a : contaminación por ingredientes no sometidos a tratamiento térmico durante la fabricación o contaminación durante el proceso de elaboración en las fases de secado y envasado (1).

2.3 Las féculas de maíz y de plátano

Las féculas de maíz y de plátano, al igual que otros alimentos infantiles, son sustitutos de las fórmulas lácteas infantiles, así como otros alimentos derivados de cereales. Son administrados a niños entre 3 y 6 meses de edad como alimentos complementarios a la alimentación con leche materna (15).

El plátano es un fruto comercialmente muy importante y está dentro de los principales alimentos consumidos en el mundo, pero tiene bajo contenido de proteína, que además, es de pobre calidad por la poca cantidad de aminoácidos azufrados que contiene (14). Según *Rodríguez, P. y Pérez, E.* 2015, en las harinas de plátano la concentración de

proteína en base seca varía entre el 3 % y 7% porque los tratamientos térmicos pueden incidir sobre la calidad del producto.

Cabe resaltar que el plátano es la fruta tropical más importante del mundo, el banano y el plátano son el cuarto cultivo de alimentos más importante del mundo después del arroz, trigo y maíz. (26) En Colombia, el cultivo de plátano es tradicional en la economía campesina, al menos el 1% de la producción nacional se destina como materia prima para la agroindustria nacional. Son alrededor de 12 mil toneladas que se destinan para preparación de snacks, harinas, productos procesados para consumo humano y alimentos para animales (27).

Igualmente, la Encuesta Anual Manufacturera arroja cifras sobre la producción industrial de fécula de plátano, mostrando que el valor de la producción alcanzó para el año 2000 \$5.566 millones con un crecimiento promedio anual 1993-2000 de 24.3%. En volumen, la producción de fécula de plátano registró 2.047 toneladas para el 2000 presentando un crecimiento 1993-2000 de 7.3%. En este mismo año el volumen de las compras de fécula de plátano como materia prima para la industria manufacturera, alcanzó 220 toneladas por un valor de \$60.905.000 (27). Lo anterior demuestra la importancia de la vigilancia de *Cronobacter* spp en esta matriz alimentaria que puede ir determinada a grupos de riesgo en la población de niños lactantes y menores de un año.

Por otra parte, el maíz es uno de los tres cereales más cultivados en el mundo seguido por el trigo y el arroz. Hay grandes áreas de producción mundiales destinadas para alimentación, producción de aceites y producción de combustibles entre otros (17).

Para el procesamiento y la extracción de derivados del maíz existen dos métodos: la molienda seca y la molienda húmeda. De la primera se pueden obtener productos como el etanol, el aceite de maíz, la harina de maíz, la sémola de maíz, etc. De la segunda se destacan productos como el almidón industrial, el almidón alimenticio, las dextrinas, los edulcorantes y los derivados del proceso de fermentación como son el etanol, el alcohol industrial, el dióxido de carbono y bioproductos como los aminoácidos, los biopolímeros y los antibióticos (18).

Tanto la harina de plátano como la harina de maíz son usadas para la producción de alimentos infantiles en Colombia, sin embargo, los datos sobre la calidad microbiológica de esta clase de alimentos infantiles están relacionados únicamente a grupos indicadores

y no a *Cronobacter* spp en particular, para el cual no se tiene conocimiento reportes en estas matrices alimentarias.

2.4 Parámetros normativos colombianos para alimentos infantiles

Los alimentos infantiles en Colombia están reglamentados bajo la Resolución 11488 de 1984 del Ministerio de Salud, la cual dicta normas referentes a composición, procesamiento, requisitos y comercialización de los mismos y de otros.

Define “Alimentos para niños lactantes y niños de corta edad son los que se utilizan principalmente durante la adaptación gradual de los niños lactantes o de corta edad a la alimentación normal, se preparan ya sea para ser consumidos directamente o bien deshidratados para ser reconstituidos en agua, leche u otro liquido conveniente.” Y define la población de los alimentos infantiles así: a) Niños lactantes: menores de un año, b) Niños de corta edad: mayores de un año y menos de 3 años (19).

Aunque las féculas de maíz y de plátano no están definidas como alimentos infantiles, su uso es aplicado culturalmente como si fueran alimentos para niños lactantes y niños de corta edad, por esta razón se aplica la normatividad vigente evaluando los parámetros microbiológicos para este tipo de matrices. Así, se evalúa la calidad microbiológica de estos alimentos y el cumplimiento o no de los criterios exigidos.

2.5 Riesgo Microbiológico de los preparados en polvo.

Las fórmulas lácteas infantiles no son consideradas alimentos estériles, por esta razón patógenos como *Salmonella* spp y *Cronobacter* spp se les puede encontrar en los alimentos y provocar gastroenteritis en lactantes alimentados con fórmulas infantiles (4). Dentro de los patógenos más importantes está *Cronobacter* spp, no por el número de infecciones que provoca sino por el 80% de mortalidad que puede provocar en neonatos y niños (10), a continuación en la Tabla 2-1 se relacionan las infecciones más frecuentes.

Tabla 2-1: Infecciones por *Cronobacter* spp en neonatos e infantes (9)

Año del brote	Número de neonatos e infantes	Edad de niños y neonatos	Número de muertes	Síntomas	Fuente	Referencias
1958	2	5 a 10 días	2	Meningitis	Desconocido	Urmenyi y whitw-Frankin (1961)
1958	1	4 días		Meningitis	Desconocido	Jöker, Norholom y Siboni (1965)
1958	1	7 días	0	Bacteremia	Desconocido	Monroe y Tift (1979)
1958				Meningitis + sepsis		Adamson y Rogers (1981)
1958	1	5 semanas	0	Meningitis	Desconocido	Kleiman, Allen, Nael y Reynolds (1981)
1977-1981	8		6	Meningitis	IFM	Muytjens <i>et al.</i> (1983), Smeets <i>et al.</i> (1998)
1977-1981	NS	NS	NS	NS	NS	Aldová <i>et al.</i> (1983) Postupa y Aldová (1984)
1984	11	2 días 2 meses	5	Colonización	Desconocido	Arseni, Malamou-Ladas, Koutsia, Xantou y Triikka (1987)
1984	1	21 días	0	Meningitis	Desconocido	Naqvi, Maxwell y Dunkle (1985)
1984	2	8 días 4 semanas	0	Meningitis	Desconocido	Wilis y Robinson (1988)
1986-1987	3	5 días	2	Meningitis	IFM	Biering <i>et al.</i> (1989); Clark <i>et al.</i> (1990)
1986-1987	4	NS	NS	Exudados de herida, apendicitis, conjuntivitis	NS	Reina Parras, Gil, Salva, Alomar (1989)
1981-1988	2	NS	2	Meningitis	Desconocido	Lecour, Seara y Cordeiro (1989)
1988	4	28 – 34.5	0	Sepsis, Diarrea hemorrágica	IFM, licuadora	Simons <i>et al.</i> (1989) Clark <i>et al.</i> (1990)
1988	1	6 meses	0	Bacteremia	IFM	Noriega <i>et al.</i> (1990)
1988	1	2 días	0	Meningitis	NS	Gallanger y Ball (1991)
Periodo de cinco años	NS	NS	NS	NEC	Desconocido	Chang, Saing, Yung, Yeung y Tsoi (1994)
Periodo de cinco años	1	NS	NS	Meningitis	Desconocido	Reis, Harm y Scharf (1994)
Periodo de cinco años	1	20 meses	0	Infección de herida	Desconocido	Tekkok, Baessa, Higgins y Ventureyra (1996)
Periodo de cinco años	1	6 días	0	Meningitis	NS	Burdette y Santos (2000)
1997	1	7 días	0	Meningitis	Desconocido	Weekly report (1997)
1998	12	4 días 2 meses	0	Enterocolitis	IFM	Van Acker <i>et al.</i> (2001)
1999-2000	NS	NS	NS	NS	IFM, licuadora	Block <i>et al.</i> (2002)
1999-2000	2	3 y 4 días	0	Bacteremia, Meningitis	IFM, licuadora	Bar-Oz <i>et al.</i> (2001)
1999-2000	1	3 años	0	Bacteremia	NS	Lai (2002)
2001	11	11 días	1	Meningitis, enterocolitis	IFM	Himelright <i>et al.</i> (2002)
2002	1	4 días	1	Meningitis	Desconocido	Safetylist (web site)

IFM: Fórmula láctea infantil en polvo, NS: No especificado en el artículo

Iversen C *et al* 2010

El Código de Prácticas de Higiene para los preparados en polvo para Lactantes y Niños pequeños CAC/RCP66-2008, identificó un grupo de microorganismos y toxinas como peligros en preparados en polvo para lactantes, clasificados así:

Categoría A: *Salmonella* spp y *Cronobacter* spp porque ambos son causa bien conocida de enfermedades en los lactantes y se han encontrado en preparaciones en polvo para lactantes.

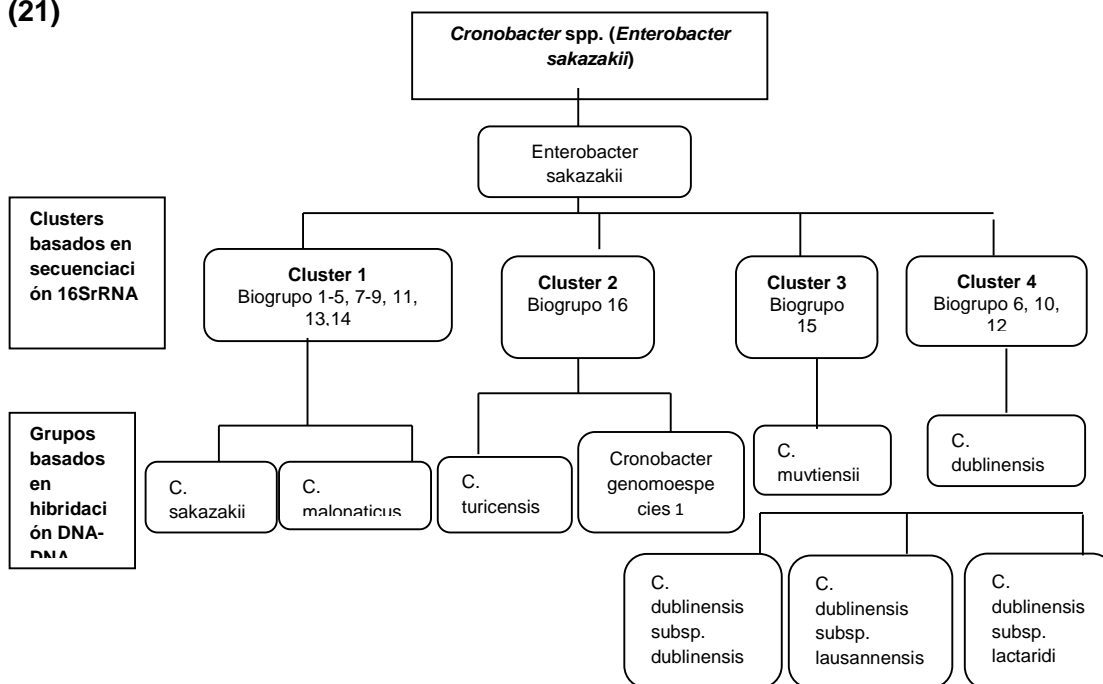
Categoría B: *Pantoea agglomerans* y *Escherichia vulneris* (ambos conocidos antes como *Enterobacter agglomerans*), *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae*. Estos microorganismos tienen cada vez más importancia como patógenos neonatales y, siendo enterobacteriáceas (cuya presencia en concentraciones bajas en los preparados en polvo para lactantes es conocida) son posibles patógenos que se podrían transmitir mediante los preparados.

Categoría C: *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* porque, a pesar de que causan enfermedades en los lactantes, no se han encontrado en los preparados en polvo (1).

2.6 Clasificación de *Cronobacter*

Las especies de *Cronobacter* spp eran originalmente conocidas como *Enterobacter cloacae* productoras de pigmento amarillo y posteriormente clasificadas como *Enterobacter sakazakii* en 1980 (20). En 2004 Iversen, C *et al* usando métodos de ribotipificación de DNA ribosomal 16S y la secuencia *hsp60* dividieron *Cronobacter* spp en 4 clusters sugiriendo que eran un nuevo género y necesitaba una reclasificación (20). Después de extensos análisis polifásicos Iversen, C *et al* 2007-2008 propusieron la reclasificación de esta bacteria un nuevo género llamado *Cronobacter* spp (20). Figura 2-3.

Figura 2-3: Distribución de los biotipos y clusters en la taxonomía de Cronobacter (21)



Strydom A *et al* 2012

El género *Cronobacter* spp consiste en un diverso grupo de bacilos gran negativos, móviles con flagelos peritricos, anaerobios facultativos, no formador de esporas (22), agrupados en 10 especies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muvtjensii*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter universalis*, *Cronobacter condimenti*, *Cronobacter helveticus*, *Cronobacter pulveris* and *Cronobacter zurichensis* (16). Éste es un grupo de microorganismos emergentes oportunistas, transmitido por alimentos, causante de infecciones sistémicas raras como meningitis neonatal, septicemia y enterocolitis en neonatos (7) .

Las infecciones por *Cronobacter* spp representan un serio riesgo para la salud, particularmente para neonatos y puede causar la muerte entre el 40 y 80%. Ha sido aislado de sitios estériles por naturaleza en individuos sanos como la sangre, médula ósea y fluido cerebro espinal (16).

Recientemente, Jarath, Z.W y otros (10) encontraron un tipo de secuencia altamente estable, denominada ST4 entre todos los aislados de *Cronobacter sakazakii* , el cual es responsable de gran proporción de infecciones neonatales severas, especialmente meningitis neonatal (20).

2.6.1 Hábitat de *Cronobacter* spp

Cronobacter spp es un microorganismo ubicuo, ha sido aislado de una gran cantidad de fuentes ambientales como alimentos provenientes de plantas, de ingredientes para alimentos como cereales, frutas y vegetales, productos de leguminosas, hierbas y especias así como alimentos de origen animal como leche, carne y pescado y productos hechos de esos alimentos. El espectro de alimentos contaminados con *Cronobacter* spp cubre alimentos procesados y sin procesar (8).

A pesar de los avances en el conocimiento de *C. sakazakii*, las fuentes y vehículos de transmisión no son aún claras (7). Los porcentajes de aislados más altos de *Cronobacter* spp (63.9%) son encontrados en productos cereales y es similar con otros resultados que enfatizan, que la mayoría de los aislados de *Cronobacter* spp alrededor mundo provienen de plantas y derivados de plantas (8).

La prevalencia de *Cronobacter* spp es más alta en alimentos derivados de plantas que en alimentos derivados de animales, sin embargo, hay más trabajos de investigación en fórmulas lácteas que en derivados de las plantas, por esta razón es necesario ampliar los estudios en estas matrices (23).

Cronobacter spp presenta una inusual resistencia al calor, desecación y acidez comparado con otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, también forma biofilms y es una barrera física de protección contra estrés ambiental y los mecanismos de vigilancia del sistema inmune (10). Es un acuerdo general, que *Cronobacter* spp es un organismo termotolerante, sin embargo, no sobrevive el proceso de pasteurización. Es una bacteria moderadamente ácido resistente, parecida a *Salmonella* spp y ha demostrado una gran resistencia osmótica y a la desecación. Ha demostrado sobrevivir en *aw* entre 0.2 - 0.65, esta resistencia parece aumentar a bajas temperaturas. Tienen la capacidad de sobrevivir hasta por dos años en condiciones de desecación y se multiplica rápidamente después de la hidratación. (21)

2.6.2 Caracterización y tipificación de *Cronobacter*

Los protocolos de identificación para enumeración de *Cronobacter* spp son resumidos en la Tabla 2-4. El primero fue descrito en 1988, en el cual la US FDA (Food and Drug Administration de Estados Unidos) recomendó un método de aislamiento y enumeración de *Cronobacter* spp en fórmulas lácteas infantiles en 2002. En el 2006 la International

Organization for Standardization (ISO) y la International Dairy Federation desarrollaron un protocolo técnico estandarizado para la detección de especies de *Cronobacter* spp de fórmulas infantiles lácteas denominado ISO-TS 22964. Recientemente la US FDA revisó el método descrito en 1988 e incluyó la metodología de PCR y dos medios de cultivo en agar cromogénico recientemente desarrollados para detección (20)

Tabla 2-4. Protocolos de detección de *Cronobacter* spp en Fórmulas lácteas Infantiles (20).

Procedimiento	FDA(original)	ISO/TS 22964	FDA (revisado)
Pre-enriquecimiento	Dilución 1:10 (p/v) de la muestra en agua destilada, incubar durante la noche a 36°C	Dilución 1:10 (p/v) de la muestra en BPW, incubar a 37°C por 18h ±2h	Dilución 1:10 (p/v) de la muestra BPW, incubar at 36°C por 6h
Enriquecimiento selectivo	Transferir 10mL del pre-enriquecimiento en 90mL EE, incubado toda la noche a 36°C	Trasferir 100µL pre-enriquecimiento a 10mL de medio mLST/vancomicina, incubado a 44°C por 24 ±2h	
Selección/aislamiento	Tomar una porción y aislar del caldo EE en agar VRBG, incubar toda la noche a 36°C	Sembrar una asada del medio cultivado mLST/vancomicina en platos de agar, incubar a 44°C por 24±2h	Centrifugar muestras 40mL, 3000 g, 10 minutos y re suspender el pellet en 200µl PBS. Sembrar 100µl en agar cromogénico, incubar toda la noche a 36°C
Confirmación	Escoja cinco colonias presuntivas positivas y siembre en agar TSA, incubar toda la noche a 25°C	Seleccione cinco colonias típicas y pasar a agar TSA, incubar a 25°C por 48±4h	Seleccione dos colonias típicas de cada medio cromogénico confirmar con PCR, API20E, Rapid ID32 E
Identificación	Colonias amarillas son confirmadas con API20E kit	Seleccione una colonia amarilla de cada caja de TSA	

		para caracterización bioquímica	
Tiempo de detección (días)	5	6	3

Yann Q Q *et al* 2012

Las colonias aisladas de los medios de cultivo cromogénicos son confirmadas tradicionalmente utilizando métodos bioquímicos clásicos como API 20E, sistema ID 32E, más recientemente han sido introducidas algunas pruebas de inmunoensayo como VITEK (21), ensayos ELISA (20).

Finalmente, los protocolos de identificación molecular, los cuales incluyen amplia variedad de blancos genéticos (Tablas 2-5a y b), son herramientas de mayor poder de diferenciación de género y especie que además son usadas para el entendimiento de la epidemiología de la bacteria, muchos de ellos con el formato de PCR. Han sido desarrollados los blancos genéticos, entre los cuales están: el gen 16S, región intergénica 16S- 23S DNAr, genes como *dnaG*, *ompA*, *gluA*, región metaloproteasa que contiene zinc *zpx* (20) (21), *gyrB*, *rpoB*, *cgcA*.

Tabla 2-5a. Genes blanco y números de acceso a secuencias usadas para búsqueda de genoma (24)

Gen	Referencia	Numero acceso a GenBank o genoma loci (a)
<i>cgcA</i>	Carter et al., 2013	ESA_01230
<i>gluA</i>	Lehner et al., 2006b	AM075208 (b)
<i>gyrB</i>	Huang et al., 2013	JX088572
<i>dnaG</i>	Seo and Brackett 2005	L01755
<i>ompA</i>	Mohan Nair and Venkitanarayanan, 2006	DQ000206
<i>rpoB</i>	Stoop et al., 2009	FJ717638 FJ717652 FJ717656 FJ717657 FJ717658 FJ717659
<i>zpx</i>	Lehner et al., 2012 Kothary et al., 2007	JQ316670 EF061082

- (a) Estas secuencias son usadas para búsquedas de Cronobacter- PubMLST BLAST. (b) Las secuencias para *gluA* y *gluB* fueron extraídas de una secuencia parcial disponible.

Jackson EE *et al* 2014

Tabla 2-5b. Blancos genéticos usados para la detección de Cronobacter spp y especies relacionadas (20).

	Blancos genéticos	Referencia
Gen loci		
Ribosomal	16S rRNA	Iversen <i>et al.</i> (2004a)
DNA(rDNA)	23S rRNA	Derzelle <i>et al.</i> (2007)
	tRNA _{Glu}	Hassan <i>et al.</i> (2007)
	FISH	Iversen <i>et al.</i> (2007a), Alameida <i>et al.</i> (2009)
1,6 α-glucosidasa	<i>gluA</i>	Iversen <i>et al.</i> (2007a)
MMS operon	<i>dnaG</i>	Seo y Brackett (2005)
		Drudy <i>et al.</i> (2006)
Metaloproteasa con Zinc	<i>Zpx</i>	Jaradat <i>et al.</i> (2009)
Proteína A me membrana externa	<i>ompA</i>	Nair and Venkitanarayanan (2006)
Especies loci		
rfb (antígeno O)	<i>wehC</i> [CsaKO:1] & <i>wehI</i> [CsaKO:2]	Mullane <i>et al.</i> (2008a)
	<i>wzx</i> [CsaKO:3; CturO:1; CmuyO:1; y CmalO:1 y O:2]	Jarvis <i>et al.</i> (2011)
B-subunidad de RNA polimerasa	<i>rpoB</i>	Stoop <i>et al.</i> (2009)
Otros genes blanco		
RNasaP		
<i>infB</i> (factor de indicación)		

Yann Q Q *et al* 2012

Por otro lado, la subtipificación molecular ha sido considerada como un enfoque útil que puede ser aplicado para aclarar la naturaleza de bacterias que colonizan un nicho ecológico particular (20). La electroforesis en gel de campo pulsado PFGE es el método de referencia usado para caracterizar y hacer trazabilidad de bacterias en eventos epidemiológicos; el protocolo para Cronobacter ha sido recientemente validado por

PulseNet. De igual manera, protocolos de análisis como MLVA (multiple- locus variable-number tandem-repeat analysis) , MLSA (Multilocus sequence analysis) han sido desarrollados para las especies de *Cronobacter* (20).

Los métodos actuales de tipificación para identificación de *Cronobacter* incluyen secuenciación de genes, ribo tipificación, ADN-ADN hibridización, *rpoB* PCR, electroforesis en gel de campo pulsado, plásmido - tipificación y ensayos moleculares 16S rRNA para serogrupos. Sin embargo, algunos no son métodos rápidos, requieren PCR posteriores, el método de análisis del gen 16S rRNA tiene dificultades discriminando entre *C. malonaticus* and *C. sakazakii*, debido a la mínima diversidad de la secuencia o la presencia de copias múltiples del gen (25). La tendencia es utilizar metodologías rápidas y sensibles capaces de solucionar estos problemas de tiempo y de diferenciación entre especies del *Cronobacter spp.*

La selección de los blancos moleculares utilizados fueron los reportados por Carter, L. *et al* 2014 (25), obedeció a que los autores destacan la capacidad de la metodología de poder discriminar las especies de *Cronobacter sakazakii* de *Cronobacter malonaticus* en una sola corrida.

2.6.3 Epidemiología y sintomatología de la infección por *Cronobacter*

Las fórmulas infantiles en polvo han sido vinculadas epidemiológicamente con infecciones en niños y brotes por *Cronobacter spp* (10). Aunque *C. sakazakii* ha causado enfermedades en todos los grupos de edades, basándose en la distribución por edades de los casos notificados, se ha establecido que los lactantes (es decir, los niños < 1 año) son un grupo con un riesgo particular. Dentro de este grupo, se considera que la población de mayor riesgo son los lactantes inmunodeprimidos y los recién nacidos (<28 días), en particular los de peso bajo al nacer (<2500 g, según la OMS [1994]). Los lactantes de madres VIH- positivas son también motivo de preocupación, porque tal vez necesiten específicamente los preparados y pueden ser más susceptibles a la infección(1).

Mundialmente no existe vigilancia activa de este patógeno, sin embargo, en el informe de vigilancia de la Organización Mundial de la Salud de 2008, un panel de expertos rastreó casos desde 1961 hasta 2008 y encontraron casos de infección por *Cronobacter spp* en

121 niños e infantes de <3 años de edad (10), tal como lo demuestran los reportes de otros autores en la Tabla 1-1 citada anteriormente.

Aunque *Cronobacter* spp ha llamado la atención de los industriales y el público por los brotes recientes y el retiro de productos del mercado, su asociación por primera vez con la muerte de neonatos fue en 1958. En 2002, fue clasificado por la Comisión para Especificaciones Microbiológicas en Alimentos como “*peligro severo para poblaciones restringidas, amenaza para la vida o secuelas crónicas sustanciales o de larga duración*”(9). En Latinoamérica esta problemática ha sido poco documentada (11), sin embargo se conocen reportes de Argentina, Cuba, México y Brasil al respecto (26) (22). Si bien en Bogotá existe el reporte de la presencia de *Cronobacter* spp en algunos lactarios, no se conoce a ciencia cierta el papel del patógeno como agente etiológico de meningitis o enterocolitis (11) o gastroenteritis.

3. Metodología

3.1 Tipo de estudio

Estudio descriptivo exploratorio, prospectivo para determinar la presencia de *Cronobacter* spp en muestras de féculas de maíz y de plátano destinadas a la alimentación infantil, y distribuidas en las diferentes localidades de la ciudad de Bogotá D.C.

3.2 Selección de las marcas de féculas de maíz y de plátano (muestreo)

3.2.1 Encuesta

Para obtener la información con relación a las marcas utilizadas en la ciudad de Bogotá y las preferencias en consumo de productos a base de féculas de maíz y plátano, se aplicó una encuesta de consumo en todas las localidades a través y con el apoyo de la red de hospitales de Bogotá a través de las Oficinas de Ambiente de las mismas. Las encuestas fueron dirigidas a los lugares de venta de productos utilizados como sustitutos de leche materna con la finalidad de establecer los parámetros de consumo definiendo las siguientes variables (Tabla 3-1):

Tabla 3-1. Variables de la encuesta aplicada para sustitutos de leche materna en expendios de la ciudad de Bogotá.

Variable	Descripción	Tipo
Marca	Nombre comercial del producto con el cual el fabricante lo comercializa	Categórica
Composición	Descripción de los componentes principales del producto	Categórica
Productor	Nombre del fabricante del producto	Categórica

Presentación	Cantidad en gramos y tipo de empaque en que viene el producto	Categórica
Localidad	Zonas geográficas establecidas de al interior de la ciudad de Bogotá que agrupa población	Categórica, toma valores por nombre de la localidad
Precio	Refiere al valor comercial en pesos colombianos del producto	Cuantitativa discontinua
Frecuencia de consumo	Refiere a la frecuencia referida por el entrevistado con la cual el producto es adquirido por clientes con hijos lactantes	Categórica, toma valores de: 1 una vez al mes 2 cada 15 días 3 1 vez a la semana 4 más de una vez por semana

Encuesta diseñada por LSP, 2015

Los datos de las encuestas fueron consolidados en base de datos utilizando Microsoft Excel (Microsoft® Excel® 2016). Se realizó un análisis descriptivo para las variables incluidas en la encuesta con el objetivo de identificar aquellas de mayor relevancia para orientar el muestreo y los criterios de elección.

3.2.2 Muestreo

Con base en los resultados de la encuesta, el muestreo se orientó hacia las localidades para las que se identificó mayor frecuencia de consumo, tomando como línea de corte, aquellas que se encuentran dentro del 90% del acumulado de máxima frecuencia de consumo.

Por tratarse de un trabajo descriptivo exploratorio, se elige un tamaño de muestra de 100 (n:100) tomando un porcentaje de error del 5%, el tamaño se eligió por conveniencia. El muestreo realizado fue de tipo estratificado proporcional, de conveniencia, para el cual se consideraron el tipo de matriz comercializada y la localidad correspondiente como estratos del muestreo. Para el análisis de las muestras por el laboratorio se definió tomar (3) tres unidades de producto que suman en total 250 g, de las cuales se realizó mezcla obteniendo una única muestra para análisis.

3.3 Análisis Microbiológico de las muestras de estudio e investigación de *Cronobacter* spp

3.3.1 Evaluación según el parámetro de alimentos infantiles en Colombia

La normatividad vigente en Colombia que aplica para los alimentos infantiles es la Resolución 11488 de 1984 (19), de acuerdo a ésta, se aplicaron los criterios microbiológicos exigidos para dar un concepto de calidad.

Los siguientes son los parámetros evaluados según la resolución:

1. Recuento de microorganismos mesofílicos: se realizó mediante el método normalizado “AOAC Official Method 966.23 Microbiological Methods” (First Action 1966, Final Action 1989) OMA – AOAC 19TH edition (2012). Los resultados se expresan en UFC/ g.
2. Número más probable coliformes totales: se realizó mediante método normalizado “Recuento de coliformes: técnica del número más probable (NMPC) Método 3” ICMSF Vol.I 2 edición (2000). Los resultados se expresan como NMPC/ g.
3. Número más probable coliformes fecales: se realizó mediante método normalizado “Determinación de organismos coliformes de origen fecal, Método 2”. ICMSF Vol.I 2 edición (2000). Los resultados se expresan como NMPCF/ g.
4. Recuento de Estafilococo coagulasa positiva: se realizó mediante método normalizado “Recuento de estafilococos coagulasa positivos, Método 1” ICMSF Vol.I 2 edición (2000). Los resultados se expresan como UFC/ g.
5. Recuento de hongos y levaduras: se realizó mediante método normalizado “Método de recuento de levaduras y mohos por siembra en placa en todo el medio”. ICMSF Vol.I 2 edición (2000). Los resultados se expresan como UFC/ g.
6. Recuento de *Bacillus cereus* se realizó mediante método normalizado: Recuento de presuntos *B. cereus*” ICMSF Vol.I 2 edición (2000). Los resultados se expresan como UFC/ g.
7. Investigación de *Salmonella* spp se realizó mediante el método normalizado “AOAC Official Method 967.26 *Salmonella* in processed Foods (First Action 1967, Final Action 1974) OMA – AOAC 20TH edition (2016) modificado. Tamaño de muestra 25g, los resultados se expresan como A/P en 25g.

3.3.2 Investigación de *Cronobacter* spp de acuerdo con la metodología ISO/TS 22694:2006

Para la investigación de *Cronobacter* spp, se verificó la metodología de referencia internacional ISO/TS 22694:2006 “*Milk and milk products — Detection of Enterobacter sakazakii*” (27) siguiendo el procedimiento de validaciones del Laboratorio de Salud Pública área de Microbiología de Alimentos.

Adicionalmente, se realizó la valoración de los medios de cultivo: Agua peptona tamponada (BWP) (Merck®), Agar base para aislamiento de *Enterobacter sakazakii* (mDFI) (Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.), Caldo lauril sulfato modificado mLST, (Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.) Se usaron como las siguientes como cepas de referencia: cepa target *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329 Thermo Scientific™ y no target *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Thermo Scientific™, según los criterios de la norma ISO 11133-2:2002 “*Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media*” (28).

La detección del microorganismo se determinó en 25 g a través de dos pasos de enriquecimiento; el primero un enriquecimiento no selectivo en agua de peptona tamponada (BWP) y segundo enriquecimiento selectivo en caldo Lauril Sulfato modificado (mLST) con adición de NaCl y 10mg de vancomicina. Posteriormente, se hace un pase al agar Cromogénico *Enterobacter sakazakii* y son recuperadas las cepas presuntivas de *Cronobacter* spp, de color verde-azul. (27) (29)

Todas las colonias presuntivas en medio cromogénico (color verde-azul), se les confirmó la producción de pigmento amarillo en placas de agar Trypticase Soya (TSA) (Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.) realizando incubación a 25°C y confirmación bioquímica usando las galerías para test bioquímico API 20E (bioMerieux S.A) (29), sugeridas por la bibliografía.

Se utilizaron como cepas de control de la metodología *C. sakazakii* ATCC 12868 y *C. muytjensii* ATCC 51329. Todos los aislados fueron mantenidos en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.) más solución de glicerol 20% a (-20) +/-2°C para criopreservación.

3.4 Tipificación de los aislamientos de *Cronobacter* spp recuperados

La identificación de especies de *Cronobacter* spp se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como blanco molecular el gen que codifica para la enzima diguanilato-ciclase (*cgcA*), involucrada en la síntesis del diguanilato cíclico; una molécula de gran importancia en la señalización celular bacteriana. Se seleccionó la metodología reportada Carter L., *et al* 2014 (25), la cual utiliza dicho blanco molecular y permite diferenciar en una sola reacción de PCR 6 de las 7 especies de *Cronobacter* spp reportadas y que incluyen: *C. malonaticus*, *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* y *C. turicensis*. No se incluye *C. condimentii*.

Para la estandarización de las condiciones de la PCR *cgcA* se usaron 9 cepas de referencia de las especies reportadas hasta el momento, las cuales fueron donadas por el Instituto para Higiene y Seguridad de Alimentos de la Universidad de Zurich, las cuales se relacionan en la siguiente tabla (Ver Tabla 3-2).

Tabla 3-2: Codificación de cepas de referencia.

Microorganismo	Colección de referencia	Código interno LSP- MBA
<i>C. muytjensii</i>	ATCC 51329	1 RefZh
<i>C. turicensis</i>	LMG 23827	2 RefZh
<i>C. condimentii</i>	LMG 2625	3 RefZh
<i>C. sakazakii</i>	ATCC 29544	4 RefZh
<i>C. malonaticus</i>	LMG 23826	5 RefZh
<i>C. universalis</i>	LMG 26249	6 RefZh
<i>C. dublinensis Lactaridis</i>	LMG 23825	7 RefZh
<i>C. dublinensis Lausannensis</i>	LMG 23824	8 Ref Zh
<i>C. dublinensis Dublinensis</i>	LMG 23823	9 Ref Zh

LSP 2015

Para la PCR *cgcA*, la cepa *C. condimentii* fue utilizada como control negativo de amplificación por cuanto no está incluida en la metodología y no se considera una

especie de relevancia clínica ya que no hay reportes de que cause enfermedad en humanos. También se incluyó, como control negativo de esta PCR, la cepa de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 suministrada por el Laboratorio de Salud Pública (LSP) como interferente conocido de *Cronobacter* spp.

3.4.1 Evaluación *in-silico* de los iniciadores

Los iniciadores reportados por L. Carter, *et al* 2014 (25) para la PCR *cgcA* y utilizados en la presente metodología, fueron evaluados utilizando la herramienta Primer BLAST del NCBI (30) frente a secuencias de genes reportados en el GenBank (31) (base de datos no redundante) para el género *Cronobacter* spp y de manera específica para las secuencias reportadas para el gen *cgcA* de cada especie.

Adicionalmente, la especificidad *in-silico* de los iniciadores fue evaluada mediante el programa BioEdit versión 7.2.5 (12/11/2013) (32), con el cual se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias reportadas en el GeneBank del NCBI con cada par de iniciadores reportado para cada especie. También se corroboraron las secuencias de los iniciadores y los tamaños de los fragmentos esperados para cada una de las especies de *Cronobacter* spp evaluadas y se estimaron las propiedades fisicoquímicas de los mismos como son los valores de TM de amplificación y las posibles estructuras secundarias que pudiesen interferir en la amplificación.

Los iniciadores reportados por L. Carter, *et al* 2014 (25) para la PCR *cgcA* se reportan a continuación (Tabla 3-3):

Tabla 3-3: Iniciadores especies- específico de *Cronobacter* spp *cgcA* reportados por L. Carter, *et al* 2014 (25)

Iniciadores	Secuencia	Tamaño amplificado (pb)	Especies identificadas
Cdm-469R ^a	CCACATGGCCGATATGCACGCC		
Cdub-40F	GATACCTCTCTGGGCCGCAGC	430	<i>C. dublinensis</i>

Cmuy-209F	TTCTTCAGGCGGAGCTGACCT	260	<i>C. muytjensii</i>
Cmstu-825F ^b	GGTGGCSCGGGTATGACAAAGAC		
Ctur-1036R	TCGCCATCGAGTGCAGCGTAT	211	<i>C. turicensis</i>
Cuni-1133R	GAAACAGGCTGTCCGGTCACG	308	<i>C. universalis</i>
Csak-1317R	GGCGGACGAAGCCTCAGAGAGT	492	<i>C. sakazakii</i>
Cmal-1410R	GGTGACCACACCTTCAGGCAGA	585	<i>C. malonaticus</i>

^a el primer Cdm-469R es usado en reacciones multiplex con los primers Cdub-40F y Cmuy-209F identificando las cepas de *C. dublinensis* y *C. muytjensii* respectivamente.

^b el primer Cmstu-825F es usado en reacciones multiplex con los primers Ctur-1036R, Cuni-1133R, Ccak-1317R y Cmal-1410R identificando *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. sakazakii* y *C. malonaticus*.

Carter L *et al* 2013

3.4.2 Extracción de ADN genómico

Para la obtención del ADN genómico tanto de las muestras como de los controles, las cepas y aislamientos fueron cultivados en agar TSA (Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.) a partir del vial de crioconservación, y posteriormente 3 colonias puras fueron transferidas a 1 mL de caldo BHI (Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.) e incubado a 35°C por 24 horas. El medio líquido fue centrifugado por 10 minutos a 10.000 RPM a 4°C para recuperar el pellet bacteriano y proceder al proceso de extracción.

La extracción de ADN fue realizada mediante el Kit de extracción DNA QIAmp® DNA minikit de Qiagen®, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La extracción se realizó adicionando 200 uL del buffer de lisis al pellet celular, 20 uL de proteinasa k y agitando hasta garantizar la homogeneidad del producto. Se incubó a 56°C durante 10 minutos, se adicionó 200 uL de etanol absoluto grado ACS, ISO, RA (Merck®) se mezcló y se transfirió a la columna de extracción y se centrifugó a 8.000xg durante 1 min. Se realizaron dos lavados de las columnas con los buffers de lavado AW1 y AW2 respectivamente centrifugando a 8.000xg durante 1 min y finalmente la columna fue acondicionada por centrifugación a 13.000xg por 3 min para realizar la elución del ADN con 100 uL de buffer de elución a 8.000xg durante 1 minuto.

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría utilizando un NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc). Como blanco de referencia se utilizó

Buffer de elución sometido al proceso de extracción en conjunto con las muestras y con los controles. Para la cuantificación de ADN se utilizaron 2 uL de extracto y se corrió el espectro UV-Vis entre 220 y 350 nm. La cuantificación se realizó a 260 nm y la calidad del ADN fue monitoreada mediante la relación de absorbancia entre 260/280 nm. Todos los extractos de ADN fueron conservados a -20°C hasta su uso.

3.4.3 Evaluación de condiciones experimentales de amplificación

La estandarización de la metodología de PCR se realizó con diluciones 1/10 de los extractos de ADN obtenidos para las cepas de referencia. Todos los iniciadores fueron evaluados de manera independiente para cada especie de *Cronobacter* spp bajo condiciones de baja astringencia, y posteriormente se evaluaron en mezcla con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de amplificación en términos de magnesio (como MgCl₂) y temperatura de asociación de iniciadores, todos bajo el mismo programa de temperatura de amplificación. Se consideró como concentración de MgCl₂ y Temperatura de amplificación óptimos aquellos que permitieron detectar cada especie de manera específica (tamaño del fragmento amplificado esperado), sin pérdida de sensibilidad (Atenuación del rendimiento de la reacción de la PCR, en comparación con el marcador de peso molecular). Para la realización de la PCR se empleó un termociclador marca BioRad C1000™

Para la evaluación de las condiciones iniciales de amplificación anteriormente citadas se empleó la ADN polimerasa *Maxima hot start Taq DNA polymerase de Thermo Scientific™*. También se evaluaron las enzimas *GoTaq® Hot Start Polimerase y GoTaq® G2 Hot Start Polimerase* de Promega Copr. y *Platinum® Blue PCR Super mix* de Invitrogen™ con el objetivo de comparar su especificidad y sensibilidad.

Todos los productos de amplificación fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, con buffer TBE 0.5X, en campo eléctrico de voltaje constante (5V/cm), a un tiempo de 60 minutos. Los geles fueron teñidos con SafeView™ de Applied Biological Materials INC a la concentración recomendada por el fabricante y revelados al UV en un digitalizador de imágenes General Electric ImageQuant 300. Las imágenes fueron adquiridas con un valor de zoom de 15, apertura de 2 y tiempo de exposición de 5s. Para la estimación del tamaño de las bandas obtenidas por PCR, se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 50 pb DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific Inc, tomando como referencia

la banda de 250pb para comparar la intensidad de las bandas de amplificación de manera cualitativa.

3.4.4 Análisis de muestras

Para el análisis de las muestras, se corrieron dos PCR *cgcA*. La primera PCR se realizó a partir de la dilución 1/10 de los extractos de ADN obtenidos para cada una de las muestras, y la segunda PCR con extractos diluidos 1/10 adicionados con ADN de *Cronobacter turicensis* a una concentración final de 0.07 ng/uL. Esta adición fue utilizada como un control interno de la metodología para confirmar que la ausencia de banda de amplificación para las especies investigadas, no está relacionada con la presencia de inhibidores y por tanto permite descartar falsos negativos.

Como prueba confirmatoria se incluyó la metodología PCR con blanco molecular *rpoB* de Stoop *et al* 2009 (33) para confirmar las cepas identificadas como *C. sakazakii* y *C. malonaticus*.

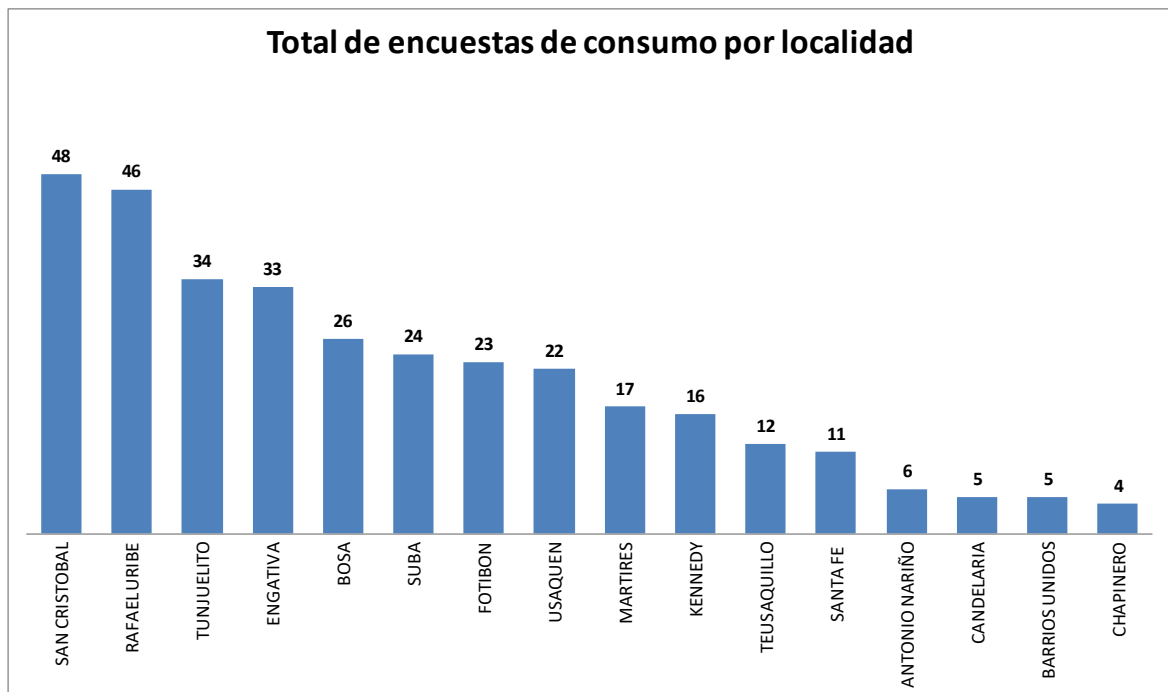
4. Resultados

4.1 Identificación de las marcas de féculas de maíz y plátano de mayor comercialización

4.1.1 Información de Consumo

Se aplicaron 332 encuestas en la ciudad de Bogotá, a través de las Unidades de Ambiente de los 12 Empresas Sociales del Estado E.S.E.S de la ciudad que cubrieron 16 localidades de la ciudad (Figura 3-1).

Figura 4-1: Número de encuestas de consumo de féculas aplicadas en la ciudad de Bogotá 2014.



Encuesta aplicada LSP Bogotá 2016

De esta manera, la distribución del consumo de féculas según la encuesta estaba así: 169 de plátano (51%), 120 de maíz (36%) y 43 de “otras harinas” (mezclas de cereales)(13%). Cabe aclarar, que el grupo de “otras harinas” fue incluido porque se identificó con el instrumento un alto consumo de esa matriz en los grupos de edad de interés.

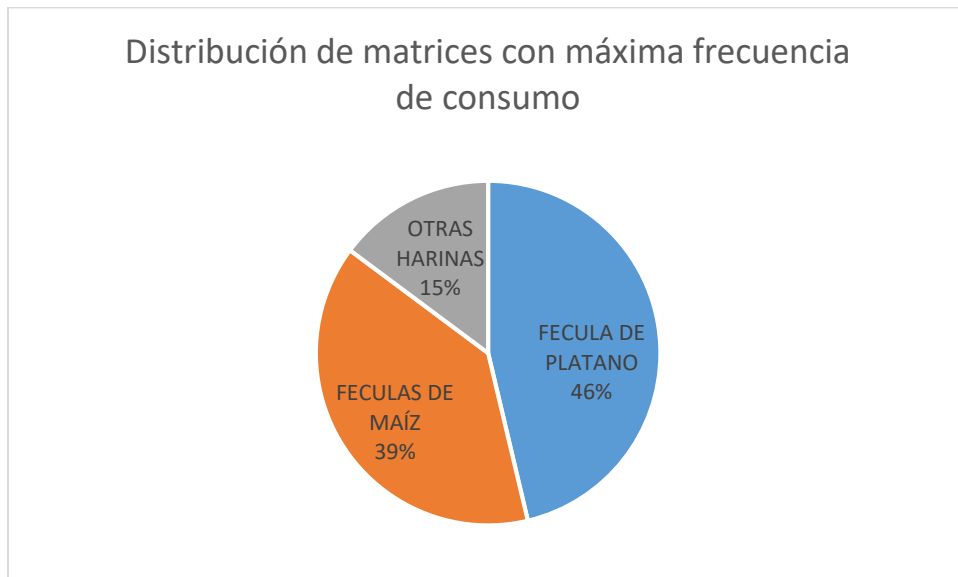
4.1.2 Información De Frecuencia De Consumo

La información recolectada se analizó según la frecuencia de consumo registrada en la encuesta, siendo seleccionadas las marcas que reportaron la máxima frecuencia de consumo (*Más de una vez por semana*) por riesgo de exposición.

En el grupo de “otras harinas” se encontró que 24 encuestas de las 43 recogidas para esta matriz alimentaria, reportaron consumo de máxima frecuencia (55.8%), poniendo en evidencia que eran alimentos de alto consumo dentro de la población objetivo.

Así, la distribución de las matrices más consumidas por frecuencia fue: fécula de plátano el 46.3% (75 encuestas), fécula de maíz fue el 38.9% (63 encuestas) y de las de “otras harinas” fue 14.3% (24 encuestas). Figura 4-2

Figura 4-2. Distribución de matrices con máxima frecuencia de consumo identificadas



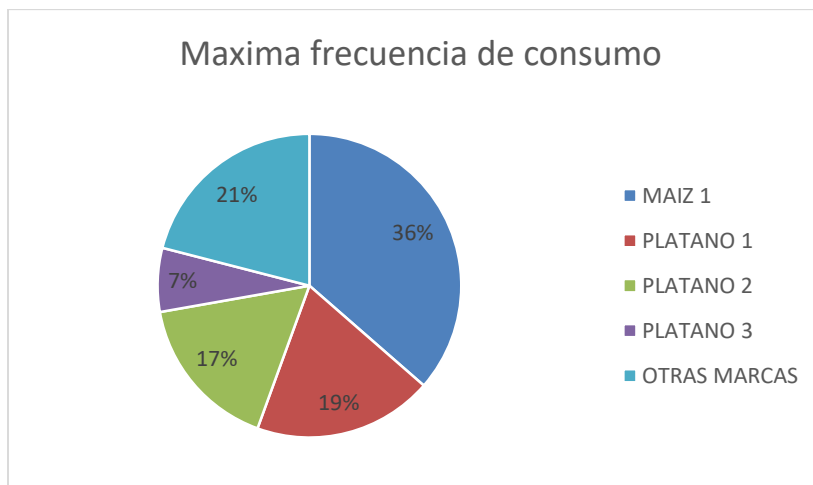
4.1.3 Información De Marcas

El alimento con mayor frecuencia de consumo detectado fue la fécula de plátano. En maíz, se concentró el 92% una sola marca comercial altamente reconocida lo cual establece una clara preferencia de consumo para la matriz de maíz. En cuanto a las féculas de plátano, hubo más variedad, siendo 3 marcas comerciales de diferentes fabricantes las que concentran el 92% de las muestras y la segunda matriz en frecuencia de consumo. Para el grupo de otras harinas, fue más variada la cantidad de marcas encontradas, así como de fabricantes, aunque una marca muy reconocida sumó el 47% (65 muestras) de las muestras, 36 fueron clasificadas como de alta frecuencia de consumo.

Posteriormente, se procedió a identificar las marcas que registraran la máxima frecuencia de consumo. Al hacer este análisis, se encontró que 4 marcas agrupan el 79% de todas las marcas encontradas (Figura 4-3) y el resto acumularon 21%.

Esto permitió identificar unas claras preferencias de consumo por marcas en las localidades encuestadas y se escogieron cuáles serían las marcas solicitadas en el muestreo incluyendo algunas de las “otras harinas”.

Figura 4-3: Frecuencias de consumo por matriz



Una vez definidas las marcas de féculas de maíz y de plátano que se distribuyen en la ciudad de Bogotá, se calculó el muestreo para el análisis exploratorio de la presencia de *Cronobacter* spp en estas matrices. Las marcas de los productos se mantienen como confidenciales en el Laboratorio de Salud Pública y las muestras se codificaron para el análisis.

4.1.4 Muestreo

El tamaño de la muestra fue de 102 el cual se distribuyó por peso porcentual según la localidad y composición. De acuerdo a esta distribución, se recibieron las muestras en el laboratorio repartidas así: 36 muestras para maíz, 53 muestras para plátano y 13 para “otras harinas” (mezcla de cereales) Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Distribución de muestreo por localidad y por matriz

Localidades	Muestras Maíz	Muestras Plátano	Muestras Harinas	Total Muestras
SAN CRISTOBAL	6	7	3	16
RAFAEL URIBE	5	8	2	15
TUNJUELITO	4	9	1	14
ENGATIVA	4	11	1	16
BOSA	3	5	1	9
SUBA	3	1	1	5
FONTIBON	3	4	2	9
USAQUEN	2	1	1	4
MÁRTIRES	2	2	1	5
KENNEDY	2	2	2	6
TEUSAQUILLO	1	1	1	3
Total de muestras				102

Encuesta LSP Bogotá 2016

4.2 Resultados del análisis microbiológico de las muestras de estudio

4.2.1 Concepto de calidad microbiológico de las féculas evaluadas con respecto al parámetro para alimentos infantiles

Se aplicaron los criterios de la Resolución 11488 de 1984 (19) y se calificaron según el cumplimiento de los requisitos en CUMPLE o NO CUMPLE (Tabla 4-2)

De las 102 muestras analizadas, los resultados son:

Tabla 4-2: Evaluación de concepto microbiológico según Resolución 11488/84

MATRIZ	CONCEPTO		
	Cumple	No Cumple	Total
Otras harinas	8	5	13
Féculas de maíz	35	1	36
Féculas de plátano	35	18	53
Total general	78	24	102

Análisis muestras LSP Bogotá 2016

Las causas de no cumplimiento se encuentran resumidos en la tabla 4-3. La mayor causa de no cumplimiento fue el NMPC con 20 muestras, seguida por recuento de microorganismos mesofílicos (Tabla 4-3).

Como NMPC fue la principal causa de no cumplimiento, la información de este indicador se cruzó con NMPCF y presencia de *Cronobacter* spp.

Tabla 4-3: Evaluación de la Causa de no cumplimiento vs la matriz.

Causa No Cumplimiento	Harinas	Maíz	Plátano	Total (n)	% No cumplimiento
NMPC	5		15	20	64,5
Recuento Mesofílicos	2		4	6	19,4
NMPCF	2		2	4	12,9

<i>B. cereus</i>		1		1	3,2
Total general	9	1	21	31	100
% No cumplimiento	29,0	3,2	67,7		

Análisis muestras LSP Bogotá 2016

4.2.2 Verificación de metodología ISO 22694:2006

La evaluación de los medios de cultivo de acuerdo a lo establecido por la norma ISO 11133-2:2002, fueron los siguientes.

Para el agar Cromogénico mDFI (Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.) fue una evaluación semicuantitativa, de acuerdo al factor de crecimiento (FG), que la norma recomienda que sea más de 6 para ser un medio aceptable. Para el agar mDFI, el factor fue de 16 (FG:16) con *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329 y en el medio de referencia Tripticasa Soya (Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc.) el factor fue de 16 (FG:16)

Respecto a los medios líquidos, la evaluación fue cualitativa; es decir una evaluación indicativa que se califica con un "score". La interpretación se hace así: 0 corresponde a turbidez cero, 1 muy baja turbidez, 2 buena turbidez. Los resultados se encuentran a continuación:

- Agua peptona tamponada: evaluación cualitativa, Score 2
- Caldo mLST/vancomicina: evaluación cualitativa, Score 1

La verificación de la metodología ISO22964:2006, se trabajó con una concentración de 100 UFC/mL de *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329, con las recuperaciones relacionadas en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4: Recuperación en Agua Peptona Tamponada (BWP) de las féculas de maíz y de plátano.

Matrices	UFC cepa target	Recuperación por matriz	LOG 10
Fórmula Láctea	100 UFC	100%	1,8
Fécula de Maíz	100 UFC	33,3	1,3
Fécula de Plátano	100 UFC	101,4	1,8

LSP Bogotá 2016

La recuperación en el caldo de cultivo selectivo Lauril Sulfato Modificado (mLST) fue de 4.8 UFC que equivalen a 0,68 LOG 10.

Los atributos evaluados de la metodología ISO 22964: 2006 fueron los límites críticos, límite de detección y de cuantificación, encontrándose como límite de detección 1 UFC (Tabla 4-5), límite crítico 4 UFC y como límite de cuantificación 12 UFC.

Tabla 4-5: Cálculo del límite de detección para la metodología ISO 22964:2006

Límite de detección (LOD)	
Nivel	2
Placas	20
	4 negativas 16 positivas
Positivos/ Total de ensayos positivos p(+)	0,6
Relación de probabilidad	3,33
Log natural	1,2
LOD	1,20 log de UFC

LSP Bogotá 2016

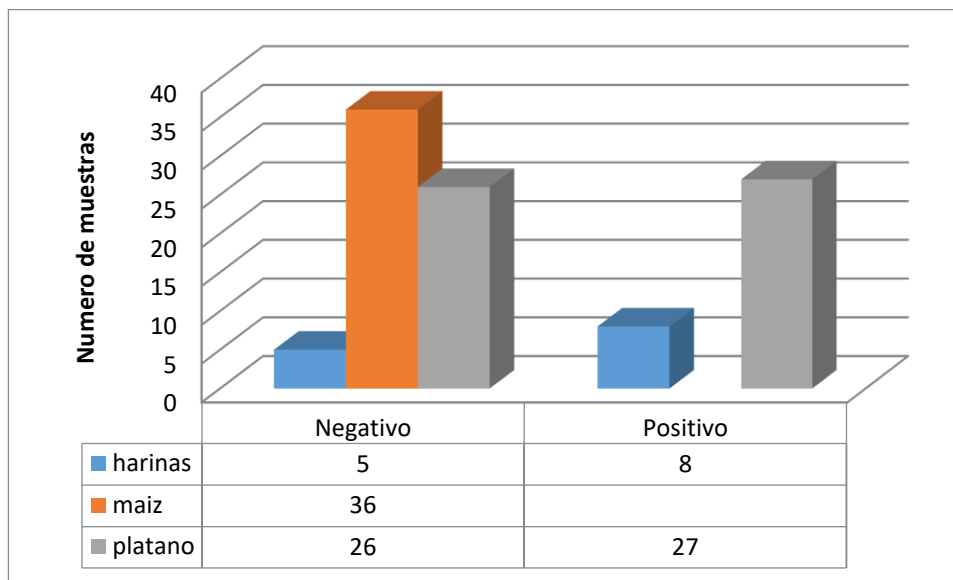
En la verificación del método para detección de *Cronobacter* spp la probabilidad de negativas fue de 4 en 20 réplicas, por lo tanto, la probabilidad es de 3.33 y su Log natural es de 1.20 UFC, este es el límite de detección (LOD).

4.2.3 Investigación de *Cronobacter* spp en féculas de maíz y de plátano

Se procesaron un total de 102 muestras de alimentos, de las cuales 35 (34.3%) fueron positivas para presencia de *Cronobacter* spp, distribuidas así: 26.5 %(n: 27) para féculas de plátano, 7.8%(n:8) para “otras harinas” y 0% negativo para féculas de maíz.

Al discriminar el análisis por matrices, se encontró que ninguna de las muestras de féculas de maíz dio positiva para el microorganismo de interés, mientras que de féculas de plátano el 51% dieron positivas y el 61.5% de las de otras harinas (mezclas de cereales) dieron positivas usando la ISO 22964:2004 para la presencia del patógeno. Figura 4-4

La identificación bioquímica se hizo usando kits miniaturizados API 20E (Biomerieux S.A) y Rapid ID 32E (Biomerieux S.A), las bases de datos en www.apweb.biomerieux.com fueron usadas para identificación de especies.

Figura 4-4: Resultados del análisis de *Cronobacter* spp por matrices analizadas

LSP Bogotá 2016

4.3 Tipificación de los aislamientos de *Cronobacter* spp recuperados

4.3.1 Análisis *in_silico* de los primers

Para las secuencias de los iniciadores incluidos en el estudio para la identificación de *Cronobacter* spp, evaluadas con la herramienta Primer Blast del NCBI, no se detectaron secuencias de genes de microorganismos diferentes a *Cronobacter* spp que presentaran fragmentos de amplificación inespecíficos detectables de tamaño similar al esperado. De igual manera, la evaluación permitió establecer una alta especificidad de los iniciadores dirigidos a blancos genéticos especie-específicos dentro del gen *cgcA*. Al realizar el alineamiento múltiple del gen *cgcA* reportado para las diferentes especies de *Cronobacter* spp, y los iniciadores correspondientes a cada especie, se confirmaron los tamaños esperados para el producto de la amplificación de la PCR. Con base en el anterior análisis, los iniciadores fueron enviados a sintetizar.

Las propiedades fisicoquímicas encontradas para los iniciadores evaluados se reportan en la siguiente tabla. (Tabla4-6)

Tabla 4-6: Propiedades de los iniciadores de PCR *cgcA* para identificación de especies de *Cronobacter* spp.

Cepa	Iniciadores	TM	%GC	Tamaño amplificado
<i>Cronobacter muytjensii</i>	Forward primer	TTCTTCAGGCGGAGCTGACCT	63.52	261
	Reverse primer(a)	CCACATGGCCGATATGCACGCC	66.62	
<i>Cronobacter dublinensis</i>	Forward primer	GATACCTCTCTGGGCCGCAGC	64.91	430
	Reverse primer(a)	CCACATGGCCGATATGCACGCC	66.62	
<i>Cronobacter turicensis</i>	Forward primer(b)	GGTGGC SGGGTATGACAAAGAC	62.40	212
	Reverse primer	TCGCCATCGAGTGCAGCGTAT	64.54	
<i>Cronobacter universalis</i>	Forward primer	GGTGGC SGGGTATGACAAAGAC	62.40	309
	Reverse primer	GAAACAGGCTGTCCGGTCACG	63.77	
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Forward primer	GGTGGC SGGGTATGACAAAGAC	62.40	493
	Reverse primer	GGCGGACGAAGCCTCAGAGAGT	66.21	
<i>Cronobacter malonaticus</i>	Forward primer	GGTGGC SGGGTATGACAAAGAC	62.40	586
	Reverse primer	GGTGACCACACCTTCAGGCAGA	64.43	
(a) el iniciador Reverse es común para <i>C. dublinensis</i> y <i>C. muytjensii</i>				
(b) el iniciador Forward es común para <i>C. turicensis</i> , <i>C. universalis</i> , <i>C. sakazakii</i> y <i>C. malonaticus</i>				

LSP Bogotá 2016

4.3.2 Evaluación del ADN extraído para los controles y los aislamientos recuperados.

Para el NanoDrop, se estableció un límite de detección de 3.44 ng/uL estimado a partir de 5 repeticiones del blanco de extracción. La concentración para los extractos ADN obtenidos tanto para las cepas de referencia y para los aislamientos se encontró entre 4 y

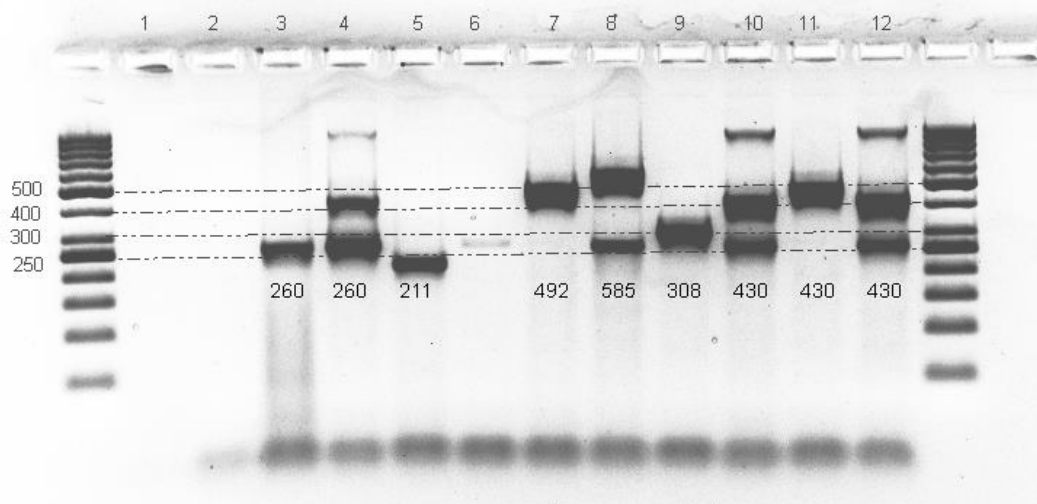
20 ng/uL. Con respecto a la pureza de los extractos de ADN evaluada como la relación de absorbancias a 260/280 nm, se encuentra que todos los extractos se encuentran entre 1.8 y 1.9, encontrándose que es un ADN de pureza adecuada para realizar la PCR, y que no presenta contaminación por proteínas que puedan influir en el montaje de la prueba.

4.3.3 Estandarización de la PCR.

La evaluación de los iniciadores fue realizada bajo condiciones de PCR de baja astringencia utilizando la enzima Maxima hot start Taq DNA polymerase de Thermo Scientific™. La composición de la mezcla de reacción de PCR fue calculada para un volumen final de 15 uL, con MgCl₂ a 4mM, Buffer de enzima 1X, cada dNTPs a 400uM, la ADN polimerasa a una concentración de 0.02U/uL y los iniciadores a 0.4uM (Forward y Revers para cada reacción Individual). Se adicionó para cada reacción de PCR un 20% en volumen del extracto de ADN (3 uL de extracto). El termograma de amplificación utilizado consistió en una etapa de 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos en 95°C por 30s, 59°C por 30s y 72°C por 60s y una etapa final de 72°C por 5 minutos.

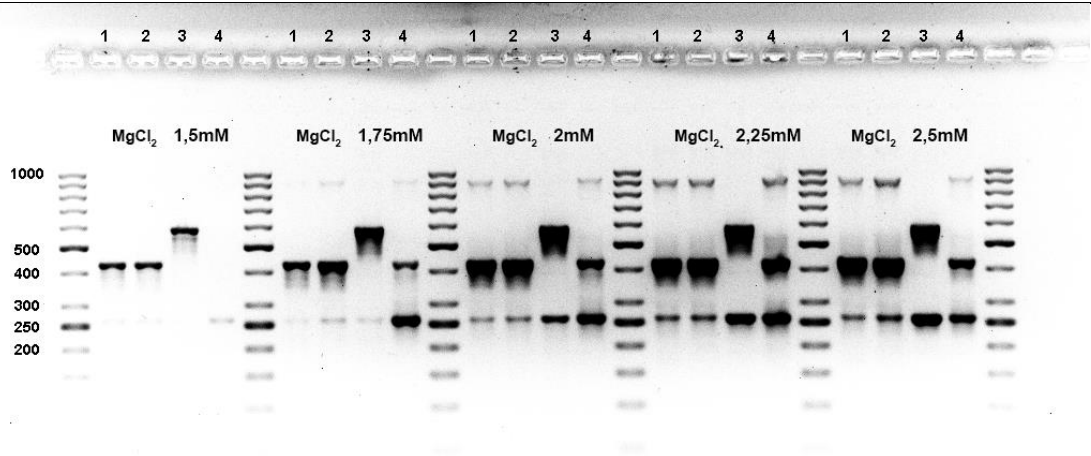
Bajo las condiciones anteriormente descritas, se logró la amplificación individual para las especies *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. sakazakii* y *C. malonaticus*. Al evaluar la PCR con todos los iniciadores en una sola mezcla de reacción (PCR multiplex), se encontraron inespecificidades para *C. muytjensii*, *C. malonaticus* y *C. dublinensis*, las cuales no fueron eliminadas con el incremento de temperatura hasta 65°C, titulación de MgCl₂ desde 1.5 hasta 2.5 mM (Figuras 4-5 y 4-6) y reducción de concentración de los iniciadores hasta 0.2uM (Figura 4-7).

Figura 4-5: Evaluación iniciadores en multiplex bajo condiciones de baja astringencia con enzima Maxima hot start Taq DNA polymerase (LSP Bogotá 2016)



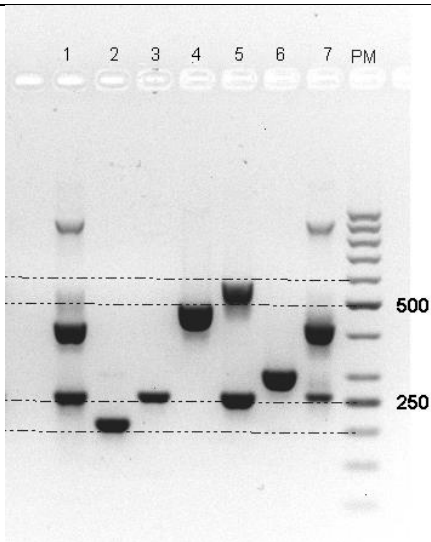
1 NTC, 2) blanco, 3) ATCC *C. muytjensii*, 4) *C. muytjensii*, 5) *C. turicensis*, 6) *C. condimentii*, 7) *C. sakazakii*, 8) *C. malonaticus*, 9) *C. universalis*, 10) *C. dublinensis Lactaridis* 11) *C. dublinensis Lausannensis*, 12) *C. dublinensis Dublinensis*
Iniciadores a 0.4uM, 63°C como temperatura de anillamiento.

Figura 4-6: Evaluación iniciadores con titulación de MgCl₂ a 65°C en multiplex con enzima Maxima hot start Taq DNA polymerase (LSP Bogotá 2016)



1) *C. dublinensis Lactaridis* 430 pb, 2) *C. dublinensis Dublinensis* 430 pb, 3) *C. malonaticus* 585 pb, 4) *C. muytjensii* 260 pb
 Iniciadores a 0.4uM, 65°C como temperatura de anillamiento.

Figura 4-7: Evaluación iniciadores a 0.2uM, a 65°C en multiplex con enzima Maxima hot start Taq DNA polymerase (LSP Bogotá 2016)



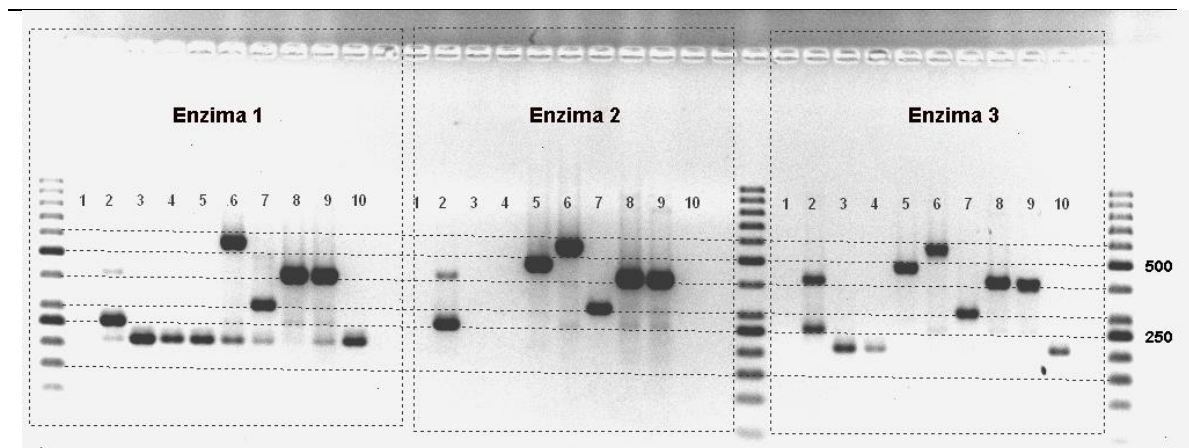
1) *C. muytjensii*, 2) *C. turicensis*, 3) *C. condimenti*, 4) *C. sakazakii*, 5) *C. malonaticus*, 6) *C. universalis*, 7) *C. dublinensis Lactaridis*
 Iniciadores a 0.2uM, 65°C como temperatura de anillamiento y MgCl₂ a 2 mM.

Al evaluar la sensibilidad y especificidad de la metodología con otras enzimas ADN polimerasas (GoTaq® Hot Start Polimerase y GoTaq® G2 Hot Start Polimerase de

Promega Copr. y Platinum® Blue PCR Super mix de Invitrogen™) bajo las condiciones recomendadas para cada una de las mismas y con el termograma de amplificación anteriormente descrito, la enzima Platinum® Blue PCR Super mix de Invitrogen™, presentó resultados más consistentes con lo esperado en el análisis in-silico, obteniéndose los tamaños de fragmentos esperados para cada especie, con mayor especificidad y reduciéndose la amplificación de fragmentos no específicos (Figura 4-8).

Para esta enzima también se observó que, al utilizar el ADN de *C. turicensis* que amplifica una banda en 211 pb usado como control de fortificación para los demás ADN de referencia, se observan resultados concordantes. Se observa la amplificación de todas las especies de *Cronobacter* evaluadas, así como obteniéndose la banda esperada para el control de fortificación en presencia de ADN de *C. condimentii*, que es utilizado como control negativo de la metodología. Por el contrario, para las otras dos enzimas evaluadas, los resultados no fueron consistentes con respecto a lo esperado, bien porque no se obtuvo la banda esperada para el control de amplificación en los casos de ADN control negativo, o porque no se obtuvo amplificación para algunos de los controles positivos (Figura 4-8).

Figura 4-8: Comparación del tres ADN polimerasas (LSP Bogotá 2016)



1) NTC, 2) *C. muytjensii*, 3) *C. turicensis*, 4) *C. condimentii*, 5) *C. sakazakii*, 6) *C. malonaticus*, 7) *C. universalis*, 8) *C. dublinensis Lactaridis*, 9) *C. dublinensis Dublinensis* 10) Fortificada con *C. tuircensis*

Enzima 1 GoTaq® Hot Start Polimerase Promega Copr

Enzima 2 GoTaq® G2 Hot Start Polimerase Promega Copr
 Enzima 3 Platinum® Blue PCR Super mix de Invitrogen™

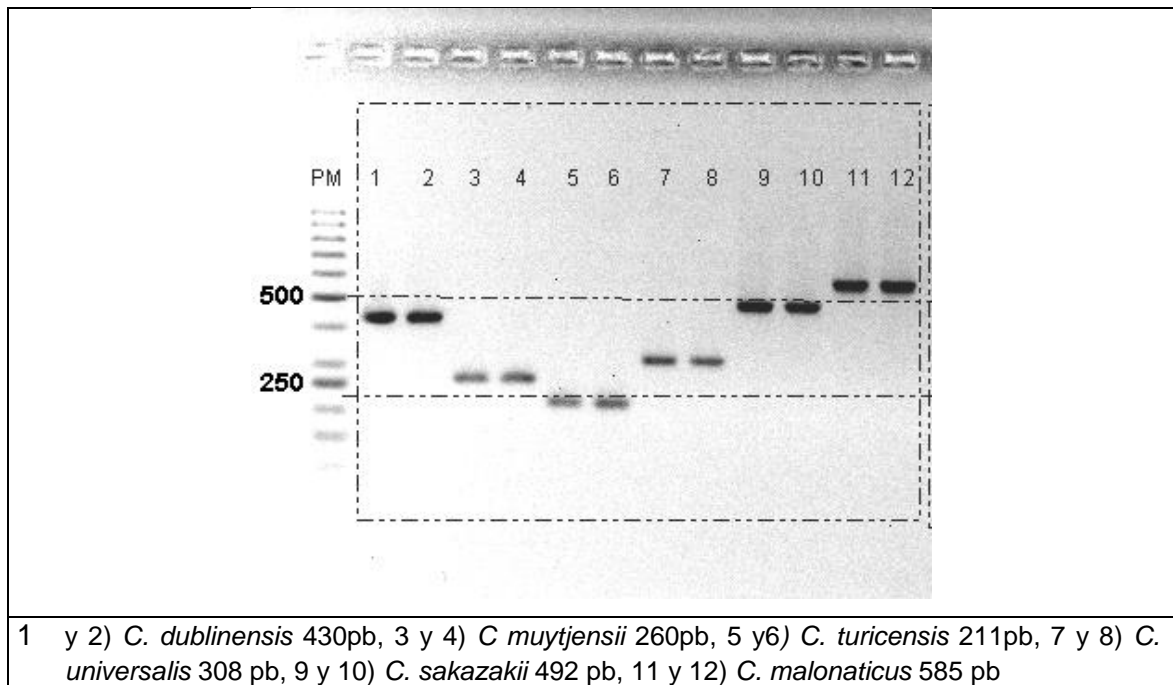
La composición final de la mezcla de PCR estandarizada con la enzima Platinum® Blue PCR Super mix de Invitrogen™ fue: para un volumen de reacción 20 uL, la *Platinum® Blue PCR SuperMix* (1.25X) se trabajó concentración final 1.0X (MgCl₂ a 1.32 mM, dNTPs a 176 mM y platinum DNA polimerasa a 0.02 U/uL), cada uno de los iniciadores a 0.20uM (Cdm-469R, Cdub-40F, Cmuy-209F, Cmstu-825F, Ctur-1036R, Cuni-1133R, Csak-1317R y Cmal-1410R respectivamente). Se adicionaron de 2.4 uL de extracto de ADN por reacción. Las condiciones del termograma de amplificación estandarizadas se describen en el siguiente cuadro (Tabla 4-7).

Tabla 4-7: Condiciones estandarizadas del termograma de amplificación con enzima Platinum® Blue PCR SuperMix

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Temperatura inicial	95°C	5 min	--
Temperatura de desnaturalización	95°C	30 s	35
Asociación de oligos	65°C	30 s	
Extensión	72°C	40 s	
Temperatura de extensión final	72°C	60 s	--

La enzima demostró, que cada juego de oligonucleótidos es específico para cada especie de *Cronobacter* evaluada y con el tamaño de banda esperado según lo reportado por los autores. (Figura 4-9)

Figura 4-9: Evaluación de los iniciadores de manera individual con la enzima Platinum® Blue PCR SuperMix. (LSP Bogotá 2016)



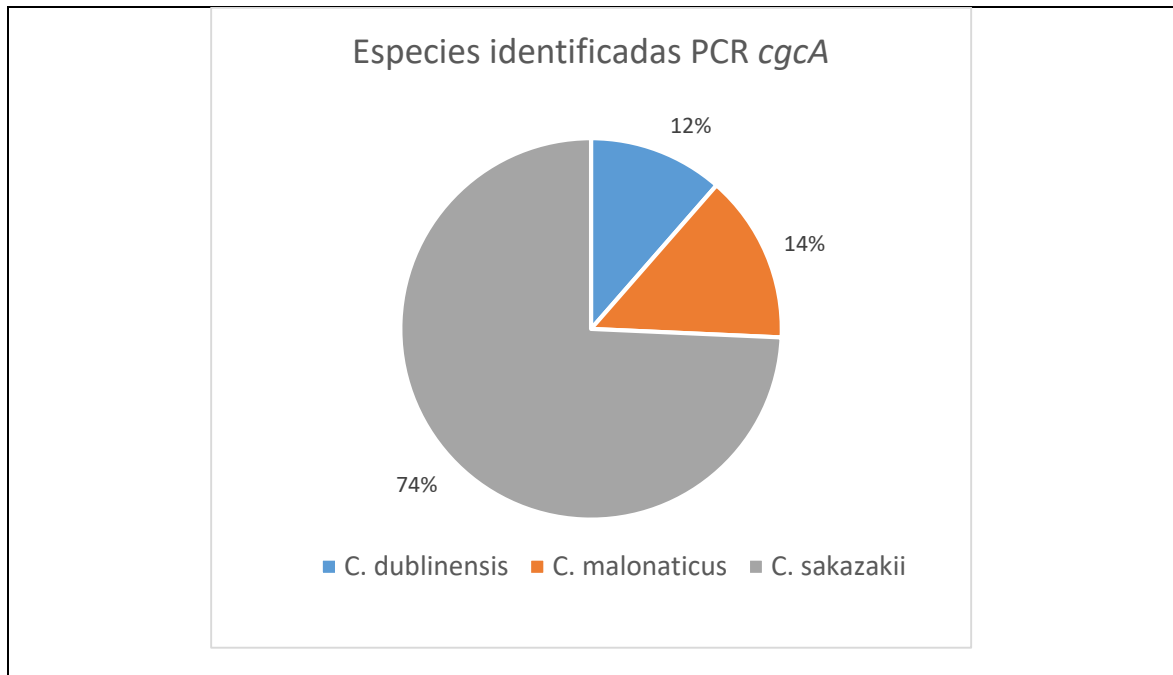
4.3.4 Especies de *Cronobacter* spp

Mediante la metodología de referencia internacional ISO/TS 22964:2006 “*Milk and milk products — Detection of Enterobacter sakazakii*” (27) fueron identificados en total 35 aislamientos como positivos para *Cronobacter* spp, los cuales fueron analizados mediante la metodología de PCR para el gen *cgcA* para identificar la especie correspondiente. Las imágenes correspondientes al análisis por PCR de los aislamientos examinados se encuentran en el Anexo1.

Para todos los aislamientos fue posible identificar la especie de *Cronobacter* spp involucrada. Únicamente se encontraron las especies *C. sakazakii*, *C. malonaticus*

y *C. dublinensis*, siendo *C. sakazakii* la especie de mayor frecuencia con el 74% (n=26) (Ver Figura 4-10).

Figura 4-10: Especies encontradas de Cronobacter spp usando la metodología PCR *cgcA*.



Análisis muestras LSP Bogotá 2016

5. Análisis y discusión de resultados

5.1 Análisis de información de consumo vs localidades seleccionadas para muestreo de féculas de maíz y de plátano.

La encuesta de consumo aplicada en la ciudad de Bogotá permitió identificar las localidades con mayor frecuencia de uso de féculas de maíz y de plátano como alimentos sustitutos de leche materna. Las localidades seleccionadas, coinciden con la información de distribución por estratos socioeconómicos en Bogotá (Tabla 5-1), ya que la mayor cantidad de población está distribuida entre estrato “2-bajo” y “3-medio bajo” con 39.3% y 35.7% respectivamente (34).

Tabla 5-1: Composición por estrato socioeconómico reportado por la Secretaría Distrital de Planeación de Bogotá (35)

Localidad	Estrato socioeconómico predominante	
	Estrato 2	Estrato 3
San Cristóbal	77%	14.7%
Rafael Uribe	50.28%	38.81%
Tunjuelito	57.50%	41.23%
Engativá	69.10%	25.39%
Bosa	87.36%	5.10%

Secretaría Distrital Planeación, 2011

Para este estudio se partió del supuesto de que la mayor cantidad de muestras de reemplazantes de leche materna, tipo féculas de maíz y de plátano, provendrían

de las localidades con población de menor poder adquisitivo, ya que las leches maternizadas por su costo no son de consumo frecuente.

Así, la población expuesta son los estratos 2 y 3 del 90% de las localidades de Bogotá, donde la repetida exposición por consumo (más de una vez por semana) incrementa el riesgo entre la población infantil de menos de un año y lactantes ya que la prevalencia de *Cronobacter* spp es del 35%.

En el análisis de las muestras encontradas demuestra que, para el caso de féculas de maíz (92%) es una sola marca la que abarca el mercado, en el caso de plátano, son 3 marcas de diferentes productores las que abarcan el 92% del mercado y en las “otras Harinas”, una marca comercial abarca el 47% pero los grupos de féculas de plátano y “Otras harinas” son los de mayor variedad de marcas y fabricantes. Estos datos coinciden con las frecuencias y preferencias de consumo encontradas en la encuesta, reafirmando que en las diferentes localidades se consumen estos alimentos para alimentación infantil como sustitutos de leche materna, estas cifras indican que un alto porcentaje de niños lactantes puede estar utilizando estas féculas para alimentación con biberón.

Por lo anterior, la ciudad de Bogotá debería adoptar un modelo de vigilancia activa en la ciudad para prevenir el riesgo de desarrollar enfermedad por exposición por consumo de alimentos infantiles de mala calidad microbiológica (19) y/o con presencia de patógenos como *Cronobacter* spp.

5.2 Evaluación de las muestras con los parámetros normativos colombianos

De acuerdo a los parámetros normativos fue evaluado el concepto (CUMPLE / NO CUMPLE), sin embargo, la evaluación se hizo sin tener en cuenta la presencia de *Cronobacter* spp, debido a que la normatividad no lo incluye.

El 23.5% de las muestras tuvo concepto de NO CUMPLE principalmente por coliformes y de las 35 muestras que fueron positivas para *Cronobacter* spp no todas dieron positivo para coliformes. Por lo anterior, hace falta analizar más muestras de las matrices seleccionadas para establecer una posible relación entre el grupo indicador coliformes y el patógeno, teniendo en cuenta que *Cronobacter* spp es una bacteria que pertenece a las *Enterobacteriaceae* y puede estar presente junto con otros de los microorganismos del grupo coliforme.

Otras características que *Cronobacter* spp tiene, como una gran resistencia a la desecación que le permite sobrevivir dentro de las áreas de producción por varias semanas (20) hace que *Cronobacter* spp pueda sobrevivir a los procesos de elaboración de los deshidratados en polvo como las féculas de maíz y de plátano.

Con respecto a los resultados de *Bacillus cereus* en las muestras, aunque solo 1 muestra no cumplió con el parámetro normativo, hubo 23 muestras más con recuentos (23%) dentro del rango permitido. Reviste de gran importancia la presencia de este grupo patógeno, debido a que incluye especies que causan intoxicaciones alimentarias y que dentro de éste, la principal característica de clasificación es el “termotipo”, que se refiere a la habilidad de crecer a altas o bajas temperaturas (36). Sin embargo, se conoce que las dosis infecciosas de *B. cereus* pueden variar desde 10^5 hasta 10^8 células viables o esporas por gramo, debido en gran medida a las grandes diferencias en las cantidades de enterotoxina producida por las cepas (37)

El grupo *Bacillus cereus* tiene rangos de crecimiento de 15 a 40°C, son cepas genéticamente heterogéneas e incluyen cepas mesófilas y psicrotolerantes, la mayoría de las productoras de toxina emética son mesófilas y las cepas diarreicas tiene como temperatura mínima de crecimiento 7°C. Adicionalmente la resistencia de las esporas se incrementa en alimentos con alto contenido de grasa y en baja actividad de agua (36) (38).

Por todo lo anterior y teniendo en cuenta que el alimento involucrado está dirigido para grupo de edad de lactantes y menores de un año, todos los parámetros

analíticos incluidos en la resolución 1184 de 1984 se convierten en un indicador importante de la calidad microbiológica de los alimentos sin embargo hace falta incluir el indicador de Enterobacterias y definitivamente, el parámetro normativo de la resolución no pone en evidencia el riesgo de la presencia de *Cronobacter* spp, aunque si permite establecer el nivel de riesgo de causar enfermedad por los otros indicadores que actualmente contiene.

5.3 Verificación de metodología de aislamiento e identificación de *Cronobacter* spp

La metodología analítica aplicada para la detección de *Cronobacter* spp en las féculas de maíz y de plátano fue la ISO/TS 22964:2006, desarrollada para leche y derivados lácteos está también recomendada para ambientes de las fábricas productoras de leche en polvo o de fórmulas lácteas infantiles. Como las matrices seleccionadas para el trabajo eran diferentes a las de la metodología analítica, se hizo la verificación comparando la matriz original con las muestras de féculas de maíz y de plátano.

De acuerdo a la evaluación de los medios de cultivo, usando la ISO 11133-2:2012 para este fin, los medios de cultivo alcanzaron las calificaciones satisfactorias para ser usados en la determinación de la presencia de *Cronobacter* spp en las muestras analizadas.

En cuanto a la valoración del caldo Lauril Sulfato Modificado (mLST) el indicador de turbidez (evaluación cualitativa) observada en las repeticiones con la cepa de referencia fue muy baja, de menos de una unidad logarítmica (0.68 Log₁₀) lo cual significa una inhibición de crecimiento del microorganismo y el caldo no logra una buena recuperación, por esta razón, aún en los tubos donde no era apreciable la turbidez se decidió hacer pase a agar cromogénico para *Cronobacter* spp ya que durante la verificación fue posible observar crecimiento de colonias típicas.

Estos resultados coinciden con los resultados reportados por Jackson, E *et al* 2014, en el que no todas las especies de *Cronobacter* spp son capaces de crecer en el caldo mLST y que algunas se inhiben al cultivarlas a 44°C por lo tanto debe extenderse la incubación de 24h a 48h. Se encuentra mejor recuperación si el mismo caldo es incubado a 37°C (24)(39). Sin embargo, este cambio de temperatura de incubación no fue evaluado en este

trabajo, pero sí se detectó la disminuida turbidez que se observó en el caldo de cultivo durante el proceso y se recomienda extender el tiempo de incubación como lo sugieren los autores.

El método ISO/TS 22964:2006 es la única alternativa oficial disponible, sin embargo, hay reportes de que el método pierde algunas cepas incapaces de crecer el caldo mLST a 44°C (10).

Se compararon las recuperaciones en Agua de Peptona Bufferada (BWP) (enriquecimiento no selectivo) obteniéndose recuperaciones muy similares entre ellas y la diferencia obtenida no superó una unidad logarítmica que es lo recomendado.

Comparando la recuperación del método con la matriz original y teniendo como criterio de recuperación el indicado en el Standar Methods 1010B Quality Control (40) entre 70 y 130%, es posible deducir que la metodología no tiene un buen desempeño para la matriz de maíz (33%). El porcentaje total de recuperación total fue de 75.3%, indicando que es un método de baja sensibilidad. Ya al respecto algunos autores habían pronunciado evidenciando de la necesidad de contar con métodos de mayor especificidad y sensibilidad (21) ya que *Cronobacter* spp ha sido encontrado en niveles de <1UFC por 100g de fórmulas lácteas infantiles responsables de infección (41).

En cuanto a la identificación bioquímica usando dos kits de identificación, API20E V 5.0 y RapidID32E V 4.0 los dos de la casa comercial Biomerieux S.A®, se observan perfiles de identificación para la misma cepa contradictorios, la cepa de referencia utilizada fue *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329 de Thermo Scientific®, que fue identificada como *Cronobacter* spp con API20E, mientras que al ser analizada con RapidID32E la cepa no es identificada, el resultado es perfil dudoso con una probabilidad de *Cronobacter sakazakii* de 72%. La herramienta actualmente tiene la capacidad de diferenciar tan solo el género *Cronobacter* spp, pero tienen deficiencia en la clasificación de especies.

5.4 Investigación de *Cronobacter* spp en féculas de maíz y de plátano

La presencia de *Cronobacter* spp en féculas de plátano y otras harinas están de acuerdo con lo reportado por otros autores, en las cuales ha sido determinada la presencia de

Cronobacter spp tal como leche en polvo, carne seca, legumbres, nueces, harinas secas, condimentos, cereales entre otras (3) (15).

De acuerdo a X.Lou *et al*, 2014, el mayor número de aislamientos en su investigación proviene de productos derivados de cereales (63%), lo cual está en concordancia con los resultados de Fridemann 2007, quien asegura que la mayoría de los aislamientos provienen de fuentes de plantas y que coinciden también con los resultados de los análisis en el presente trabajo.

La fécula de plátano fue la matriz con mayor número de aislamientos (51%) positivos para *Cronobacter* spp, actualmente no hay información disponible sobre estudios relacionados para este microorganismo en matrices como esta para realizar comparación, tan solo los reportados en este trabajo.

Con respecto a las féculas de maíz y las “otras harinas”, estudios han reportado que *Cronobacter* spp puede ser encontrado principalmente en plantas utilizadas como alimentos o para la fabricación de los mismos (23). La prevalencia encontrada en derivados de plantas alcanza 20.1%, muestras de hierbas, especias, cereales y derivados, alimentos listos para el consumo, avena entre otros.(23) Inicialmente las fórmulas lácteas infantiles eran consideradas la principal fuente de contaminación, sin embargo, se ha demostrado que hay otras fuentes que sirven como reservorio y rutas de transmisión para *Cronobacter* spp (23).

En las féculas de maíz, durante la verificación del método, se observó baja recuperación. Por consiguiente, la ausencia de *Cronobacter* spp en las muestras de fécula de maíz puede ser atribuida a esta baja sensibilidad de la metodología ISO/TS 22964:2006, mas no se puede afirmar la ausencia de *Cronobacter* spp en las mismas y por tanto, tampoco se puede inferir sobre la seguridad o nivel de riesgo de este alimento hasta tanto no se cuente con una metodología idónea que garantice la recuperación de este microorganismo.

En Colombia es importante comenzar a caracterizar y documentar la presencia de este microorganismo en diferentes alimentos para identificar posibles relaciones con el desarrollo de enfermedad como meningitis o enfermedad diarreica aguda (EDA), eventos a los cuales se les hace seguimiento por ser de interés Salud Pública y los cuales algunas veces son cerrados con diagnósticos inespecíficos.

5.5 Identificación de especies de *Cronobacter* spp

La metodología molecular implementada para la identificación de especies de *Cronobacter* spp por PCR, utilizando el blanco molecular *cgcA* descrito por L. Carter, *et al* 2014 (25) mostró un alto grado de sensibilidad y especificidad, por cuanto permitió identificar todas las especies en los 35 aislamientos presuntivos para *Cronobacter* spp. Adicionalmente, la metodología descrita es de fácil implementación para el control de calidad en la industria de alimentos ya que permite dar mayor alcance al método tradicional confirmando la identidad de la especie, o inclusive, podría ser validada para el análisis directamente desde la matriz de alimento, ya que las tecnologías basadas en PCR están siendo ampliamente utilizadas tanto en el ámbito clínico como en la industria alimentaria.

En este estudio, de las 102 muestras analizadas 35 dieron positivas para la presencia de *Cronobacter* spp, distribuidas en 26 para *Cronobacter sakazakii*, 5 para *Cronobacter malonaticus* y 4 para *Cronobacter dublinensis*. Significa que la frecuencia determinada del 34.3% concuerda con lo reportado por otros autores, Parra, J. y cols 2015 (12) quienes reportan rangos de positividad para leche en polvo entre 3 y 30%(12). Chap. J. *et al* 2009 (42) hicieron un trabajo en diferentes grupos de alimentos encontrando positividad entre el 10 y el 12%(42), Turkovský, I *et al* 2011(29) reportan 41 de 131 muestras de alimentos procesadas encontraron 31.3% aislamientos positivos de *Cronobacter* spp en muestras derivadas de plantas.

Los análisis por Multilocus sequence typing (MLST), han demostrado que solo *Cronobacter sakazakii* cuenta con 55 sequence types (STs) y la clonalidad y prevalencia el ST4 está muy relacionada con meningitis y no con enterocolitis necrotizantes. Los aislamientos de los casos más severos de meningitis siempre son de *C. sakazakii* ST4 (10).

Cronobacter sakazakii, *Cronobacter malonaticus* y *Cronobacter turicensis* han sido las especies asociadas con enfermedad demostrada en humanos y por lo anterior las de mayor importancia clínica, sin embargo, el estándar internacional es ausencia total de *Cronobacter* spp (24)

A pesar de ser descrito como un microorganismo inocuo y oportunista, no mucha información se ha adelantado para establecer el nicho ecológico. Sin embargo, experimentalmente ya ha sido confirmada la asociación de *Cronobacter* spp con plantas (vegetales) y su presencia en alimentos secos se asocia a la incrementada resistencia de

Cronobacter a la desecación (29) . *Cronobacter* spp puede sobrevivir en a_w entre 0.2 y 0.65 y puede sobrevivir hasta por dos años en condiciones de desecación y se multiplica rápidamente después de la hidratación. (21)

Esta información es particularmente importante para el caso de las matrices analizadas, las féculas de maíz, de plátano y las otras harinas, ya que son matrices con bajas disponibilidad de agua, elaboradas con materias primas de origen vegetal y estos alimentos son comercializados para alimentación de niños y adultos, pero no para neonatos y lactantes

Por otra parte, las instrucciones de uso de los polvos indica que debe ser reconstituidos en agua hervida, pero no es clara la temperatura de reconstitución que mínimo debe ser de 70°C por recomendación de la FAO para disminuir el riesgo de infección por microorganismos (42). Es necesario adicionar la recomendación del tiempo que debe mantenerse la temperatura para garantizar que ni *Salmonella* spp no *Cronobacter* spp sobreviven. Para el caso de *Cronobacter* spp se recomienda sostener la temperatura por al menos 1 minuto (43).

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

Se confirma la presencia de *Cronobacter* spp en las féculas de maíz y de plátano distribuidas en la ciudad de Bogotá, lográndose identificar con mayor frecuencia *C. sakazakii*.

Se reporta una incidencia del 34.3% de *Cronobacter* spp para las matrices evaluadas, que sirve como punto de partida para hacer un estudio poblacional en la ciudad de Bogotá.

Al igual que otros autores, se concluye que la metodología analítica ISO/TS 22964:2006 2006 “*Milk and milk products — Detection of Enterobacter sakazakii*” debe ser revisada para reducir los falsos negativos provocados por caldo Lauril Sulfato más vancomicina modificado (mLST).

La ausencia de *Cronobacter* spp en las matrices de maíz usando el método ISO/TS 22964:2006 2006, no puede garantizarse, hasta tanto los porcentajes de recuperación del método no alcancen los valores del Standar Methods 1010B Quality Control.

6.2 Recomendaciones

La difusión de este trabajo en el cuerpo médico de la ciudad es importante para incluir *Cronobacter* spp como posible causa de ETA (Enfermedad Trasmitada por Alimentos).

Se recomienda hacer estudios clínicos que permitan ir correlacionando la presencia de *Cronobacter* spp vs la sintomatología en niños lactantes y menores de un año consumidores de fécula de plátano.

Siendo *C. sakazakii* la especie más recuperada, se recomienda avanzar en un programa de vigilancia epidemiológica de este microorganismo ya que ha estado asociado a las principales causas de enfermedad en niños lactantes y menores de un año.

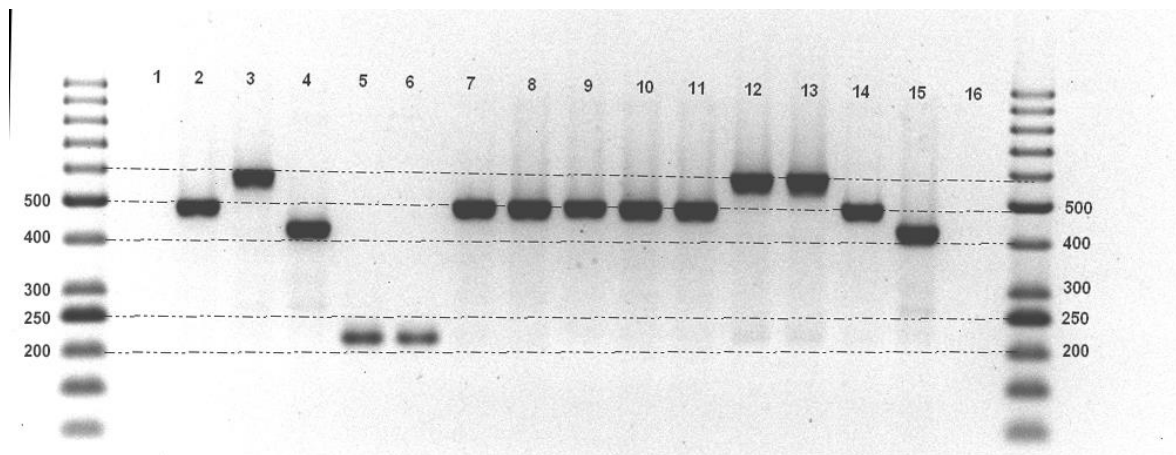
Se plantea trabajar en una prueba analítica, desde la etapa de enriquecimiento no selectivo, para la identificación de *Cronobacter* spp y favorecer las necesidades de la industria de alimentos en cuanto a la vigilancia, la inocuidad y calidad de sus productos.

Se sugiere advertir en los rotulados de los empaques de las féculas informar que la preparación segura debe hacerse en agua a por lo menos 70°C por un minuto, ya que son alimentos que pueden ser usados en alimentación infantil o para adultos mayores.

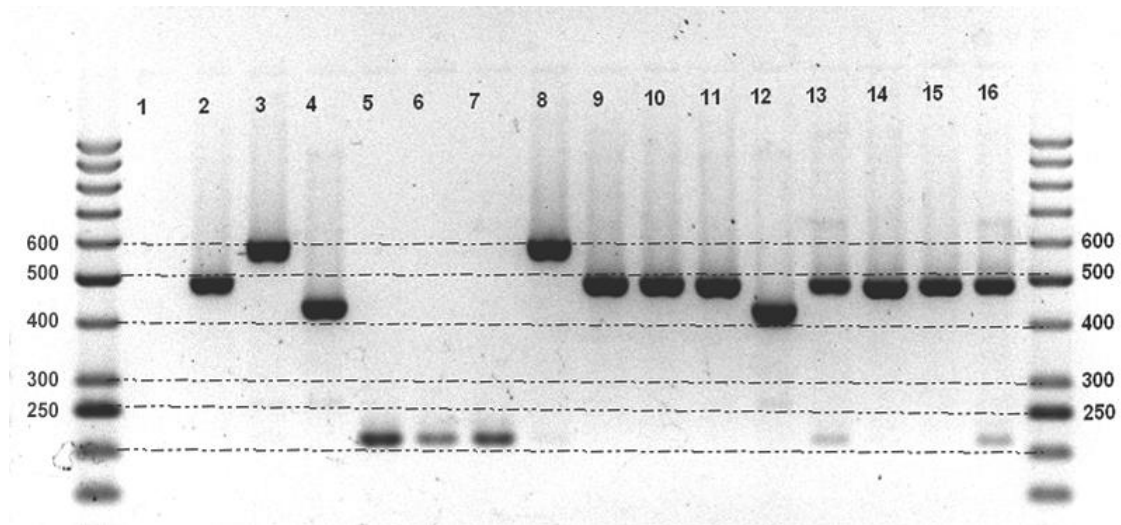
Realizar pruebas adicionales a API20E para confirmación bioquímica de los aislados de *Cronobacter* spp, incluir producción de ácido a partir de dulcitol y utilización de malonato.

A. Anexo: Imágenes correspondientes al análisis por *cgcA* PCR de los aislamientos examinados

Imagen: Resultados *Cronobacter* spp

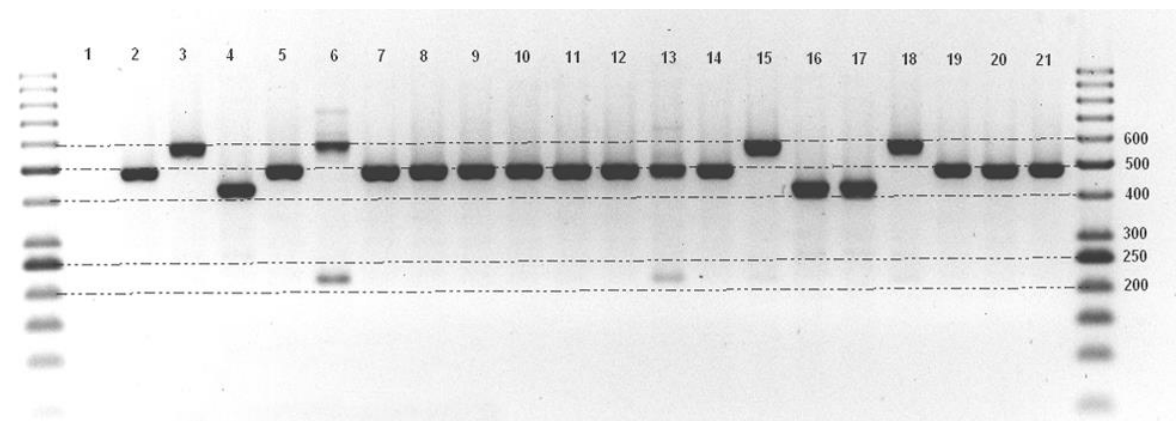


1) NTC, 2) *C sakazakii*, 3) *C. malonaticus*, 4) *C dublinensis* *Dublinensis*, 5) *C turicensis*, 6) Control fortificación. 7 a 11) muestras id. *C sakazakii*, 12 y 13) muestras id *C. malonaticus*, 14) muestra id. *C sakazakii*, 15) muestra id. *C dublinensis*
LSP Bogotá 2016

Imagen: Resultados *Cronobacter* spp muestras

1) NTC, 2) *C sakazakii*, 3) *C. malonaticus*, 4) *C dublinensis Dublinensis*, 5) *C turicensis*, 6) *C. condimentii*, 7) Control fortificación. 8) muestra id. *C. malonaticus*, 9 a 11 y 13 a 16) muestras id. *C sakazakii*, 12) muestra id. *C. dublinensis*.

LSP Bogotá 2016

Imagen: Resultados *Cronobacter* spp muestras

1) NTC, 2) *C sakazakii*, 3) *C. malonaticus*, 4) *C dublinensis Dublinensis*, 5, 7 al 14 y 19 a 21) muestras id. *C sakazakii*, 15 y 18) muestras id. como *C. malonaticus*, 16 y 17) muestras id. *C dublinensis*

LSP Bogotá 2016

Bibliografía

1. World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes: informe de la reunión. 2005;
2. Koletzko B, Shamir R, Ashwell M. Quality and safety aspects of infant nutrition. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Sep 26];60(3):179–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699763>
3. Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Salud IC de BF. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia (ENSIN) 2010. Ministerio de la Protección Social Bogota; 2010. 513 p.
4. Bejarano-Roncancio JJ, Castillo-Quiroga YM. Major microbiological contaminants in infant milk formulas 1. *CienciaUAT*. 2013;25(1):42–8.
5. Bejarano Roncancio JJ. El banco de leche humana y el lactario hospitalario. 2013;2.
6. Bejarano-Roncancio JJ, Castillo-Quiroga YM. Principales contaminantes microbiológicos en formulas lácteas infantiles. *CienciaUAT*. 2014;
7. Lou X, Si G, Yu H, Qi J, Liu T, Fang Z. Possible reservoir and routes of transmission of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) via wheat flour. *Food Control* [Internet]. 2014 Sep [cited 2014 Aug 20];43:258–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514001546>
8. Friedemann M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2014 Sep 26];116(1):1–10. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507000323>
9. Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2003 Nov [cited 2014 Nov 9];14(11):443–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224403001559>
10. Jaradat ZW, Al Mousa W, Elbetieha A, Al Nabulsi A, Tall BD. *Cronobacter* spp.-- opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-

- adaptive traits. *J Med Microbiol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2014 Sep 26];63(Pt 8):1023–37. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84905175338&partnerID=tZOtx3y1>
11. Consuelo Vanegas M, Cristina Rugeles L, Juliana Martínez A. Aislamiento e identificación de *Enterobacter sakazakii* en lactarios de Bogotá, DC. *Infectio*. 2009;13(1):36–42.
 12. Parra J, Oliveras L, Rodríguez A, Riffo F, Jackson E, Forsythe S. Riesgo de contaminación por *Cronobacter Sakazakii* en leches en polvo para la nutrición de lactantes Risk of *Cronobacter Sakazakii* contamination in powdered milk for infant nutrition. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2015;42(4):83–9. Available from: SciELO Chile
 13. Latham MC. *Nutricion Humana en el Mundo en Desarrollo* [Internet]. Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. 2002. p. Capitulo 7. Available from: <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0b.htm#bm11>
 14. Rodríguez P, Pérez E. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de aminoácidos de harina de plátano de dos clones Effect of thermal treatment on content of amino acids of two clones of banana flours Efeito do tratamento térmico no teor de aminoácidos de dois clones de . 2015;28(1):55–62.
 15. Yao K, N'guessan KF, Zinzendorf NY, Kouassi KA, Kouassi KC, Loukou YG, et al. Isolation and characterization of *Cronobacter* spp. from indigenous infant flours sold in public health care centres within Abidjan, Côte d'Ivoire. *Food Control*. 2016;62:224–30.
 16. Kent RM, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C, Paul Ross R. Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients*. 2015;7(2):1217–44.
 17. Pineda-Gómez P, Coral DF, Ramos-Rivera D, Rosales Rivera A. Estudio de las propiedades térmicas de harinas de maíz producidas por tratamiento termico-alcalino. *Ing y Cienc - ing.cienc* [Internet]. 2011;7(14):119–42. Available from: <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/ingciencia/article/view/446>
 18. David C, Tovar G. Producción y procesamiento del maíz en Colombia. *Rev Científica Guillermo Ockham* [Internet]. 2013;11(1):97–110. Available from: http://investigaciones.usbcali.edu.co/ockham/images/volumenes/Volumen11N1/Guillermo11-1_c7.pdf
 19. MINISTERIO DE SALUD. Resolución Número 11488 de 1984.

- 1984;1984(11488):107–19.
20. Yan QQ, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S. Cronobacter species (formerly known as Enterobacter sakazakii) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. J Appl Microbiol [Internet]. 2012 Jul [cited 2014 Nov 19];113(1):1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22420458>
 21. Strydom A, Cawthorn D-M, Cameron M, Witthuhn RC. Species of Cronobacter – A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. Int Dairy J [Internet]. 2012 Dec [cited 2014 Oct 4];27(1–2):3–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612001355>
 22. Pérez J. Enterobacter sakazakii en las fórmulas en polvo para lactantes. 2011 [cited 2014 Nov 19]; Available from: <http://184.168.109.199:8080/xmlui/handle/123456789/628>
 23. Sani NA, Odeyemi OA. Occurrence and prevalence of Cronobacter spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis. Springerplus [Internet]. 2015;4(1):545. Available from: <http://www.springerplus.com/content/4/1/545>
 24. Jackson EE, Sonbol H, Masood N, Forsythe SJ. Genotypic and phenotypic characteristics of Cronobacter species, with particular attention to the newly reclassified species Cronobacter helveticus, Cronobacter pulveris, and Cronobacter zurichensis. Food Microbiol [Internet]. 2014;44:226–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.013>
 25. Carter L, Lindsey L a, Grim CJ, Sathyamoorthy V, Jarvis KG, Gopinath G, et al. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, cgcA, to differentiate species within the genus Cronobacter. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Nov 9];79(2):734–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3553758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 26. Leyva V, Ruiz H, Machín M, Tejedor R, Martino TK, Ferrer Y. Primer estudio de Enterobacter sakazakii en alimentos en Cuba . Vol. 34, Revista Cubana de Salud Pública . scielocu ; 2008. p. 0.
 27. ISO ISO. TS 22964: 2006 (IDF/RM 210: 2006) Milk and Milk Products-Detection of Enterobacter sakazakii. Int Organ Stand Geneva. 2006;

28. ISO D. 11133-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidel Prep Prod Cult media Part. 1.
29. Turcovský I, Kuniková K, Drahovská H, Kaclíková E. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie Van Leeuwenhoek* [Internet]. 2011 Feb [cited 2014 Sep 26];99(2):257–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20640509>
30. Medicine USNL of. National Center for Biotechnology Information [Internet]. [cited 2017 Apr 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
31. Medicine NL of. National center of biotechnology informations NCBI, US National Library of Medicine [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
32. Hall T. BioEdit version 7.2. 5. Ibis Biosci Carlsbad, CA, USA. 2013;
33. Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2009;136(2):165–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.023>
34. Secretaría Distrital de Planeación. Bogotá Ciudad de Estadísticas: Boletín No. 31: Población, vivienda y hogares a junio 30 de 2011, en relación con la estratificación socioeconómica vigente en el 2011. 2011;(31):1–63. Available from: [http://www.sdp.gov.co/portal/page/portal/PortalSDP/InformacionTomaDecisiones/Estadisticas/Bogot? Ciudad de Estad?stic/2011/DICE114-CartillaViHoPe-30062011.pdf](http://www.sdp.gov.co/portal/page/portal/PortalSDP/InformacionTomaDecisiones/Estadisticas/Bogot?Ciudad%20de%20Estad?stic/2011/DICE114-CartillaViHoPe-30062011.pdf)
35. Secretaría Distrital de Planeación. Bogotá Ciudad de Estadísticas: Boletín No. 31: Población, vivienda y hogares a junio 30 de 2011, en relación con la estratificación socioeconómica vigente en el 2011. 2011;(31):1–63.
36. Ministerio de la Protección Social. Perfil de riesgo: *Bacillus cereus* en alimentos listos para el consumo no industrializados. 2011. 15-17 p.
37. Doyle MP, Buchanan RL. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. American Society for Microbiology Press; 2012.
38. Lina-Maria CC. Estudio de caso de una infección por *Bacillus cereus* asociada a la salud humana en una unidad de cuidados intensivos pediátricos en Bogotá. *Vitae*. 2016;23:Suplemento 2.
39. Ye Y, Li H, Wu Q, Zhang J, Lu Y. The *Cronobacter* sp. in milk and dairy products: Detection and typing. *Int J Dairy Technol*. 2014;67(2):167–75.

40. E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton LSC, editor. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2012. 1496 p.
41. Gičová a., Orišková M, Oslanecová L, Drahovská H, Kaclíková E. Identification and characterization of Cronobacter strains isolated from powdered infant foods. *Lett Appl Microbiol.* 2014;58(3):242–7.
42. 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 [Internet]*. 2009 Dec 31 [cited 2014 Oct 14];136(2):185–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729216>
43. Yang H-Y, Kim S-K, Choi S-Y, You D-H, Lee S-C, Bang W-S, et al. Effect of acid, desiccation and heat stresses on the viability of Cronobacter sakazakii during rehydration of powdered infant formula and in simulated gastric fluid. *Food Control [Internet]*. 2015 Apr [cited 2014 Oct 18];50:336–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514005180>