

## Detección de *Cronobacter* spp. mediante el uso del sistema Innovate™ y el kit RapiScreen™ para productos lácteos

### Introducción

Las especies de *Cronobacter* son bacterias gramnegativas que se encuentran de forma natural en el entorno. *Cronobacter* puede sobrevivir en alimentos secos, como leche de fórmula para bebés, bebidas en polvo, té herbales y almidones, incluso en un proceso de desecado. Se sabe que causan infecciones graves y a menudo potencialmente mortales en bebés.

Para minimizar el riesgo, es vital comprobar el producto final en busca de contaminación por microorganismos. El sistema de detección rápida de microbios Innovate™ está diseñado para ofrecer una detección rápida de microorganismos para una amplia gama de productos, que incluye la leche y la leche de fórmula para bebés. Para detectar unos niveles muy bajos de contaminantes en estos tipos de productos, se requiere un paso de enriquecimiento para garantizar que haya suficiente ATP para la detección. Normalmente, un producto se incuba en su propio envase para enriquecer el ATP con cualquier célula microbiana contaminante. Las bases de referencia preestablecidas obtenidas del producto no contaminado se utilizan para determinar unos resultados positivos.

### Objetivo

El objetivo de este estudio fue validar el sistema Innovate con el kit RapiScreen™ para productos lácteos para la detección de *Cronobacter muytjensii* y *Cronobacter sakazakii* en diferentes productos de leche de avena para demostrar la equivalencia con las técnicas de placa tradicionales.

### Equipos, suministros y reactivos

- Circuitos de inoculación estériles
- Pipetas y puntas estériles
- Incubadoras capaces de alcanzar 30 o 35 ± 2 °C
- Toallitas con alcohol
- Kit RapiScreen para productos lácteos (incluye reactivos, viales de polipropileno (PP) viales, microplacas)
- Agar de dextrosa de patata (ADP)
- Placas de agar de soja tréptica (AST)
- Caldo de soja tréptica (CST)
- Medidor de pH y electrodos (es decir, sensores InLab® de Mettler-Toledo)
- Sistema de bolsa para la generación de gas anaeróbico Gas Pak™ EZ con indicador
- Jeringas de 1 ml y 3 ml
- Solución salina con tampón de fosfato de Dulbecco - DPBS (1X)
- Pasta para calzado, recubrimiento de reparación y protección transparente para calzado
- Agujas deslizantes de precisión, calibre 16 1/2"
- Control positivo de ATP
- Instrumento del sistema Innovate

### Pruebas de organismos y productos

- Microorganismos
  - *Cronobacter muytjensii*, ATCC n.º 51329
  - *Cronobacter sakazakii*, ATCC n.º 29544
- Tipos de productos lácteos comprobados
  - Leche con chocolate ESL
  - ESL con un contenido bajo de grasa ESL
  - Leche original ESL
  - Leche para restauración UHT
  - Leche con chocolate UHT
  - Leche original UHT

### Métodos

Se prepararon cultivos de *Cronobacter* mediante la rehidratación de gránulos ATCC, marcándolos en placas TSA y manteniendo el cultivo a la temperatura adecuada ( $30 \pm 1$  °C y  $35 \pm 1$  °C, respectivamente, para *C. muytjensii* y *C. sakazakii*). Se seleccionaron las colonias y se prepararon series de diluciones entre diez en DPBS y se prepararon recuentos de placas para identificar una concentración de <100 UFC.

Para determinar los niveles de la base de referencia de ATP, cada producto de leche se incubó inicialmente durante 48 horas a 32 °C. Las muestras se mezclaron y se transfirieron 25 ml de cada producto a un contenedor estéril para su comprobación. Se completaron tanto las pruebas de pH como la base inicial/base de referencia con el kit RapiScreen para productos lácteos.

Una vez establecidas las bases de referencia y preparados los cultivos, se inoculó cada uno de los productos por triplicado con <100 UFC por contenedor (también se inocularon niveles de espícula altos a efectos de comparación). Los microorganismos se inocularon con espícula con una jeringa a través de la parte superior el contenedor sellado con pasta para calzado. Se incubó un contenedor no inoculado con cada juego inoculado como un control negativo. Se establecieron controles positivos mediante la inoculación de caldo de soja tréptica. Se incubaron muestras para *C. muytjensii* a  $30 \pm 1$  °C, mientras que se incubaron muestras para *C. sakazakii* a  $35 \pm 1$  °C durante un total de dos días. En los días 1 y 2, se obtuvieron alícuotas de cada contenedor y se comprobaron en el sistema Innovate con el kit RapiScreen para productos lácteos. En paralelo, se inocularon 10 µl de cada muestra de producto en las placas TSA y se incubaron durante 24 horas para confirmar el crecimiento y la morfología.

### Resultados

En todos los tipos de leche comprobados, el aumento de los niveles altos y bajos de espícula de *especies de Cronobacter* se detectó después de 24 horas de incubación con el sistema Innovate y el kit RapiScreen para productos lácteos (Tablas 1 y 2). Los valores de RLU típicos fluctuaron entre 40 000 y 175 000, demostrando un crecimiento y producción de ATP sólidos, incluso con una inoculación de espícula <100 UFC. Los controles no inoculados tenían valores de referencia comprendidos entre 6 y 25 UFC, típicos para productos UHT y ESL procesados correctamente.

En contraste, la detección de *Cronobacter* en placas no se observó hasta después de 48 horas de incubación. Todas las muestras positivas en el sistema Innovate confirmaron el crecimiento en las placas de cultivo, incluso en aquellas con niveles de espícula bajos (<100 UFC). Incluso los cultivos con niveles altos de espícula no se confirmaron hasta pasadas 48 horas. Este método estándar no confirmó la contaminación a 24 horas en ningún tipo de muestra, incluso con el sistema Innovate y el kit RapiScreen para productos lácteos.

**Tabla 1.** Detección de *Cronobacter muytjensii* en diferentes tipos de productos de leche de avena



Detección de <i>C. mytjensii</i> (horas)				
Tipo de producto	Sistema Innovate		Placas	
	Espícula UFC alta	Espícula UFC baja	Espícula UFC alta	Espícula UFC baja
Original ESL	24 h	24 h	48 h	48 h
Original UHT	24 h	24 h	48 h	48 h
Chocolate ESL	ND	24 h	ND	48 h
Contenido de grasa bajo ESL	ND	24 h	ND	48 h
Para restauración UHT	ND	24 h	ND	48 h
Chocolate UHT	ND	24 h	ND	48 h
No inoculado	-	-	-	-

**Tabla 2.** Detección de *Cronobacter sakazakii* en diferentes tipos de productos de leche de avena

Detección de <i>C. sakazakii</i> (horas)				
Tipo de producto	Sistema Innovate		Placas	
	Espícula UFC alta	Espícula UFC baja	Espícula UFC alta	Espícula UFC baja
Original ESL	24 h	24 h	48 h	48 h
Original UHT	24 h	24 h	48 h	48 h
Chocolate ESL	ND	24 h	ND	48 h
Contenido de grasa bajo ESL	ND	24 h	ND	48 h
Para restauración UHT	ND	24 h	ND	48 h
Chocolate UHT	ND	24 h	ND	48 h
No inoculado	-	-	-	-

### Conclusiones

Tal como se muestra en las tablas anteriores (Tablas 1 y 2), tanto *C. mytjensii* como *C. sakazakii* se detectaron con el sistema Innovate después de 24 horas de incubación en todos los productos inoculados con los organismos. Para el método de placas tradicional, se obtuvieron resultados positivos después de 48 horas para todas las muestras comprobadas.

Los resultados de crecimiento del día 3 y posteriores no se completaron debido al crecimiento excesivo para ambos organismos en todos los productos. Para el día 2, todos los contenedores de productos se hincharon. Debido a esto, los contenedores se desecharon después del día 2 para evitar el riesgo de estallido de los productos en el interior de la incubadora. De forma similar, solo los niveles bajos de espícula para los tipos chocolate ESL, contenido de grasa bajo ESL, leche para restauración UHT y leche con chocolate UHT se comprobaron debido al rápido crecimiento de ambos organismos en todos los productos de leche de avena.



## Resumen

El procesamiento aséptico de los productos de leche de avena puede ayudar a reducir el riesgo de contaminación microbiana de los productos. Esto queda mostrado claramente en los valores de línea de base bajos para la detección de ATP en muestras no inoculadas. Además, fue posible detectar la contaminación por *Cronobacter* en niveles bajos (<100 UFC por contenedor) a las 24 horas mediante el uso del sistema Innovate y el kit RapiScreen para productos lácteos. Esto supone una mejora de 24 horas en comparación con la detección mediante el uso de métodos de placas estándar, verificando así que el sistema de detección microbiana rápida Innovate supera el rendimiento del método de referencia cuando se emplea para la detección de *Cronobacter*.

Tomando como base estos resultados, Hygiena® recomienda el uso del sistema Innovate para la detección de nivel bajos de *Cronobacter* en productos lácteos UHT y ESL.