



## DetECCIÓN DE *Cronobacter sakazakii* EN BEBIDAS BASADAS EN SOJA MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA INNOVATE™ Y EL KIT RAPISCREEN™ PARA PRODUCTOS LÁCTEOS

### Introducción

*Cronobacter sakazakii* es una bacteria móvil, gramnegativa, sin formación de esporas, coliforme y con forma de varilla, de la familia *Enterobacteriaceae*, género *Cronobacter*. Ha estado implicada en brotes de enfermedades neonatales (bebés prematuros), en casos aislados de personas gravemente inmunocomprometidas y en ancianos, pero rara vez causa enfermedades en adultos sanos. *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.

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 sakazakii* en diferentes bebidas de proteínas a base de soja 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  $35 \pm 2$  °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 tríptica (AST)
- Caldo de soja tríptica (CST)
- Medidor de pH y electrodos (es decir, sensores InLab<sup>®</sup> de Mettler-Toledo)
- 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
- Aguja deslizante de precisión, calibre 16 1/2"
- Control positivo de ATP
- Instrumento del sistema Innovate

### Pruebas de organismos y productos

- Microorganismos
  - *Cronobacter sakazakii*, ATCC n.º 29544
- Tipos de productos lácteos comprobados
  - Bebida de proteínas completa a base de soja, chocolate
  - Bebida de proteínas completa a base de soja, vainilla
  - Batido UHT a base de soja, chocolate
  - Batido UHT a base de soja, vainilla



## Métodos

### 1. Cultivos

Los cultivos de *Cronobacter sakazakii* se prepararon con placas de organismos liofilizados en placas TSA. Se prepararon cultivos en CST durante 24 horas a  $35 \pm 1$  °C. A continuación, se estableció una dilución en serie entre 10 con DPBS, y se prepararon recuentos de placas en placas de CST para detectar una concentración de <100 UFC. El inóculo real para el organismo utilizado durante la inoculación de espícula se determinó por duplicado en placas TSA. Las placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C y el recuento se realizó después de 24 horas.

### 2. Evaluaciones de pH

Los productos para los que se evaluó el pH se midieron por triplicado para garantizar la precisión de las mediciones. El medidor de pH utilizado para la medición de productos se calibró antes de su uso. Esto demostró que no era necesario realizar más pruebas para confirmar que el kit RapiScreen para productos lácteos era capaz de neutralizar los productos suficientemente.

### 3. Determinación de RLU inicial y de referencia

Para determinar los niveles de la base de referencia de ATP, cada producto se incubó inicialmente durante 24 horas a 37 °C. Las muestras se mezclaron cuidadosamente y se transfirieron 20 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.

El nivel inicial de ATP de cada producto se determinó mediante la ejecución de un ensayo utilizando una solución de búfer ATS en lugar de reactivo ATX reconstituido. A continuación, se repitió el uso de ATX reconstituido para permitir el vaciado de la señal inicial de ATP. Estos resultados hacen referencia a los valores iniciales de RLU. Los valores de referencia de RLU deberían ser bajos y consistentes, demostrando que la señal inicial de RLU se ha vaciado por completo. Un valor de referencia y estable de RLU permite ajustar un umbral (positivo/negativo) para el valor de corte de identificación de las muestras contaminadas.

- Protocolo de base de referencia: Dispensar 60 µl de ATX – Agitar durante 10 minutos – Seguir las instrucciones del kit RapiScreen para productos lácteos para la detección
- Protocolo inicial: Dispensar 60 µl de solución tampón ATX – Agitar durante 10 minutos – Seguir las instrucciones del kit RapiScreen para productos lácteos para la detección

Una vez establecidas las bases de referencia y preparados los cultivos, se inoculó cada uno de los productos por duplicado con <100 UFC por contenedor. Los microorganismos se inocularon con espícula con una jeringa a través de la parte superior el contenedor sellado con cola en 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 TSB o DPBS con 100 µl del cultivo <100 UFC.

Las muestras se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante un periodo de hasta siete días. En los días 1-7, se obtuvieron alícuotas de cada contenedor y se comprobaron en el sistema Innovate con el kit RapiScreen para productos lácteos. En paralelo, cada día, se inocularon 10 µl de cada muestra de producto en las placas TSA y se incubaron durante 24 horas a  $35 \pm 2$  °C para confirmar el crecimiento y la morfología.

## Resultados

En todos los tipos de bebidas comprobados, el aumento de los niveles de espícula de *Cronobacter sakazakii* se detectó después de 24 horas de incubación con el sistema Innovate y el kit RapiScreen para productos lácteos (Tabla 1). Los valores de RLU fluctuaron entre 1600 y más de 81 000, demostrando un crecimiento y producción de ATP sólidos, incluso con una inoculación de espícula <100 UFC. No se obtuvo ningún dato después del día 3

en ninguno de los cuatro productos inoculados debido a una fuga del producto, como resultado de una formación excesiva de gas. Todos los resultados positivos del sistema Innovate se confirmaron marcando los productos en TSA. Los controles no inoculados tenían valores de referencia comprendidos entre 3 y 14 UFC, típicos para productos UHT procesados correctamente.

**Tabla 1.** Detección de *Cronobacter sakazakii* en diferentes bebidas elaboradas con soja

Base inicial del producto: N/A		Base de referencia del producto: N/A		Umbral: N/A						
<i>C. sakazakii</i>	Inóculo objetivo	Inóculo real	Confirmación Resultado de la placa	Días: Valor RLU (medio)						
	N.º células UFC	N.º células UFC		1	2	3	4	5	6	7
Chocolate a base de soja (CBS)	<100	90	Crecimiento	4379	2861	1601	Fuga*	Fuga	Fuga	Fuga
Vainilla a base de soja (VBS)	<100	90	Crecimiento	32269	45726	8208	Fuga	Fuga	Fuga	Fuga
Chocolate UHT (CU)	<100	90	Crecimiento	31496	31367	Fuga	Fuga	Fuga	Fuga	Fuga
Vainilla UHT (VU)	<100	90	Crecimiento	65270	81627	5553	Fuga	Fuga	Fuga	Fuga
Panel vacío	Inóculo objetivo	Inóculo real	Confirmación Resultado de la placa	1	2	3	4	5	6	7
<i>Control negativo CBS: 35 °C</i>	0	0	Negativo	5	4	4	4	6	4	5
<i>Control negativo VBS: 35 °C</i>	0	0	Negativo	13	11	10	12	12	14	14
<i>Control negativo CU: 35 °C</i>	0	0	Negativo	5	5	3	5	6	4	4
<i>Control negativo VU: 35 °C</i>	0	0	Negativo	12	10	9	8	12	11	11

\*Fuga: producción de gas del organismo que provoca que el contenedor del producto explote o tenga fugas.

### Conclusiones

Tal como se muestra en la tabla anterior (Tabla 1), se detectó *C. sakazakii* mediante el uso del sistema Innovate y el kit RapiScreen para productos lácteos después de 24 horas de incubación en todos los productos con espícula. Para el método de placas tradicional, se obtuvieron resultados positivos para todas las muestras comprobadas, con la morfología esperada.

Los resultados de crecimiento del día 4 y posteriores no se completaron en productos inoculados debido al crecimiento excesivo del organismo en todos los productos. El día 3, todos los contenedores de productos se hincharon y el día 4 se observaron fugas debidas a una producción excesiva de gas, un indicio de crecimiento de los organismos.



## Resumen

El procesamiento aséptico de los productos de bebidas a base de soja 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 sakazakii* en niveles bajos (<100 UFC por contenedor) a las 24 horas mediante el uso del sistema Innovate y el kit RapiScreen para productos lácteos. De hecho, se detectaron unos valores de RLU muy altos de *C. sakazakii* en proteína completa a base de soja (chocolate), vainilla a base de soja, vainilla UHT y chocolate UHT, validando la utilidad del sistema Innovate para detectar *C. sakazakii* en todos estos tipos de productos.

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