



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN
CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

**EVALUACIÓN DE ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN EL
DESARROLLO DE *CRONOBACTER SAKAZAKII* EN FÓRMULAS LÁCTEAS
INFANTILES**

Trabajo de Grado de Maestría presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela por la Lic. Maribel E Petrola Ch.
para optar por el título de Magister Scientiarum en Ciencia y
Tecnología de Alimentos.
Tutores: Mc. Amaury Martínez y Dra. Teresita Luigi

Caracas, Venezuela

Marzo, 2012

CONSTANCIA DE CERTIFICACIÓN DE TUTORES

Nosotros, Amaury Martínez y Teresita Luigi por medio de la presente certificamos que hemos tenido conocimiento del trabajo de investigación que lleva por título: “Evaluación de algunos factores que afectan el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles”, desde su inicio hasta su culminación. Consideramos que el presente estudio reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

Mc Martínez Amaury

Dra Luigi Teresita

ACTA DE EVALUACIÓN.

Los abajo firmantes, hacemos constar que hemos actuado como jurado examinador del trabajo titulado: Evaluación de algunos factores que afectan el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles, realizado por la Licenciada Maribel Petrola.

Luego de su evaluación, consideramos que reúne los requisitos de mérito para su aprobación.

Nombre:

C.I:

Nombre:

C.I:

OBSERVACIONES: _____

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- OBJETIVOS	4
III.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
3.1.- Características de <i>Cronobacter sakazakii</i>	5
3.2.- Reservorio de <i>Cronobacter sakazakii</i>	8
3.3.- Tolerancia a la temperatura y desecación de <i>Cronobacter sakazakii</i>	11
3.4.- Modo de transmisión de <i>Cronobacter sakazakii</i> .	12
3.5.- Patogenicidad y virulencia de <i>Cronobacter sakazakii</i>	14
3.6.- Brotes epidémicos y casos aislados de <i>Cronobacter sakazakii</i>	16
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1.-Población	17
4.2.- Muestras.	17
4.3.- Cepa utilizada en el procedimiento metodológico	17
4.4.- Obtención de las muestras.	17
4.5.- Comprobación de la pureza de la cepa de <i>Cronobacter sakazakii</i>	18
4.6.- Control negativo de las muestras para <i>Cronobacter sakazakii</i>	18
4.7.- Curva de crecimiento de <i>Cronobacter sakazakii</i> .	18
4.8.- Inoculación artificial de las fórmulas lácteas infantiles con <i>Cronobacter sakazakii</i>	19
4.9.- Evaluación del efecto de la temperatura de reconstitución de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i>	19
4.10.- Evaluación de la influencia del período de retención de la fórmula	20

previa alimentación en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i>	
4.11.- Evaluación del efecto de la temperatura de refrigeración de la fórmula láctea infantil reconstituida en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i>	20
4.12.- Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula láctea reconstituida y del tiempo y temperatura de alimentación en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i>	20
V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.	21
5.1.- Comprobación de la pureza de la cepa de <i>Cronobacter sakazakii</i>	21
5.2.- Control negativo de las muestras para <i>Cronobacter sakazakii</i>	22
5.3.- Curva de crecimiento de <i>Cronobacter sakazakii</i> .	22
5.4.- Evaluación del efecto de la temperatura de reconstitución y período de retención de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i>	23
5.5.- Evaluación del efecto de la temperatura de refrigeración de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazaki</i>	28
5.6.- Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula infantil reconstituida y del período y temperatura de alimentación en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i> .	30
VI.- CONCLUSIONES.	35
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	36
VIII.- ANEXOS	43

INDICE DE TABLAS

Número de tabla	Descripción	Página
1	Evaluación del efecto de la temperatura de reconstitución y período de retención de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i>	27
2	Evaluación del efecto de la temperatura de refrigeración de la fórmula láctea infantil reconstituida en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i>	29
3	Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula infantil reconstituida y del período de alimentación en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i> utilizando una temperatura de alimentación de 20°C.	32
4	Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula infantil reconstituida y del período de alimentación en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i> utilizando una temperatura de alimentación de 24°C.	33
5	Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula infantil reconstituida y del período de alimentación en el desarrollo de <i>Cronobacter sakazakii</i> utilizando una temperatura de alimentación de 37°C.	34

INDICE DE FIGURAS.

Número de figura.	Descripción	Página
1	<i>Cronobacter sakazakii</i> en agar Cromogénico para <i>Cronobacter salazakii</i> .	21
2	Curva de crecimiento exponencial para <i>Cronobacter sakazakii</i>	23

INDICE DE ANEXOS

Número de anexo	Descripción	Página
1	Reacciones bioquímicas de las 57 cepas de <i>Enterobacter sakazakii</i> incluyendo una cepa tipo y una de <i>Enterobacter cloacae</i> .	43
2	Características de los 15 biogrupos reconocidos entre 57 cepas de <i>E. sakazakii</i> estudiadas.	45
3	Diferenciación bioquímica de <i>E. sakazakii</i> 16S rDNA clusters	46
4	Casos aislados de infección de <i>Cronobacter sakazakii</i>	47
5	Brotos epidémicos de infección por <i>Cronobacter sakazakii</i> .	48

RESUMEN

EVALUACIÓN DE ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE *CRONOBACTER SAKAZAKII* EN FÓRMULAS LÁCTEAS INFANTILES

Autor: Lic. Maribel Petrola

Tutores: Mc. Amaury Martínez y Dra. Teresita Luigi

Realizado en: Universidad Central de Venezuela (UCV). Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). Fase experimental realizada en la Universidad de Carabobo (UC). Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud. Financiado por: CDCH-UCV.

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un problema sanitario mundial. Entre los alimentos que sirven como vehículos, las fórmulas lácteas infantiles (FLI) constituyen un problema significativo. De los agentes etiológicos transmitidos por FLI destaca, *Cronobacter sakazakii*; asociándose a patologías como meningitis y septicemia. El objetivo de la presente investigación fue evaluar algunos factores que afectan el desarrollo de *C. sakazakii* en FLI; la temperatura de reconstitución de la fórmula, el período y temperatura de retención de la fórmula, temperatura de refrigeración de la fórmula reconstituida, recalentamiento de la fórmula previa alimentación y, el período y temperatura de alimentación. Para esto se contaminaron las muestras de FLI reconstituidas con tres niveles de inóculo de *C. sakazakii* (10^2 , 10^4 y 10^6 Cél/mL). En la presente investigación la temperatura de reconstitución de la FLI resultó ser un factor determinante en el desarrollo de *C. sakazakii*; al utilizar temperaturas de reconstitución de 50 y 60°C, se logró una inactivación del microorganismo; sin embargo, al utilizar temperaturas menores, no se logró la inactivación del mismo. Con respecto al tiempo y temperatura de retención de la fórmula, existió un aumento de la carga de *C. sakazakii* cuando la fórmula fue retenida a temperatura ambiente durante cuatro horas; sin embargo, cuando fue retenida a 4°C hasta cuatro horas no se observaron cambios en la carga bacteriana; por ende, la temperatura y tiempo de retención de la FLI reconstituida sí son factores determinantes en el desarrollo de *C. sakazakii*; mientras que; la temperatura de refrigeración de la FLI reconstituida y el tiempo y temperatura de alimentación no resultaron ser determinantes en el desarrollo de *C. sakazakii* siempre y cuando dicha fórmula sea recalentada hasta 37°C previa alimentación.

Palabras clave: Fórmula Láctea Infantil, *Cronobacter sakazakii*.

ABSTRACT

EVALUATION OF SOME FACTORS AFFECTING THE DEVELOPMENT OF *CRONOBACTER SAKAZAKII* IN INFANT FORMULAS

Foodborne diseases are a global health problem. Among the foods that serve as vehicles, infant milk formulas (IF) is a significant problem. Etiological agents transmitted by IF stands, *Cronobacter sakazakii*; associating with diseases such as meningitis and septicemia. The aim of this study was to evaluate factors affecting the development of *C. sakazakii* in IF; the reconstitution temperature of the formula, the temperature and retention time of the formula, cooling temperature of the formula reconstituted prior heating of the formula feed and the feeding period and temperature. For this IF contaminated samples reconstituted with three levels of inoculum of *C. sakazakii* (10^2 , 10^4 and 10^6 cells / mL). In the present investigation the temperature of reconstitution of the IF was found to be a determining factor in the development of *C. sakazakii*; reconstitution using temperatures of 50 and 60 ° C, achieved a microorganism inactivation, however, to use lower temperatures, no inactivation was achieved thereof. With respect to the retention time and temperature of the formula, there was an increased load of *C. sakazakii* when the formulation was held at room temperature for four hours, but when it was held at 4 ° C until four hours no change in bacterial load, thus the temperature and retention time of the reconstituted IF themselves are determinants in the development of *C. sakazakii*, while, the cooling temperature and time IF reconstituted feed temperature and proved not to be crucial in the development of *C. sakazakii* provided that the formula be reheated to 37 ° C after feeding.

Key words: Infant Formulas, *Cronobacter sakazakii*

I.- INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades producidas por agentes infecciosos que se transmiten al ser humano por vía oral, mediante el consumo de alimentos o aguas contaminadas, constituyen un problema sanitario mundial, siendo los niños menores de un año, los ancianos y las mujeres embarazadas la población más susceptible. Estas enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), incluidas las intoxicaciones e infecciones, son patologías producidas por la ingestión de productos alimenticios y/o agua que contengan agentes etiológicos en cantidades tales, que afecten la salud del consumidor a escala individual o de grupos poblacionales (Díaz y col., 2003; Unicomb, 2003).

La importancia de los alimentos como vehículos claves en la etiología de estas infecciones ha sido ampliamente reconocida, así como también está claramente establecido que las mismas pueden variar en su sintomatología, desde cursar en forma asintomática hasta producir la muerte. De esta manera, los riesgos de las ETAs dependen de la preparación, manipulación y almacenamiento de los alimentos, de la calidad de las materias primas, de los hábitos alimentarios y de la producción animal intensiva con alimentos balanceados contaminados (Nassib, 2003).

Existe una gran diversidad de alimentos de origen animal que sirven como vehículo de transmisión de las ETAs, dentro de los cuales se incluye la leche y todos sus derivados; siendo frecuentemente asociados con la diseminación de estas enfermedades, puesto que no son estériles y aunque la pasteurización ha sido un elemento fundamental para la dramática disminución de las enfermedades infecciosas

ligadas al consumo de este tipo de alimentos, las epidemias asociadas al consumo de los mismos, han continuado sucediéndose (Nassib, 2003).

En el caso específico de la contaminación de las fórmulas lácteas infantiles, es necesario destacar que constituye un problema significativo, no solamente por ser un vehículo importante de distribución de las ETAs, sino también, por afectar a un grupo poblacional altamente susceptible a las infecciones. Entre los agentes etiológicos que pueden ser transmitidos por fórmulas lácteas infantiles y que comúnmente pueden causar intoxicación o infección alimentaria se encuentran miembros de la familia *Enterobacteriaceae*; entre los cuales se destaca, *Cronobacter sakazakii* (FAO/WHO, 2006).

En este orden de ideas, las fórmulas lácteas infantiles han sido reconocidas como una importante fuente de infección por *C. sakazakii*, especialmente en hospitales, ya que, generalmente se preparan simultáneamente todas las fórmulas que van a ser utilizadas durante todo un día, sumando el hecho que las instrucciones de preparación no siempre se siguen correctamente (Jacobs y col., 2011); siendo necesario destacar que las patologías más frecuentes causadas por éste microorganismo son: septicemia, meningitis, cerebritis, infecciones de las vías urinarias y enterocolitis necrotizante (FAO/WHO, 2004).

Como se mencionó anteriormente, *Cronobacter sakazakii* es un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo con motilidad peritrica y no esporulado. Este

microorganismo fue llamado inicialmente *Enterobacter cloacae* productor de pigmento amarillo; sin embargo, en el año 1980 se clasificó como *Enterobacter sakazakii*, en base a diferencias obtenidas mediante pruebas de hibridación de ADN, reacciones químicas, producción de pigmento y susceptibilidad a antibióticos, con respecto al *Enterobacter cloacae* (Drudy y col., 2006). Por último, para el año 2007 el microorganismo en cuestión fue nuevamente reclasificado como un nuevo género, “*Cronobacter*”, el cual consta de cinco especies basadas en diferencias genotípicas y fenotípicas (Iversen y col., 2004; Cawthorn y col., 2008; Iversen y col., 2007). Estas especies del género *Cronobacter* serían hasta la fecha; *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* y *C. dublinensis* (Forsythe, 2010).

II.- OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar algunos factores que afectan el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles.

Objetivos específicos

.- Determinar el efecto de la temperatura de reconstitución de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

.- Analizar la influencia del período de retención de la fórmula láctea infantil reconstituida previa alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

.- Examinar la influencia de la temperatura de retención de la fórmula láctea infantil reconstituida previa alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*

.- Determinar el efecto de la temperatura de refrigeración de la fórmula láctea infantil reconstituida en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

.- Examinar la influencia del recalentamiento de la fórmula láctea infantil reconstituida previa alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

.- Examinar la influencia del período de alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles reconstituidas.

.- Evaluar la influencia de la temperatura de alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles reconstituidas.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

3.1.- Características de *Cronobacter sakazakii*.

Cronobacter sakazakii es un bacilo Gram negativo con un tamaño de 3 µm de largo y 1µm de ancho aproximadamente, posee motilidad peritrica y no es esporulado. Con respecto a su nutrición y crecimiento, Farmer y col., 1980 demostraron utilizando 57 cepas de *C. sakazakii* (para esa fecha denominado *Enterobacter sakazakii*), que el microorganismo es capaz de crecer utilizando el citrato como única fuente de carbono, sin ningún requerimiento obvio de vitaminas, aminoácidos u otros factores de crecimiento. Todas las 57 cepas utilizadas en dicha investigación crecieron a 25, 36 y 45°C, 50 de ellas crecieron a 47°C; sin embargo, ninguna de las cepas creció a 4°C ni a 50°C; resultando ser una bacteria anaeróbica facultativa ya que, crece tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas (Farmer y col., 1980).

Estos mismos autores demostraron que todas las cepas (57 en total) de *E. sakazakii* (actualmente denominado *C. sakazakii*) crecieron rápidamente en agar tripticasa soya, formando colonias de 2 a 3 mm de diámetro luego de 24 horas de incubación a 36°C; mientras que, si se incubaban a 25°C por 24 horas, las colonias resultaron ser de 1 a 1,5 mm de diámetro y de 2 a 3 mm si se incubaban por 48 horas a 25°C. Las colonias resultaron ser amarillas brillantes luego de 48 horas de incubación a 25°C, pero la producción del pigmento amarillo disminuyó en gran medida a 36°C. Los resultados obtenidos en cuanto a las reacciones bioquímicas de

las 57 cepas de *E. sakazakii* utilizadas en la investigación antes mencionada, se muestran en el Anexo 1.

Farmer y col., (1980) basados en la caracterización bioquímica de las 57 cepas de *E. sakazakii*, describieron 15 subgrupos definidos por los resultados en las siguientes pruebas bioquímicas: producción de indol, Rojo de Metilo, Voges - Proskauer, Ornitina, motilidad a 36°C, utilización del malonato, producción de gas a partir de D-glucosa, producción de ácido a partir de: Inositol - Dulcitol y α -metil-D- glucosidasa (Anexo 2). Sin embargo, en años posteriores, al comparar los genotipos con las pruebas bioquímicas de 189 cepas de *E. sakazakii*, y con los análisis de las secuencias parciales del ADN, se obtuvieron 4 grupos filogenéticamente bien definidos:

- Grupo de diferenciación 1: Compuesto por la mayoría de las cepas, (170-189), incluye los biogrupos: 1-5, 7-9, 11, 13 y 14.
- Grupo de diferenciación 2: Nuevo biogrupo 16
- Grupo de diferenciación 3: Biogrupo 15.
- Grupo de diferenciación 4: Biogrupos 5, 10 y 12 (13).

Como puede observarse, de acuerdo a estos estudios de Iversen y col., 2006 se encontró un nuevo biogrupo adicional a los inicialmente descritos: el 16, que incluye nueve cepas que son inositol y dulcitol positivas, pero indol negativo. Dentro de estos grupos, el tipo salvaje del biogrupo 1 parece ser el más común. En el Anexo 3 se observa la caracterización bioquímica y los 4 grupos de diferenciación, indicando las

cepas correspondientes a cada uno, así como el equivalente a los grupos originalmente descritos por Farmer y col., 1980.

Dentro de las características bioquímicas observadas en las tablas N° 2 y 3, una de las principales, y que distingue *E. sakazakii* de otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*, es la actividad de la alfa glucosidasa, por lo que esta ha sido utilizada como un marcador selectivo en el desarrollo de medios de diferenciación. Sin embargo, se ha demostrado esta misma actividad en otras especies de *Enterobacteriaceae* dando lugar a falsos positivos en colonias presuntivas de esta bacteria, por lo que numerosos investigadores se han dedicado a la caracterización del genoma responsable de esta característica para lograr desarrollar sistemas de identificación más específicos. En este sentido, Lehner y col., 2005 identificaron los dos genes responsables de la codificación de la actividad de la alfa glucosidasa, lo que ha permitido un sistema de identificación específico y confiable por PCR, que es capaz de reconocer correctamente a *C. sakazakii* (Lehner y col., 2005).

Para el año 2007 algunos investigadores propusieron que *Enterobacter sakazakii* debía ser reclasificado como un nuevo género llamado *Cronobacter* debido a que por análisis taxonómicos se determinó que este microorganismo comprende un número importante de “genos especies”. En este sentido, se ha planteado que *C. sakazakii* subsp *sakazakii* comprendería los biogrupos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11 y 13 previamente descritos (indol, dulcitol y malonato negativos, metil α D glucopiranosida positivo) y el *C. sakazakii* subsp *malonaticus* comprendería los

biogrupos 5, 9 y 14 (indol y dulcitol negativo, malonato y metil α D glucopiranosida positivo) (Iversen y col., 2004; Cawthorn y col., 2008; Iversen y col., 2007).

3.2.- Reservorio de *Cronobacter sakazakii*

El hábitat natural del *C. sakazakii* no está totalmente esclarecido; sin embargo, esta bacteria puede ser encontrada tanto en el medio ambiente como en alimentos. Asimismo, dicho microorganismo ha sido aislado a partir de un amplio rango de muestras clínicas, como: sangre, médula ósea, esputo, orina, tejido de apéndice inflamado, tracto respiratorio e intestinal, ojos, oídos y heces, así como también en muestras de ambientes hospitalarios (Drudy y col., 2006).

Aunque en muchos de los casos se desconoce el reservorio de *C. sakazakii*, crecientes informes han establecido que los preparados en polvo para lactantes son una fuente y un vehículo importante de la infección. Simmons y col., en 1989 reportaron una epidemia causada por este microorganismo en una unidad de cuidados intensivos, durante un período de 6 semanas en 1988, que afectó 4 de los 20 recién nacidos hospitalizados: tres con sepsis y uno con evacuaciones diarreicas con sangre (Simmons y col., 1989). Posteriormente a este episodio se han reportado varias epidemias atribuidas a la contaminación con *C. sakazakii* en fórmulas infantiles (Caubilla y col., 2007).

Se ha demostrado que *C. sakazakii*, aun cuando inicialmente se encuentre en muy bajas concentraciones, cuando la fórmula es reconstituida, es capaz de multiplicarse rápidamente y crecer, esto último ha sido comprobado en cereales infantiles a base de arroz, que al ser reconstituidos bien sea con agua o leche, exhiben

un crecimiento exorbitante de *C. sakazakii*, por lo que se ha recomendado que este tipo de cereal, una vez preparado, sea consumido inmediatamente o se descarte si no es posible su mantenimiento a temperaturas que impidan el crecimiento bacteriano (Richards y col., 2005).

Además de lo anteriormente señalado, se ha reportado la presencia del microorganismo sobre las superficies de los utensilios y equipos usados en la preparación de las fórmulas infantiles, en las instalaciones donde se han documentado infecciones neonatales por este germen. La capacidad de la bacteria para formar “biofilms” sobre las superficies abióticas hace pensar en la posibilidad de contaminación de las fórmulas infantiles al contacto con las superficies sólidas (ya sea en hospitales, hogares de cuidado, cocinas y hogar). Adicionalmente, también se ha demostrado la resistencia del germen a los desinfectantes usualmente utilizados en hospitales, sobre todo cuando la bacteria se encuentra en líquidos orgánicos (restos de la fórmula infantil) (Hoikyung, 2006; Iversen y col., 2004).

En este sentido algunos autores han investigado el uso de ciertas sustancias para inhibir la formación de “biofilms” por parte del *C. sakazakii*. Por ejemplo, Amalaradjou y col., publicaron recientemente que el uso de un compuesto denominado “transcinamaldehido” (componente del aceite de la canela) inhibe la formación de “biofilms” mediante la inhibición de los genes que inducen esta formación, y vislumbran la posibilidad de utilizar esta sustancia sobre los equipos y las áreas de preparación de las fórmulas lácteas infantiles (Amalaradjou y col., 2011).

Como se mencionó anteriormente, *C. sakazakii* ha sido aislado de un amplio rango de alimentos, que incluyen leche, carne, vegetales, hierbas, especias, así como en cereales infantiles y en los microambientes de las industrias donde estos últimos son producidos (Kandhai y col., 2003). También, se ha confirmado su presencia en camarones deshidratados, frutas y vegetales; y carne, por lo tanto, la contaminación por *C. sakazakii* no está restringida a productos deshidratados; adicionalmente los productos alimenticios ya cocidos, bebidas y agua utilizada en la preparación de alimentos han estado contaminadas por esta bacteria (Kim y col., 2008).

De lo antes señalado se puede concluir que el reservorio natural de *C. sakazakii* actualmente es desconocido, la bacteria se ha encontrado tanto en el medio ambiente como en alimentos y podría ser un producto vegetal el reservorio natural, pues ha sido aislada de hierbas y especias deshidratadas (Drudy y col., 2006). Con respecto a esto, Baumgartner y col., lograron aislar *C. sakazakii* en 14 de 23 muestras de hierbas frescas analizadas además de, aislar dicho microorganismo en hierbas secas y muestras de productos de confitería; publicando dichos autores que *C. sakazakii* habita en los ambientes de producción de estos alimentos importándose entonces dicha bacteria a los hogares (Baumgartner y col., 2005). También se presume que el reservorio puede ser insectos, tales como, *Stomoxys calcitrans* (mosca caroñosa-carbuncosa) (Hamilton y col., 2003).

3.3.- Tolerancia a la temperatura y a la desecación de *Cronobacter sakazakii*.

La razón por la cual *C. sakazakii* está presente y puede sobrevivir en las fórmulas infantiles en polvo no se conoce del todo. Nazarowec-White y Farber (Citado en Breeuwer y col., 2003) investigaron la resistencia al calor de dicho microorganismo en las fórmulas infantiles reconstituidas y demostraron que *C. sakazakii* es uno de los microorganismos más termorresistentes dentro del grupo de Enterobacterias, reportando un máximo de crecimiento a temperaturas entre 41 y 45°C para 10 cepas examinadas, con un valor D=4.2 minutos a 58°C, el cual es más alto que el reportado para otras Enterobacterias. Los resultados de Breeuwer y col., fueron diferentes a los hallazgos anteriores, pues las 22 cepas que examinaron crecieron a 47°C, con un valor de D que indicó que *C. sakazakii* no es particularmente termorresistente. Sin embargo, en ambos estudios se aclaró que dicho microorganismo no puede sobrevivir a un proceso de pasteurización convencional (Breeuwer y col., 2003).

Por otra parte, Rosset y col., en el 2006, examinaron 86 muestras de fórmulas infantiles reconstituidas y 93 preparaciones para alimentación a través de sondas en 25 unidades de cuidado neonatal. Estos autores tomaron en cuenta las características del ambiente de preparación de las fórmulas, la temperatura a la cual la fórmula fue preparada, la temperatura al inicio y al final del almacenamiento de la fórmula ya reconstituida y el tiempo y la temperatura de recalentamiento de dichas fórmulas; demostrando que los valores de crecimiento potencial de *C. sakazakii* en las fórmulas lácteas podían explicarse por una combinación de diferentes parámetros y en el caso

de la alimentación a través de sondas, los elevados valores de crecimiento potencial del microorganismo se relacionaron con largo tiempo de alimentación (Rosset y col., 2006).

Por otra parte, Arku y col. han publicado recientemente la capacidad adaptativa del *C. sakazakii* al calor, al observar la supervivencia de la bacteria después de someterla a condiciones de estrés (52°C). Según los autores, esta capacidad adaptativa se debe a alteraciones en la proporción de ácidos grasos en la membrana, pues la relación entre la proporción de ácidos grasos insaturados y saturados disminuye durante la adaptación, lo cual confiere una mayor rigidez a dicha membrana y por ende mayor capacidad de resistencia al calor (Arku y col., 2011).

3.4.- Modo de transmisión de *Cronobacter sakazakii*

Actualmente, el mecanismo de transmisión del *C. sakazakii* no ha sido claramente identificado. Sin embargo, estudios epidemiológicos demuestran que las fórmulas infantiles en polvo son la principal fuente de infección, especialmente en las unidades de cuidado intensivo neonatal. *C. sakazakii* también ha sido aislado en otros alimentos tales como, carne, queso, vegetales y granos, así como del aparato digestivo de moscas domésticas, en el ambiente de las áreas de producción en industrias alimentarias y en el hogar. Esto podría indicar el peligro potencial de este patógeno para transmitirse al consumidor, no sólo a través de leche en polvo, creando un alto riesgo de enfermedad entre poblaciones susceptibles (Gutiérrez y Torres, 2005).

Debido a su capacidad de adaptarse a los altos potenciales osmóticos y/o a las condiciones de deshidratación y debido a que *C. sakazakii* no sobrevive a una pasteurización estándar, se han propuesto dos rutas por las que dicho microorganismo puede ingresar a la fórmula infantil; a través de una contaminación intrínseca, ya sea por el uso de ingredientes contaminados agregados después del proceso de secado o, a partir del ambiente de producción, después del secado y antes del envasado. También puede ocurrir una contaminación extrínseca durante la reconstitución y manipulación de la fórmula (INFOSAN, 2005).

Se ha estudiado ampliamente que las causas de la contaminación extrínseca de las fórmulas lácteas infantiles pueden ser las personas que manipulan el alimento, o bien, que el agua utilizada para reconstituir el producto o la sonda empleada para la alimentación estén contaminadas (Gutiérrez y Torres, 2005). También, con respecto a la transmisión del *C.sakazakii*, es necesario destacar que no existen evidencias de transmisión vertical, horizontal entre lactantes o a través del medio ambiente por inhalación (Conde y col., 2007).

En conclusión, la transmisión del *C. sakazakii* es por vía alimentaria. No existen estudios experimentales o epidemiológicos sobre la relación dosis-respuesta. Se considera que tres unidades formadoras de colonias de *C. sakazakii* en 100 gramos de preparación en polvo para lactantes son suficientes para que la infección se produzca cuando el biberón es reconstituido en condiciones precarias; de igual manera la dosis que realmente es ingerida por los lactantes infectados no se conoce (AFSSA, 2001).

3.5.- Patogenicidad y virulencia de *Cronobacter sakazakii*

C. sakazakii es el agente infeccioso más severo que produce patologías poco frecuentes o raras, involucrando particularmente a niños muy pequeños (recién nacidos lactantes), personas de edad avanzada e inmunosuprimidos. Si bien la infección se ha identificado más frecuentemente en niños prematuros existiendo una asociación entre las infecciones invasivas por *C. sakazakii* y el peso del recién nacido al nacer. Las personas de más alto riesgo son los recién nacidos menores de 4-5 semanas; esta bacteria ha sido asociada a numerosas patologías graves potencialmente letales tales como: meningitis, septicemia, bacteriemias, enterocolitis necrosante; con una rata de mortalidad reportada que oscila entre el 40 y 80% (Caubilla y col., 2007; Pagotto y col., 2003).

La patogenicidad de un microorganismo dado depende en gran medida de su capacidad de adherirse sobre superficies como mucosas, epitelio gástrico y/o intestinal o tejido endotelial. Sin embargo, es poco lo que se conoce en relación con los mecanismos patogénicos de *C. sakazakii*. El microorganismo es capaz de unirse a células intestinales y sobrevivir internamente en los macrófagos. Sin embargo, las adhesinas específicas de la bacteria y receptores en las células huésped involucrados en este proceso no se conocen muy bien. Algunos tipos de *C. sakazakii* producen un material capsular que permite la evasión de los macrófagos; también, dicha cápsula ofrece protección al microorganismo, facilitando su supervivencia en ambientes adversos. Como *Citrobacter diversus* o *Citrobacter freundii*, *C. sakazakii* parece

tener un tropismo para el sistema nervioso central, que le permite violar la barrera hematoencefálica (Drudy y col., 2006; Mangué y col., 2006).

Como se mencionó anteriormente, *C. sakazakii* puede unirse a superficies de plástico y silicón y de esta manera crecer en forma de “biofilms”; lo cual quizá sea un factor asociado a la alterada susceptibilidad antimicrobiana (Drudy y col., 2006). Con respecto a las condiciones ambientales que afectan la formación de ésta película sobre superficies abióticas, Hoikyung en el año 2006 estudió los efectos de la temperatura y la disponibilidad de nutrientes en la formación del “biofilms” sobre superficies de acero inoxidable y en tubos de alimentación enteral utilizando cinco cepas en fase estacionaria de crecimiento en caldo tripticasa soya y en el caldo de la fórmula infantil a una temperatura de incubación de 12 y 25°C. El mayor crecimiento fue observado a 25°C; no se produjeron biofilms a 12°C ni tampoco en el caldo tripticasa soya a 25°C, lo que indica que la disponibilidad de nutrientes tiene un papel fundamental en la formación del “biofilms”. Estas observaciones enfatizan la importancia del control de la temperatura en la preparación y almacenamiento de las fórmulas infantiles (Hoikyung, 2006).

En resumen, es poco lo que se conoce en cuanto a la virulencia de este microorganismo y las posibles diferencias que pudieran existir entre las distintas cepas, aparentemente, el microambiente en el cual se desarrolla la infección influye notablemente en la virulencia del germen, siendo un factor importante la madurez e integridad de las uniones intercelulares de la barrera intestinal, así como también la madurez del sistema inmune y el tipo de respuesta de citocinas que estimula *C.*

sakazakii. En relación con los mecanismos de patogenicidad se ha podido establecer la capacidad del germen para penetrar la barrera hematoencefálica, persistiendo en los macrófagos y desarrollando una inflamación crónica; no ha podido establecerse a ciencia cierta si el tropismo por las células del SNC varía entre diferentes cepas. Es mucho lo que todavía queda por investigar en este punto (Hoikyung, 2006; Townsend y col., 2008).

3.6.- Brotes epidémicos y casos aislados reportados

Antes de la tipificación de *C. sakazakii* en 1980, es bastante difícil afirmar que haya sido específicamente el causante de patologías severas en humanos, sin embargo, en los Anexos 4 y 5 respectivamente, se reflejan los casos aislados reportados así como los brotes epidémicos, respectivamente, por *C. sakazakii*.

Es necesario destacar que probablemente existen muchos más casos de los aquí reportados, sobre todo provenientes de países subdesarrollados, en donde por las características propias de los mismos, se hace difícil un diagnóstico etiológico tanto en brotes epidémicos como en casos aislados, no solamente por la falla en las notificaciones oficiales, sino también debido a la carencia de métodos de laboratorio accesibles para confirmar la etiología de esas entidades.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Población.

En la presente investigación la población estuvo conformada por muestras de fórmulas lácteas infantiles obtenidas comercialmente en la Ciudad de Valencia, Estado Carabobo-Venezuela.

4.2.- Muestras

En el presente estudio se utilizaron dos muestras de fórmulas lácteas infantiles de la misma marca comercial.

4.3.- Cepa utilizada en el procedimiento metodológico

En la presente investigación se utilizó una cepa de *Enterobacter sakazakii* ATCC 5931 proveniente del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, la cual fue conservada en cuñas de agar nutritivo con sucesivos repiques cada siete días.

4.4.- Obtención de las muestras

Las dos muestras de fórmulas lácteas infantiles fueron adquiridas en un mismo supermercado ubicado en la ciudad de Valencia. Se recolectaron los datos aportados por la empresa fabricante de las dos fórmulas que formaron parte de este estudio (marca, lote, fecha de vencimiento, código de barra, etc.).

4.5.- Comprobación de la pureza de la cepa de *Cronobacter sakazakii*.

Se realizaron aislamientos de la cepa de *C. sakazakii* en placas con agar Cromogénico para *C. sakazakii*. Dichas placas fueron incubadas a una temperatura de 35°C por 24 horas. Posteriormente se observó la morfología de las colonias en las placas y se realizó tinción al Gram de las mismas.

4.6.- Control negativo de las muestras para *Cronobacter sakazakii*.

Se procedió a determinar la presencia o ausencia *C. sakazakii* en las dos muestras utilizadas de fórmula láctea infantil mediante el método “Lauril Sulfato Triptosa modificado con Vancomicina (mLST)” descrito por Iversen y Forsythe en el año 2006.

4.7.- Curva de crecimiento de *Cronobacter sakazakii*.

Se tomó una asada a partir de una colonia del cultivo puro y se inoculó en caldo Tripticasa Soya (TSB) y, a partir de este último, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución de 10^{-8} . De cada una de las diluciones se sembraron placas con agar Tripticasa Soya por duplicado, a fin de calcular el recuento de la población microbiana. A partir de ese recuento se realizaron diluciones decimales seriadas de la población microbiana hasta obtener un nivel de inóculo de 10^1 Células/mL. Para ello se procedió a sembrar por duplicado cada una de las diluciones en cuestión en TSB.

Los tubos inoculados fueron incubados en un baño con recirculación a 35°C durante 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 32 horas. Transcurrido el tiempo de cada uno de los tubos se procedió a sembrar por duplicado 0,1 mL del caldo en placas con agar Cromogénico para *C. sakazakii*. Todas las placas fueron incubadas por 24 horas a 35°C. Se procedió luego a

obtener el recuento de la población microbiana para cada tiempo de incubación y, con los datos obtenidos, se realizó la curva de crecimiento en caldo TSB para *C. sakazakii*.

El procedimiento descrito anteriormente se repitió empleando caldo “Skim Milk” en lugar de TSB. De esta manera se obtuvo otra curva de crecimiento para *C. sakazakii* en leche descremada (Skim Milk).

4.8.- Inoculación artificial de las fórmulas lácteas infantiles con *Cronobacter sakazakii*.

Para la contaminación artificial de las fórmulas lácteas infantiles se utilizaron tres niveles de inóculo; 10^2 , 10^4 , 10^6 Cél/mL, según la información obtenida al momento de realizar la curva de crecimiento del microorganismo en TSB. Dichas fórmulas fueron inoculadas luego de ser reconstituidas, realizando siempre los respectivos controles de inóculo.

4.9.- Evaluación del efecto de la temperatura de reconstitución de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

Se procedió a reconstituir la fórmula infantil con agua destilada estéril ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$) a cinco diferentes temperaturas: 10°C , 24°C (temperatura ambiente), 35°C , 50°C y 60°C . Rápidamente las muestras fueron inoculadas con los tres niveles de inóculo antes mencionados (10^2 , 10^4 , 10^6 Cél/mL). Se sembró cada alternativa por duplicado en placas con agar Cromogénico para *C. sakazakii* y de ser necesario se realizaron diluciones decimales de las mismas.

4.10.- Evaluación de la influencia del período de retención de la fórmula previa alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*

Se utilizaron las fórmulas reconstituidas a 5 diferentes temperaturas (contaminadas con los tres niveles de inóculo) y posteriormente se mantuvieron retenidas por 2, 4 y 6 horas tanto en condiciones de refrigeración (4°C) y no refrigeración (24°C/Temperatura ambiente). Se sembró cada alternativa por duplicado en placas con agar Cromogénico para *C. sakazakii* y, de ser necesario, se realizaron diluciones decimales de las mismas.

4.11- Evaluación del efecto de la temperatura de refrigeración de la fórmula láctea infantil reconstituida en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

Luego de reconstituir la fórmula infantil con agua destilada estéril a 5 diferentes temperaturas y contaminarla con los tres niveles de inóculo, se procedió a refrigerar las mismas durante 4 horas a 3 temperaturas de refrigeración diferentes; 4°C, 6°C y 10°C. Se sembró cada alternativa por duplicado en placas con agar Cromogénico para *C. sakazakii* y, de ser necesario, se realizaron diluciones decimales de las mismas.

4.12.- Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula láctea reconstituida y del tiempo y temperatura de alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

Se utilizaron las fórmulas infantiles reconstituidas a 5 diferentes temperaturas (con los 3 niveles de inóculo), tanto refrigeradas (4°C x 4 h) como sin refrigeración, sometidas o no a un recalentamiento posterior (hasta alcanzar los 37°C). A partir de todas estas alternativas, se evaluó la influencia del tiempo de alimentación; utilizando períodos de alimentación comprendidos entre media hora (corto período de alimentación) y cuatro

horas (largo período de alimentación). El procedimiento anterior se llevó a cabo a 20°C, 24°C y 35°C (ambientes de alimentación). Para finalizar se sembró cada alternativa por duplicado en placas con agar Cromogénico para *C. sakazakii* y, de ser necesario, se realizaron diluciones decimales de las mismas.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Comprobación de la pureza de la cepa de *Cronobacter sakazakii*.

Se realizó tinción al Gram de las colonias obtenidas luego de sembrar la cepa en placas con agar Cromogénico para *C. sakazakii* (Figura 1), observándose bacilos Gram negativos. Por último; se sometió la cepa a una identificación automatizada utilizando el equipo bioMérieux Vitex; reportando dicho equipo ciertamente la pureza de la cepa utilizada.



Figura 1. *Cronobacter sakazakii* en agar Cromogénico para *Cronobacter sakazakii*.

5.2.- Control negativo de las muestras para *Cronobacter sakazakii*.

En las dos muestras de fórmulas lácteas infantiles utilizadas en la presente investigación no se recuperó *Cronobacter sakazakii* mediante la metodología “Lauril Sulfato Triptosa modificado con Vancomicina (mLST)” descrita por Iversen y Forsythe en el año 2006.

5.3.- Curva de crecimiento de *Cronobacter sakazakii*.

En la figura 2 se muestran las curvas de crecimiento exponencial para *C. sakazakii*. Se puede observar que la fase de latencia del microorganismo en caldo Trypticase Soya (línea azul) resultó ser de dos horas (2h), obteniéndose un tiempo de generación (g) de 0,40 (24 minutos/generación). Cuando se utilizó leche descremada (Skim Milk) como medio de crecimiento (línea roja), el tiempo de latencia para el microorganismo resultó ser de cuatro horas (4h) y el tiempo de generación (g) de 0,60 (36 minutos/generación).

Es necesario destacar que existe cierta disyuntiva con respecto al tiempo de generación del *C. sakazakii* ya que en la bibliografía se han venido reportando distintos valores de g, los cuales varían dependiendo de la temperatura y medios utilizados para la incubación del microorganismo en cuestión. En este orden de ideas, Richards y col. en el año 2005 publicaron tiempos de generación para *C. sakazakii* de 43 y 48 minutos en fórmulas infantiles reconstituidas con agua y leche respectivamente, ambas incubadas a 30°C. Estos mismos autores reportaron que el tiempo de generación para el microorganismo va a depender del líquido utilizado para reconstituir la fórmula infantil además del tiempo y la temperatura de incubación utilizados (Richards y col., 2005).

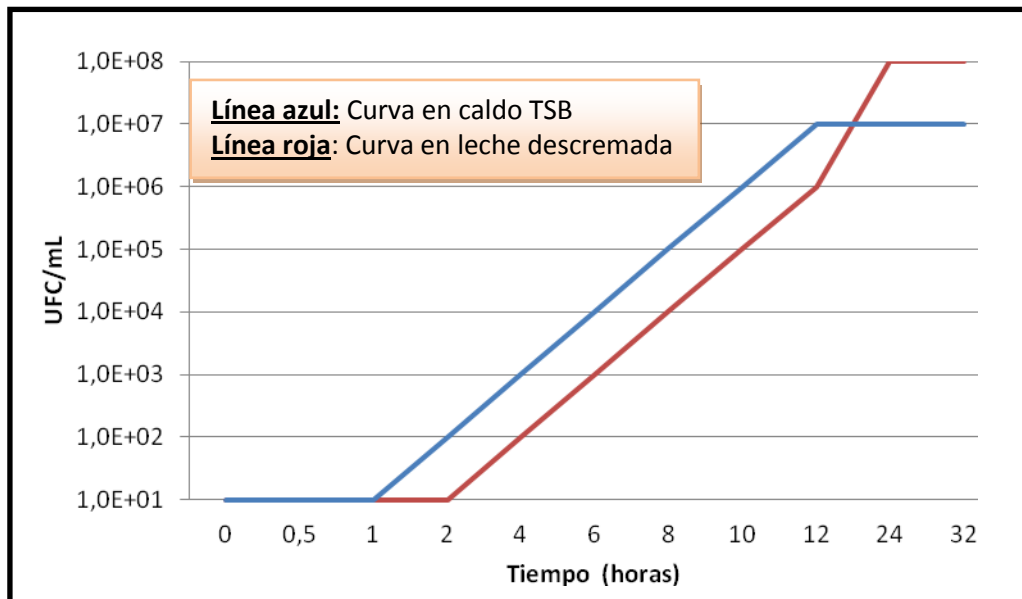


Figura 2. Curva de crecimiento exponencial para *Cronobacter sakazakii*.

5.4.- Evaluación del efecto de la temperatura de reconstitución y período de retención de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*

En la Tabla 1 se plasma el comportamiento de *C. sakazakii* en fórmulas lácteas reconstituidas a cinco diferentes temperaturas y retenidas durante un periodo de 2, 4 y 6 horas, tanto a temperatura de refrigeración (4°C) como a temperatura ambiente (24°C). Se puede observar que en los tres niveles de inóculo utilizados y a las dos diferentes temperaturas de retención de la fórmula (24°C y 4°C), únicamente se logró una disminución de la carga bacteriana al utilizar temperaturas de reconstitución de 50 y 60°C independientemente del tiempo y la temperatura de retención de la fórmula; es decir, se logró la inactivación del *C. sakazakii* al reconstituir la fórmula infantil con agua destilada estéril a dichas temperaturas. Estos resultados demuestran que *C. sakazakii* no es un microorganismo termorresistente, lo cual coincide con los resultados publicados por Iversen y col., en el año 2004, quienes reportaron en su trabajo que *C. sakazakii* no es una bacteria

termorresistente ya que, al incubar un total de setenta cepas de dicho microorganismo en TSB a una temperatura de 47°C durante 24 horas, no se observó ningún tipo de crecimiento.

En este mismo orden de ideas, la FAO, en el año 2006, en su “Serie de evaluación de criterios microbiológicos N° 10” realizado para *C. sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles, exponen que cuando la fórmula infantil es reconstituida con agua a temperaturas entre 10 y 40°C no se observa la inactivación del microorganismo; sin embargo, cuando la temperatura de reconstitución es de 50°C si existe una inactivación del *C. sakazakii* aunque poco apreciable, por ende recomiendan que si se utiliza dicha temperatura de reconstitución (50°C), inmediatamente se almacene la fórmula a bajas temperaturas. Por otra parte reportan que cuando la temperatura de reconstitución es de 60°C se observa una inactivación del microorganismo; sin embargo, la reactivación del mismo puede ocurrir dependiendo de qué tan largo sea al período de alimentación. Por último, cuando utilizaron agua a 70°C para reconstituir la fórmula observaron una inactivación significativa del microorganismo que no fue superada bajo ningún escenario llevado a cabo posteriormente (FAO/WHO, 2006).

Es necesario destacar que al utilizar una temperatura de reconstitución de 70°C aunque se logre una marcada inactivación del *C. sakazakii* también es cierto que trae ciertas consecuencias que es necesario tomarlas en cuenta; como lo son; pérdida de nutrientes en algunos preparados, especialmente de Vitamina C, aglutinación del preparado, sin dejar atrás una mayor incidencia de quemaduras ya sea del lactante o de la persona encargada de preparar la fórmula. Debido a esto, la FAO en el año 2004 en su “Serie de evaluación de criterios microbiológicos N° 6” para *C. sakazakii* y otros microorganismos

en los preparados en polvo para lactantes recomiendan reconstituir la fórmula con agua hervida y posteriormente enfriada hasta 50°C, lo cual coincide con el trabajo publicado por Pérez, en el año 2010, quien también recomienda reconstituir la fórmula infantil con agua hervida a 50°C para lograr una inactivación del *C. sakazakii* sin que haya pérdida de nutrientes en la fórmula infantil (FAO/WHO, 2004).

Con respecto al tiempo y la temperatura de retención de la fórmula (tiempo entre preparación y alimentación), en la Tabla 6 se puede observar un aumento de la carga de *C. sakazakii* cuando la fórmula fue retenida a temperatura ambiente (24 °C) durante un tiempo mayor /igual a cuatro horas en los tres niveles de inóculo utilizados. Estos resultados por una parte difieren con lo publicado por Telang y col., en el 2005, en cuya investigación reportan que no existe un incremento significativo de *C. sakazakii* cuando es retenido a temperatura ambiente (22°C) durante un período de seis horas y, por otra parte coinciden con lo reportado por la FAO en el año 2006 al publicar que el riesgo de que exista un aumento en la carga de *C. sakazakii* en las fórmulas lácteas infantiles se incrementa cuando la temperatura del lugar de retención de la fórmula es alta (Telang y col., 2005; FAO/WHO, 2006).

Como se mencionó anteriormente, también se utilizó temperatura de refrigeración como ambiente de retención y como se puede observar en la tabla 1, no se observó un aumento de la carga de *C. sakazakii* cuando la fórmula fue retenida a esta temperatura durante 2, 4 y 6 horas. Estos resultados coinciden con los reportados por Rosset y col., en el año 2007, quienes expusieron en su publicación que cuando la fórmula láctea infantil reconstituida, es almacenada a bajas temperaturas ($3,5^{\circ}\text{C} < T < 7,5^{\circ}\text{C}$) hasta un período de

24 horas, no existe un crecimiento potencial del *C. sakazakii*. Sin embargo, en cierta parte estos resultados difieren con los reportados por la FAO en el año 2006 donde se plasma que cuando es utilizada la refrigeración como temperatura de retención de la fórmula, los riesgos asociados con las fórmulas reconstituidas a 10, 20 y 70°C no se ven afectadas por el tiempo de retención de dichas fórmulas (a temperatura de refrigeración); mientras que, utilizando otras temperaturas de reconstitución (30, 40, 50 y 60°C) si existe un aumento del riesgo asociado a un incremento del tiempo de refrigeración (Rosset y col., 2007; FAO/WHO, 2006).

En la presente investigación, como se puede observar en la Tabla 1, al aumentar el tiempo de refrigeración (4°C) de 2 a 6 horas no se observó un aumento de la carga bacteriana bajo ninguna condición de reconstitución de la fórmula; sin embargo, es necesario destacar que en el “Meeting Report” llevado a cabo por la FAO en el año 2006, el mayor riesgo fue observado cuando la fórmula fue retenida durante ocho horas o más y en la presente investigación se utilizaron períodos de retención de hasta seis horas.

Por último, es necesario destacar que durante las 4 horas de refrigeración no se observó la reactivación del *C. sakazakii* en aquellas fórmulas previamente reconstituidas con agua a temperaturas de 50 y 60°C.

Tabla 1. Evaluación del efecto de la temperatura de reconstitución y período de retención de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*

Nivel de inóculo (Cél/mL)	Período de retención	Temperatura reconstitución				
		10°C	24°C	35°C	50°C	60°C
10 ²	2 h a 4°C	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴		10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	10 ¹
10 ²	4 h a 4°C	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴		10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	6 h a 4°C	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴		10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	10 ¹
10 ²	2 h a 24°C	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴		10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	10 ¹
10 ²	4 h a 24°C	10 ³	10 ³	10 ³	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴		10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹	<10 ¹
10 ⁶		10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹	<10 ¹
10 ²	6 h a 24 °C	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ¹	<10 ¹
10 ⁶		10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ¹	10 ¹

5.5.- Evaluación del efecto de la temperatura de refrigeración de la fórmula láctea infantil en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

En la tabla 2 se puede observar como no existió ni un incremento ni una inactivación del *C. sakazakii* al incubar las fórmulas a tres diferentes temperaturas de refrigeración (4, 6 y 10°C) durante 4 horas. Es decir, en la presente investigación, la temperatura de refrigeración de la fórmula infantil ya reconstituida no tuvo impacto en el comportamiento de *C. sakazakii*. También, es necesario destacar que durante las cuatro horas de refrigeración no se observó la reactivación del *C. sakazakii* en aquellas fórmulas previamente reconstituidas con agua a temperaturas de 50 y 60°C.

Los resultados anteriores coinciden, en cierta parte, con los reportados por la FAO en el año 2006, pero solo para ciertas temperaturas de reconstitución ya que esta última publica que a medida que aumenta la temperatura de refrigeración de la fórmula existe un incremento en el riesgo de *C. sakazakii* para aquellas fórmulas reconstituidas a temperaturas comprendidas entre 30 y 50°C; sin embargo, el incremento en el riesgo reportado resultó ser bastante pequeño (FAO/WHO, 2006).

Tabla 2. Evaluación del efecto de la temperatura de refrigeración de la fórmula láctea infantil reconstituida en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*

Nivel de inóculo Cél/mL	Temperatura de reconstitución de la fórmula	TEMPERATURAS DE REFRIGERACIÓN (4 HORAS)		
		4°C	6°C	10°C
10 ²	10°C	10 ²	10 ²	10 ²
10 ⁴		10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
10 ⁶		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
10 ²	24°C	10 ²	10 ²	10 ²
10 ⁴		10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
10 ⁶		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
10 ²	37°C	10 ²	10 ²	10 ²
10 ⁴		10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
10 ⁶		10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
10 ²	50°C	<10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴		<10 ¹	<10 ¹	10 ¹
10 ⁶		<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	60°C	10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴		<10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁶		10 ¹	<10 ¹	<10 ¹

5.6.- Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula infantil reconstituida y del período y temperatura de alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.

Como se explicó en la metodología, se llevaron a cabo distintos escenarios; se utilizaron las fórmulas infantiles reconstituidas a cinco diferentes temperaturas (10, 24, 35, 50 y 60°C) contaminadas con tres niveles de inóculo de *C. sakazakii* (10^2 , 10^4 y 10^6 UFC/mL). Dichas fórmulas fueron sometidas a un enfriamiento a 4°C por 4 horas (refrigeración) o simplemente no se refrigeraron (sin refrigeración). Posteriormente, las fórmulas (refrigeradas y no refrigeradas) fueron recalentadas hasta 37°C o simplemente no se sometieron a ningún tipo de recalentamiento. Por último, a todos los escenarios antes planteados se les evaluó la influencia del tiempo de alimentación; utilizando tiempos desde 30 minutos hasta cuatro horas a tres diferentes temperaturas o ambientes de alimentación (20, 24 y 37°C).

En las tablas 3, 4 y 5 se observan los resultados de todos los escenarios planteados utilizando temperaturas de alimentación de 20, 24 y 37°C, respectivamente. Se observa, que cuando la temperatura de reconstitución de la fórmula láctea infantil fue de 50 y 60°C sin importar si dicha fórmula fue refrigerada o no, recalentada o no, o si se utilizaron tiempos cortos o largos de alimentación siempre existió una disminución de la carga bacteriana, recuperándose un máximo de 10^1 UFC/mL. Estos resultados corroboran una vez más que la temperatura de reconstitución de la fórmula infantil es un factor realmente importante en el desarrollo o supervivencia de *C.sakazakii*.

Además de la temperatura de reconstitución de la fórmula, otro factor importante en la supervivencia del *C. sakazakii* fue el hecho de recalentar la fórmula hasta 37°C. Como se puede observar en las tablas siguientes, cuando las fórmulas fueron recalentadas (tanto las

refrigeradas como las no refrigeradas) se logró en la mayoría de los casos una disminución de la carga bacteriana de uno y hasta dos ciclos logarítmicos, sin observar la reactivación del microorganismo o un nuevo aumento en dicha carga bacteriana al utilizar periodos de alimentación de hasta 4 horas a las tres temperaturas de alimentación utilizadas (20°C/tabla 3, 24°C/tabla 4 y 37°C/tabla 5). Sin embargo, cuando las fórmulas infantiles reconstituidas no fueron sometidas a un recalentamiento, al utilizar periodos de alimentación mayores a dos horas, en la mayoría de los casos (excluyendo las fórmulas reconstituidas a 50 y 60°C) se observó un aumento en la carga bacteriana tanto en las fórmulas refrigeradas como en las no refrigeradas.

Estos resultados anteriores sugieren entonces que con el hecho de recalentar la fórmula reconstituida antes de su consumo se logra una inactivación del microorganismo en cuestión, sin importar si dicha fórmula fue refrigerada o no previamente; sin embargo, es necesario destacar que no se observó la reactivación del microorganismo en ninguno de los casos donde la fórmula fue recalentada pero sólo por un periodo de alimentación de hasta cuatro horas, por ende se sugiere realizar ensayos donde se demuestre cuánto tiempo adicional el microorganismo permanece inactivo.

Tabla 3. Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula infantil reconstituida y del período de alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* utilizando una temperatura de alimentación de 20°C.

Nivel de inóculo Cel/ml	Condiciones	Temperatura de reconstitución.				
		10°C	24°C	35°C	50°C	60°C
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1h alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2h alimentación	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ³	10 ³	10 ³	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4h alimentación	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2horas alimentación	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ³	10 ³	10 ³	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹	10 ¹

Tabla 4. Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula infantil reconstituida y del período de alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* utilizando una temperatura de alimentación de 24°C.

Nivel de inóculo Cel/ml	Condiciones	Temperatura de reconstitución.				
		10°C	24°C	35°C	50°C	60°C
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1h alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2h alimentación	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ³	10 ³	10 ³	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4h alimentación	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2horas alimentación	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ³	10 ³	10 ³	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹	10 ¹

Tabla 5. Evaluación de la influencia del recalentamiento de la fórmula infantil reconstituida y del período de alimentación en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* utilizando una temperatura de alimentación de 37°C.

Nivel de inóculo Cel/ml	Condiciones	Temperatura de reconstitución.				
		10°C	24°C	35°C	50°C	60°C
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ³	10 ³	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2 horas alimentación	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración,	10 ¹	10 ¹	10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1h alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2h alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ¹	10 ¹
10 ²	Refrigeración, Sin	10 ³	10 ³	10 ³	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4h alimentación	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	30 min alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	1 hora alimentación	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	<10 ¹	<10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ²	10 ²	10 ²	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	<10 ¹
10 ⁶	2horas alimentación	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹	10 ¹
10 ²	Sin Refrigeración, Sin	10 ³	10 ³	10 ³	<10 ¹	<10 ¹
10 ⁴	Recalentamiento,	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
10 ⁶	4 horas alimentación	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ¹	10 ¹

VI. CONCLUSIONES.

- .- La temperatura de reconstitución de la fórmula láctea infantil es un factor que afecta en el desarrollo o supervivencia de *Cronobacter sakazakii*.
- .- Al utilizar temperaturas de reconstitución de la fórmula láctea infantil de 50 y 60°C se logra una inactivación del *Cronobacter sakazakii*.
- .- El período y temperatura de retención de la fórmula infantil reconstituida previo alimentación es un factor determinante en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.
- .- La temperatura de refrigeración (durante cuatro horas) de la fórmula láctea infantil reconstituida no es un factor determinante en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*.
- .- El recalentamiento de la fórmula láctea infantil reconstituida previa alimentación si es un factor determinante en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii*
- .- El tiempo y temperatura de alimentación no son factores determinantes en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* cuando la fórmula infantil es previamente recalentada.
- .- El tiempo de alimentación si es un factor determinante en el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* cuando la fórmula infantil no es previamente recalentada.
- .- No se observó una reactivación del *Cronobacter sakazakii* utilizando periodos de alimentación de hasta cuatro horas cuando la fórmula infantil fue previamente recalentada.

Referencias bibliográficas.

.- Agence Francaise De Sécurité Sanitarie Des Aliments (afssa). *Enterobacter sakazakii*. Décret n° 2001. 671. Du 26 juillet 2001 relatif á la lutte contre les infections nosocomiales dans les établissements de santé.

.- Arku, B; Fanning, S y Jordan, K. 2011. Heat Adaptation and Survival of Cronobacter spp. (Formerly *Enterobacter sakazakii*). *Foodborne Pathog Dis.* 8 (9): 975-981.

.- Amalaradjou, M y Venkitanarayanan, K. 2011. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of Cronobacter sakazakii biofilm on abiotic surfaces. *J Food Prot.* 74(2): 200-8.

.- Baumgartner, A; Grand, M; Liniger, M e Iversen, C. 2009. Detection and frequency of Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. 1st International Conference on Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) January 22nd & 23rd, 2009 University College Dublin, IRELAND

.- Breeuwer, P; Lardeau, A; Peterz, M y Joosten, H. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol.* 95: 967-973.

.- Caubilla, J; Hurrell, E; Townsend, S; Cheetham, P; Loc-Carrillo, C; Fayed, O; Prere, M y Forsythe, S. 2007. Genotypic and Phenotypic Analysis of *Enterobacter sakazakii* Strains

from an Outbreak Resulting in Fatalities in a Neonatal Intensive Care Unit in France. *J Clin Microbiol.* 45(12): 3979-3985.

.- Cawthorn, D; Botha, S y Witthuhn, C. 2008. Evaluation of Different methods for the detection and Identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *Int J Food Microbiol.* 127: 129-138.

.- Conde, A; Legorburu, A; Urcelay E; Zárate, Z y Zugazabeitia, A. 2007. Sépsis Neonatal por *Enterobacter sakazakii*. *An Pediatr.* 66: 196-197.

.- Díaz, S y Zambrano, M. 2003. Calidad microbiológica de tres marcas de leche pasteurizada expandidas en el Sector la Cueva de San Cristóbal. Departamento de Ingeniería de Producción Animal. Universidad Nacional Experimental del Táchira UNET. San Cristóbal, Táchira, Venezuela.

.- Drudy, D; O'Rourke, M; Murphy, M; Mullane, N; Mahony, R; Lorraine, K y col. 2006. Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. *Int J Food Microbiol.* 110:1-8.

.- Farmer, J; Asbury, M; Hickman, F; Brenner, D y The *Enterobacteriaceae* Study Group. 1980. *Enterobacter sakazakii*: A New Species of "*Enterobacteriaceae*" Isolated from Clinical Specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 30(3): 569-584.

.- FAO/WHO. 2006. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powered infant formula. Microbiological Risk Assessment series N° 10.

.- FAO/WHO. 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powered infant formula. Microbiological Risk Assessment series N° 6.

.- Food and Drugs Administration (FDA). Investigation of Cronobacter Bacteria Illness in Infants. 2011. <http://www.fda.gov/default.htm>.

.- Forsythe, S. 2010. Cronobacter species. *Oxid.* 31 (1): 0965- 0989.

.- Gutierrez, R y Torres Chavolla, E. 2005. *Enterobacter sakazakii* un patógeno emergente en alimentos. *Énfasis alimentación.* 5:82-85.

.- Hamilton, J; Lehane, M y Braig, H. 2003. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Safer Healthier People.* 9(10).

.- Hoikyung, K. 2006. Attachment of and Biofilm Formation by *Enterobacter sakazakii* on Stainless Steel and Enteral Feeding Tubes. *Appl Environ Microbiol.* 72: 5846- 5856.

.- Iversen, C and Forsythe, S. 2006. Comparison of Media for the Isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol.* 73(1):48-52.

.- Iversen, C; Lehner, A; Mullane, N; Marugg, J; Fanning, S y col. 2007. Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J Clin Microbiol.* 45(11): 3814-3816.

.- Iversen, C; Lecanshire, L; Waddington, M; Forsythe, S y Ball, G. 2006. Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of Artificial Neural Networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. *BMC Microbiol.* 6:28.

.- Iversen, C; Waddington, M; On, S y Forsythe, S. 2004. Identification of Phylogeny of *Enterobacter sakazakii* Relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* Species. *J Clin Microbiol.* 42(11): 5368-5370.

.- [Jacobs, C](#); [Braun, P](#); y [Hammer, P](#). 2011. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *J Dairy Sci.* 94(8):3801-10.

.- Kandhai, C; Reij, M; Gorris, L; Guillaumeb-Gentil, O y Van Schothorst, M. 2003. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *The lancet.* 363 (9402): 39-40.

.- Kothary, M. 2007. Characterization of the Zinc-Containing Metalloprotease Encoded by *zpx* and Development of a Species- Specific Detection Methods for *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol.* 73(13):4142- 4151.

.- Kwang-Pyo, K. 2008. *Enterobacter sakazakii* invasion in humal intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of thight junction. *Infection and Immunity*. 76:562-570.

.- Kim, K; Jang, S; Kim, S; Park, J; Heu, S y Ryu, S. 2008. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int J Food Microbiol*.122: 196-203.

.- Lehner, A; Riedel, K; Eberl, L; Breeuwer, P; Diep, B y Stephan, R. 2005. Biofilm Formation, Extracellular Polysaccharide Production, and Cell-to-Cell Signaling in Various *Enterobacter sakazakii* Strains: Aspects Promoting Environmental Persistence. *J Food Prot*. 68(11): 2287-2294.

.- Lenatti, R; O`Connor, D; Hebert, K; Farger J y Pagotto, F. 2008. Growth and survival of *Enterobacter sakazakii* in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula. *Int J Food Microbiol*. 122: 171-179.

.- Li-Chun, L and Beuchat, L. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity and temperature. *Food Microbiol*. 24:767-777.

.- Liu,Y; Gao, Q; Zhang, X; Hou, Y; Yang, J y Huang, X. 2006. PCR and Oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Molecular and Cellular Probes*. 20(1): 11-17.

- .- Mange, J; Stephan, R; Borel, N; Wild, P; Kwang, S; Pospischil, A y Lehner, A. 2006. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiology*. 6:58doi:10.1186/1471-2180-6-58.
- .- Monroe, P. 1979. Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii*. *J.Clin. Microbiol.* 20: 850-851.
- .- Mullane, N, Murray, J, Drudy, D, Prentice, N, Whyte, P, Wall, P, Parton, A and Fanning, S. 2006. Detection of *Enterobacter sakazakii* in Dried Infant Milk Formula by Cationic-Magnetic-Bead-Capture. *Appl Environ Microbiol.* 72(9):6325-6330.
- .- Nassib T, Eldin, M y El sharoud W. 2003. Assessment of the presence of Salmonella spp in Egyptian diary products using various detection media. *Lett Appl Microbiol.* 6: 405 – 409.
- .- Pagotto, F; Nazarowec, W; Bidawid, S y Farber, J. 2003. *Enterobacter sakazakii*: Infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *J Food Prot.* 66: 370-37.
- .- Red Internacional de autoridades de inocuidad de alimentos (INFOSAN). *Enterobacter sakazakii* en las formulas infantiles en polvo. INFOSAN Nota Informativa N°. 1/2005.
- .- Richards, G; Gurtler, J y Beuchat, L. 2005. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. *J Appl Microbiol.* 99(4): 844-850.

- .- Rosset, P; Noel, V y Morelli, E. 2006. Time-temperature profiles of infant milk formula in hospitals and analysis of *Enterobacter sakazakii* growth. *Food Control*. 18: 1412-1418.
- .- Simmons, B; Gelfand, M; Haas, M; Metts, L y Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 10(9):398-341.
- .- Telang, S, Berseth, C, Ferguson, P, Kinder, J, Derooin, M, Petschow, B. 2005. Fortifying Fresh Human Milk with Commercial Powdered Human Milk Fortifiers Does Not Affect Bacterail Growth During 6 Hours at Room Temperature. *Journal of the American Dietetic Association*. 105 (10): 1567-1572.
- .- Townsend, S; Hurrell, E and Forsythe, S. 2008. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolated associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiology*. 8:64-70..- Unicom, L. 2009. Pathogen Transmission Routes, Hygiene Practices and Prevention. *J Health Popul Nutr*. 27 (5): 599-601.

ANEXOS.

Anexo 1. Reacciones bioquímicas de las 57 cepas de *Enterobacter sakazakii* incluyendo una cepa tipo y una de *Enterobacter cloacae*.

Prueba	% positivo acumulado de las 57 cepas a las			Reacción para el tipo de cepa	
	24 horas	48 horas	7 días	<i>E. sakazakii</i> ATCC 29544	<i>E. cloacae</i> ATCC 13047
Indol	11	11	ND	-	-
Rojo de Metilo	ND	12	ND	-	-
Voges- Proskauer	98	98	ND	+	+
Citrato	100	100	100	+	+
Sulfuro de hidrogeno en TSI	0	0	0	-	-
Urea	0	0	0	-	-
Fenilalanina	50 ^c	ND	ND	(+ ^w) ^c	-
Lisina	0	0	0	-	-
Arginina	93	100	100	+	+ ²
Ornitina	91	91	91	+	+
Motilidad a 36°C	91	91	91	+	+
Hidrólisis de gelatina a 22°C	0	0	45	+ ⁷	-
Crecimiento en KCN	84	100	100	+	+
Utilización del malonato	18	18	18	-	+
Producción de ácido a partir de D-glucosa	100	100	100	+	+
Producción de gas a partir de D-glucosa	96	98	98	+	+
Producción de ácido a partir de:					
D- Adonitol	0	0	0	-	-
D-Arabinosa	100	100	100	+	+
D- Arabitol	0	0	0	-	-
Celobiosa	100	100	100	+	+
Dulcitol	5	5	5	-	-
Eritritol	0	0	0	-	-
Glicerol	0	0	0	-	+ ³
Inositol	75	75	75	+	+ ²
Lactosa	100	100	100	+	+
Maltosa	100	100	100	+	+
D-Manitol	100	100	100	+	+
D- Manosa	100	100	100	+	+
Melibiosa	100	100	100	+	+
α -metil- D- glucosidasa	93	96	96	+	+
Rafinosa	100	100	100	+	+
L- Ramnosa	100	100	100	+	+
Salicin	98	100	100	+	+
D-Sorbitol	0	0	0	-	+
Sucrosa	100	100	100	+	+
Trehalosa	100	100	100	+	+
D- Xilosa	100	100	100	+	+ ⁶

Producción de ácido	0	0	0	-	-
Tartrate, Jordan	0	0	0	-	-
Hidrólisis de esculina	100	100	100	+	+
Utilización de acetato	84	96	100	+	+
Citrato	100	100	100	+	+
Sulfuro de hidrogeno en PIA	0	0	0	-	-
Reducción de nitratos	98	98	ND	ND	+
Motilidad de 22°C	89	91	91	+	+
DNasa a 25°C	0	0	95	+ ⁵	-
DNasa a 36°C	2	9	100	+ ³	-
Hidrólisis pectato	0	0	0	-	-
Pigmento amarillo a 25°C	100	100	100	+	-
Tirosina	0	0	0	-	-

Símbolos. -, negativo al final del período de incubación; +, positivo a las 24 horas; (+^w) reacción equivocada que no pudo ser constantemente positiva o negativa; +⁷, el superíndice indica el día en que la reacción se convirtió en positiva.

ND. No detectado.-

C. Color verde muy tenue.

ONPG, O-nitrofenil-3- D- galactopiranosil

Fuente: Farmer y col; 1980.

Anexo 2. Características de los 15 biogrupos reconocidos entre 57 cepas de *E. sakazakii* estudiadas.

Biogrupo	Número de cepas en el biogrupo (%)	Prueba que diferencia al biogrupo del tipo salvaje.
1 (tipo salvaje)	24 (42)	-
2	7 (12)	Inositol -
3	5 (9)	Motilidad -
4	4 (7)	Ornitina -
5	3(5)	Malonato +
6	1 (2)	Indol +
7	1 (2)	Gas -
8	1 (2)	Nitrito -
9	3 (5)	Inositol - , malonato +
10	2 (4)	Inositol - , indol +
11	1 (2)	Inositol -, dulcitol +
12	1 (2)	Indol +, malonato +
13	1 (2)	Rojo de metilo +, Voges proskauer -
14	1 (2)	Inositol-, malonato +, ornitina -
15	2 (4)	Indol +, malonato + , dulcitol+, alfa metil glucosidasa-

Fuente: Farmer y col., 1980.

Anexo 3. Diferenciación bioquímica de *E. sakazakii* 16S rDNA clusters

Biogrupos de Farmer	Producción de ácido a partir de:			Numero de cepas	cluster genómicos
	Inositol	Dulcitol	Indol		
1-5, 7-9, 13, 14	(+/-)	-	-	169	1
11	-	+	-	1	1
16	+	+	-	9	2
15	+	+	+	6	3
6, 10, 12	(+/-)	-	+	4	4

Fuente: Iversen y col; 2006.

Anexo 4. Casos aislados de infección de *Cronobacter sakazakki*.

Fecha (Referencia)	Lugar	Edad	N° de casos	N° de muertes	Causa fallecimiento	Reservorio	Otros
2010 (Lui y col., 2006)	España	Lactante	1			Fórmula infantil	Meningitis
2007 (Lui y col., 2006)	Italia	Recién nacido	1			Se ignora	Osteomielitis de fémur postcirugia: hombre joven sano.
2007 (Iversen y col., 2006)	España	Recién nacido	1			Se ignora	Sépsis neonatal
2007 (Lehner y col., 2005)	USA	75 años	1	1	múltiples abscesos esplénicos		
2004 (Kim y col., 2008)	Nueva Zelanda		1	1			
1996 (Kothary, 2007)	USA	Lactante	1				Quiste dermoide congénito.
1991 (Kwang Pyo, 2008)	USA	Recién nacido	1		infarto cerebral, absceso cerebral		
1979 (Lenati y col., 2008)	USA	Recién nacido	1			Formulas infantiles	Bacteriemia.
1965 (Lehner y col., 2005)	USA		1				Meningitis.
1965 (Lehner y col., 2005)	Dinamarca	Recién nacido	1				Meningitis

Anexo 5. Brotes epidémicos de infección por *Cronobacter sakazakii*

Fecha- (Referencia).	Lugar	Edades	N° de casos	N° de muertes	Causa fallecimiento	Reservorio	Otros
2011(FDA, 2011)	USA	Lactantes	4	2		Actualmente en estudio por la FDA y CDC	
2004 (Kim y col., 2008)	Francia	Lactantes	15	2	Gastroenteritis.	Fórmula infantil	9 infectados, 4 enfermos, 2 fallecidos.
2001 (Mangue y col., 2006)	USA	Recién nacidos	5			Mezclador de leche en la cocina	2 casos: sepsis – sepsis + meningitis. 3 casos: colonización intestinal.
1998 (Monroe y col.,1979)	Bélgica	Recién nacidos	12	2	Enterocolitis necrosante	Fórmula infantil	
1989 (Mullane y col., 2006)	USA	Recién nacidos	3				meningitis neonatal
1961 (Li chun y col., 2007)	USA	Recién nacidos	2		Meningitis neonatal		
1986/87 (Mullane y col., 2006)	Iceland (reykjavik)	Recién nacidos	3	1	Meningitis hemorragia ventricular	Fórmulas infantiles.	Meningitis neonatal: caso 1: retardo mental-cuadriplejia.
1977/1986 (Lui y col., 2006)	Netherlands	Recién nacidos	8	6			2 pacientes con meningitis y enterocolitis necrotizante simultáneamente

