



**UNIVERSIDAD CENTRAL VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INCIDENCIA DE *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella spp* EN FORMULAS
LACTEAS INFANTILES RECONSTITUIDAS Y ESTUDIO DE SU SENSIBILIDAD
ANTIBIOTICA**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Kenia Rojas, para optar al título de
Licenciado en Biología.**

Tutora: Dra. Elisabetta Tomé

CARACAS-VENEZUELA

Marzo 2012

*Todo logro,
alguna vez fue considerado
imposible.*

RECONOCIMIENTOS

El presente Trabajo Especial de Grado se realizó gracias al apoyo de la Dra. Elisabetta Tomé, MSc. Carolina Palomino y Dr. Amaury Martínez, quienes me asesoraron desde el planteamiento del tema, el seguimiento experimental, hasta la concepción del presente documento.

Deseo también hacer reconocimiento a las instituciones y personas que se suscriben en esta sección, su apoyo hizo posible este trabajo de investigación.

Instituciones

- Universidad Central de Venezuela.
- Facultad de Ciencias.
- Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Proyecto PG-03.7371.2008/1
- Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. Instituto de Biología Experimental.
- Laboratorio de Inmunología, Centro de estudios biomédicos y veterinarios. IDECYT.

Por su apoyo técnico

- MSc. Beira Rojas.
- Br. Carolina Uzcategui.

Por su colaboración técnica

- Dra. Rita Perez.
- Dra, pediatra y puericultora, Barbarita Vásquez.
- Lic. Indira Pérez.
- Lic. Mariana Eleizalde
- Auxiliar de Farmacia, Ramona Jiménez.

Agradezco a Dios; a toda mi familia, en especial a mis padres; a mis amigos y compañeros; por su gran apoyo y constante paciencia. Y a todas aquellas personas que en forma directa o indirecta contribuyeron a que este trabajo de investigación pudiera llevarse a cabo.

INDICE GENERAL

I. Resumen	1
II. Introducción.....	3
III. Objetivos	6
IV. Antecedentes	8
4.1 Enterobacterias	8
4.2 Géneros de interés para esta investigación	9
4.2.1 Genero <i>Enterobacter</i>	9
4.2.1.1 <i>Enterobacter cloacae</i>	12
4.2.2 Genero <i>Cronobacter</i>	12
4.2.2.1 <i>Cronobacter sakazakii</i>	13
4.2.3 Genero <i>Salmonella</i>	14
4.2.3.1 <i>Salmonella spp</i>	14
4.3 Incidencia de enterobacterias en Formulas Lácteas Infantiles	16
4.3.1 Contaminación con <i>Cronobacter sakazakii</i>	17
4.3.2 Contaminación con <i>Salmonella spp</i>	21
4.4 Antibióticos	23
4.4.1 Clasificación de interés para esta investigación	24
4.4.1.1 β -lactamicos	25
4.4.1.2 Anfenicoles	25
4.4.1.3 Aminoglicósidos	26
4.4.1.4 Macrólidos	27
4.4.1.5 Quinolonas	28
4.4.1.6 Sulfonamidas	29
4.4.1.7 Tetraciclinas	30
4.4.2 Resistencia bacteriana.....	30
V. Materiales y métodos	32
5.1 Muestreo	32
5.2 Evaluación de la calidad microbiológica de las Formulas Lácteas Infantiles	32
5.2.1 Recuento de aerobios mesófilos	32

5.2.2 Recuento de coliformes	34
5.3 Incidencia de enterobacterias en Formulas Lácteas Infantiles.....	34
5.3.1 Aislamiento de <i>Cronobacter sakazakii</i>	34
5.3.2 Aislamiento de <i>Salmonella spp</i>	35
5.4 Identificación de enterobacterias mediante galerías API20E	36
5.5 Sensibilidad antibiótica	37
5.5.1 Método disco-difusión	37
5.5.2 Concentración Mínima Inhibitoria	38
5.7 Análisis estadístico	41
VI. Resultados y discusiones	42
6.1 Evaluación de la calidad microbiológica de las Formulas Lácteas Infantiles	42
6.1.1 Recuento de aerobios mesófilos	42
6.1.2 Recuento de coliformes	45
6.2 Contaminación en Formulas Lácteas Infantiles	46
6.2.1 Aislamiento de <i>Cronobacter sakazakii</i>	52
6.2.2 Aislamiento de <i>Salmonella spp</i>	52
6.2.3 Identificación mediante galerías API20E	55
6.3 Sensibilidad antibiótica.....	58
6.3.1 Método disco-difusión	58
6.3.2 Concentración Mínima Inhibitoria	60
6.3.2.1 Amikacina y Gentamicina.....	60
6.3.2.2 Azitromicina	62
6.3.2.3 Ceftazidima	63
6.3.2.4 Ciprofloxacino	64
6.3.2.5 Cloranfenicol.....	65
6.3.2.6 Sulfametoxazol/Trimetoprima	65
6.3.2.7 Tetraciclina.....	66
6.3.2 Resistencia antibiótica	67
6.3.2.1 Ampicilina/Ac. Clavulanico, Oxacilina y Penicilina	67
6.3.2.2 Cefalotina	70

6.3.3 Multiresistencia	71
VII. Conclusiones	75
VIII. Recomendaciones	76
IX. Bibliografía	77
X. Anexos	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Diferenciación bioquímica de <i>Enterobacteriaceae</i>	10
Tabla II. Características bioquímicas del genero <i>Enterobacter</i>	11
Tabla III. Características bioquímicas de <i>Salmonella spp.</i>	15
Tabla IV. Infecciones de <i>C. sakazakii</i> en infantes y neonatos	18
Tabla V. Casos de salmonelosis durante el periodo 1985- 2005 relacionados con las fórmulas infantiles en polvo	22
Tabla VI. Muestras obtenidas, y sus lotes correspondientes por establecimiento	33
Tabla VII. Antibióticos utilizados para el ensayo de CMI	40
Tabla VIII. Recuento de aerobios mesófilos en FLI	44
Tabla IX. Recuento de coliformes totales en FLI	47
Tabla X. Estudio de la industria sobre los ingredientes utilizados en las operaciones de mezcla en seco (Cordier, 2004)	50
Tabla XI. Aislamiento de <i>Cronobacter sakazakii</i> en FLI	53
Tabla XII. Aislamiento de <i>Salmonella spp.</i> en FLI	53
Tabla XIII. Resultados de la Galería API 20E para la cepa aislada	56
Tabla XIV. Diámetro (mm) de los halos de inhibición de las cepas en estudio frente a los diferentes antibióticos	59
Tabla XV. Concentración mínima inhibitoria (µg/mL) de las cepas en estudio frente a los diferentes antibióticos	61
Tabla XVI. Resistencia de las cepas en estudio frente a los diferentes antibióticos	68
Tabla XVII. Calculo del Índice de MultiResistencia para la cepa aislada	73

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Anillo β -lactamico	25
Imagen 2. Estructura química del cloranfenicol	26
Imagen 3. Estructura de un aminoglucosido.....	26
Imagen 4. Estructura de la Eritromicina	28
Imagen 5. Estructura de la cloroquina	29
Imagen 6. Estructura del ácido para-aminobenzoico (PABA)	29
Imagen 7. Estructura del naftaceno	30

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proceso de producción de FLI, tipo mezcla líquida	49
---	-----------

I. RESUMEN

Los principales aspectos microbiológicos de preocupación para la salud pública asociados con los preparados en polvo para lactantes, se refieren a la presencia de *Salmonella spp* y otras enterobacteriáceas como *Cronobacter sakazakii*. Este microorganismo junto con *Salmonella entérica* son causa bien conocida de enfermedades en los lactantes (infecciones sistémicas, enterocolitis necrotizante y diarrea grave), habiendo sido encontrados en preparaciones en polvo para lactantes y habiendo sido demostrado, de manera convincente, que los preparados en polvo contaminados son, tanto desde el punto de vista epidemiológico como microbiológico, el vehículo y la fuente de infecciones en los lactantes.

Este estudio se llevó a cabo con la finalidad de 1. evaluar la calidad microbiológica de fórmulas lácteas infantiles reconstituidas mediante recuento de aeróbios mesófilos y coliformes totales, 2. evaluar la presencia de cepas de *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella spp*. en las mismas, 3. determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la multirresistencia de los patógenos aislados hacia los antibióticos de consumo común en la población infantil. Se utilizó Agar PCA (HIMEDIA) para el conteo de aerobios, Agar VRBA (MERCK) para el conteo de coliformes totales, Agar cromogénico específico para *Cronobacter Sakazakii* (OXOID) y medios de cultivo oficiales para el aislamiento de *Salmonella spp* (COVENIN 1086:84). Para la identificación bioquímica de las cepas presuntivas se utilizaron Galerías API 20E (Biomeriux).

El perfil de resistencia antibiótica (antibiograma) se realizó de acuerdo al método de disco difusión de Bauer y col., 1966, y las CMI se determinaron según el método de microdilución en placa para los antibióticos Amikacina, Azitromicina, Ceftazidime, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Sulfametoxazol/Trimetoprima y Tetraciclina.

El aislamiento de *Cronobacter sakazakii* arrojó resultados positivos en un 5% de las muestras analizadas (n=1). La cepa presuntiva fue identificada posteriormente como *Enterobacter cloacae*. El recuento de coliformes totales fue menor a 10 UFC/g en c/u de las muestras analizadas. *Salmonella spp* estuvo ausente en las muestras analizadas. La cepa aislada presentó resistencia frente a los antibióticos Amoxicilina/Acido clavulanico, Ampicilina, Cefalotina, Oxacilina y Penicilina; arrojando un índice de multirresistencia de 0,36 por lo que se catalogó como multirresistente.

II. INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la historia humana los bebés han sido amamantados. Una mujer que no pudiera o no quisiera amamantar a su bebé por lo general encontraba otra mujer, una “nodriza”, que lo hiciera (Papalia y col., 2005).

A principios del siglo XX, con el advenimiento de la refrigeración, pasteurización y esterilización confiables los fabricantes empezaron a desarrollar fórmulas para modificar y enriquecer la leche de vaca para consumo de bebés. Hasta este punto, los lactantes que no eran alimentados con leche de pecho fallecían en un porcentaje entre el 60-90%, sobre todo por contaminación bacteriana de la leche que se les administraba (Charmelo, 2009).

Durante la segunda mitad del siglo XX la alimentación con fórmula se convirtió en la norma en Estados Unidos y en otros países industrializados. Para 1971 solo 25% de las madres estadounidenses trataban de amamantar a sus bebés. Desde entonces, el reconocimiento de los beneficios de la leche materna ha ocasionado una reversión de esta tendencia, de modo que en la actualidad 70% de las madres estadounidenses amamantan a sus bebés. Sin embargo, menos de la tercera parte sigue con la lactancia a los seis meses y muchas de ellas complementan la leche materna con fórmula (Papalia y col., 2005).

Se necesitan sucedáneos de la leche materna cuando por diversos motivos los lactantes no tienen acceso a ella. Los preparados comerciales se suelen utilizar como sucedáneos de la leche materna y se preparan a nivel industrial de acuerdo a las normas pertinentes del Codex. Cuando las Fórmulas Lácteas

Infantiles (FLI) van enfocadas al consumo por lactantes sanos menores de seis meses, etapa caracterizada por inmadurez digestiva y metabólica, altos requerimientos nutricionales de acuerdo al peso y la necesidad de alimentación láctea exclusiva; se denominan FLI de “Inicio” o tipo I. Si se dirigen a lactantes mayores de seis meses se denominan FLI de “Continuación” o tipo II. Las FLI pueden también sustituir la leche materna en lactantes mayores que toman otros alimentos, y se denominan fórmulas lácteas de “acompañamiento”. Estos tres tipos de preparados solo necesitan la adición de agua para quedar listos para el consumo y, por consiguiente, a menudo también se encuentran ya en forma líquida listos para su uso (FAO-OMS, 2004).

Las FLI de inicio, de las cuales nos ocuparemos en esta investigación, son derivadas de la leche de vaca. Esta es modificada en cantidad, calidad y tipo de nutrientes con el fin de asemejarla tanto como sea posible a la leche humana (de allí el antiguo término de fórmulas maternizadas), y adaptarla a las condiciones de inmadurez digestiva y renal del recién nacido, mejorar su digestibilidad y tolerancia, disminuyendo la carga renal de solutos. Por todo ello, estas fórmulas deben ser la primera opción cuando sea necesario complementar o sustituir la lactancia materna.

Sin embargo, es importante destacar que la fórmula infantil en polvo que cumple con los estándares actuales no es un productos estéril y, podría ocasionalmente contener bajos niveles de patógenos (INFOSAN, 2005). Por tratarse de un polvo seco, pero enriquecido en nutrientes de todo tipo, constituye un sustrato sobre el cual pueden estar presentes microorganismos tolerantes a las condiciones de baja humedad, que son oportunistas y que proliferan cuando las

condiciones se modifican y se hacen favorables, y que crecen a gran velocidad gracias a la abundancia de nutrientes y a la ausencia de flora competidora. Los productos lácteos son excelentes medios para la proliferación bacteriana potencialmente patógena, por lo que condiciones inadecuadas de producción, preparación y manipulación de fórmulas lácteas pueden plantear un riesgo considerable a los infantes (Agostini y col., 2004).

Cronobacter spp. o *Enterobacter sakazakii*, como se lo conocía hasta hace poco tiempo, es un microorganismo perteneciente a la familia de las enterobacterias, que ha adquirido importancia recientemente, como patógeno emergente, por ser agente causante de brotes de Enterocolitis Necrotizante (NEC), meningitis y cerebritis, ocurridos fundamentalmente en servicios de neonatología en países desarrollados (USA, Europa y Oceanía), y que están asociados al consumo de este tipo de fórmulas alimenticias.

Si bien el número de brotes sobre los que existe registro a nivel internacional es bajo (aproximadamente 80 brotes en los últimos 50 años), la virulencia de las enfermedades asociadas, la altísima tasa de mortalidad de los afectados y las secuelas graves que produce en aquellos pocos que consiguen superar la fase aguda del cuadro, a nivel cerebral, han determinado una fuerte preocupación de parte de los organismos internacionales de salud.

Por su parte *Salmonella* spp, aunque raramente, también ha sido asociada epidemiológica y microbiológicamente con infecciones en lactantes producto de la contaminación intrínseca de bajo nivel de preparados en polvo.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la incidencia de *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella* spp. en fórmulas lácteas infantiles reconstituidas e investigar su sensibilidad hacia ciertos antibióticos de uso frecuente en infantes.

Objetivos específicos

1. Evaluación de la calidad microbiológica de algunas fórmulas lácteas infantiles disponibles en el mercado local mediante el recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella* spp.
2. De las muestras obtenidas, aislar e identificar cepas de *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella* spp haciendo uso de pruebas bioquímicas.
3. Determinar, mediante el método de disco-difusión, la sensibilidad antibiótica de las cepas aisladas de *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella* spp; hacia los antibióticos Acido nalidixico, Amikacina, Amoxicilina/Acido clavulanico, Ampicilina, Azitromicina, Cefalotina, Ceftazidime, Ciprofloxacino, Cloranfenicol, Gentamicina, Oxacilina, Penicilina, Sulfametoxazol/Trimetoprima y Tetraciclina.
4. Determinar, mediante el método de microdilución, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas aisladas de *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella* spp hacia los antibióticos: Amikacina, Amoxicilina/Acido clavulanico,

Ampicilina, Azitromicina, Cefalotina, Ceftazidime, Ciprofloxacino,
Cloranfenicol, Gentamicina, Oxacilina, Penicilina,
Sulfametoxazol/Trimetoprima y Tetraciclina.

IV. ANTECEDENTES

La leche materna es el alimento ideal para los niños durante su primer año de vida, puesto que no solo contiene todos los nutrientes necesarios para el desarrollo sino que permite la formación del vínculo afectivo madre-hijo.

Cuando por alguna circunstancia, el niño no puede ser alimentado por el seno materno, es preciso buscar otra alternativa. De ahí que, en la actualidad, las FLI sean consumidas habitualmente por niños de todo el mundo y se consideren como la alternativa de alimentación para complementar o suplir la lactancia.

Los principales argumentos microbiológicos motivo de preocupación para la salud publica actual asociados con los preparados en polvo para lactantes se refieren a la presencia de *Salmonella* spp y otras enterobacteriáceas (coliformes), entre ellas *C. sakazakii* (OMS-FAO, 2004).

4.1 Enterobacterias

Se llama de esta manera a un grupo muy diverso de bacterias que tienen como hábitat natural el intestino del hombre y de varias especies animales (Romero, 2007). Son también agentes etiológicos habituales en las infecciones sistémicas de los recién nacidos, y en menor medida de los niños de mas edad.

Esta familia está formada por bacilos cortos (1,0 a 6µm), Gram-negativos, aerobios y/o anaerobios facultativos, no formadores de esporas. Algunos son móviles por cilios peritricos, otros inmóviles. Muchos de ellos forman capsula,

otros crecen flagelos, la mayoría producen fimbrias y pilis. Todos son oxidasa negativos ni licuan el alginato, algunos son catalasa positivos. Reducen los nitratos a nitritos. Fermentan la glucosa con formación de ácido, con o sin producción de gas (Romero, 2007).

La familia *Enterobacteriaceae* comprende cinco tribus. Cada tribu abarca varios géneros, estos agrupan diferentes especies, a su vez, las especies pueden presentar diferentes serotipos y estos, biotipos. La tabla I nos muestra las diferencias bioquímicas más importantes entre las diferentes especies que conforman esta familia (Gómez-Ruiz, 1974).

4.2 Géneros de interés para esta investigación

4.2.1 Género *Enterobacter*

Como género, *Enterobacter* tiene las características generales de *Klebsiellaeae*, pero puede ser diferenciado de la mayoría de las especies de *Klebsiella* porque son inmóviles y ornitina positivos. Todas las especies forman parte de la flora nativa del intestino, pero pueden producir infecciones severas del tracto urinario y del tracto respiratorio (Koneman, 2008). La Tabla II muestra las características bioquímicas que permiten definir al género.

Tabla II. Características bioquímicas del genero *Enterobacter*.

Prueba bioquímica	Resultado
Acetoína	+
Catalasa	+
Citrato de Simmons	+
Fenilalanina	-
Fermentación	+
Gelatina	+
Gluconato	+
Glucosa	+
H ₂ S	-
Indol	-
KCN	+
Lactosa	+
Lisina	-
Motilidad	+
Ornitina	+
Oxidasa	-
Producción de gas	+
Rojo de metilo	+ 0 -
Sacarosa	+
Ureasa	+ 0 -

Fuente: (Gómez-Ruiz, 1974)

4.2.1.1 *Enterobacter cloacae*

Morfología: Bacilo corto Gram-negativo, de 0,5-1 x 1-2 µm. Colonias radiales, de 2-4 mm de tamaño, con un centro engrosado; de color ceniza y consistencia mucosa sobre Agar Colombia.

Propiedades metabólicas: Aerobio mesófilo.

Resistencia: La temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 37° C. El tratamiento térmico a 100 °C por 2 minutos permite su eliminación.

Actividad bioquímica: Lactosa, glucosa, sacarosa y citrato positivos. Indol negativo. Detectable en agar ornitina. Produce H₂S (Gomes-Ruiz, 1974).

Infección: Se asocia con distintas infecciones oportunistas que afectan las vías urinarias y respiratorias, y las heridas cutáneas. En ocasiones, producen septicemia y meningitis neonatal, así como superinfecciones (Koneman, 2008).

4.2.2 Género *Cronobacter*

En 1980 Farmer y colaboradores analizaron la especie *E. sakazakii* mediante hibridación DNA-DNA. Los resultados mostraron un 41% de relación con *Citrobacter freundii* y un 54% con *E. cloacae*.; puesto que *E. sakazakii* resultó fenotípicamente mas cercano a *E. cloacae* se mantuvo dentro del género *Enterobacter*. Análisis posteriores de la fracción DNAr 16S y secuenciación del gen hsp60 mostraron que *E. sakazakii* formaba al menos 4 grupos genómicos distintos que podían ser considerados especies únicas. De esta forma, en 2007 se

estableció el género *Cronobacter* conformado por las especies de *E. sakazakii* (OXOID, 2010).

En la actualidad este género está compuesto por bacilos cortos Gram-negativos, móviles, no esporulados, anaerobios facultativos, cercanos a los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*; y comprende las especies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* y *C. dublinensis* (OXOID, 2010).

4.2.2.1 *Cronobacter sakazaki*

Morfología: Bacilo Gram-negativo con movilidad peritrica y no esporulado. Presenta una cápsula ancha. Mide 0,6-1,0 x 1,2-3,0µm.

Propiedades metabólicas: Es un anaerobio facultativo. Mesófilo

Resistencia: No es particularmente termotolerante, temperatura óptima 35°C. Presenta mecanismos que le permiten adaptarse a sobrevivir en los productos desecados debido a que posee una gran tolerancia a los bajos tenores de concentración de vapor de agua libre (aw), poniendo en juego un mecanismo bioquímico adaptativo, que le permite ser más resistente en su fase estacionaria al estrés osmótico y a la desecación (Lameda, 2002).

Actividad bioquímica Citrato positivo, indol y rojo metilo negativo. Respuesta lenta en agar gelatina. DNAsa negativo. Detectable en agar ornitina.

Infección En general infecciones nosocomiales: urinaria, pulmonar, bacteriemia asociada a catéteres, contaminación de perfusiones IV, infección de la herida quirúrgica y meningitis neonatal (Mensa y col., 1997).

4.2.3 Género *Salmonella*

El género *Salmonella* comprende un grupo muy heterogéneo de bacterias que colonizan el intestino del hombre y de muchas especies animales, causando patología intestinal.

Está formado por bacilos Gram-negativos, no encapsulados, flagelados peritricos, con fimbrias y pilis. Algunos forman una delgada microcápsula y no producen esporas. Pueden ser aerobios o anaerobios facultativos. Son viables en diferentes condiciones ambientales, sobreviven a la refrigeración y congelación y pueden resistir el calentamiento (Romero, 2007). Las características bioquímicas propias del género, se observan en la Tabla III.

4.2.3.1 *Salmonella* spp

Morfología: Bacilo Gram-negativo aerobio no esporulado. Generalmente móvil por cilios peritricos. Las colonias tienen un diámetro de entre 2 a 4mm. (Jay, 2000).

Propiedades metabólicas: Son aerobios anaerobios facultativos. Crecen entre un rango de temperatura de 7 a $\leq 54^{\circ}\text{C}$; con un óptimo de 35 – 37 $^{\circ}\text{C}$; con propiedades psicrotróficas de crecimiento de 2 a 4 $^{\circ}\text{C}$. Crecen entre un rango de pH de 4,5 a 9,5 con un pH óptimo de crecimiento 6,5 – 7,5; y con una actividad de agua (a_w) mínima de 0,93 (Doyle, Beuchat, y Montville, 1997).

Resistencia: Algunas cepas pueden crecer bajo condiciones de refrigeración. Igualmente toleran condiciones de baja humedad relativa, debido a la presencia de proteínas que actúan como componentes protectores. Son fácilmente destruidas

Tabla III. Características bioquímicas de *Salmonella spp.*

Prueba bioquímica	Resultado
Acetato	+
Adonitol	-
Alginato	-
Arginina	+
Citrato de Simmons	+
Dulcitol	+
Eritrol	-
Esculina	-
Fenilalanina	-
Gelatina	-
Glucosa	+
H ₂ S	+
Indol	-
KCN	-
Lactosa	-
Lisina	+
Malonato	-
Motilidad	+
Ornitina	+
Oxidasa	-
Producción de gas	+
Rafinosa	-
Rojo de metilo	+
Sacarosa	-
Ureasa	-
V-P	-

Fuente: (Gómez-Ruiz, 1974)

por calor (a temperatura de pasteurización de la leche) (Jay, 2000) y son muy sensibles a ciertos ácidos como es el caso del acético, propiónico y butírico (pH < 4). No toleran concentraciones salinas moderadas (2 – 8% NaCl).

Actividad bioquímica: Son capaces de producir sulfuro de hidrógeno detectable en Agar Triple Azúcar Hierro, Agar Hierro, Lisina y Ornitina. Reduce nitratos a nitritos. Son ureasa negativa e indol negativo. No desaminan el aminoácido fenilalanina y triptófano. Son oxidasa negativo y fermentan glucosa con producción de ácido o ácido y gas. No fermentan lactosa (Gómez-Ruiz, 1974).

Infección:

Salmonellas tifoparatificas: fiebre tifoidea (fiebre, cefalea, tos, diarrea, estreñimiento, exantema, esplenomegalia, leucopenia). Colecistitis. Estado de portador asintomático (Mensa y col., 1997).

Salmonellas gastroenteriticas: Enteritis, colitis, estado de portador intestinal asintomático. Bacteriemia y sepsis (especialmente en pacientes con déficit de la inmunidad celular, SIDA, esquistomiosis o hemolisis). Colecistitis, artritis, osteitis, endocarditis, infección endovascular (aneurisma arterioesclerótico de la aorta abdominal), infección urinaria, meningitis, neumonía, empierna (Mensa y col., 1997).

4.3 Incidencia de enterobacterias en Fórmulas Lácteas Infantiles

Las recomendaciones de la FAO establecen que el contenido máximo de organismos coliformes debe ser menor de 3 Unidades Formadoras de Colonias por gramo de leche (< 3UFC/g) (Moreno y col., 2005). En un estudio realizado en

1998 se observó la presencia de enterobacterias en el 52% de 141 preparados diferentes de 35 países. Dado que los preparados en polvo para lactantes son una fuente de nutrición para muchos niños con riesgo, se consume un número muy elevado de porciones. En consecuencia, hay una pequeña posibilidad de que incluso un solo microorganismo o un pequeño número presente en los preparados reconstituidos pueda ser causa de enfermedad (OMS-FAO, 2004).

Cronobacter sakazakii y *Salmonella entérica* son causa bien conocida de enfermedades en los lactantes (por ejemplo, infecciones sistémicas, enterocolitis necrotizante [NEC] y diarrea grave) y se han encontrado en preparaciones en polvo para lactantes. Se ha demostrado de manera convincente que los preparados en polvo contaminados son, tanto desde el punto de vista epidemiológico como microbiológico, el vehículo y la fuente de infecciones en los lactantes (OMS-FAO, 2004).

4.3.1 Contaminación con *Cronobacter sakazakii*

Si bien *C. sakazakii* ha sido detectado en diferentes tipos de alimentos, solo las fórmulas infantiles en polvo se han visto asociadas a los brotes de esta enfermedad, como se observa en la Tabla IV.

Existen dos rutas por la cual este microorganismo puede ingresar a la fórmula infantil; la primera a través de una contaminación intrínseca ya sea por ingredientes contaminados agregados después del proceso de secado o a partir del ambiente de producción, después del secado y antes del envasado. En un estudio realizado en 13 países de Europa, con fórmulas infantiles en polvo, se

Tabla IV. Infecciones de *C. sakazakii* en infantes y neonatos.

Año	País	Infectados	Edad	Muertes	Síntomas	Vehículo	Referencias
1965	USA	1	-	-	Meningitis.	-	Joker y col., 1965.
1965	Dinamarca	1	Neonato	-	Meningitis.	.	Joker y col., 1965.
1977 – 1981	-	8	-	6	Meningitis.	FLI	Muytjens y col., 1983.
1979	USA	1	Neonato	-	Bacteriemia.	-	Monroe, 1979.
1981	USA	2	5 semanas	-	Meningitis- cerebritis necrotizantes. Secuelas motoras y mentales.	-	Kleiman y col., 1981.
1981	USA	1	-	-	Meningitis.	-	Drudy y col., 2006.
1986 – 1987	USA	3	5 días	2	Meningitis.	FLI	Biering y col., 1989.
1988	USA	4	28 - 34,5 semanas	0	Sepsis/diarrea sanguinolenta	FLI	Simmons y col., 1989; Clark y col., 1990.
1988	-	1	6 meses	0	Bacteriemia.	FLI	Nonega y col., 1990.
1991	USA	1	Neonato	-	Infarto y absceso cerebral.	-	Gallagher, P. 1991.
1994	Francia	17	Neonatos	4	Shock séptico.	FLI	Caubilla, 2007.
1996	USA	1	20 Meses	-	Quiste dermoide congénito infectado con E. Sakazakii.	-	Tekkök ji y col., 1996.

1998	Bélgica	12	4 días - 2 meses	0	Enterocolitis.	FLI	Van Acker y col., 2001.
1999 – 2000	-	-	-	-	-	FLI	Block y col., 2002.
1999 – 2000	USA	2	3 y 4 días	0	Bacteriemia, meningitis.	FLI	Bar-Oz y col., 2001.
2001	-	11	11 días	1	Meningitis, enterocolitis.	FLI	Himelright y col., 2002.
2004	Nueva Zelanda	1	-	1	-	-	Boletín semanal del centro de recursos de la red IBFAN para América del sur y Caribe. Año 3, n° 119. 2005.
2004	Francia	16	Lactantes	3	Gastroenteritis severa.	FLI	Boletín semanal del centro de recursos de la red IBFAN para América del sur y Caribe. Año 3, n° 119. 2005.
2005	-	1	37 días	0	Gastroenteritis	FLI	-
2007	España	1	Neonato	-	Sepsis Neonatal.	-	Conde y col., 2007.
2007	-	1	33 semanas	0	Meningitis.	FLI	De Simón y col., 2009.
2011	-	12	-	2	-	FLI	-
- = No	especifica						

Fuente: Iversen y Forsythe, 2003; modificada por Rojas, 2012.

encontró que *C. sakazakii* fue aislado en un numero muy bajo ($<1\text{UFC/g}$), en 14% de las 141 muestras analizadas; esto cae por debajo de los límites máximo aceptados de organismos coliformes para las fórmulas infantiles en polvo definido por la FAO (Agostini y col., 2004).

La segunda ruta, es la contaminación externa durante la reconstitución y manipulación de la fórmula, por ejemplo utilizando utensilios que no sean higienizados apropiadamente. Con base en la información disponible, en el 50 – 80 % de los casos, la fórmula infantil en polvo es tanto la fuente como el vehículo de la enfermedad inducida por *C. sakazakii*, y en 20 – 50 % de los casos la fórmula es el vehículo pero la fuente de origen es la falta de higiene durante la reconstitución y manipulación (INFOSAN, 2005).

Se han descrito infecciones graves asociadas a *C. sakazakii* en recién nacidos, en especial en las primeras semanas de vida, sobre todo infecciones del sistema nervioso central con alta mortalidad o secuelas neurológicas importantes, pero también episodios de enterocolitis necrotizante y otras infecciones graves (Moreno, 2005).

Aunque *C. sakazakii* ha causado enfermedades en todos los grupos de edades, basándose en la distribución por edades de los casos notificados se dedujo que los lactantes (es decir, niños menores de 1 año) eran un grupo con un riesgo particular. Dentro de este grupo, se consideran que el mayor riesgo lo corren los lactantes inmunodeprimidos y los recién nacidos (≤ 28 días), en particular los de peso bajo al nacer (menor 2.500g, según la OMS [1994]). Los lactantes de madre VIHpositivas son también motivo de preocupación, porque tal

vez necesiten específicamente los preparados y pueden ser más susceptibles a la infección (OMS-FAO, 2004).

4.3.2 Contaminación con *Salmonella*

A diferencia de *C. sakazakii* y otras enterobacteriáceas, en los estudios de los preparados en polvo para lactantes raramente se ha detectado *Salmonella*, en un estudio realizado por Muytjens, Roelofs-Willems y Jasper (1988) en el que se investigaron 141 preparados diferentes, no se encontró *Salmonella* en ninguna de las muestras. Sin embargo, se han producido casos de contaminación intrínseca de los preparados en polvo que han dado lugar a brotes de enfermedad (ver Tabla V). En estos brotes, se estableció una asociación epidemiológica y microbiológica de la contaminación intrínseca de bajo nivel de los preparados en polvo para lactantes por *Salmonella* con infecciones en los lactantes. Los preparados en polvo reconstituidos son probablemente un vehículo normal en la transmisión de *Salmonella* a los lactantes, dada su importante función en la alimentación de estos, pero debido al plan de muestreo que existe actualmente para este microorganismo es más probable que se produzca la contaminación de los preparados en el ámbito del preparador o del entorno de preparación que en el proceso de fabricación.

Una observación común es que la clasificación por edades de los pacientes con salmonelosis sigue una distribución bimodal cuyos máximos corresponden a los niños y los ancianos. Las razones para la existencia de un exceso relativo de casos entre los niños muy pequeños son la mayor susceptibilidad a la primera

Tabla V. Casos de salmonelosis durante el periodo 1985- 2005 relacionados con las fórmulas infantiles en polvo.

Serotipo de <i>Salmonella</i>	Año	Nro de infectados	Lugar	Organismo aislado desde fórmula infantil en polvo	Vehículo	Referencias
Ealing	1985	48	Reino Unido	Si	FIP	Rowe y col.,1987
Tennessee	1993	≥3	Estados Unidos, Canadá	Si	FIP	Center for Disease Control and prevention. 1993
Virchow	1996	≥48	España	Si	FIP	Usera y col., 1996
Anatum	1996 – 1997	17	Reino Unido, Francia	No	FIP	Threlfall y col., 1998
London	2000	30	Corea	Si (solo paquetes abiertos)	FIP	Park y col., 2004
Agona	2004 - 2005	141	Francia	Si	FIP	Brouard y col., 2007
FIP = Fórmula	Infantil	en Polvo				

Fuente: (Cahill y col., 2008)

exposición o la mayor probabilidad de necesitar cuidados médicos y que tienen más probabilidades de ser sometidos a control que otros grupos de edades. Con independencia de su susceptibilidad a la infección, una vez infectados los lactantes (en particular los que padecen inmunodepresión médica) tienen más probabilidades de sufrir consecuencias graves o de morir por Salmonelosis. Los lactantes que se alimentan con leche materna tienen menos probabilidades de sufrir una infección con *Salmonella*. En un estudio de casos y testigos con objeto de determinar los factores de riesgo para la Salmonelosis esporádica se observó que los consumidores de una alimentación líquida que no contenía leche materna tenían una probabilidad 44,5 veces mayor de contraer la enfermedad (Rowe y col., 2004).

4.4 Antibióticos

Se denomina antibiótico a cualquier sustancia química producida por un microorganismo, utilizada para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos infecciosos. Una propiedad común a todos los antibióticos es la toxicidad selectiva: presentan una toxicidad hacia los organismos invasores superior a la que muestran frente a animales o seres humanos (Lorenzo-Velazquez, 2008). Para conseguir inhibir o destruir a los microorganismos, los antibióticos deben atravesar la barrera superficial de la bacteria y después fijarse sobre su diana (Tomé y col., 2008).

En un principio, el término antibiótico solo se empleaba para referirse a los compuestos orgánicos de origen biológico, los cuales se obtienen de cultivos de

bacterias u hongos, que resultan tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad también se emplea para denominar compuestos sintéticos, los producidos exclusivamente por síntesis química, o semisintéticos, cuando a partir de un núcleo básico del antibiótico producido por el microorganismo, se modifican algunas de sus características químicas para mejorar sus propiedades farmacéuticas o su espectro o, incluso, para disminuir su toxicidad (Lorenzo-Velazquez, 2008).

4.4.1 Clasificación de interés para esta investigación

Los criterios de clasificación de antibióticos son diversos, lo que origina varias claves que han permitido agruparlos según la estructura química, el espectro de actividad, el efecto antimicrobiano y el mecanismo de acción.

Por su estructura química, los antibióticos se agrupan en familias, con propiedades generales similares, como β -lactámicos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglucosidos, glucopeptidos, macrolidos, etc.

4.4.1.1 β -lactámicos

Comprenden las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, aztreonam e inhibidores de β -lactamasas. Todos los fármacos pertenecientes a este gran grupo presentan en su estructura química un anillo β -lactámico (Imagen 1). A este anillo se encuentra unido un anillo tiazolidínico, de cinco componentes en el caso de las

penicilinas, o un anillo dihidrotiacínico, de seis componentes en el caso de las cefalosporinas (Lorenzo y Velazquez, 2008).

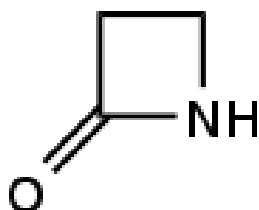


Imagen 8. Anillo β -lactámico, estructura lactámica con un anillo heterocíclico que consiste en tres átomos de carbono y un átomo de hidrogeno.

4.4.1.2 Anfénicoles

Esta familia de antibióticos presenta una estructura bastante simple, lo que ha facilitado desde hace tiempo su síntesis química, consta de un grupo propanol unido a un radical nitrobenzeno.

Los fármacos de esta familia pueden considerarse antibióticos de amplio espectro puesto que pueden actuar sobre bacterias, hongos o protozoos, e interfieren en el crecimiento de más de uno de ellos o de numerosas especies (Lorenzo-Velazquez, 2008).

Dentro de este grupo se encuentra el cloranfenicol (imagen 2), aislado a partir del *Streptomyces venezuelae* en 1947, y el primer antibiótico de amplio espectro descubierto (Gonzalez y Saltigeral, 2002).

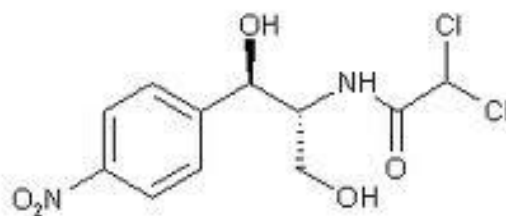


Imagen 9. Estructura química del cloranfenicol.

4.4.1.3 Aminoglucósidos

Los Aminoglucósidos contienen un anillo aminociclitol, unido por enlaces glucosídicos a dos o más azúcares (imagen 3), estos últimos generan las características farmacocinéticas y antibacterianas de estos fármacos (Gonzalez y Saltigeral, 2002).

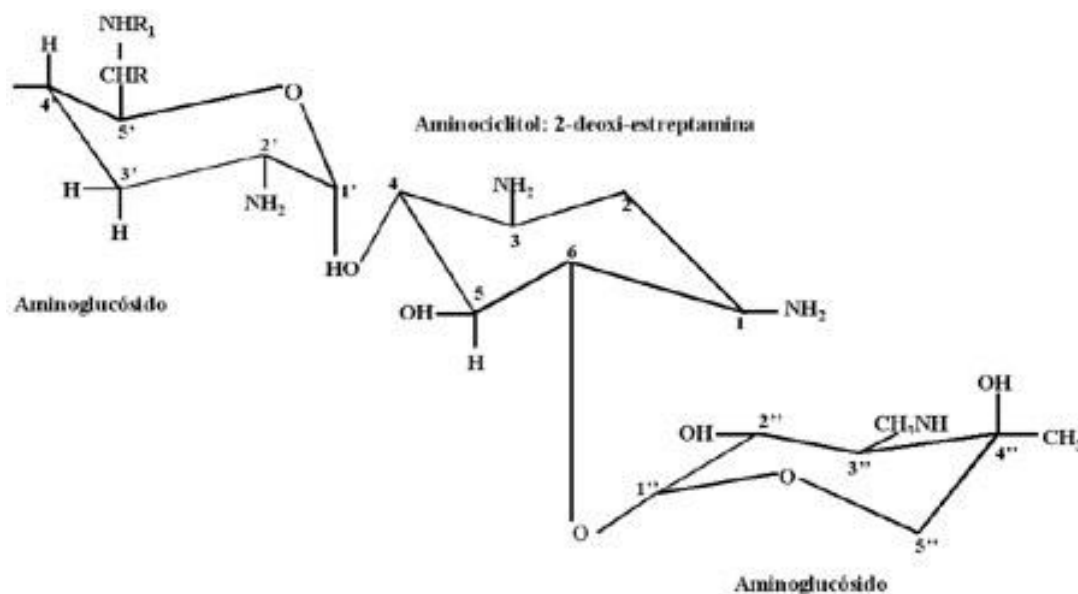


Imagen 10. Estructura de un aminoglucósido, con su anillo aminociclitol unido a dos azúcares.

Esta familia esta constituida por sustancias naturales, producidas por actinomicetos (*Streptomyces* y *Micromonospora*), y derivados semisinteticos que por su espectro antibacteriano y su acción bactericida tienen gran utilidad en el tratamiento de infecciones graves causadas por microorganismos Gram negativos, especialmente las enterobacterias (Gonzalez y Saltigeral, 2002). Son inactivos contra las bacterias aerobias Gram positivas (Tomé y col., 2008).

4.4.1.4 Macrólidos

Los macrólidos son antibióticos de amplio espectro que incluyen la eritromicina, oleandomicina y espiramicina. Están constituidos por un anillo lactónico macrocíclico (imagen 4) en cuya cadena lateral se agregan carbohidratos variados y complejos, uno de los cuales contiene un grupo dimetilamino (Gonzalez y Saltigeral, 2002).

Según el número de átomos que posea el anillo lactónico (14, 15 y 16 átomos), los macrólidos se clasifican en tres grupos.

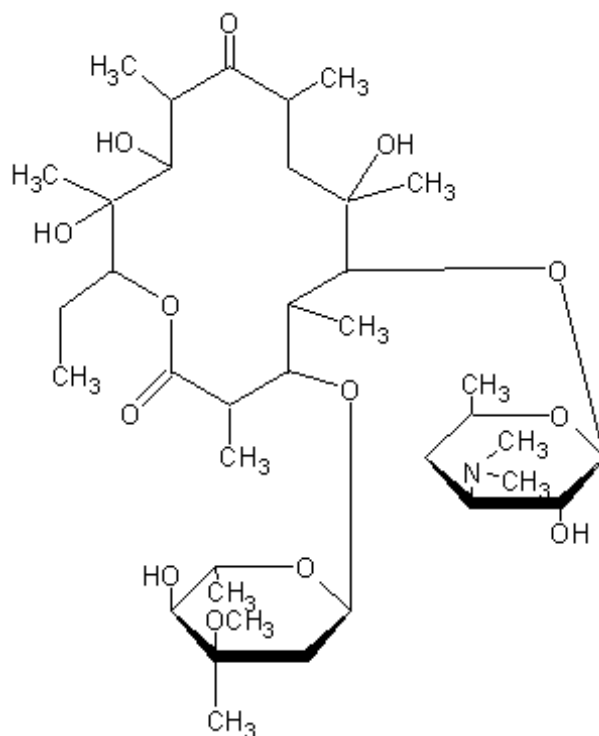


Imagen 11. Estructura de la Eritromicina, donde se observa el anillo macrocíclico.

4.4.1.5 Quinolonas

Son derivados sintéticos obtenidos a partir de la cloroquina. De ella se aisló, en 1962, el primer miembro del grupo: el ácido nalidixico. Las quinolonas pueden clasificarse en varios grupos, al primero pertenecen las no fluoradas que son compuestos antisépticos urinarios en sentido estricto; el segundo grupo está compuesto por las quinolonas fluoradas (fluoroquinolonas), con un átomo de fluor en posición 6 que mejora el espectro y lo amplía a gérmenes Gram-positivos (Lorenzo y Velazquez, 2008).

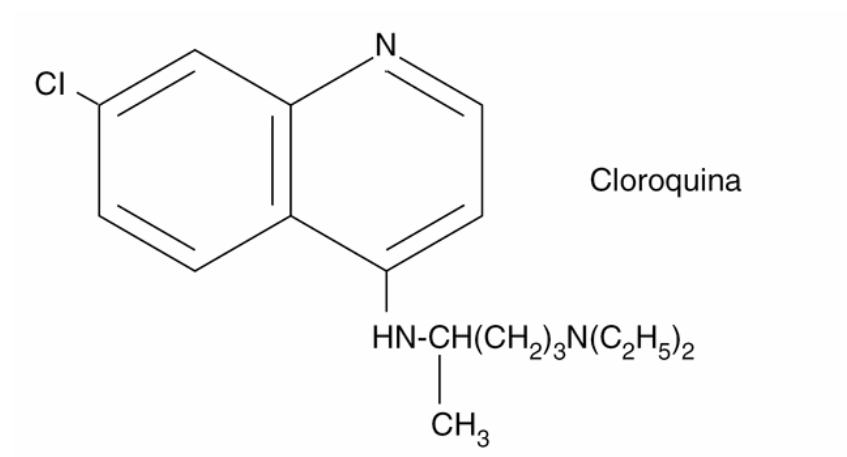


Imagen 12. Estructura de la cloroquina.

4.4.1.6 Sulfonamidas

Son análogos estructurales del ácido Para-aminobenzoico (PABA) que utilizan las bacterias para sintetizar ácido fólico. Compiten con el PABA en su unión con la enzima encargada de la síntesis del mismo (Mensa, 1997).

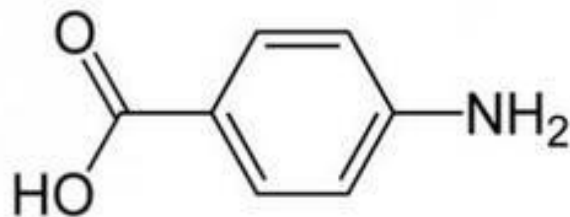


Imagen 13. Estructura del ácido para-aminobenzoico (PABA).

4.4.1.7 Tetraciclinas

Las tetraciclinas son un grupo de antimicrobianos con una estructura química básica común, formada por un sistema anular de cuatro anillos, el octa-hidronaftaceno o naftaceno; al que se pueden añadir diferentes radicales.

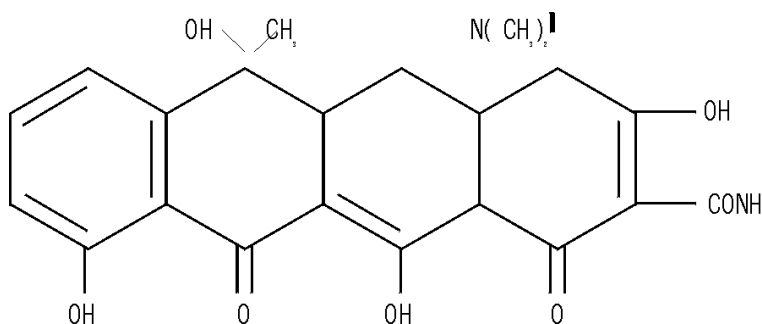


Imagen 14. Estructura del naftaceno.

4.2 Resistencia bacteriana

La introducción de los antimicrobianos en la década de 1940 representó uno de los mayores avances médicos de todos los tiempos. Sin embargo, las enfermedades infecciosas siguen siendo la causa más frecuente de consulta en atención primaria, donde se realiza el 92% de la prescripción de antibióticos.

Las infecciones bacterianas del neonato de alto riesgo son una preocupación constante del pediatra, debido a la gran facilidad con que se diseminan en el organismo del paciente y a otros niños hospitalizados. La tendencia en el uso injustificado de antibióticos es particularmente acentuada en el manejo del recién nacido; en ello influyen sus deficientes mecanismos

inmunológicos y la alta letalidad que la infección ocasiona; con frecuencia se los prescribe solo por la premura de la situación, las dificultades diagnosticas o el exceso de celo del medico (Manotas et al., 1990).

El problema del uso injustificado de antibióticos radica en la capacidad de las bacterias para desarrollar mecanismos de resistencia, puesto que las infecciones por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad, demanda sanitaria, coste del tratamiento y deterioro de la calidad del tratamiento de futuros pacientes.

Los mecanismos de resistencia adquiridos y transmisibles son los más importantes y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas (Daza, 1998).

Varios autores han notificado una resistencia creciente a los antibióticos utilizados normalmente en el tratamiento inicial de la infección sospechosa por *Enterobacter*. También se ha informado de la existencia de β -lactamasas y cefalosporinas procedentes de *E. sakazakii*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestreo

Fueron adquiridas cuatro marcas comerciales de Fórmulas Lácteas Infantiles tipo I en sus presentaciones de 400g, provenientes de cinco establecimientos comerciales ubicados en la zona metropolitana de Caracas, a razón de 4 muestras por cada marca para un total de 20 muestras.

Las marcas comerciales fueron identificadas con las letras A, B, C y D; a su vez cada uno de los establecimientos comerciales se identificó con los números 1, 2, 3, 4 y 5. Los lotes correspondientes a cada una de las muestras, y su respectivo establecimiento comercial, se muestran en la Tabla VI.

5.2 Evaluación de la calidad microbiológica de las fórmulas lácteas

5.2.1 Recuento de aerobios mesófilos (COVENIN 902:87)

50g de cada una de las diferentes muestras fueron pesados asépticamente en bolsas tipo click, y se homogeneizaron con 450mL de agua peptonada en un Stomacher durante un minuto. A partir de allí se prepararon las diluciones seriadas necesarias.

Se sembraron por superficie 0,1mL de la muestra original y de la dilución 10^{-1} , en placas de agar PCA (por duplicado). Se invirtieron las placas, y se incubaron a $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48h aproximadamente. Finalizado el periodo de

Tabla VI. Muestras obtenidas, y sus lotes correspondientes por establecimiento.

Establec/ Marcas	1	2	3	4	5
A	347	518	518	347	993
B	738	912	577	916	738
C	559	538	859	868	499
D	525	365	403	403	211

Los lotes se identificaron utilizando un generador de números aleatorios. Números iguales, corresponden a lotes iguales.

incubación, se seleccionaron aquellas placas donde aparecieron entre 30 y 300 colonias.

5.2.2 Recuento de coliformes (COVENIN 1086:84)

50g de cada una de las diferentes muestras fueron pesadas asépticamente en bolsas tipo click, y se homogeneizaron con 450mL de agua peptonada en un Stomacher durante un minuto.

Se colocó 1mL de la dilución 10^{-1} y la dilución 10^{-2} , en cada una de dos placas de Petri. Se agregó a cada placa de 12 a 15mL de VRBA previamente esterilizado y mantenido a una temperatura de 44-46°C aproximadamente. Se mezcló convenientemente y se dejó solidificar por 8-10min sobre una superficie plana. Sin que transcurrieran más de 20min desde el momento de la preparación de la dilución hasta el agregado del agar. Una vez solidificado el agar, se cubrió con 3-4mL del mismo medio para formar una doble capa.

Se invirtieron las placas y se incubaron a 35-37°C durante 24 horas aproximadamente. Finalizado el periodo de incubación, se seleccionaron las placas que contenían no más de 150 colonias. Se contaron como coliformes las colonias de color rojo oscuro que tengan un diámetro no mayor de 0.5mm.

5.3 Incidencia de enterobacterias en Fórmulas Lácteas Infantiles

5.3.1 Aislamiento de Cronobacter sakazakii (ISO/TS 22964:2006)

Pre-enriquecimiento

Se pesaron asépticamente 25g de muestra por triplicado y se añadieron a 225mL de agua peptonada bufferizada. Se homogeneizaron en el Stomacher durante 1 min, y luego se incubó a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24h.

Enriquecimiento selectivo

Después del periodo de incubación, se transfirieron 0,1mL del cultivo por duplicado a un tubo con 10mL de LSTm. Se incubó a $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas aproximadamente.

Del tubo de caldo LSTm previamente incubado, se tomaron 0,1mL y se sembraron por superficie en placas de agar cromogénico para *C. sakazakii*. Las placas se incubaron a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas aproximadamente. Finalizado el periodo de incubación, se seleccionaron las placas que presentaron crecimiento de colonias azules.

5.3.2 Aislamiento de Salmonella spp (COVENIN 1291:2004)

Pre-enriquecimiento

Se pesaron asépticamente 50g de muestra por triplicado, se añadieron 450mL de caldo lactosado, y se homogeneizaron en el Stomacher durante 1min. Se dejó en reposo durante 1h aproximadamente, a temperatura ambiente. Se incubó a $35-37^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24h.

Enriquecimiento selectivo

Después del periodo de incubación se transfirió 1mL del cultivo a un tubo con caldo TTVB, que se incubó a 35°C durante 24 horas; y 0,1mL a un tubo con RV que se incubó a 44°C en baño con agitación durante 24 horas.

Al final del periodo de incubación, se transfirió una asada (3 a 5mm) de cada uno de los dos medios de enriquecimiento selectivo, previamente homogeneizados, a la superficie de placas de agar BS, agar HE y agar XLD. El inóculo se extendió de manera tal que se obtuvieran colonias aisladas.

Las placas se incubaron invertidas a una temperatura de 35-37°C durante 24h. Al final de la incubación se observaron las colonias presuntivas de *Salmonella* cuyas características en los medios diferenciales coincidían con la de la bibliografía.

5.3.3 Identificación de Enterobacterias mediante galerías API 20E

A partir de una colonia bien aislada de microorganismo, se hizo una suspensión en 5mL de solución salina (1% NaCl). Se llenaron con la suspensión bacteriana los tubos de todos los pocillos.

Se llenaron las cúpulas, parte aerobia, de los pocillos CIT, VP y GEL. Se cubrieron con parafina las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE y H₂S, para obtener microaerofilia. Se colocó la tira en su propia cámara, previamente humedecida, para proporcionar una atmosfera húmeda durante la incubación.

Se incubó a 37°C durante 24h. Tras la incubación se anotaron los resultados inmediatos. Estos resultados se identificaron con ayuda del CVCM.

5.4 Sensibilidad antibiótica

5.4.1 Método disco-difusión (Bauer y col., 1966)

Preparación de cultivos

Se inocularon en solución salina colonias de la cepa de interés, previamente aislada e identificada, hasta alcanzar el estándar de turbidez 0,5 de McFarland que corresponde a una población de 10^8 UFC/mL.

Aplicación de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos

Para la susceptibilidad antimicrobiana se aplicó el método de disco difusión descrito por Bauer y col., 1996. Se emplearon discos de antibióticos (BBLTM, Himelab): 30 µg de Amikacina (AN), 10 µg de Ampicilina (AM), 30 µg de Tetraciclina (TE), 30 µg de Acido Nalidixico (NA), 30 µg de Ceftazidima (CAZ), 30 µg de Cloranfenicol (C) , 30 µg de Amoxicilina/Acido clavulanico, 30 µg de Cefalotina (CF), 5 µg de Ciprofloxacina (CIP), 10 µg de Gentamicina (GN), 15 µg de Azitromicina (AZM), 1 µg de Oxacilina (OX), 10IU/IE/IU de Penicilina y 23,75/1,25 µg de Sulfametoazol-Trimetoprim (SXT).

El diámetro de la zona de inhibición de cada agente antimicrobiano fue comparado con el control *Escherichia coli* ATCC 25922. Los microorganismos fueron reportados como resistentes, sensibles e intermedios según los criterios del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico de los Estados Unidos de América (NCCLS). Para caracterizar a la cepa aislada de la FLI, se comparó

también con cepas controles de *E. cloacae* CVCM 1104 y *E. sakazakii* CVCM 1141.

Se extendió sobre placas de agar Mueller-Hinton la suspensión de la cepa de interés, utilizando un hisopo estéril. Los discos de los antibióticos se colocaron asépticamente sobre las placas, que se incubaron a 35-37°C durante 24 horas. La sensibilidad o resistencia, se determinó en función del diámetro del halo de inhibición producido (Bauer y col., 1966).

Análisis de la multirresistencia

El índice de resistencia múltiple a antibióticos se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{MAR} = \frac{\text{Nº de antibióticos para los cuales se presentó resistencia}}{\text{Nº de antibióticos a los que se expuso la cepa}}$$

Índices mayores a 0,2 indican que la bacteria de interés, presenta resistencia múltiple (Vanegas y col., 2004).

5.4.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI a través del método de microdilución descrito por Andrews en el año 2001. Sólo se determinó la CMI en aquellas cepas que presentaron sensibilidad a los antibióticos evaluados mediante el método de disco-difusión (excepto el ácido nalidíxico ya que el mismo no se encuentra a la venta en

nuestro país). La CMI se define como la más baja concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento microbiano después de la incubación.

Preparación de los antibióticos

Se adquirieron antibióticos comerciales, en forma de suspensión o de ampolla (Tabla VII). Se realizaron distintas diluciones a partir de la concentración madre del mismo para alcanzar principalmente 3 concentraciones (10.000, 1.000 y 100 µg/mL). Posteriormente a partir de estas 3 concentraciones obtenidas se realizaron diluciones para alcanzar concentraciones entre 128 y 0.0625 µg/mL.

Preparación del cultivo

Se inocularon 2 o 3 colonias de la cepa de interés previamente aislada en 4mL de caldo Mueller-Hinton hasta alcanzar el estándar de turbidez 0.5 de McFarland, el cual corresponde a una población de 10^8 UFC/mL.

Siembra en Placas de Microtitulación

Utilizando una placa de microtitulación, se colocaron 75µL de la dilución correspondiente del antibiótico en cada pocillo y 75µL del microorganismo de prueba. A modo de control se inoculó una fila que contenía sólo la cepa, una fila que contenía la dilución del antibiótico y una fila con M-HC. Se incubaron las placas por 24h a 35-37°C. Al final de la incubación se midió la absorbancia con el lector de placas Biorad modelo 3550 a una longitud de onda de 595nm. Finalmente se determinó la concentración mínima inhibitoria comparando las absorbancia obtenidas. La concentración en la cual la absorbancia de la cepa con

Tabla VII. Antibióticos utilizados para el ensayo de CMI.

Antibiótico	Presentación comercial	Laboratorio	Concentración
Amikacina	Ampolla	Genven	500mg/2mL
Amoxicilina + Ac. clavulanico	Suspensión	Genven	<u>400mg + 57mg</u> 5ml
Ampicilina	Suspensión	Calox	250mg/5mL
Azitromicina	Suspensión	Genven	200mg/5mL
Cefalotina	Ampolla	Genven	1g/5mL
Ceftazidima	Ampolla	Generico de calidad	1g/5mL
Ciprofloxacina	Suspensión	Dr Reddys	200mg/100mL
Cloranfenicol	Gotas oftálmicas	Oftalmi	2,5mg/1mL
Gentamicina	Ampolla	Genven	80mg/2mL
Oxacilina	Ampolla	Genven	1g
Penicilina	Ampolla	Pfizer	800.000 UI*
Sulfametoxazol + Trimetoprima	Suspensión	Rocher	<u>20mg + 40mg</u> 5mL
Tetraciclina	Capsulas	Galdema	300mg

* 1 UI = 0,6µg

antibiótico empieza a disminuir con respecto a la absorbancia de la cepa sola es la CMI.

5.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron ordenados en tablas de Excel. Las diferencias significativas, de las medias de los diámetros, de los halos de inhibición de la cepa aislada y de las cepas controles fueron determinados a través de un análisis de varianza de una vía ANOVA usando el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows 2007. El nivel de significancia considerado fue $p \leq 0,05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la calidad microbiológica de las fórmulas lácteas infantiles

6.1.1. Recuento de Aerobios Mesófilos

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se utiliza para estimar la flora total de un alimento, pero sin especificar tipo. Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la implementación de buenas prácticas de manufactura (Pascual y Calderón, 2000).

El recuento de estos microorganismos tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento este exento de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena (Pascual y Calderón, 2000).

Excepto en productos que se elaboran por fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de los alimentos. Su significado es diverso:

- Materia prima excesivamente contaminada.
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos.
- La posibilidad, de que pueda haber patógenos puesto que esta flora suele ser mesófila.

- Altos recuentos suelen ser signo e inmediata alteración del producto. Tasas superiores a 10^6 y 10^7 UFC/g suelen ser inicio de descomposición (Pascual y Calderón, 2000).

La Norma COVENIN 909:1996 para fórmulas alimenticias adaptadas para lactantes, que contempla los requisitos que deben cumplir las Fórmulas Lácteas Infantiles, define el límite mínimo de aerobios mesófilos como $5,0 \times 10^3$ (UFC/g) y el límite máximo como $1,0 \times 10^4$ (UFC/g); puesto que las muestras analizadas no pertenecían al mismo lote de una misma marca, es imposible aplicar esta norma estrictamente, aun así podemos usar dichos valores como patrones de referencia. La Tabla VIII muestra el conteo de aerobios mesófilos obtenidos para cada una de las muestras analizadas; puede observarse como la muestra C tiende al límite máximo por lo que podría inferirse contaminación de la muestra.

En los alimentos tratados con calor los recuentos de gérmenes viables pueden dar cifras muy bajas y, en realidad, reflejan únicamente el grado de tratamiento térmico al que fueron sometidos. La ausencia de la flora normal alterante puede suponer un peligro cuando se encuentran presentes microorganismos patógenos, puesto que estos se multiplican más fácilmente cuando la flora alterante es escasa o nula.

Tabla VIII. Recuento de aerobios mesófilos en FLI.

Marca\Muestra	1	2	3	4	5
A	<100UFC/g	6x10³UFC/g	<100UFC/g	<100UFC/g	<100UFC/g
B	<100UFC/g	<100UFC/g	<100UFC/g	<100UFC/g	<100UFC/g
C	1x10⁴UFC/g	1x10⁴UFC/g	1x10⁴UFC/g	9x10³UFC/g	1x10⁴UFC/g
D	<100UFC/g	<100UFC/g	<100UFC/g	<100UFC/g	<100UFC/g

6.1.2 Recuento de Coliformes Totales

El término coliformes se refiere a bacterias que generalmente se reproducen en el intestino, crecen con oxígeno y se alimentan de lactosa produciendo gas. Incluye *E. coli* y otras enterobacterias como *Klebsiella* y *Enterobacter* (Bravo, 2004).

De este grupo se tienen dos divisiones:

- Coliformes totales: Se desarrollan a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Estas bacterias, no tienen necesariamente origen intestinal, pero la presencia de ellos en alimentos indica deficientes prácticas de sanitización de superficies inertes y un mal proceso de desinfección de la materia prima. En este grupo se incluyen *Enterobacter* y *Klebsiella*.
- Coliformes fecales: Se desarrollan a $44.5 \pm 2^\circ\text{C}$. En este grupo se encuentra *E. coli* como principal especie, por ser un organismo de origen totalmente intestinal (Bravo, 2004).

Con excepción de *E. coli* estos microorganismos pueden sobrevivir en el suelo, en los vegetales, etc. por periodos largos de tiempo y su presencia no puede interpretarse, por tanto, como indicador de contaminación fecal. Además, pueden haberse multiplicado en el alimento y su presencia en número alto puede no tener relación con el grado de contaminación inicial. Son particularmente útiles como componentes de criterios microbiológicos para indicar contaminación post-proceso térmico.

Utilizando el método de siembra en doble capa de agar VRBA, para las muestras analizadas no hubo crecimiento de colonias típicas de coliformes por lo que se reporta un estimado de **<10UFC/g** (Tabla IX), siendo <3UFC/g el carácter de recomendación que establece la norma COVENIN 909:1996 para fórmulas alimenticias adaptadas para lactantes.

Los coliformes totales son utilizados como organismos indicadores, porque si las condiciones del producto han sido propicias para que estos se desarrollen, también pueden haberlo sido para *Salmonella* y otros patógenos entéricos.

De los preparados en polvo para lactantes se consume un número muy elevado de porciones, por lo que hay una pequeña posibilidad de que incluso un solo microorganismo de este grupo o un pequeño número presente en los preparados reconstituidos pueda ser causa de enfermedad sobre todo para las poblaciones en riesgo (niños prematuros, de bajo peso al nacer o inmunocomprometidos). De esta manera, el carácter de recomendación debería ser reconsiderado.

6.2 Contaminación en Fórmulas Lácteas Infantiles

Los preparados en polvo para lactantes se fabrican a partir de ingredientes que pueden incluir leche, derivados lácteos, concentrado de proteína de soya, carbohidratos, grasas, minerales, vitaminas y algunos aditivos alimentarios (OMS-FAO, 2004).

En algunos casos los fabricantes elaboran los preparados para lactantes secando primero una mezcla en húmedo de los ingredientes principales

Tabla IX. Recuento de coliformes totales en FLI.

Marca\Muestra	1	2	3	4	5
A	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g
B	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g
C	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g
D	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g

(Proteínas, grasas y carbohidratos), que se conoce normalmente como polvo base de los preparados. Luego se mezclan los ingredientes secundarios secos, como las vitaminas, los minerales y otros carbohidratos, con el polvo base en grandes mezcladores hasta obtener la formulación del producto final (Esquema 1). Esta opción permite realizar operaciones de secado mas prolongadas y reducir la frecuencia de las conversiones entre distintas formulaciones de los productos.

Otra opción es mezclar juntos todos los ingredientes previamente secados para obtener el polvo de preparado para lactantes terminado. Este proceso es más eficaz desde el punto de vista energético y proporciona más flexibilidad en las modificaciones de la formulación. Una vez finalizada las fases de secado o mezcla, el producto final se transfiere de los silos de almacenamiento o mezcladores a la maquinaria de llenado, donde se introduce en potes o recipientes flexibles. Los recipientes se tratan con gas inerte y se sellan, codifican, etiquetan y embalan para su expedición. El producto terminado se suele retener para someterlo a pruebas finales, que incluyen un examen del contenido de nutrientes, la uniformidad y un análisis microbiológico (OMS-FAO, 2004).

En el proceso de mezcla en seco es esencial que los ingredientes secos tengan los mismos niveles microbiológicos que el producto final, puesto que no reciben un tratamiento térmico adicional. En la Tabla X se resumen los resultados del estudio, de la industria para la detección de enterobacteriáceas y *Cronobacter sakazakii* en los ingredientes utilizados en las operaciones de mezcla en seco para todos los tipos de preparados en polvo (hasta los tres años), realizado por Cordier en el 2004.

Tabla X. Estudio de la industria sobre los ingredientes utilizados en las operaciones de mezcla en seco.

Ingredientes	n (10g)	Positivos coliformes o enterobacteriáceas	Positivos <i>E. sakazakii</i>
Vitaminas	793	8	0
1691	835	1	1
Suero en polvo desmineralizado	23	3	0
Sacarosa	1691	28	0
Lactosa	2219	70	2
Banana en polvo/copos	105	3	1
Naranja en polvo/copos	61	1	1
Lecitina	136	1	1
Almidón	1389	155	40

Fuente: OMS-FAO, 2004.

Vale destacar que los ingredientes de la mezcla en seco, no son materias primas, sino que se elaboran de manera tal que cumplan los mismos requisitos que los preparados en polvo ya terminados. De esta manera, la presencia de enterobacterias se debe a una contaminación después del tratamiento térmico.

La presencia de enterobacterias en los preparados en polvo para lactantes, se encuentra influenciada por diversos factores:

- Contaminación inicial de la materia prima a su llegada a la fabrica/industria
- Contacto con las manos de los operarios u otras fuentes de origen humano, contacto con superficies, contaminación a partir del aire y del agua o contaminación proveniente de ingredientes o aditivos.
- Temperatura de conservación a la que se somete el alimento durante el almacenamiento y en el periodo previo al tratamiento industrial.
- El tiempo de exposición a temperaturas que permitan la proliferación de microorganismos
- La intensidad del tratamiento en lo que se refiere a sus efectos letales sobre organismos de distinta resistencia
- Contaminación posterior al tratamiento, así como de otras fuentes en relación con operaciones asesorías: embotellado, envasado o envoltura, enfriado ya sea con agua o aire.
- Efecto selectivo del tratamiento sobre ecología de la población microbiana sobreviviente (Thatcher, 1973).

De los factores ante mencionados, la contaminación post-tratamiento parece ser la mas peligrosa, ya que la mayoría de los alimentos industrializados ofrecen

mejores condiciones para el crecimiento de los no productores de intoxicaciones y toxoinfecciones que los propios alimentos no tratados o naturales.

6.2.1 Aislamiento e identificación de *Cronobacter sakazakii*

Haciendo uso del esquema de detección de *Enterobacter sakazakii*, contenido en la norma ISO/TS 22964:2006 para leches y productos lácteos; solo se obtuvo crecimiento en la muestra D-1, para las demás muestras la ausencia de crecimiento se reporta como <100UFC/g como se observa en la Tabla XI.

Durante el aislamiento, un error experimental modificó la temperatura de crecimiento de 41°C a 37°C. Esta modificación permitió observar crecimiento en la muestra D-1. Posteriormente se modificó la temperatura para las demás muestras, sin obtener resultados.

Motivado a este comportamiento atípico, antes de su identificación la cepa aislada se consideraba como presuntivo de *C. sakazakii*.

6.2.2 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.

Utilizando el método de ensayo para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp en alimentos, contenido en la norma COVENIN 1291:2004, no se encontró *Salmonella* en las muestras analizadas lo que se reporta como 0/25g o ausencia en 25g (Tabla XII).

Existe desde 1979 un plan de muestreo para *Salmonella* en productos destinados al uso en infantes, cuyas edades estén comprendidas entre los 0-6

Tabla XI. Aislamiento de *Cronobacter sakazakii* en FLI.

Marca\Muestra	1	2	3	4	5
A	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g
B	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g
C	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g
D	6x10³UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g	<10UFC/g

Tabla XII. Aislamiento de *Salmonella spp* en FLI.

Marca\Muestra	1	2	3	4	5
A	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g
B	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g
C	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g
D	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g

meses de edad: n=60 c=0 m=0/25g; que se conoce como **tolerancia cero** y que explica como las contaminaciones intrínsecas con este patógeno son relativamente pocas (OXOID, 2010).

Aun con poca frecuencia, los preparados para lactantes han sido asociados a infecciones por Salmonella. Los brotes reportados en los últimos 20 años, 1985-2005, se mencionan a continuación:

- 1985, Reino Unido. Brote de *Salmonella* serotipo *Ealing*. La contaminación se produjo en el desecador (spray drier). El número estimado de organismos presentes era de 1,6 por cada 450g.
- 1993, Estados Unidos y Canadá. Brote de *Salmonella* serotipo *Tennessee*, aislada tanto de los preparados en polvo como de la planta de producción.
- 1994, España. Brote de *Salmonella* serotipo *Virchow*. 48 casos, en su mayoría infantes menores de 7 meses.
- 1996-1997, Reino Unido y Francia. Brote de *Salmonella* entérica serotipo *Anatum*. 17 casos, 15 en Reino unido y 2 en Francia.
- 2000, Corea. Brote de *Salmonella* entérica serotipo *London*. Todos los casos fueron infantes menores de 10 meses (excepto por un niño de 7 años).
- 2005, Francia. Brote de *Salmonella* entérica, serotipo *Agona*, relacionado con el consumo de leche maternizada. El brote tuvo lugar en dos fases:

Diciembre 2004 – Marzo 2005: 44 casos, leche marca Picot.

Marzo 2005: 69 casos. Leche en polvo Bledilait.

Los resultados confirmaron que la marca de leche en polvo Picot era el origen de la infección. Posteriormente se conoció que los lotes contaminados de Bledilait fueron elaborados en la misma línea de producción de Picot. Por otra parte, el perfil molecular de las cepas aisladas de pacientes que consumieron Bledilait fue el mismo que el de las cepas aisladas de pacientes que consumieron Picot (Reporte del Instituto de Salud Publica de Francia, 2005)

En todos estos brotes se estableció una asociación epidemiológica y microbiológica de la contaminación intrínseca de bajo nivel de los preparados en polvo para lactantes por *Salmonella* con infecciones en los lactantes (OMS-FAO, 2004)

Los preparados en polvo reconstituidos son probablemente un vehículo normal en la transmisión de *Salmonella* a los lactantes, dada su importante función en la alimentación de estos, pero es mas probable que se produzca la contaminación de los preparados en el ámbito del preparador o del entorno de preparación que en el proceso de fabricación (OMS-FAO, 2004).

Brotes como los mencionados anteriormente, son poco frecuentes.

6.2.3 Identificación mediante Galerías API 20E

Utilizando la batería de pruebas pertenecientes a la galería API 20E (Tabla XIII) y añadiendo la prueba de Oxidasa (Ox: -), la cepa aislada se definió con 71,1% (muy buena identificación en el genero) como *Enterobacter cloacae*.

Enterobacter cloacae es una especie presente en el tracto digestivo humano, comúnmente asociada a infecciones nosocomiales. Entre el 1° de Enero de 1989 y

Tabla XIII. Resultados de la Galería API 20E para la cepa aislada.

Prueba bioquímica	Abreviatura	Resultado
B-galactosidasa	ONPG	+
Arginina deshidrolasa	ADH	+
Lisina descarboxilasa	LDC	-
Ornitina descarboxilasa	ODC	+
Utilización del citrato	CIT	+
Producción de H ₂ S	H₂S	-
Ureasa	URE	-
Triptófano desaminasa	TDA	-
Voges-Proskauer	VP	-
Gelatinasa	GEL	-
Fermentación/oxidación de glucosa	GLU	+
Fermentación/oxidación de manitol	MAN	+
Fermentación/oxidación de inositol	INO	+
Fermentación/oxidación de sorbitol	SOR	+
Fermentación/oxidación de ramnosa	RHA	+
Fermentación/oxidación de sacarosa	SAC	+
Fermentación/oxidación de melobiosa	MEL	+
Fermentación/oxidación de amigadalina	AMY	+
Fermentación/oxidación de arabinosa	ARA	+
Citocromo oxidasa	OX	+

el 28 de Febrero de 1990, se estudiaron 89 cepas bacterianas aisladas de pacientes de la sala de cuidados especiales del Servicio de Neonatología de la Fundación Hospitalaria San Vicente de Paul, de Medellín. De las 89 cepas aisladas 7 correspondieron a *Enterobacter* spp, lo que representa un 7,9%. Por otra parte, en un estudio realizado por Mutjyens y col., en 13 países de Europa, con fórmulas infantiles en polvo, se encontró que de 141 muestras analizadas el 53% correspondían a *Enterobacter* spp.

El aislamiento de una especie como *Enterobacter cloacae* permite demostrar que la fórmula láctea infantil no es un producto estéril, y que puede contener bajos niveles de patógenos.

E. cloacae es un miembro saprofita de la flora digestiva normal en humanos. Reservorios comunes incluyen el tracto gastrointestinal en adultos sanos, en pacientes enfermos, el tracto urinario y respiratorio, herida médica quirúrgica y quemaduras. En los últimos años, esta especie ha emergido como un patógeno importante en pacientes hospitalizados, por lo que se considera como un patógeno oportunista.

Brotes de infección han sido reportados en las unidades de cuidados intensivos neonatales, causados por contaminación cruzada, líquidos intravenosos contaminados, soluciones nutritivas parenterales y otros productos farmacéuticos o equipos médicos contaminados. *E. cloacae* es aislado de las heces de los neonatos con una frecuencia que varía entre el 10 y el 70%. Bacteriemia debido a *E. cloacae* se ha convertido en una importante infección nosocomial en salas neonatales e infantiles, acumulando 1 episodio por cada 1000 admisiones,

causando infecciones graves especialmente en infantes inmunocomprometidos (Harbarth y col., 1999).

6.3 Sensibilidad antibiótica

6.3.1 Método de Disco-difusión

Las cepas: *E. cloacae* CVCM 1104 y *E. sakazakii* CVCM 1141, se utilizaron como patrones de comparación para la caracterización de la cepa aislada. Y la cepa *E. coli* ATCC 25922 se utilizó como cepa control.

Se realizó un ANOVA de una vía comparando el diámetro de los halos de inhibición (Tabla XIV) de la cepa aislada con la cepa pura de *E. cloacae*, para concluir que no existe diferencia estadísticamente significativa entre una cepa y la otra con un 95,0% de confianza.

Se realizó el mismo análisis para diferenciar a la cepa aislada de *E. sakazakii*, pero aun cuando ambas cepas son genéticamente diferentes no existe diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro de sus halos de inhibición (con un 95,0% de confianza).

Para los antibióticos frente a los cuales la cepa presentó sensibilidad, se calculó la concentración mínima inhibitoria (Tabla XI), a excepción del ácido nalidixico que desde hace algunos años no se comercializa en el país. De los antibióticos frente a los cuales presento resistencia, se discutirá mas adelante.

Tabla XIV. Diámetro (mm) de los halos de inhibición de las cepas en estudio frente a los diferentes antibióticos.

ANTIBIÓTICO	TIPO	CEPA	<i>E. CLOACAE</i> CVCM 1104	<i>E. SAKAZAKII</i> CVCM 1141	<i>E. COLI</i> ATCC 25922
Ac. Nalidixico	Quinolona	28	29	30	28
Amikacina	Aminoglicósido	19	23	28	20
Amoxicilina	β -lactámico	7	8	34	22
Ampicilina	β -lactámico	-	-	32	20
Azitromicina	Macrólido	20	19	21	28
Cefalotina	Cefalosporina	7	7	19	21
Ceftazidima	Cefalosporina	26	32	35	32
Ciprofloxacina	Quinolona	39	40	40	40
Cloranfenicol	Anfenicol	28	31	35	34
Gentamicina	Aminoglicósido	21	25	23	20
Oxacilina	β -lactámico	-	-	-	-
Penicilina	β -lactámico	-	-	7	-
SXT	Sulfonamida	25	28	32	28
Tetraciclina	Tetraciclina	21	27	28	25

6.3.2 Concentración Mínima Inhibitoria

El cálculo de la CMI, se realizó utilizando el método de microplacas descrito anteriormente. Se determinó la CMI comparando las absorbancia obtenidas. La concentración en la cual la absorbancia de la cepa con antibiótico empieza a disminuir con respecto a la absorbancia de la cepa sola es la CMI. Las CMI obtenidas, se presentan en la Tabla XV.

Por su estructura química, los antibióticos se agrupan en familias, que generalmente se comportan de la misma manera frente a un determinado tipo de microorganismos; nos valdremos de este hecho para hacer la caracterización de la cepa aislada, de acuerdo a su sensibilidad antibiótica.

6.3.2.1 Amikacina y Gentamicina: Aminoglicósido.

Esta familia esta constituida por sustancias policatiónicas que se unen a las cargas negativas del lipopolisacárido de la pared bacteriana, penetrando en la bacteria probablemente por un mecanismo de transporte activo. Se unen a las sub-unidades 30S y 50S del ribosoma e inhiben la síntesis proteica. De esta forma, ejercen efecto bactericida rápido y dosis-dependiente, poco influido por el tamaño del inóculo bacteriano. Son activos sobre bacterias en fase estacionaria y 00tienen efecto postantibiótico que puede persistir varias horas (Mensa, 1997).

Los bacilos Gram-negativos muestran los porcentajes mas bajos de sensibilidad frente a los aminoglicósidos de uso corriente: Gentamicina, Netilmicina y Amikacina (Manotas y Uribe, 1990). Su efecto bactericida es máximo

Tabla XV. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) de las cepas en estudio frente a los diferentes antibióticos.

ANTIBIÓTICOS	TIPO	CEPA	<i>E. CLOACAE</i> CVCM 1104	<i>E. SAKAZAKII</i> CVCM 1141
Amikacina	Aminoglicósido	>0,125	>0,125	0,25
Gentamicina	Aminoglicósido	0,5	0,5	0,5
Azitromicina	Macrólido	4	1	4
Ceftazidima	Cefalosporina	1	>0,125	>0,125
Ciprofloxacina	Quinolona	0,25	0,25	0,25
Cloranfenicol	Anfenicol	>1	>1	1
SXT	Sulfonamida	2	2	0,25
Tetraciclina	Tetraciclina	>0,125	1	2

a concentraciones 4 veces superiores a la CMI. La anaerobiosis, el medio ácido, hiperosmolar o rico en Ca, Mg o poliaminas dificultan la entrada del aminoglicósido al interior de la bacteria y aumentan la CMI (Mensa, 1997).

En el caso de la Amikacina, se consideran sensibles cepas cuyas CMI $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ y para la Gentamicina $\leq 4 \mu\text{g/mL}$; la cepa aislada presentó CMI $< 0,125 \mu\text{g/mL}$ para Amikacina y $0,5 \mu\text{g/mL}$ para Gentamicina siendo las CMI para *Enterobacter* $1 \mu\text{g/mL}$ y $4 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Así la cepa aislada de *E. cloacae* se considera sensible a ambos antibióticos.

No se obtuvieron diferencias respecto a la cepa control de *E. cloacae*, por su parte *C. sakazakii* pareciera ser más resistente. Los resultados de sensibilidad obtenidos mediante este método, coinciden con los resultados obtenidos mediante el método de disco difusión.

6.3.2.2 Azitromicina: Macrólido.

Esta familia de antibióticos, se une en la porción 50S del ribosoma e inhibe la síntesis proteica. Pueden comportarse como bacteriostáticos o bactericidas según su concentración en el medio, el microorganismo, la densidad de población bacteriana y la fase de crecimiento. Suelen ser más activos a pH alcalino y tienen efecto postantibiótico (Mensa, 1997).

La Azitromicina es más activa que la eritromicina (macrólido de 14 átomos en el anillo macrolactónico) frente a la mayoría de los gérmenes Gram-negativos incluyendo enterobacterias. La CMI frente a *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* es de $4-8 \mu\text{g/mL}$; obteniéndose para la cepa aislada una CMI de $4 \mu\text{g/mL}$.

La resistencia natural de las especies de *Enterobacter* a los macrólidos, se debe probablemente a la función de barrera que cumple la membrana externa. La sensibilidad de las especies a Azitromicina, no es inesperada puesto este antibiótico difunde significativamente mejor que otros macrólidos a través de los muchos canales de porinas presentes en la célula; también es conocido por interactuar con el lipopolisacárido, penetrando la membrana externa en virtud de esta interacción (Stock y Wiedemann, 2002).

6.3.2.3 Ceftazidima: Cefalosporina.

Las cefalosporinas pertenecen al grupo de antibióticos beta-lactámicos con efecto básico de tipo bactericida. El sitio de acción principal de estos compuestos es la porción externa de la membrana citoplasmática bacteriana; allí, esta se une al antibiótico con las proteínas receptoras o fijadoras del mismo. Posteriormente esto bloquea la tercera fase de la síntesis de la pared bacteriana, la formación de peptidoglicano, el cual desempeña un papel fundamental en la estructura de la bacteria. Una vez que se pierde la pared, el agua del espacio extracelular penetra al espacio intracelular por diferencia osmótica y, por lo tanto, hay salida de elementos intracelulares. Adema, se encuentran las enzimas autolíticas (peptidoglicano hidrolasas), las cuales en forma normal intervienen en la división y crecimiento bacterianos, pero en las circunstancias descritas actúan como autolisinas (González y Saltigeral, 2002).

Se consideran sensibles los microorganismos con $CMI \leq 2 \mu\text{g/mL}$ (Mensa, 1997), obteniéndose para la cepa una $CMI = 1 \mu\text{g/mL}$ por lo que se considera sensible. Al comparar la CMI de la cepa aislada con la de la cepa pura de *E. cloacae* se observa un aumento en la CMI, esto pudiera deberse a un fenómeno conocido como *resistencia adquirida* donde la cepa aislada estudiada requiere de una mayor concentración del antibiótico para inhibir su crecimiento con respecto a la cepa patrón (resistencia natural).

6.3.2.4 Ciprofloxacino: Quinolona.

Las quinolonas bloquean la actividad de la DNA-girasa bacteriana. Su actividad bacteriana es rápida, y se relaciona directamente con la concentración de antibiótico en el medio. La CIM es poco influenciada por el tamaño del inóculo si este es menor a 10^6 UFC/mL. Son activos sobre bacterias en fase de crecimiento estacionario y tienen efecto post antibiótico (Mensa, 1997).

En el caso del ciprofloxacino, se consideran sensibles microorganismos con $CMI < 1 \mu\text{g/mL}$, siendo la CBM 2 a 4 veces superior a la CIM. En el caso de las infecciones producidas por microorganismos con $CMI > 0,5 \mu\text{g/mL}$, como es el caso de la cepa aislada cuya $CMI = 0,25 \mu\text{g/mL}$, se recomienda reducir los intervalos de administración y/o aumentar la toma por dosis para evitar la selección de cepas resistentes (Mensa, 1997).

En el estudio realizado por Manotas y Uribe, en 1990, sin duda los mejores porcentajes de inhibición tanto de Gram-positivos como de Gram-negativos se obtuvieron con las quinolonas; estas drogas, recomendadas para infecciones

graves por bacterias altamente resistentes, se han contraindicado en niños ya que tienen la particularidad según experimentos en animales de acumularse en el cartílago articular y dañarlo. No se ha estudiado el efecto en recién nacidos por lo que persiste la contraindicación de en esta edad.

6.3.2.5 Cloranfenicol: Anfenicol.

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro, activo frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo microorganismos anaerobios, que inhibe la síntesis proteica uniéndose de forma reversible a la sub-unidad 50S del ribosoma. Tiene efecto bactericida para los gérmenes más sensibles y bacteriostático frente al resto (Mensa, 1997).

La CMI reportada para *Enterobacter* es de 8µg/mL, y se obtuvo una CMI <1µg/mL por lo que las cepas se consideran sensible.

En líneas generales, el cloranfenicol no parece una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones neonatales puesto que solo inhibe a solo un 50% de las bacterias (Manotas y Uribe, 1990).

6.3.2.6 Sulfametoxazol-Trimetroprima: sulfonamida.

Las sulfonamidas, como el sulfametoxazol, son análogos estructurales del ácido Para-aminobenzoico (PABA) que utilizan las bacterias para sintetizar ácido fólico; y compiten con el PABA en su unión con la enzima encargada de la síntesis del mismo. Tienen efecto bacteriostático y son activas frente a enterobacterias,

aun cuando la actividad antibacteriana es inhibida en presencia de pus o restos de tejido necrótico (Mensa, 1997).

La combinación de sulfametoxazol y trimetoprima, a menudo conocida como SXT o Cotrimoxazol, produce un bloqueo secuencial en la síntesis de ácido fólico. El efecto es a menudo sinérgico y bactericida. No ejerce efecto postantibiótico frente a bacilos Gram-negativos. El espectro de acción es algo superior a la suma de sus componentes (en general, la sensibilidad a la trimetoprima predice la sensibilidad a la combinación). Se consideran sensibles $\text{CMI} \leq 2/38 \mu\text{g/mL}$ (Mensa, 1997). la cepa aislada presento una $\text{CMI} = 2 \mu\text{g/mL}$ por lo que se considera sensible.

La proporción óptima de Trimetoprima/sulfametoxazol en la que se observa sinergia es de 1/20, sin embargo puede observarse sinergia con proporciones desde 1/1 hasta 1/40. La sinergia es máxima cuando el microorganismo es sensible a ambos antibióticos (Mensa, 1997). Aun así, esta droga no es tan importante en el neonato debido a la contraindicación de las sulfas por el defecto desplazatorio sobre la bilirrubina (Manotas y Uribe, 1990).

6.3.2.7 Tetraciclina

Esta familia de antibióticos, se acumula de forma activa en la bacteria y, tras unirse a la sub-unidad 30S del ribosoma, interfieren con la síntesis proteica. El mecanismo de acción más importante depende de su capacidad para bloquear la unión del complejo aminoácido-ARN de transferencia (ARNt) con el ribosoma. Como consecuencia, no se dispone de aminoácidos para el ARN mensajero

(ARNm) y no se producen polipéptidos, impidiendo la síntesis de proteínas a este nivel. Estos fármacos son principalmente compuestos bacteriostáticos (Mensa, 1997).

Se consideran sensibles los microorganismos cuyas CMI $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, la cepa aislada presento una CMI $> 0,125 \mu\text{g/mL}$ por lo que se considera sensible.

6.3.3 Resistencia antibiótica

Los antibióticos frente a los cuales la cepa presento resistencia se observan en la Tabla XVI. Las familias a las cuales pertenecen estos antibióticos, así como las posibles causas de resistencia, se mencionan mas adelante.

Por su estructura química, los antibióticos se agrupan en familias, que generalmente se comportan de la misma manera frente a un determinado tipo de microorganismos; nos valdremos de este hecho lo que para hacer la caracterización de la cepa aislada, de acuerdo a su sensibilidad antibiótica.

6.3.3.1 Ampicilina/Ac. clavulanico, Oxacilina y Penicilina: β -lactámicos.

Son bactericidas, de efecto lento. Bloquean la actividad transpeptidasa de las proteínas fijadoras de Penicilina (PBP). La síntesis de peptidoglicano disminuye y la bacteria muere, por efecto osmótico o digerida por enzimas autolíticas (Mensa, 1997).

Tabla XVI. Resistencia de las cepas en estudio frente a los diferentes antibióticos.

ANTIBIÓTICO	TIPO	CEPA	<i>E. CLOACAE</i> CVCN 1104	<i>E. SAKAZAKII</i> CVCN 1141	<i>E. COLI</i> ATCC 25922
Ac. Nalidixico	Quinolona	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Amikacina	Aminoglicósido	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Amoxicilina	β -lactámico	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible
Ampicilina	β -lactámico	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible
Azitromicina	Macrólido	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Cefalotina	Cefalosporina	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible
Ceftazidima	Cefalosporina	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Ciprofloxacina	Quinolona	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Cloranfenicol	Anfenicol	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Gentamicina	Aminoglicósido	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Oxacilina	β -lactámico	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Penicilina	β -lactámico	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
SXT	Sulfonamida	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Tetraciclina	Tetraciclina	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

En general, la resistencia de las bacterias Gram-negativas se debe a:

- Disminución de la permeabilidad por características intrínsecas de la pared bacteriana: las bacterias Gram-negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, que dificulta la permeabilidad del antibiótico.
- Inactivación por beta-lactamasas contenidas en el espacio periplásmico. La síntesis de beta-lactamasas esta mediada por genes cromosómicos o plasmídicos, las beta-lactamasas cromosómicas pueden sintetizarse de forma permanente o sólo en presencia del beta-lactámico como es el caso de las beta-lactamasas inducibles de *Enterobacter* y *Citrobacter*.
- Modificaciones de las PBPs (o remplazamiento por PBPs nuevas) con disminución de la afinidad por el β -lactámico (Mensa, 1997).

Virtualmente toda la resistencia observada en Enterobacteriaceae es mediada por β -lactamasas adquiridas en plásmidos o expresadas cromosomalmente.

Existe una forma particular de resistencia, que se conoce con el nombre de Tolerancia, caracterizada por la persistencia de la CMI dentro de los valores habituales junto a un aumento importante de la concentración mínima bactericida (CMB), que supera en 32 veces el valor de la CMI. Frente a estos microorganismos tolerantes, el β -lactámico se comporta como un antibiótico bacteriostático. Este tipo de resistencia probablemente se deba a una reducción en la síntesis de autolisinas (Mensa, 1997).

6.3.3.2 Cefalotina: cefalosporina.

Pertenecen al grupo de antibióticos beta-lactámicos con efecto básico de tipo bactericida. El sitio de acción principal de estos compuestos es la porción externa de la membrana citoplasmática bacteriana; allí, esta se une al antibiótico con las proteínas receptoras o fijadoras del mismo. Posteriormente, esto bloquea la tercera fase de la síntesis de la pared bacteriana, formación de peptidoglicano, el cual desempeña un papel fundamental en la estructura de la bacteria. Una vez que se pierde la pared, el agua del espacio extracelular penetra al espacio intracelular por diferencia osmótica y, por lo tanto, hay salida de elementos intracelulares. Adema, se encuentran las enzimas autolíticas (peptidoglicano hidrolasas), las cuales en forma normal intervienen en la división y crecimiento bacterianos, pero en las circunstancias descritas actúan como autolisinas (González y Saltigeral, 2002).

La mayor prevalencia de *Enterobacter spp* a nivel hospitalario se asocia con el mayor uso de cefalosporinas de espectro extendido en todo el mundo a partir de 1980. El tratamiento con cefalosporinas de 3a generación selecciona con frecuencia cepas resistentes a estos antibióticos. La selección de mutantes resistentes puede ocurrir espontáneamente con una frecuencia de 10^{-5} . El NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance System) de Estados Unidos informa que *Enterobacter spp* fue la quinta causa de infección en el área de terapia intensiva y el tercer agente más frecuente de neumonía nosocomial. *E. cloacae* tiene una beta-lactamasa cromosómica de tipo 1 (o Amp-C) que determina

resistencia a ampicilina y cefalosporinas de 1ª y 2ª generación. Esta beta-lactamasa no es inhibida por los inhibidores de beta-lactamasas (sulbactam, ácido clavulánico y tazobactam) y es inducible. Las cefalosporinas de 4ª generación (cefepima o cefpirona) no son afectadas ya que estos antibióticos son más permeables y atraviesan rápidamente el espacio periplásmico donde están ubicadas las β -lactamasas. Si estuviera afectada la permeabilidad de la membrana externa, estos antibióticos permanecerían más tiempo en el espacio periplásmico con la consecuente inactivación (Luna y col., 2001).

6.3.4 Multirresistencia

Para la cepa estudiada, se obtuvo un índice de multirresistencia igual a 0,36. Se consideran multiresistente aquellas cepas cuyos índices sean mayores de 0,2.

La infección es común en bebés en unidades de cuidados intensivos, pero los primeros síntomas suelen ser no específicos por lo que los bebés son sometidos a amplios rangos de antibióticos antes de que los resultados de los cultivos estén disponibles. Recientemente, la emergencia de microorganismos resistentes a la Gentamicina el potencial problema de ototoxicidad, nefrotoxicidad y penetración pobre en el fluido cerebroespinal por parte de los Aminoglicósido; dejan al tratamiento con cefalosporinas de tercera generación como el tratamiento de rutina (Modi y col., 1987).

Modi y col., documentaron un brote de *E. cloacae* en una unidad de cuidados intensivos de un hospital en Liverpool (Inglaterra) entre Junio 1985 y Enero 1987. Este microorganismo era resistente no solo a penicilinas y

Tabla XVII. Calculo del Índice de Multirresistencia para la cepa aislada

RESPUESTA	CANTIDAD DE ANTIBIÓTICOS	
Sensibilidad	8	
Resistencia	5	5
Total	14	14
	IMR	0,36

aminoglicósidos sino a cefalosporinas de tercera generación. Este tipo de brotes, dan lugar a lo que se conocen como superinfecciones, porque el microorganismo en cuestión es capaz de sobrevivir al tratamiento común en infecciones neonatales que incluye una primera línea de tratamiento con aminoglicósidos.

VII. CONCLUSIONES

1. La evaluación de la calidad microbiológica de algunas Fórmulas Lácteas Infantiles disponibles en el mercado local mediante el recuento de aerobios mesófilos, permitió inferir contaminación en una de las muestras.,
2. Todas las muestras presentaban un estimado de coliformes <10UFC/g.
3. Un cambio en la temperatura durante el aislamiento de *C. sakazakii* permitió aislar una cepa de una de las muestras, que posteriormente se identificó como *E. cloacae*.
4. No se aislaron cepas de *C. sakazakii* en ninguna de las muestras estudiadas.
5. No se aislaron cepas de *Salmonella spp*, en conformidad con el plan muestreo de **Tolerancia cero** que existe para este microorganismo.
6. Mediante el método de disco difusión, la cepa aislada resultó sensible a Acido nalidixico, Amikacina, Azitromicina, Ceftazidime, Ciprofloxacino, Cloranfenicol, Gentamicina, Sulfametoxazol/Trimetoprima y Tetraciclina.
7. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la cepa aislada de *E. cloacae* hacia los antibióticos: Amikacina, Azitromicina, Ceftazidime, Ciprofloxacino, Cloranfenicol, Gentamicina, Sulfametoxazol/Trimetoprima y Tetraciclina; obteniéndose sensibilidad para los mismos en concordancia con los datos obtenidos mediante el método de disco difusión
8. La cepa aislada se catalogó como multiresistente, de acuerdo a su comportamiento frente Amoxicilina/Acido clavulanico, Ampicilina, Cefalotina, Oxacilina y Penicilina.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Obtener muestras pertenecientes al mismo lote de una misma marca.
2. Utilizar el método de NMP, para el recuento de coliformes totales, por su sensibilidad de hasta <3UFC/g.
3. Modificar la temperatura durante el aislamiento de *C. sakazakii* de 41°C a 37°C, como método para aislar *E. cloacae*.
4. Afinar el método de CMI por microdilución, comprobando las concentraciones de los antibióticos comerciales y de las diluciones posteriores.
5. Ampliar el número de antibióticos para una mejor caracterización de las cepas.
6. Promover la lactancia materna, en neonatos y bebés hasta por lo menos los seis meses de nacido; en virtud del riesgo de infección que implica el consumo de FLI durante esta etapa.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Agostoni C., Axelsson I., Goulet O., Koletzko B., Michaelsen K., Puntis J W., Rigo J. y colaboradores. 2004. *Preparation and Handling of Powdered Infant Formula: A Comentary by the ESPGHAN Comité on Nutrition*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.
2. Andrews, J. 2001. *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of antimicrobial chemotherapy.
3. Bannon, M.; Stutchfield, P.; Weindling, A. y Damjanovic, V. 1989. Ciprofloxacin in neonatal *Enterobacter cloacae* septicaemia. Archives of disease in Childhood.
4. Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*.
5. Cahill, S., Wachsmuth, K., Costarrica, M. y Embarek, P. 2008. *Powdered Infant Formula as a source of Salmonella Infections in Infants*. Food Safety.
6. Charmelo, B. 2009. *Incidencia de Enterobacter sakazakii en Leches Maternizadas y Fórmulas Infantiles*. Tesis de maestría. Universidad de Oriente, Barcelona, Venezuela.
7. COVENIN. 1984. Norma Venezolana 1086-84. *Alimentos. Método para recuento de bacterias coliformes en placas de petri (1era. Revisión)*. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.
8. COVENIN. 1987. Norma Venezolana 902-87. *Alimentos. Método para recuento de bacterias aerobias en placas de petri (2da. Revisión)*. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.

9. COVENIN. 2004. Norma Venezolana 1291-2004. *Aislamiento e identificación de Salmonella en alimentos*. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.
10. Daza, R. 1998. *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria*. Información terapéutica del sistema nacional de salud (España). Vol. 22-Nº3.
11. Defilló, B. 1985. *Farmacología medica. Drogas esenciales. Volumen 1: Antiinfecciosos.I*. Santo Domingo.
12. Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T. 1997. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Whashington D.C.
13. FAO – OMS. 2004. *Enterobacter sakazakii y otros Microorganismos en los Preparados en Polvo para Lactantes. Informe de la reunión*.
14. Gómez-Ruiz, J. 1974. *Microbiología de alimentos*. Facultad de Farmacia. UCV. Caracas, Venezuela.
15. Gonzalez, N. y Saltigeral, P. 2001. *Antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios, antimicóticos e inmunomoduladores*. Mc Graw Hill, Quinta edición.
16. Harbarth, S.; Sudre, P.; Dharan, S.; Cadenas, M. y Pittet, D. 2009. *Outbreak of Enterobacter cloacae related to understaffing, overcrowding and poor hygiene practices*. Infection control and hospital epidemiology.
17. Jay, J. 2000. *Microbiología moderna de los alimentos*.: ACRIBIA, S. A, Cuarta edición. Zaragoza, España.
18. Jones, T., Ingram, A., Fullerton, K., Marcus, R., Anderson, B., McCarthy, P., Vugia, D. y colaboradores. 2006. *Estudio de casos y*

controles sobre la epidemiología de infección esporádica por Salmonella en lactantes. Pediatrics, edición en español.

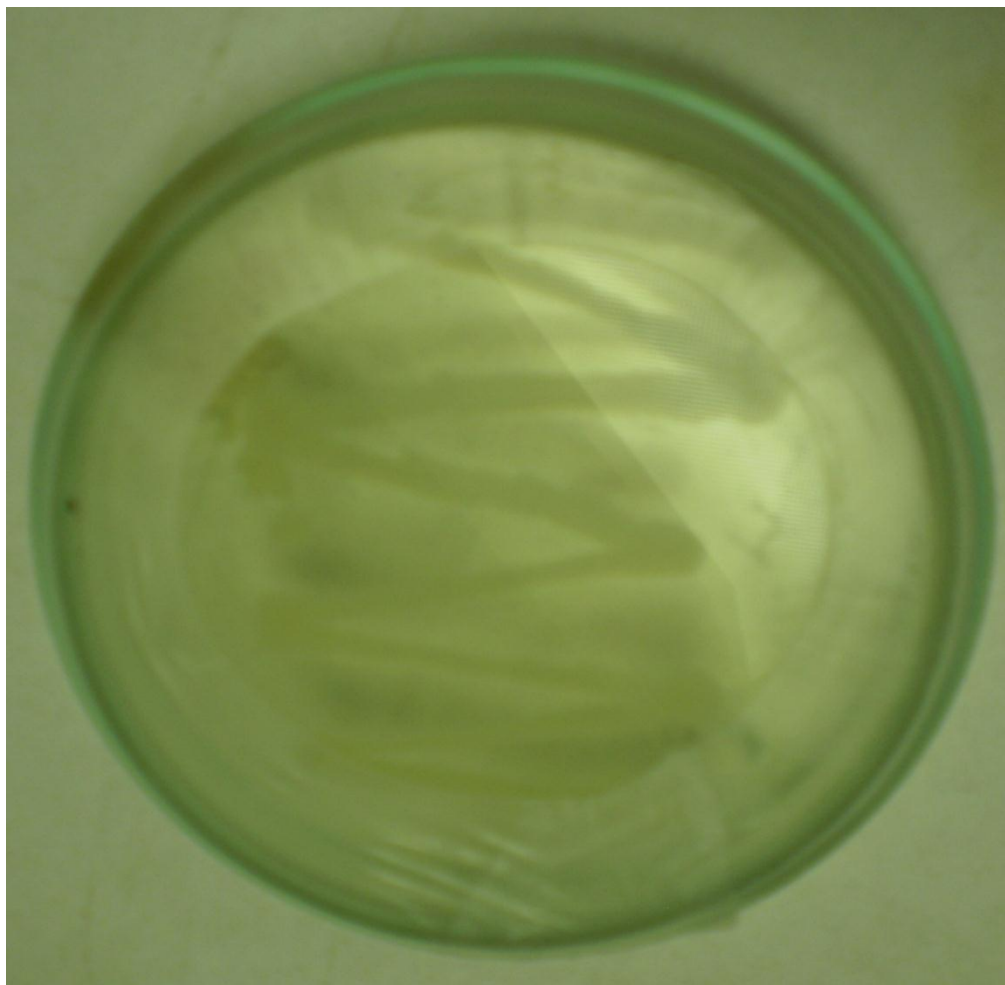
19. Lamed, J. 2002. *Una bacteria “contaminante” que respetar.* <<http://www.stalucia.com/modules.php.nane>>
20. Lorenzo-Velázquez, B. *Farmacología básica y clínica.* 18 edición. Editorial Panamericana. 2008.
21. Luna, C., Gherardi, C., Famiglietti, A y Vay, C. 2001. *Resistencia bacteriana y antibioticoterapia en medicina respiratoria y terapia intensiva.* Medicina.
22. Manotas, J. y Uribe, A. *Sensibilidad a los antibióticos de bacterias aisladas de neonatos hospitalizados.* IATREA 3, Nro. 2, Julio 1990.
23. Mensa, J., Gatell, J., Jimenez, M. y Prats, G. 1997. *Guía de terapéutica antimicrobiana.* Masson, Séptima edición. Barcelona, España.
24. Modi, N; Damjanovic, V. y Cooke, R. 1987. *Outbreak of cephalosporin resistant Enterobacter cloacae infection in neonatal intensive care unit.* Archives of disease in Childhood.
25. Moreno, J M., Gahano J M. y Dalmaus S. 2005. *Preparación y Manejo de las Fórmulas Infantiles en Polvo. Reflexiones en Torno a las Recomendaciones del Comité de Nutrición de la ESPGHAN.* Acta Pediátrica Española.
26. OXOID, 2010. *Cronobacter species.* OXOID Culture. Vol. 31 N° 1.
27. Papalia, D., Olds, S., Feldman, R. 2005. *Desarrollo humano.* Mc Graw Hill, Novena Edición. México DF, México.
28. Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos

- (INFOSAN) 2005. *Enterobacter Sakazakii* en Fórmulas Infantiles en Polvo. Nota Informativa.
29. Reporte del Instituto de Salud Pública de Francia. 2005. *Brote de salmonelosis en Salmonella entérica serotipo Agona en los lactantes, asociado al consumo de leche en polvo.*
30. Rojas, M. y Lozano, G. 1999. *Nutrición Clínica y Gastroenterología Pediátrica*. Editorial Médica Panamericana, Primera Edición. Bogotá, Colombia.
31. Romero, R. 2007. *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3ra edición. México.
32. Stock, I. y Wiedemann, B. 2002. *Natural antibiotic susceptibility of Enterobacter amnigenus, Enterobacter cancerogenus, Enterobacter gergoviae and Enterobacter sakazakii strains*. Clinical Microbiology and Infection.
33. Tomé, E., Pereira V., López C., Gibbs P. y Teixeira P. 2008. *In vitro tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon*. Food Control 19.
34. Vanegas, M. 2009. *Resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de biopelículas en una planta de alimentos*. Revista MVZ Córdoba.
35. Yversen, C. y Forsythe, S. 2003. *Perfil de riesgo de Enterobacter sakazakii: un patógeno emergente asociado con fórmulas lácteas infantiles*. Trends in Food Sci and Technology.

X. ANEXOS



Anexo 1. Marcas comerciales de FLI.

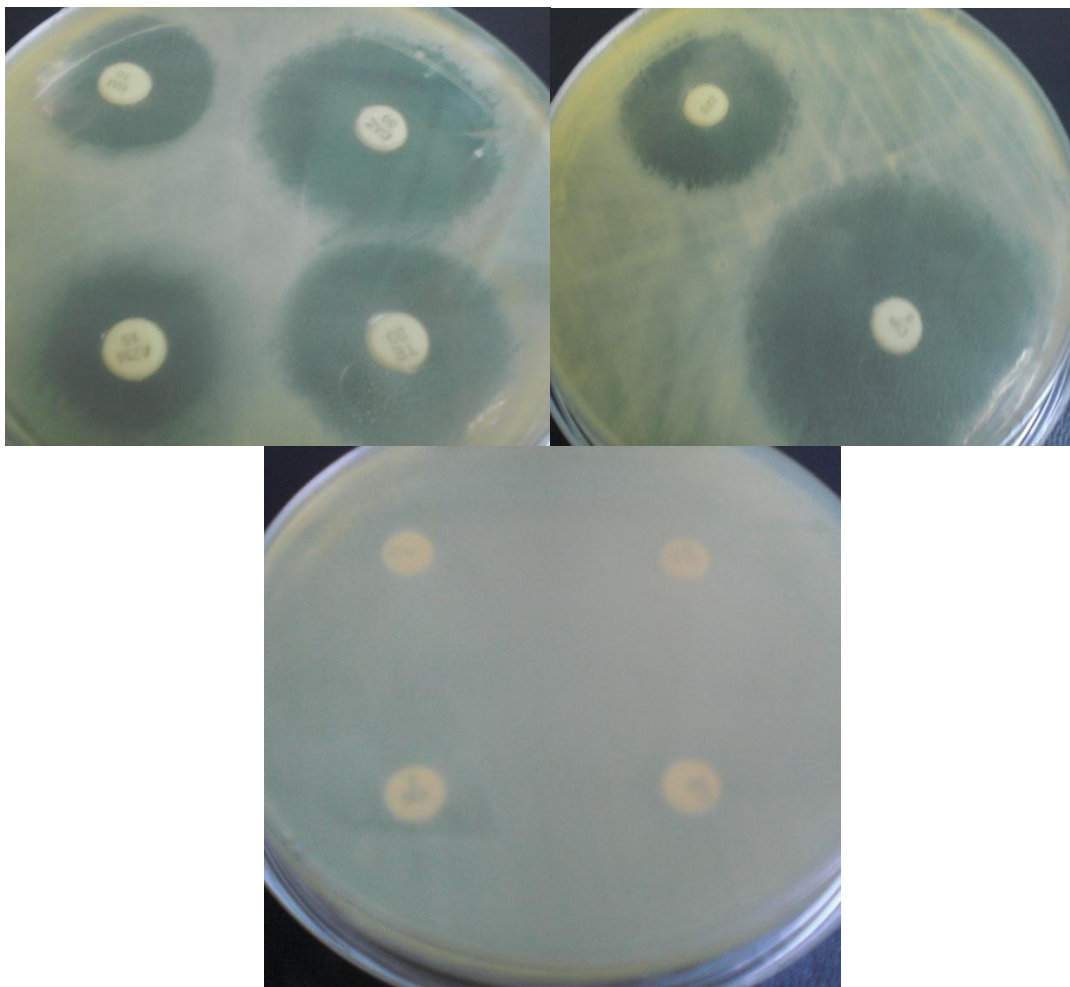


Anexo 2. Crecimiento de *E. cloacae* en agar TSA.

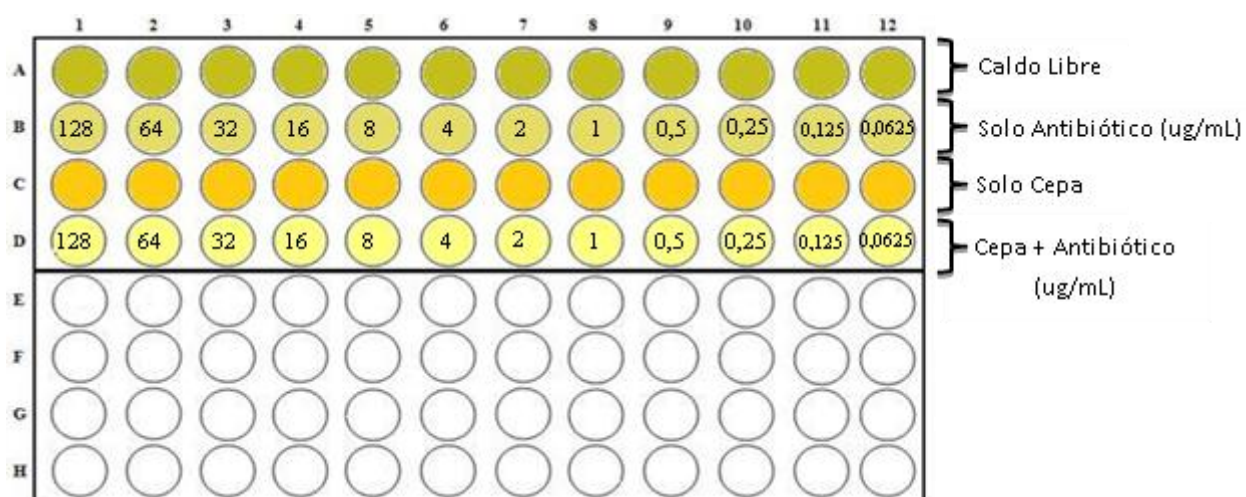
Nótese la ausencia del pigmento amarillo característico de *C. sakazakii*.



Anexo 3. Inoculación de Galería API 20E.



Anexo 4. Halos de inhibición obtenidos con el método de disco difusión. Nótese la ausencia de halos cuando la cepa presenta resistencia.



Anexo 5. Siembra en placa de microtitulación para la determinación de la CMI de cada antibiótico.



Anexo 6. Lector de placas Biorad modelo 3550.