

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE
LA REPÚBLICA (PROPAC)

**EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIANOS EN ALIMENTOS
PREPARADOS EN UN HOSPITAL MATERNO INFANTIL**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

MSP JULIO PARRA FLORES

DIRIGIDO POR

DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., OCTUBRE DEL 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIANOS EN ALIMENTOS PREPARADOS EN UN HOSPITAL MATERNO INFANTIL

TESIS
QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA
MSP JULIO PARRA FLORES

DIRIGIDO POR
DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

SINODALES

Dr. Eduardo Fernández Escartín
Presidente

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretaria

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Vocal

Dr. Victor Olalde Portugal
Suplente

Dr. Jorge Domínguez Domínguez
Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortíz
Director de la Facultad

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2011
México

RESUMEN

En 1999 el Codex Alimentarius publicó los principios y guías que definen la evaluación de riesgos microbianos (ERM) como un proceso con base científica interesado en la identificación de peligros y encaminado a proteger la salud de la población. *Cronobacter sakazakii*, es un patógeno emergente que causa meningitis neonatal, septicemia, y enterocolitis necrotizante en niños prematuros y recién nacidos, con letalidad de 20-40%. Las leches en polvo han sido implicadas como vehículo de transmisión y las superficies de trabajo y utensilios como reservorios. Este trabajo ha identificado y caracterizado cepas de *C. sakazakii* recuperadas de fórmulas lácteas y ambiente de un lactario e implicadas como agente etiológico en un brote asociado al consumo de leche rehidratada. *C. sakazakii* se detectó siguiendo la técnica de cultivo de la FDA (EEUU) y mediante reacción de PCR (utilizando iniciadores que amplifican la región *rpoB*). Una caracterización más amplia del patógeno se realizó con el sistema computarizado BIOLOG, pruebas de virulencia en tejidos, perfil de resistencia a antibióticos y pruebas moleculares. Se cuantificó su concentración mediante una combinación de la técnica de número más probable y PCR. El rastreo de fuentes, reservorios y similaridad genética se efectuó con la técnica de electroforesis en gel por campos pulsados (EGCP). La positividad general entre el total de 404 muestras fue de 22.7%. En 35 estudios con muestras de leche, materia fecal y ambiente que se realizaron en el hospital durante 16 meses, incluido el brote, se aislaron 80 cepas de *C. sakazakii*. Específicamente las cepas de leche y materia fecal durante el brote mostraron el mismo genotipo. Su cuantificación en leche en polvo osciló entre 0.0079 - 0.33 NMP/g, en leche rehidratada entre 0.0051 - 24 NMP/ml, y en superficies 0.19 - 240 NMP/900 cm². *C. sakazakii* mostró una elevada incidencia y amplia distribución dentro del lactario. Las cepas recuperadas del brote resultaron positivas a dos factores de virulencia y mostraron similar perfil de resistencia a antibióticos. La dosis estimada de ingestión de *C. sakazakii* fue de 2,160 y 3,600 entre los lactantes afectados durante el brote. De acuerdo con el modelo de ERM por *Cronobacter sakazakii*, la probabilidad de enfermar se reduce 100,000 veces cuando se utiliza agua a 70°C para rehidratar la leche cuando se compara con agua a 45°C.

(Palabras claves: Evaluación de Riesgos Microbianos, brote de enfermedad, *C. sakazakii*, leche en polvo, lactario)

SUMMARY

In 1999, the Codex Alimentarius published its principles and guidelines which define microbial risk assessment (MRA) as a scientifically based process interested in hazard identification and aimed at protecting the health population. *Cronobacter sakazakii* is an emerging pathogen that causes neonatal meningitis, septicemia, and necrotizing enterocolitis in premature infants and neonates, with a mortality of 20-40%. Powdered infant formula has been implicated as a vehicle of transmission, while work surfaces are identified as reservoirs. In this study we have identified and characterized strains of *C. sakazakii* recovered from infant formulas and environmental samples in a lactarium in which it was implicated as the etiologic agent in an outbreak among infants associated with consumption of rehydrated milk. *C. sakazakii* was detected using culture techniques used by the FDA (USA) and by PCR (using primers that amplify the *rpoB* region). A broader characterization of the pathogen was performed with the computerized BIOLOG system, virulence tests on tissue, antibiotic resistance profile and molecular testing. Concentration was determined using a combination of most probable number and PCR. The tracking of sources, reservoirs and genetic similarity was performed with the technique of pulsed field gel electrophoresis (PFGE). General positivity among the total of 404 samples was 22.7%. In 35 studies with samples of milk, feces and the environment taken from the hospital over a period of 16 months, including the outbreak; we isolated 80 strains of *C. sakazakii*. Specifically, the strains derived from milk and feces during the outbreak showed the same genotype. Its quantification in powdered milk ranged from 0.0079 to 0.33 MPN/g, in rehydrated milk was between 0.0051 and 2400 MPN/ml, and in inert surfaces were between 0.19 and 240 NMP/900 cm². *C. sakazakii* showed a high incidence and wide distribution within the lactarium. The strains recovered from the outbreak were positive for two virulence factors and showed similar antibiotic resistance profile. The estimated dose of ingestion of *C. sakazakii* was 2,160 and 3,600 among infants affected during the outbreak. According to the risk assessment model for *Cronobacter sakazakii*, the probability of illness is reduced by 100,000 times when the water used to rehydrate the milk is at 70°C compared to water at 45°C.

(Keywords: Microbial Risk Assessment, disease outbreak, *C. sakazakii*, powdered infant formula, lactarium)

DEDICATORIA

A mis padres, **Germaín y Lucía**
por su amor, ejemplo de vida y apoyo incondicional

Al amor de mi vida, **Carolina**, por tu amor,
compañera inseparable y fortaleza en momentos de flaqueza,
Javiera y Consuelo,
mis pequeños amores, compañeras en este viaje maravilloso de
aprender a aprender, tener y saber

AGRADECIMIENTOS

Al comité de perfeccionamiento de la Universidad del Bio Bio, por el permiso de perfeccionamiento y apoyo financiero para un buen desempeño de mis estudios.

Al Ministerio de Educación de Chile a través del proyecto MECESUP, por otorgarme la beca de financiamiento para estudios de posgrado en el extranjero.

Al Dr. Eduardo Fernández Escartín, gran académico y maestro lleno de experiencia y sabiduría, que pone al alcance de todos. Un segundo padre para mí.

A mis sinodales, Dra Montse, Dra Sofía, Dr. Domínguez y Dr.Olalde, por sus consejos y apoyo cuando era necesario

A mi Maestra Yossi (Josefina Saldaña), por enseñarme no sólo microbiología, sino también lo maravilloso de este país. Por su amistad y cariño.

A Gerardo, Erika, Natalia, Alejandro y Eric, por hacerme sentir parte de su familia.

A Daniel, compañero y amigo. A Paco y Maru, por su amistad

A mi hermano beliceño Jorge, por acompañarme siempre

A mi querida amiga Vero, una gran mujer y Tania por tu alegría

A Carmelita, Laurita, Benjamín por su apoyo cuando era necesario

A mis compañeros del posgrado, Lorenzo, Hector, Iván, Alejandro, Yahaira y a muchos otros que me hicieron sentir en casa

A mi decana Nora por su apoyo incondicional

A Orietta y colegas de la Universidad del Bio Bio

A mi amiga Jacqueline y Claudio, por su apoyo constante desde la distancia

A mis hermanos Germaín y Carlos, por su apoyo en Chile

A Rina, David, Carla, Luis, Fran, Cony, Macarena, David y Gastón, por el apoyo de mi familia en Chile

A todos otros amigos que me desearon éxito en este camino que emprendí

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	4
2.1 Consumo de alimentos y enfermedad	4
2.1.1 Forma de expresión: casos esporádicos, brotes y epidemias	5
2.1.2 Magnitud del problema	7
2.1.3 Incidencia y severidad	7
2.1.4 Costos	10
2.2 La prevención: desde el principio empírico de la prohibición hasta el análisis de riesgos	12
2.2.1 Situación en diferentes países	12
2.2.2 La gestación de los riesgos y el desenlace	13
2.2.3 Riesgos microbianos	14
2.2.4 Estudio epidemiológico de ETAs	15
2.2.5 Prevención de las ETAs	18
2.2.6 Enfoque tradicional	20
2.2.6.1 Reglamentos	20
2.2.6.2 Inspección	21
2.2.6.3 Laboratorio	21

2.2.6.4	Normas microbianas	22
2.2.6.5	Infraestructura o sitios	22
2.2.6.6	Prácticas sanitarias de operación	24
2.2.6.7	Del control de calidad al aseguramiento de la inocuidad	24
2.2.7	Enfoques modernos	25
2.2.7.1	Análisis de peligros y control de puntos críticos	25
2.2.7.2	Análisis de riesgos (AR)	26
2.2.7.3	Evaluación de riesgos (ER)	26
2.2.7.3.1	Identificación del peligro	28
2.2.7.3.2	Evaluación exposición	28
2.2.7.3.3	Caracterización del peligro y dosis respuesta (D-R)	30
2.2.7.3.4	Microbiología predictiva como herramienta de la E.R	34
2.2.7.3.4	Caracterización del riesgo	36
2.3	Evaluación de Riesgos aplicada a los alimentos	38
2.3.1	Patógenos microbianos asociados al consumo de alimentos preparados en hospitales	40
2.3.1.1	<i>Salmonella spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	41
2.3.1.2	<i>Cronobacter spp</i>	42
2.3.1.3	<i>Cronobacter sakazakii</i>	42
2.3.2	Identificación, caracterización y rastreo molecular	44
2.3.2.1	Detección de patógenos por cultivos	44
2.3.2.2	Detección de patógenos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
2.3.2.3	Caracterización bioquímica	46
2.3.2.4	Perfil de resistencia a antibióticos	46
2.3.2.5	Electroforesis en gel por campos pulsados (EGCP)	47

3.	JUSTIFICACIÓN	49
4.	OBJETIVOS	51
5.	METODOLOGÍA	52
5.1	Equipos y materiales	52
5.1.1.	Equipos y materiales	52
5.1.2.	Material biológico	55
5.1.3.	Enfoque general del estudio	56
5.2	Obtener un perfil microbiológico de los alimentos y la cocina del hospital donde son preparados de contaminación y prácticas de trabajo.	60
5.2.1	Estudio observacional cocina general	58
5.2.2	Muestreo cocina general	59
5.3	Identificar <i>C. sakazakii</i> dentro de un lactario en términos de su incidencia, fuentes de contaminación y prácticas de trabajo que propician su actividad o sobrevivencia en leche rehidratada	60
5.3.1	Estudio observacional del lactario	62
5.3.2	Muestreo lactario	61
5.3.3	Análisis microbiológicos	62
5.3.3.1	Grupos indicadores	62
5.3.3.2	Bacterias patógenas	62
5.3.4	Detección de patógenos por PCR	64
5.4	Efectuar un estudio epidemiológico prospectivo ante un brote de infección bacteriana que se presentó entre los lactantes del hospital	67
5.4.1	Detección de casos	67
5.4.2	Investigación de la configuración del brote	68
5.5	Caracterizar las cepas de <i>C. sakazakii</i> implicadas en el brote, mediante cultivo, pruebas de metabolismo, factores de virulencia, pulsotipos, y perfil de resistencia a antibióticos	68
5.5.1	Pruebas bioquímicas	69
5.5.2	Pruebas de virulencia	69

5.5.3. Perfil de resistencia a antibióticos	69
5.5.4 Rastreo molecular de <i>C. sakazakii</i> por electroforesis en gel por campos (EGCP)	70
5.6. Evaluar la exposición a <i>C. sakazakii</i> entre los lactantes afectados mediante pruebas de reto en las fórmulas lácteas aplicando un modelo predictivo, como recurso para caracterizar el riesgo	71
5.6.1 Cuantificación de <i>C. sakazakii</i> por la técnica de NMP	71
5.6.2 Prueba de reto	71
5.6.3 Caracterización del riesgo	72
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
6.1 Estudio observacional cocina general	74
6.2. Incidencia de microorganismos indicadores y patógenos en la cocina del hospital.	79
6.2.1. Bacterias indicadoras	79
6.2.2. Incidencia de patógenos	82
6.3. Estudio observacional lactario	86
6.4. Incidencia de microorganismos indicadores y patógenos en el lactario.	91
6.4.1. Bacterias indicadoras	91
6.4.2. Detección e incidencia de <i>Cronobacter</i> spp y <i>C.sakazakii</i>	93
6.4.2.1. Detección por cultivo	93
6.4.2.2. Confirmación mediante pruebas metabólicas	96
6.4.2.4 Evaluación de la detección molecular de <i>Cronobacter</i> spp	97
6.4.3. Incidencia de <i>Cronobacter</i> spp por PCR en leche en polvo, leche rehidratada, superficies, agua y materia fecal	101
6.4.4. Evaluación de la detección de especies de	103

	<i>Cronobacter</i> spp por PCR	
6.4.5.	Incidencia de <i>C. turicensis</i> , <i>C. malonaticus</i> , <i>C. dublinensis</i> , <i>C. muytjensii</i> , <i>C. genonoespecie</i> y de <i>C. sakazakii</i> en leche en polvo, leche rehidratada, agua, superficies y materia fecal de niños por PCR	104
6.5.	Caracterización de cepas de <i>C. sakazakii</i>	108
6.5.1.	Perfil de resistencia a antibióticos	108
6.5.2.	Electroforesis en Gel por Campos Pulsados de <i>C. sakazakii</i>	112
6.6.	Estudio del brote por <i>C. sakazakii</i>	118
6.6.1.	Detección de casos	119
6.6.2.	Configuración del brote	121
6.7.	Prueba de reto	128
6.8.	Caracterización del riesgo	135
7.	CONCLUSIONES	137
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
9.	ANEXOS	164

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Brotos de enfermedad por alimentos con elevada letalidad.	9
2	Brotos masivos de enfermedad por consumo de alimentos.	9
3	Complicaciones/secuelas asociadas a ETAs según patógeno.	10
4	Pérdidas económicas (anual) por brotes de ETAs en varios países.	11
5	Ejemplos del costo económico de brotes de ETAs según patógeno, alimento y país implicados.	11
6	Ejemplos de sitios de gestación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.	23
7	Ejemplo de modelos de dosis-respuesta y constantes utilizadas en los cálculos de riesgos.	33
8	Análisis microbiológicos con bacterias indicadoras según tipo de muestra	63
9	Detección de patógenos según tipo de muestra.	63
10	Caldos de enriquecimiento utilizados para PCR.	65
11	Iniciadores específicos para cada patógeno y condiciones de la PCR.	65
12	Factores asociados en la presentación de 660 brotes de ETAs que se configuraron en servicios de alimentos. Estados Unidos. 1973-1982.	75
13	Prácticas registradas en 15 visitas a la cocina del hospital del niño y la mujer.	77
14	Contenido de Bacterias. Mesófilas Aerobias en muestras	79

	colectadas en al cocina de un hospital.	
15	Contenido de Coliformes Totales en 4 tipos de muestras colectadas en la cocina de un hospital.	80
16	Contenido de <i>E. coli</i> en 4 tipos de muestras colectadas en la cocina de un hospital.	81
17	Contenido de <i>Enterobacteriaceae</i> en alimentos de un hospital	81
18	Incidencia de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> en alimentos y superficies por 2 técnicas de detección.	83
19	Positividad general por cultivo y PCR de <i>L. monocytogenes</i> en la cocina del hospital en dos períodos de muestreo.	84
20	Positividad a <i>L. monocytogenes</i> en diversas superficies de la cocina.	85
21	Observaciones de 25 muestreos al lactario del hospital materno infantil desde el 24 de Julio 2009 al 30 de Julio 2010.	89
22	Contenido de Bacaterias Mesófilas Aerobias en 5 tipos de muestras colectadas en el lactario de un hospital.	91
23	Contenido de <i>Enterobacteriaceae</i> en 5 tipos de muestras colectadas en el lactario de un hospital.	92
24	Comportamiento de 50 cepas de <i>C. sakazakii</i> aisladas de diversas fuentes a prueba BIOLOG.	96
25	Detección de <i>Cronobacter</i> spp por PCR en materia fecal inoculando 10 y 200 células en 30 horas e incubado a 35° C.	100
26	Identificación por PCR de cepas de <i>Cronobacter</i> spp aisladas de muestras que resultaron positivas por cultivo.	102
27	Contenido mínimo, máximo y promedio de <i>Cronobacter</i> spp en 5 tipos de muestras colectadas de un lactario.	102

28	Incidencia de 5 especies de <i>Cronobacter</i> spp según tipo de muestra e identificadas por <i>rpoB-PCR</i> .	105
29	Distribución de <i>C. sakazakii</i> según tipo de muestra.	106
30	Distribución de cepas de <i>C. sakazakii</i> aisladas de diversas superficies.	107
31	Muestras de leche hidratada positivas a <i>C. sakazakii</i> .	108
32	Perfil de resistencia de cepas de <i>C. sakazakii</i> según fuente de aislamiento.	109
33	Frecuencia de cepas de <i>C. sakazakii</i> aisladas de 4 fuentes según número de antibióticos a los que mostraron resistencia.	111
34	Perfil de resistencia a antibióticos de cepas aisladas durante el estudio según fuente y grupo clonal.	117
35	Casos de diarrea positivos a <i>Cronobacter</i> y a <i>C. sakazakii</i> en niños hospitalizados entre mayo 2009 y mayo 2010.	119
36	Antecedentes de niños involucrados en el brote.	120
37	Detección y cuantificación por PCR de <i>C. sakazakii</i> en leche en polvo y rehidratada.	120
38	Detección de <i>C. sakazakii</i> en materia fecal.	121
39	Estimación de la exposición a <i>C. sakazakii</i> por porción de consumo.	122
40	Velocidad de desarrollo de <i>C. sakazakii</i> a 7°C y 35°C en leche rehidratada y caldo soya tripticaseína.	134
41	Análisis de varianza de la velocidad de desarrollo de <i>C. sakazakii</i> en función del producto, temperatura y volumen.	135
42	Reducción del Riesgo Relativo en función de temperatura ambiente, tiempo de almacenamiento en refrigeración y T° del agua de hidratación.	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Pérdida de las cifras de incidencia de ETAs debidas al subregistro.	8
2	Configuración de peligros microbianos en los alimentos.	14
3	Modelo de Evaluación de Riesgos de <i>C. sakazakii</i> .	38
4	Serie de MRA publicadas por la OMS y FAO.	39
5	Perfil microbiano de los alimentos y ambiente de la cocina de un hospital.	56
6	Enfoque general para la ER.	57
7	Fórmula de Número Más Probable (NMP).	71
8	Imágenes del lactario hospital.	86
9	Áreas de trabajo en el lactario.	87
10	Proceso de preparación y distribución de leche rehidratada en el hospital.	88
11	Morfología colonial de <i>C. sakazakii</i> en agar ABRVG después de la incubación a 35°C durante 24 h.	93
12	Morfología colonial de <i>C. sakazakii</i> en agar EMB después de la incubación a 35°C durante 24 h.	94
13	Producción de pigmento amarillo al someter a cepas de <i>C. sakazakii</i> a temperatura de 22°C.	94
14	Reacción cromogénica por acción de la α glucosidasa en cepas de <i>C. sakazakii</i> en agar DFI.	95
15	Ajuste de iniciadores Esakf y Esakr con 4 niveles adicionales de Taq polimerasa, 0,45 U, 1 U, 1,5 U y 2 U.	98

16	Especificidad de iniciadores Esakf y Esakr para detección de <i>Cronobacter</i> spp.	99
17	Prueba de especificidad para detección de <i>C. sakazakii</i> .	104
18	Amplificación de <i>C. sakazakii</i> en una muestra de leche en polvo.	104
19	Similaridad genética entre cepas de <i>C. sakazakii</i> aisladas del brote utilizando el protocolo del CDC (Pulsenet 2010).	112
20	Valoración preliminar de la técnica de EGCP para 5 cepas de <i>C. sakazakii</i> .	113
21	Imagen EGCP de 23 cepas de <i>C. sakazakii</i> de leche en polvo, leche rehidratada, ambiente y materia fecal aisladas fuera del brote.	114
22	Dendrograma de 46 cepas de <i>C. sakazakii</i> aisladas durante el muestreo.	115
23	Imagen de EGCP de cepas de <i>C. sakazakii</i> aisladas durante el brote.	124
24	Dendrograma de 23 cepas de <i>C. sakazakii</i> aisladas de diferentes fuentes. Bloques A y B pertenecen a cepas recuperadas durante el brote. C y D a cepas aisladas de diferentes fuentes antes y después del brote.	125
25	Capacidad de adherencia e invasividad de 19 cepas de <i>C. sakazakii</i> .	126
26	Tiempo requerido en alcanzar 6°C a partir de 3,000 y 100 mL de leche rehidratada con agua a 45°C.	129
27	Tiempo requerido en alcanzar 37°C en 100 mL de leche rehidratada que se había conservado en refrigeración.	129
28	Comportamiento de <i>C. sakazakii</i> a 7°C en leche rehidratada	131

(3,000 mL y 100 mL) y 100 mL de CST.

- | | | |
|-----------|---|------------|
| 29 | Comportamiento de <i>C. sakazakii</i> a 35°C en 3,000 mL de leche inoculada con 1.7 log UFC/mL. | 132 |
| 30 | Comportamiento de <i>C. sakazakii</i> a 35°C en 100 mL de leche inoculada con 1.71 log UFC/mL. | 133 |
| 31 | Comportamiento de <i>C. sakazakii</i> a 35°C en 100 mL de caldo soya tripticaseína inoculada con 1.81 log UFC/mL. | 133 |
| 32 | Velocidad de desarrollo de <i>C. sakazakii</i> a 7° y 35°C en leche rehidratada y en CST. | 134 |

1. INTRODUCCIÓN

El Codex Alimentarius publicó en 1999 los principios y guías que definen la evaluación de riesgos microbianos (ERM) como un proceso con base científica interesado en la identificación de peligros y encaminado a proteger la salud de la población. Este riesgo puede ser imputable al propio alimento, a los agentes patógenos que pueden contener, y al nivel de susceptibilidad que manifiestan las personas expuestas (y aún la misma persona en diferentes circunstancias. El estudio de estos factores permite sustentar programas verdaderamente racionales de vigilancia y control de la inocuidad de los alimentos. La expresión de este riesgo, son las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), las cuales constituyen un problema relevante de salud pública. En países industrializados, a pesar de sostenidos esfuerzos por asegurar la inocuidad microbiana de los alimentos, las ETAs siguen teniendo presencia significativa y son motivo especial de preocupación. Los enfoques preventivos que se suelen poner en operación se sustentan en general en tecnologías avanzadas de producción, y una amplia cobertura de vigilancia epidemiológica sistemática para detectar la ocurrencia de brotes entre la población. Adicionalmente, existe interés permanente en llevar a cabo el estudio epidemiológico de los brotes de tales ETAs, lo que aporta una fuente segura de información para identificar no sólo los agentes etiológicos, sitio y tipo de alimentos implicados, sino los factores de riesgo que participan en la configuración de dichos incidentes.

Entre los sitios que suelen verse implicados en los brotes de ETAs destacan de manera especial aquellos que se preparan y sirven en hospitales. Esta población constituye un grupo con singular susceptibilidad y mayor riesgo de enfermar y desarrollar cuadros clínicos más severos, especialmente los niños recién nacidos y prematuros.

Debido a la diversidad de alimentos que se preparan en la cocina de un hospital o al especial cuidado en la preparación de formulas lácteas en el lactario, resulta evidente también la diversidad de factores y mecanismos a través de los cuales estos alimentos puede adquirir peligrosidad. Tales factores de riesgo

pueden resumirse dentro de tres situaciones generales: la exposición del alimento a la contaminación, las facilidades para la multiplicación de los microorganismos, y las posibilidades de sobrevivencia a los tratamientos con efecto antimicrobiano que se apliquen en cada caso. La naturaleza y forma de expresión de estos factores es muy dependiente de la infraestructura, y condiciones de operación de cada sitio particular en el que se preparan los alimentos.

El presente estudio consta de dos partes:1) la microbiología de los alimentos y su entorno dentro de la cocina general del hospital; 2) un estudio prospectivo (en relación con un brote de enfermedad diarreica ocurrido entre lactantes) del ambiente del lactario.

En el primer término, realizaremos un estudio observacional que permitirá conocer las prácticas y operaciones riesgosas que favorecen la contaminación, sobrevivencia y desarrollo de bacterias patógenas, y en segundo, a propósito del brote de enfermedad disponer de información específica en el lactario, sobre la incidencia de *Cronobacter* spp y de *Cronobacter sakazakii* en leches en polvo (LP) y rehidratadas (LR) preparadas, su concentración, su fuente de contaminación (eventualmente el mecanismo), y una valoración del comportamiento del patógeno en el alimento una vez contaminado hasta el tiempo de su consumo. Para estos fines se aplicarán técnicas tradicionales de cultivo y técnicas moleculares (reacción de polimerasa en cadena para identificar el patógeno, y electroforesis en gel con campos pulsados para rastrear la fuente de contaminación). Se evaluará la respuesta al consumo de LR contaminadas y se aplicará el método epidemiológico para identificar los individuos expuestos y no expuestos y en cada grupo aquellos que enferman y no enferman en el estudio prospectivo. Identificado el alimento, su análisis microbiológico permitirá determinar la concentración del patógeno, y conociendo la cantidad consumida, estimar la dosis ingerida tanto entre los que enfermaron como entre los que no enfermaron (situación inédita en nuestro país y desconocida para *C. sakazakii*). En situación ideal es posible establecer la relación dosis respuesta, es decir, la asociación entre el grado de exposición (nivel de población de un patógeno ingerido con un alimento contaminado) y la magnitud

del daño experimentado por quienes la han consumido (desde una condición asintomática hasta un cuadro clínico de cualquier severidad). Una aproximación mayor a esta estimación se obtendrá de un estudio aplicando los parámetros de desarrollo del patógeno en un estudio experimental predictivo sobre la dinámica del patógeno en el alimento bajo las condiciones en las que se ha conservado (tiempo, temperatura) previo al consumo.

Un aspecto fundamental es la adecuada coordinación y colaboración entre el laboratorio de investigación y el servicio de alimentos y epidemiología del hospital para detectar tan tempranamente como sea posible los casos de gastroenteritis que se presenten entre los pacientes e iniciar a la brevedad el estudio epidemiológico para identificar el alimento implicado en el incidente.

En resumen en este trabajo se incluye y destaca:

- estudios sobre una bacteria patógena emergente, cuya caracterización fenotípica y genotípica en la literatura científica aún se encuentran en evolución,
- la distribución de especies del género dentro del lactario, leche en polvo y leche rehidratada, con énfasis en la especie *C. sakazakii*,
- un estudio epidemiológico prospectivo de un brote de enfermedad en lactantes incluida la identificación del vehículo, dosis ingerida del patógeno y el rastreo de la fuente de contaminación,
- un conocimiento del perfil de contaminación microbiana prevalente en el lactario durante la gestación del brote,
- una valoración de los factores de riesgo que contribuyeron a la presentación del brote.

La información generada constituye aportaciones originales sobre un problema relevante de salud pública, específicamente dentro de la medicina preventiva y sustentado en una metodología científica actualizada con valor aplicativo en la gestión de riesgos microbianos asociado al consumo de alimentos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Consumo de alimentos y enfermedad

Una buena alimentación es fundamental para preservar y promover la salud. Los alimentos proveen los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades metabólicas de cada ser humano. Son además, fuente de placer personal y aspecto central en reuniones familiares y sociales.

Sin embargo, su consumo indiscriminado, aún cuando satisfaga el apetito, puede conducir a problemas de sobrealimentación como sobrepeso, obesidad y sus lamentables consecuencias. El subconsumo crónico, por otra parte, también compromete la salud a través de cuadros carenciales, insuficiente desarrollo físico, inmunológico e intelectual (Medina, 2005).

Aún cuando se reconoce el efecto positivo hacia la salud del potencial nutritivo de un alimento, conviene reconocer que existen riesgos que inevitablemente se relacionan con su consumo. Estos son de diversa índole y pueden agruparse de la siguiente manera.

- Factores individuales (características específicas de cada persona, como intolerancias fisiológicas o hipersensibilidad)
- Agentes físicos (materia extraña macroscópica en los alimentos)
- Agentes químicos (componentes intrínsecos, aditivos, contaminantes)
- Agentes microbianos (bacterias, parásitos, hongos, virus, priones)

Si bien múltiples y variados los agentes de riesgo, son los agentes microbianos los que afectan con mayor frecuencia a la población.

El riesgo microbiano en los alimentos, se conforma con la interacción de tres componentes básicos: se inicia con el proceso de contaminación, es decir, el microorganismo debe ingresar al alimento. A continuación, dos tipos de eventos pueden resultar decisivos, la sobrevivencia del microorganismo y su eventual proliferación.

La contaminación y oportunidad de sobrevivencia y el desarrollo de los microorganismos en los alimentos puede ocurrir en su propio origen o bien en algún punto ulterior en el proceso continuo del campo a la mesa.

Que un individuo enferme como consecuencia del consumo de un alimento contaminado con un microorganismo patógeno, depende de tres elementos y su interrelación: individuo, patógeno y alimento. Los posibles eventos se desarrollan desde el simple tránsito del microorganismo por el tubo digestivo con expulsión ulterior sin manifestación clínica alguna, o posterior evolución de una enfermedad, con desenlace letal en situación más extrema.

2.1.1. Formas de expresión: casos esporádicos, brotes y epidemias

El consumo de alimentos contaminados y su forma de expresión ulterior, dependen de la interacción de los factores mencionados. La más común es el cuadro diarreico. En la mayor parte de las poblaciones, el síndrome diarreico suele extenderse entre 4-7 días, incluso sin tratamiento médico. Sin embargo, dependiendo de cada individuo se observan diversos niveles de afectación, que van desde ninguna sintomatología, condición de portadores, enfermedad, hospitalización, secuelas, hasta la muerte. Esta diversidad de respuestas suele observarse incluso dentro de un mismo brote de enfermedad, en donde las víctimas comparten de manera muy próxima los factores de riesgo (ingestión del mismo patógeno y su virulencia y mismo alimento).

Aparentemente no existe la menor dificultad para identificar un caso como parte de un brote de ETA. En la práctica, sin embargo, la diferenciación entre caso esporádico y brote puede ser desde muy evidente, hasta virtualmente imposible de establecer, especialmente cuando los brotes se extienden más y más en el tiempo y en el espacio (Fernández Escartín, 2008).

Un brote de ETA, se define como la presentación de dos o más casos de enfermedad entre individuos en quienes se demuestre un cuadro clínico similar, y el consumo de un alimento común (International Association for Food Protection, 1999).

Ambos, brote o caso individual, pueden sugerir evidencias de que existe el antecedente del consumo de un alimento. Por tal razón, resulta fundamental procurar la mayor y más detallada información posible. Lamentablemente, en la práctica el abordaje del problema se limita a la atención clínica del paciente

(cuando llega a ser requerida, lo cual en nuestro medio está lejos de ser la regla). Así, la existencia de un brote, como se ha definido, se pasa por alto.

Es necesario entonces, revisar de manera permanente los reportes de cuadros diarreicos en una comunidad y advertir la eventual irrupción de un número elevado de casos nuevos de diarrea (incidencia) mayor a lo que se espera habitualmente en un período de tiempo determinado, dentro de cada jurisdicción sanitaria. Cuando el número de casos se eleva sobre 2 veces el valor de la mediana (cinco años anteriores) hablamos de epidemia.

El primer estudioso del tema fue John Snow, quién en 1854 estudió la epidemia de cólera en Londres, cuando aún se desconocía la naturaleza microbiana de la enfermedad, sentando las bases de la epidemiología moderna. Detectó que la fuente de contaminación era el agua que se distribuía entre la población (Fernández Escartín, 2008), información básica para establecer medidas de control y prevención seguras.

En un comienzo, la epidemiología se concretaba al estudio de las epidemias de naturaleza infecciosa. El concepto actual es mucho más amplio, de manera que se aplica a las muertes violentas, accidentes de tránsito, divorcios, delincuencia y en general todo problema que afecta a las comunidades humanas. Esta ciencia no se restringe a la mera colección de datos y hechos. Es primariamente un método de razonamiento; implica un arreglo ordenado en series de inferencias que se extienden más allá de la observación (Sharrar, 1987). Es una ciencia que está relacionada además con la identificación, descripción, investigación experimental y explicación teórica de los acontecimientos naturales. Encuentra una aplicación de valor insustituible en la vigilancia y control de la calidad sanitaria de los alimentos.

El control inadecuado o poco efectivo de la calidad del agua y alimentos, ha originado epidemias en el siglo pasado y presente. En México, entre 1969 y 1971, se produjo un brote multinacional de disentería que se extendió a Guatemala y a El Salvador, cuyo agente etiológico fué *Shigella dysenteriae* (Martínez, 1973; Pérez Miravete, 1973).

Israel en 1970 e India en 1991 fueron víctimas de epidemias de cólera. (Balakrish *et al.*, 1994). Nuevamente en México, en 1991, se presentó una condición epidémica que se mantuvo hasta 1998. Más recientemente en Chile, entre 2004 y 2006, se registró una epidemia extensiva por *Vibrio parahaemolyticus*, que afectó a 9 regiones del país con más de 10,000 casos (Minsal, 2009).

Estas epidemias tienen un denominador común, su magnitud, expresado en el gran costo económico y social, y elevada incidencia.

2.1.2. La magnitud del problema

Ésta se puede apreciar desde dos perspectivas: su incidencia y severidad, y el costo económico implicado.

2.1.3. Incidencia y severidad

La forma de expresión más frecuente es el cuadro diarreico que varía, como se indicó, de leve y autolimitado hasta grave con eventuales complicaciones que pueden llegar al fallecimiento. Adicionalmente, el daño se manifiesta sin afectación del aparato digestivo como ocurre en la brucelosis, botulismo, tuberculosis, toxoplasmosis y otras. La vigilancia epidemiológica pone de manifiesto elevadas cifras de incidencia. Por ejemplo, en Estados Unidos se estima en 79 millones los incidentes anuales de ETAs, con 300,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes (Mead *et al.*, 2000). Para Canadá, son 2 millones, para Australia 4.2 y para Inglaterra-Gales, 1.3. En Francia ocurren entre 239,000 y 269,000 casos, con 10,200 a 17,800 hospitalizaciones y 228 a 691 muertes. (Vaillant *et al.*, 2005). En México, Chile y otros países latinoamericanos existe escasa información al respecto.

En ocasiones un solo brote afecta a miles de personas y se presentan fallecimientos entre las víctimas. Aunque se tiene la impresión de que las enfermedades transmisibles por alimentos consisten en cuadros diarreicos autolimitados y de corta duración, la realidad es que en ocasiones provocan la

muerte entre las víctimas (Cuadro 1), dañan a miles de personas (Cuadro 2), o pueden progresar con complicaciones severas (Cuadro 3) (Fernández Escartín, 2008).

De hecho, la información completa sobre la incidencia de las ETAs, no se logra en ningún país. No se trata de enfermedades de notificación obligatoria. Los especialistas se ven en la necesidad de recurrir a estimaciones mediante una diversidad de cálculos y consideraciones (Archer y Kvenberg, 1985; Todd, 1985).

Es importante destacar como problema mayor, la pérdida de información derivada del subregistro de los casos. La incidencia real se va perdiendo de acuerdo a la siguiente secuencia (Mossel y Moreno García, 1982) (Figura 1).

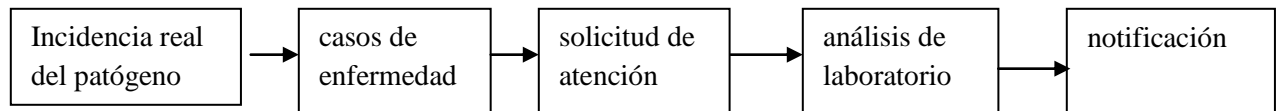


Figura 1. Pérdida de las cifras de incidencia de ETAs debidas al subregistro.

Por regla general, y como se ha señalado, ante un incidente de ETA, no en todos los individuos la enfermedad se expresa con la misma intensidad, de manera que sólo una proporción solicitará asistencia médica. Muy pocos entre estos llegan a contar con pruebas de laboratorio que identifiquen el agente etiológico. De los que inicialmente solicitaron atención médica, sólo algunos serán notificados a la autoridad sanitaria por parte del profesional.

Cuadro 1. Brotes de enfermedad por alimentos con elevada letalidad.

Año	País	Casos	Patógeno	Alimento	Muertes
1983	Holanda ¹	59	<i>S. flexneri</i>	Camarones	14
1985	EEUU ¹	142	<i>L. monocytogenes</i>	Queso panela	48
1991	Egipto ¹	> 91	<i>C. botulinum</i>	Pescado salado	18
1992	Francia ¹	279	<i>L. monocytogenes</i>	Lengua, cerdo	85
1994	EEUU ¹	104	<i>E. coli</i> O157:H7	Hamburguesas	17
1998	Brasil ¹	~4,000	<i>S. aureus</i>	Carne asada	7
2008	EEUU ²	2	<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter</i>)	Fórmulas lácteas	2

1. Fernández Escartín, 2008.

2. Lempel *et al.*, 2009.

Cuadro 2. Brotes masivos de enfermedad por consumo de alimentos.

País	Año	Alimento	Patógeno	Casos
Portugal	1974	Bivalvos	<i>V. cholerae</i>	2,467
China	1977	Almejas	Virus hepatitis A	292,301
EEUU	1985	Leche	<i>S. Typhimurium</i>	> 190,000
EEUU	1992	Ensaladas	<i>E. coli</i> enterotox	~ 3,300
EEUU	1994	Helados	<i>S. Enteritidis</i>	224,000
Italia	1997	Ensalada atún-maíz	<i>L. monocytogenes</i>	1,566
Brasil	1998	Carne res/pollo	<i>S. aureus</i>	4,000

Europa	2005	Frambuesa	<i>Norovirus</i>	> 1,000
España	2005	Pollo	S. Hadar	2,138

Fernández Escartín, 2008.

Cuadro 3. Complicaciones / secuelas asociadas a ETAs según patógeno.

Patógeno	Secuelas
<i>Brucella</i>	artritis, endocarditis, meningitis, orquitis, prostatitis
<i>C. jejuni</i>	artritis, endocarditis, eritema nodoso, Guillain Barré
<i>L. monocytogenes</i>	absceso cerebral, pleuritis, artritis séptica
<i>Salmonella</i>	apendicitis, colecistitis, eritema nodoso, endocarditis, meningitis, osteomielitis, enfermedad de Reiter
<i>Shigella</i>	eritema nodoso, SUH, miocarditis, artritis reactiva
<i>Y. enterocolitica</i>	artritis, endocarditis, eritema nodoso, espondilitis
<i>T. gondii</i>	encefalitis, Guillain Barré, pancreatitis
<i>T. spiralis</i>	falla cardiaca, secuelas neurológicas

Fernández Escartín, 2008.

2.1.4. Costos

El impacto de las ETAS se puede valorar atendiendo a los costos sociales y económicos:

El costo social puede desglosarse en:

- a) costos familiares individuales: gastos médicos y pérdida de ingresos,
- b) costos para la industria: producción animal, control de patógenos, decomisos por brotes, indemnizaciones, ausentismos,
- c) costos para el gobierno: vigilancia epidemiológica, investigación y estudios de brotes.

En un estudio económico asociado a ETAs en Canadá y Estados Unidos, los costos sociales generados se extendieron en cada evento desde \$16,690 a más

de \$1 millón de dólares en 17 brotes (Todd, 1985). El impacto económico fue generalmente mayor en brotes ocurridos en restaurantes, hoteles e instituciones, que en establecimientos con servicio de banquetes. La descapitalización de la empresa y pérdida del prestigio fueron los principales factores en estos costos, pero los gastos entre la víctimas y manejadores de alimentos afectados fueron también considerables (Todd, 1985). Costos económicos considerables (a veces inimaginables para las víctimas y los propios gobiernos de los países afectados), se aprecian en Cuadros 4 (Todd, 1989) y 5.

Cuadro 4. Pérdidas económicas (anual) por brotes de ETAs en varios países:

País	Costo
Canadá	\$ 1 334 (dls) millones
Estados Unidos	\$ 8 400 (dls) millones
Holanda	€ 345 millones
Inglaterra	£ 300-700 millones
Por deterioro	20-60% producción

Cuadro 5. Ejemplos del costo económico de brotes de ETAs según patógeno, alimento y país implicados.

Alimento	Año	País	Patógeno	Casos	Costo (x 1000 dls)
Pastel	1977	Canadá	<i>Salmonella</i>	44	36
Leche	1981	Escocia	<i>Salmonella</i>	654	1,379
Chocolate	1983	Canadá	<i>Salmonella</i>	200	62,063
Carne/res	1964	Escocia	<i>Salmonella</i>	507	164,356
Atún	1963	Estados Unidos	<i>C. botulinum</i>	3	164,187

Fernández Escartín, 2008.

2.2. La prevención: desde el principio empírico de la prohibición hasta el análisis de riesgos (AR)

2.2.1. Situación en diferentes países

Ordinariamente, las ETAs se manifiestan como un problema recurrente de salud pública. Ocasionan más de 200 enfermedades conocidas. Se estima que cada año a escala mundial se presentan miles de millones de episodios causados por patógenos transmitidos por alimentos, de los cuales 70% corresponden a enfermedades diarreicas. Existen continentes enteros como África con un número indeterminado de casos y otros como Sudamérica con igual problema asociado en primer término a factores de pobreza e higiene deficiente.

En los países industrializados más del 50% de las enfermedades infecciosas del aparato digestivo son transmitidas por agua y alimentos (Todd *et al.*, 1994). En estos países, donde se reconoce que los insumos son generalmente suficientes (energía eléctrica, disponibilidad de medios para el enfriamiento y calentamiento de alimentos), con relativo buen nivel de educación y de organizaciones de derechos de los consumidores, todos los años se tiene conocimiento se brotes por alimentos contaminados. Desde otro ángulo, habla bien de la transparencia y esfuerzos dedicados a la protección de la salud. Anualmente en Estados Unidos ocurren cerca de 400 casos de tifoidea, la mayor parte adquirida fuera del país. En este país se reportan anualmente 1.4 millones de casos de salmonelosis, aunque sólo 30,000 se confirman por cultivo; *E. coli* O157:H7 se ha identificado en casi 73,000 casos principalmente por consumo de carne, leche y jugos no pasteurizados, hortalizas y agua inadecuadamente clorada (CDC, 1993). En Francia, la incidencia de salmonelosis humana reportada por el Centro Nacional de Investigación para *Salmonella* y *Shigella* (CNRSS) en 2001, fue de 21 casos por 100,000 habitantes; *Salmonella* Enteritidis representó el 39% de los casos (Grimont *et al.*, 2001).

2.2.2. La gestación de los riesgos y el desenlace

Según se ha señalado, en la conformación de las ETAs destacan tres componentes: el patógeno, el individuo y el alimento. Estos componentes interactúan en grado variable en el desenlace, es decir la enfermedad (respuesta). Por ejemplo, un individuo susceptible puede consumir un alimento que contiene una cantidad elevada de cierto microorganismo (exposición); pero si la concentración del microorganismo no se encuentra en cantidad suficiente (dosis mínima infectante), o no posee un potencial suficiente (virulencia, patogenicidad), para provocar la enfermedad, el daño no ocurre. El estudio exhaustivo de los brotes de ETAs genera información de insustituible valor para planear y llevar a cabo programas efectivos de prevención. La participación de epidemiólogos y microbiólogos especialistas en evaluación de riesgos, permite detectar aquellos acontecimientos que propiciaron la presentación del brote de enfermedad. Se incluyen: la identificación del agente etiológico, el alimento y sitio implicado, la magnitud del problema (número de casos, tasa de ataque, hospitalizaciones, fallecimientos), los factores contribuyentes en la gestación de los peligros que finalmente configuraron el riesgo, la dosis ingerida del agente patógeno, la distribución de los casos según edad, la identificación de individuos hipersensibles y el rastreo de la fuente de contaminación del agente patógeno al alimento. Es evidente que conforme se acumulan los productos de más y más estudios, es posible demostrar o poner en evidencia la tendencia del problema general en el tiempo, los alimentos más comunes según cada patógeno identificados en los brotes, la variación estacional y otros hallazgos no menos significantes. Por otra parte, la información obtenida constituye una base de datos fundamental para trazar políticas y programas más consistentes, y evaluar su eficiencia, tomando en cuenta que se trata de un conocimiento derivado de hechos actuales, es decir acontecimientos que ciertamente tienen lugar.

En otras palabras, se pasa del sentido común, de las opiniones personales y las especulaciones, al conocimiento de la realidad objetiva. Esta visión del problema permite sustentar científicamente las acciones y en general los programas de prevención de las ETAs de manera más segura. La configuración

de los peligros microbianos en los alimentos puede resumirse de acuerdo con el esquema de la Figura 2 (Fernández Escartín, 2008).

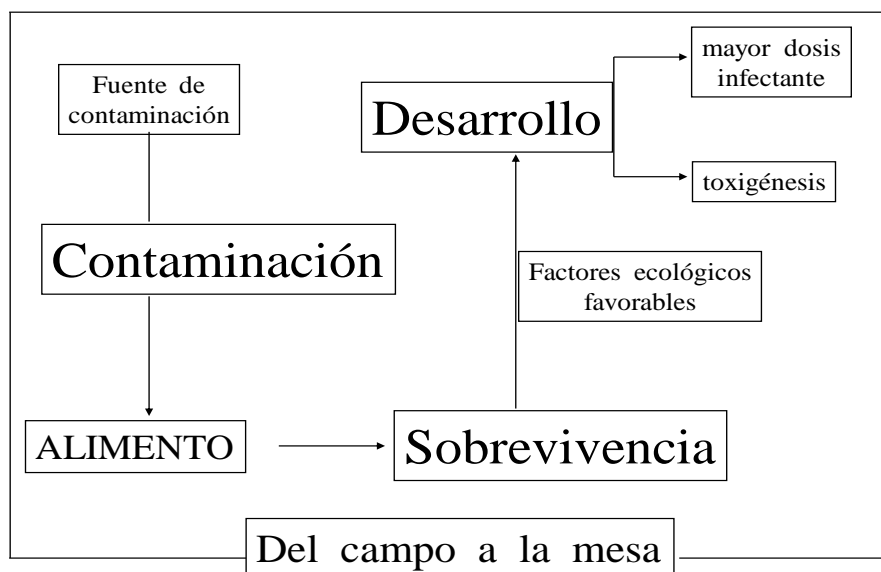


Figura 2. Configuración de peligros microbianos en los alimentos.

En algunos casos la mera contaminación resulta suficiente para comprometer seriamente la peligrosidad del alimento. Esta situación se observa ante microorganismos cuya dosis infectante es muy baja: bastan pocas células vivas para iniciar el proceso infeccioso. Son ejemplos ilustrativos algunas cepas de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. Se han reportado brotes en los cuales la concentración de *Salmonella* fue de 6 UFC en 65 g de helado (Hennessy *et al.*, 1996), y de 2-9 células en chocolate (D'Aoust *et al.*, 1975). Para *E. coli* O157:H7 la dosis mínima se estima en 1-4 células (Duncan y Hackney, 1994). En otros casos es indispensable la proliferación del patógeno para alcanzar una población que permita superar las defensas del individuo e iniciar el cuadro infeccioso.

2.2.3. Riesgos microbianos

Un riesgo microbiano, es la probabilidad de que un individuo enferme cuando se expone a un peligro (FAO-OMS, 1995), que en nuestro caso es la ingesta de alimentos contaminados. De esta manera pueden existir riesgos con

alta o baja probabilidad de ocurrir y, en cada caso, con alta o baja severidad. Aunque el término se utiliza frecuentemente como sinónimo de peligro, es fundamental hacer una diferenciación clara de ambos términos en el contexto de la inocuidad de los alimentos. El peligro se refiere al patógeno que causa la enfermedad (FAO-OMS, 1995). El Codex (CAC, 1999) lo define como un agente biológico, químico o físico, o condición del alimento con el potencial para causar un efecto adverso a la salud. En la instrumentación de medidas preventivas de control, el término se aplica también a las maniobras o situaciones que propicien la contaminación, sobrevivencia o desarrollo de los microorganismo patógenos. Los agentes microbianos, según los especialistas, son los que representan una amenaza mayor a la salud cuando se consumen alimentos. El daño más frecuente se observa en el tubo digestivo, aún cuando hay otras áreas que pueden afectarse como la faringe (*Streptococcus pyogenes*), riñones (*E. coli* O157:H7) y sistema nervioso (*Clostridium botulinum*). La lista de patógenos en la actualidad se ha incrementado notablemente. En algunos casos se trata de microorganismo de reciente descubrimiento (*E. coli* O157:H7, *C. cayetanensis*, *Cronobacter sakazakii*); en otros, de gérmenes que perdieron vigencia de acuerdo con reportes epidemiológicos, pero que han resurgido y se reportan cada vez con mayor frecuencia en algunos países (*S. Enteritidis*) (Fernández Escartín, 2008). Algunos factores tienen una participación muy evidente en ese incremento. Por ejemplo, nuevos patrones en los hábitos y costumbres alimentarias de la población, cambios en los sistemas y tecnologías aplicadas en la producción y distribución de los alimentos, un aumento en el número de inmunocomprometidos, y de manera indirecta, la disponibilidad de técnicas más eficientes de análisis para la detección de microorganismos patógenos en los alimentos y la ampliación de la cobertura de la vigilancia epidemiológica (Batz *et al.*, 2005).

2.2.4. Estudio epidemiológico de brotes de ETAs

El conocimiento de la incidencia de las ETAs es esencial para la planeación y evaluación de los programas orientados a su control y prevención. Los datos obtenidos, actualizados, computados y analizados de manera permanente,

constituyen la premisa para el establecimiento de estrategias no sólo preventivas de tales brotes, si no para diseñar programas de vigilancia y control sanitario más efectivos (Fernández Escartín, 2008). Los datos epidemiológicos también son relevantes como fuente de información a la comunidad, específicamente acerca de la naturaleza y magnitud del problema.

La educación a los consumidores, es tarea insoslayable para una adecuada toma de decisiones correcta en la protección de la inocuidad de un alimento. Bajo tal condición, se logra una participación más activa de apoyo a los programas de prevención y control gubernamentales. La comunicación o los reportes (a los niveles correspondientes) de la aparición de casos sospechosos, debe ser responsabilidad no sólo de la autoridad de salud, sino también de las personas afectadas.

Hay que subrayar la necesidad de proceder tan prontamente como sea posible al inicio del estudio de brotes por 4 razones básicas (Palmer *et al.*, 1995):

- a) emprender acciones inmediatas de control y evitar daños mayores;
- b) disponer de información y hechos más confiables acerca de las personas involucradas (enfermos y quienes intervienen en el manejo del alimento sospechoso), y aumentar la probabilidad de muestrear estos alimentos;
- c) no perder la oportunidad de efectuar la investigación si el incidente se presentó en situaciones especiales como barcos y aeronaves;
- d) idealmente, un estudio epidemiológico debe obtener información tan cuantitativa como sea posible para caracterizar mejor la relación dosis respuesta del patógeno implicado. Desafortunadamente la dosis del patógeno ingerida por las víctimas en un brote es un valor muy difícil de obtener en la práctica.

El estudio de las ETAs debe ser motivo de investigación permanente como parte de una política nacional a favor de la inocuidad de los alimentos. Los objetivos a desarrollar en un estudio epidemiológico de un brote, tienen características de inmediatos y mediatos (Fernández Escartín, 2008).

A. Inmediatos:

- a. Identificar los casos asociados con el incidente.

- b. Demostrar la etiología y el alimento implicados.
- c. Detectar la fuente de contaminación y establecer los factores que propiciaron la contaminación del microorganismo, los que condujeron a su supervivencia, los que favorecieron su desarrollo, y si fuera el caso, la generación de toxinas.

B. Mediatos.

- a. Evitar la presentación de nuevos brotes.
- b. Disponer de la información necesaria para establecer prioridades y medidas efectivas dentro de los programas de aseguramiento de la inocuidad de los alimentos.

Etapas en el estudio

Una metodología para estudios epidemiológicos de brotes de ETAs está contenida en el manual “Procedures to investigate foodborne illness” IAMFESS (International Association for Food Protection, 1999), que detalladamente establece etapas y procedimientos en forma práctica para su elaboración.

Las etapas consideradas en la realización del estudio de un brote (Fernández Escartín, 2008) incluyen:

1. Notificar y registrar los casos sospechosos
2. Analizar los datos primarios
3. Iniciar la investigación preliminar
4. Calcular el período de incubación y describir la sintomatología
5. Llevar a cabo el estudio epidemiológico descriptivo
 - definir el caso (para el brote particular)
 - trazar la curva epidémica
 - definir las características de las personas afectadas
6. Formular una hipótesis
7. Llevar a cabo el análisis epidemiológico
8. Identificar la causa del brote:

- a) agente etiológico
 - b) alimento implicado
9. Localizar y estudiar el sitio en donde el alimento adquirió peligrosidad:
 - trazar el diagrama de flujo de la preparación del alimento
 - identificar los factores asociados en la configuración del brote
 10. Probar la hipótesis
 11. Calcular el costo económico del brote
 12. Preparar un reporte con conclusiones y recomendaciones.

Cada brote tiene peculiaridades propias. La lista anterior constituye una referencia para ser aplicada en el caso de incidentes de hospitales. La importancia del estudio epidemiológico de las ETAs, radica en el beneficio de sus productos.

2.2.5. La prevención de las ETAs

El interés por prevenir las ETAs ha sido una necesidad histórica de la sociedad. La obligación de alimentarse favoreció por ensayo y error comprender que un determinado alimento tenía un riesgo asociado de enfermar. El consumo de ciertos granos de cereales, leche y agua, por nombrar algunos, tenían un mayor control y castigo en caso de adulteración.

Se comenzaron a elaborar ciertos códigos de conservación de alimentos y agua (Mesopotamia y países del mar mediterráneo, por ejemplo). La protección de los alimentos inicialmente se basó en reglamentos y su cumplimiento (incluyendo el castigo) a través de inspección en los sitios de almacenamiento, preparación y servicio (Fernández Escartín, 2008).

La identificación de los peligros, no siempre es fácil de obtener en los sitios donde se manejan alimentos. Es fundamental realizar una observación a fondo de las condiciones en las que esos alimentos son manipulados. Estos factores propiciadores son de naturaleza e impacto variable según el tipo de alimento, la población para la cual son elaborados y el sitio en donde se prepara.

Prevenir las ETAs resulta complejo, sin una solución simple o universal (Potter *et al.*, 2000). Para aplicar medidas preventivas razonablemente seguras y

abatir los problemas de las ETAs, es esencial establecer en qué términos evoluciona el proceso de configuración de los peligros.

Al respecto, es fundamental el conocimiento de los factores que determinan que un alimento pase de la condición de inocuo a peligroso; es decir, en qué términos se gestan los brotes de ETAs. Se trata de la interrelación del microorganismo, el alimento y el individuo: cómo se van configurando hasta provocar el desenlace; en qué términos influyen las prácticas, maniobras y diversos factores tales como hábitos alimentarios, estilos de vida y cambios en su demografía.

El objetivo básico de la vigilancia y control sanitario de los alimentos consiste en lograr que se alcancen y mantengan los atributos propios de un alimento de buena calidad sanitaria. Debe destacarse la prevención de su deterioro y evitar las enfermedades transmisibles por los alimentos. Este último propósito presupone, por un lado, reconocer la existencia y la magnitud del problema, es decir, la incidencia de tales enfermedades, su distribución en la población y sus tendencias en el tiempo. Por otra parte, diseñar y controlar en las mejores condiciones los programas preventivos existentes.

La necesidad de prevenir se fundamenta en la magnitud del daño, en los costos ocasionados y en el impacto que tiene para la población. Prevenir es invertir; mientras más información se produzca, más certeras serán las medidas adoptadas. Es necesario entonces, trabajar en todo el proceso de producción de alimentos del campo a la mesa y generar amplia información científica que fundamente las medidas de prevención de las ETAs por causas microbianas (Fernández Escartín, 2008).

Esta información proviene tanto del estudio epidemiológico sistemático y exhaustivo de los brotes, como de los estudios experimentales sobre el hábitat, patogenicidad, y comportamiento de los microorganismos que los causan.

Reportes actuales de brotes de ETAs en diferentes países del primer mundo con implementación de sistemas de protección de inocuidad de alimentos de vanguardia, subrayan la necesidad de seguir investigando y generando

información. El sistema de sanción por no cumplimiento (vigente en la actualidad), o poco eficiente, conduce a la incorporación de sistemas o enfoques modernos, como el APPCC y el Análisis de Riesgos (Fernández Escartín, 2008).

En países como los nuestros, la necesidad de garantizar la inocuidad es tan imperativa como difícil. Desafortunadamente, no se vislumbra con suficiente convicción esta necesidad, existe escaso personal calificado y por regla general prevalece el desconocimiento por parte de las autoridades. No valoran la magnitud de esta inversión y el ahorro para la sociedad en general. Prevenir las ETAs es movilizar el conocimiento actual y la necesidad de generar y disponer de nueva información científica. Aún cuando existan grandes diferencias entre los países, cada uno debe ir adecuando sus programas de inocuidad.

2.2.6. Enfoque tradicional

Como se esbozó anteriormente, el sistema tradicional para proteger a las poblaciones de los riesgos asociados al consumo de los alimentos, se apoya en una legislación (reglamentos), en la inspección para comprobar su cumplimiento, y en el muestreo y análisis de productos de acuerdo con las normas sanitarias correspondientes. Situación esta, que no satisface las necesidades actuales de prevenir las ETAs, si no más bien, corregir las deficiencias encontradas y sancionar los incumplimientos.

2.2.6.1. Reglamentos

Con el tiempo se introdujeron principios y métodos que se encontraron muy ventajosos e indispensables para evitar la enfermedad consecutiva al consumo de un alimento. Estas indicaciones adquirieron carácter de reglamentos (es decir, fueron obligatorios y motivo de vigilancia y castigo por su incumplimiento). A fines del siglo XIX, y conforme se ampliaron los conocimientos (empíricos o producto del desarrollo de la ciencia), sobre la etiología y factores que afectaban la seguridad de los alimentos, las normas fueron adquiriendo mayor relevancia.

En la actualidad cada país elabora su código sanitario de los alimentos. Lo actualiza dependiendo de sus necesidades, nuevos hallazgos de patógenos, y

obligaciones adquiridas por concepto de exportaciones, entre otras. Existen instituciones del estado que velan por su cumplimiento. FDA, USDA en Estados Unidos, Secretaria de Salud en México y Autoridad Sanitaria en Chile.

2.2.6.2. Inspección

El objetivo central de esta actividad es detectar situaciones y operaciones que contravengan una disposición reglamentaria. Parece tarea que no requiere mayor esfuerzo (y de hecho en algunos casos así es). En la práctica, durante el proceso de inspección, las decisiones tienen un evidente carácter subjetivo. Es fundamental realizar un exhaustivo estudio observacional a fin de detectar las prácticas y operaciones que ponen en riesgo la inocuidad de los alimentos. Las violaciones deben ser confirmadas en el laboratorio (Fernández Escartín, 2008).

2.2.6.3. Laboratorio

El desarrollo de la microbiología y la toxicología, permiten contar con técnicas confiables para detectar la presencia de agentes patógenos en los alimentos, y de acuerdo con los resultados, decidir si pueden o no ser autorizados para su consumo (Fernández Escartín, 2008). Algunas pruebas de laboratorio resultan especialmente útiles para resolver acerca de la idoneidad de un alimento. Más aún, permitían poner de manifiesto violaciones a los reglamentos, sin que para ello sea necesaria la presencia del inspector en el establecimiento.

Lamentablemente existe la idea generalizada de pretender atender el problema del aseguramiento de la inocuidad de los alimentos a base de muestrear y analizar los productos terminados, sea en una fábrica o servicio de alimentos (Fernández Escartín, 2008). El criterio de decisión es muy simplista: existen normas (límites de contenidos microbianos) que separan lo permitido de lo no permitido.

Hay que agregar que la exactitud y precisión de las técnicas actuales para el monitoreo microbiológico, son bajas (Mossel y Drake, 1990). La estrategia o enfoque preventivo correcto debe apoyarse en la detección de aquellas operaciones

riesgosas que comprometen la inocuidad de un alimento, y de puntos en los cuales una intervención acertada evitará la contaminación, supervivencia o multiplicación de un agente patógeno. Esta ya no es la tarea mecánica y simplista de muestrear y analizar.

2.2.6.4. Normas microbianas

Se reconocen como los límites de tolerancia establecidos para grupos seleccionados de microorganismos en los alimentos y materiales de su entorno desde la producción primaria hasta el servicio (Fernández Escartín, 2008). Estos límites o valores tolerados de un microorganismo o grupo indicador para un determinado alimento o producto listo para el consumo tiene el carácter de obligatorio. Su incumplimiento implica sanción por parte de las autoridades de salud (Minsal, 1997). A ese valor se le califica como estándar o norma microbiana; por ejemplo, contenido de bacterias mesófilas en leche.

Estas normas generadas, son de aplicación obligatoria ante la regulación sanitaria y revisten especial interés para los fabricantes y autoridades. El uso racional de estos criterios ha permitido ostensiblemente mejorar la calidad sanitaria de los alimentos (Fernández Escartín, 2008).

2.2.6.5. Infraestructura o sitios

Los sitios donde se producen o preparan los alimentos que se han identificado durante el estudio epidemiológico de los brotes de ETAs (Cuadro 6), incluyen fábricas, comercios establecidos en la vía pública, lugares informales (el campo, transportes), hogares y servicios de alimentos (restaurantes, fondas). Con mucho, son estos dos últimos los que con mayor insistencia son citados por los países que cuentan con estudios y registros epidemiológicos confiables. En Holanda, más de la mitad (769) de los incidentes de ETAs en los que se identificó el sitio, el alimento sospechoso había sido consumido en un restaurante; sin ser menos importante, en hospitales ocurrieron 21 brotes con 437 personas afectadas (Simone *et al.*, 1997).

Cuadro 6. Ejemplos de sitios en donde se han gestado brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Sitio	Patógeno	País
Restaurante ¹	<i>Clostridium botulinum</i>	Estados Unidos
Hogar ²	<i>Salmonella</i> Muenster	Arabia Saudita
Industria láctea ³	<i>Staphylococcus aureus</i>	Japón
Escuela pública ⁴	<i>Giardia lamblia</i>	Estados Unidos
Planta tratamiento agua ⁵	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Estados Unidos
Área de cultivo y cosecha de ostras ⁶	Norovirus	Estados Unidos
Planta procesadora de leche ⁷	<i>Salmonella</i>	Estados Unidos
Hospital ⁸	<i>E. coli</i>	Escocia
Asilo de ancianos ⁹	<i>Salmonella</i>	Inglaterra
Servicio buffet ¹⁰	<i>Salmonella</i>	Estados Unidos
Hospital ¹¹	<i>Enterobacter sakazakii</i> (<i>Cronobacter spp</i>)	Bélgica

1. Seals *et al* (1981)

2. Nabbut *et al* (1982)

3. Asao *et al* (2003)

4. Osterholm *et al* (1981)

5. Mackenzie *et al* (1994)

6. Khon *et al* (1995)

7. Collins *et al* (1968)

8. O'Brien *et al* (2001)

9. Evans *et al* (1996)

10. Backers *et al* (1985)

11. Van Acker *et al* (2001)

Un componente más activo y con cierto efecto preventivo en el manejo de los alimentos, se designó como buenas prácticas de fabricación. Consiste en una lista de señalamientos e instrucciones que deben seguirse para conferir al alimento una calidad preestablecida por el fabricante. Precisa por una parte, de

qué manera proceder en las diferentes etapas del procesamiento de un alimento, y por otra, implica la capacitación de los trabajadores para una ejecución satisfactoria de todas esas prácticas de fabricación.

2.2.6.6. Prácticas sanitarias de operación (PSO)

Las PSO son todas aquellas actividades necesarias para producir alimentos bajo condiciones óptimas de higiene. Están sustentadas en el Código Internacional de Prácticas recomendado en los Principios Generales de Higiene de los Alimentos del Codex Alimentarius (1969).

Deben aplicarse de manera sistemática con cada código específico de prácticas de higiene (cuando sea apropiado), y con las directrices sobre criterios microbiológicos.

Se consideran como un prerrequisito en la implementación del enfoque moderno de inocuidad de los alimentos, conocido como Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (APPCC), que se menciona más adelante.

2.2.6.7. Del control de calidad al aseguramiento de la inocuidad

A nivel internacional, un programa de aseguramiento de la calidad es sinónimo de ISO (International Standardization Organization). Las normas ISO son una serie de estándares que describen los requerimientos necesarios para operar un sistema de calidad dentro de una industria. Específicamente las normas ISO 9000 constituyen un instrumento internacionalmente aceptado, muy a propósito para lograr la calidad y dar satisfacción a los consumidores. Constituyen un documento que ofrece directrices respecto a cómo organizar, mantener o mejorar los procesos productivos y garantizar la calidad final de los productos. Están destinadas a uniformar el lenguaje internacional existente entre clientes y proveedores acerca de gestión para asegurar la certificación de calidad y facilitar el comercio Internacional (International Standardization Organization, 2010). Como la inocuidad es una garantía que se debe ofrecer, en 2005, se crearon las normas ISO 22,000:2005 (ISO, 2009), que proporcionan un marco de requisitos

armonizados internacionalmente para el enfoque global. Está diseñada para permitir que todo tipo de organización que forma parte de la cadena de alimentos implemente un sistema de gestión de inocuidad alimentaria. Sin embargo, el requisito previo para implementarla, es contar con el sistema APPCC en operación. Se transforma así en un enfoque moderno de inocuidad alimentaria.

2.2.7. Enfoques modernos

Como se indicó, el enfoque tradicional (reglamentos-inspección-laboratorio) no permite asegurar la inocuidad de los alimentos. En las últimas décadas el interés por entregar alimentos seguros ha aumentado. Existen en la actualidad dos sistemas orientados a la procuración de la inocuidad de los alimentos. El primero, APPCC orientado básicamente a las empresas de alimentos; el segundo y más reciente, el Análisis de Riesgos (AR), que compete más bien a las políticas de los gobiernos (Fernández Escartín, 2008).

2.2.7.1. Análisis de peligros y control de puntos críticos

La experiencia muestra que los sistemas tradicionales de inspección, adiestramiento y prácticas sanitarias de fabricación, análisis de productos terminados, así como de control y aseguramiento de la calidad, no conducen al aseguramiento de la inocuidad de los alimentos. A mediados de los años 70, se desarrolló el sistema APPCC. Constituye una herramienta dentro de un sistema integrado de aseguramiento de la inocuidad de los alimentos, específico para cada lugar de expendio, producción o consumo (Codex, 1997).

Las directrices de su aplicación emanan del Codex Alimentarius (FAO-OMS) a través de la Directiva CAC/RCP 1-1969, Rev. 3 (1997), enmendada 1999.

En este código internacional recomendado de prácticas – principios generales de higiene de los alimentos, se establece en el punto 3.2, referente a la higiene de productos alimenticios, que “se han de tener presentes en todo momento los posibles efectos de las actividades de producción primaria sobre la inocuidad y la aptitud de los alimentos”. En particular, hay que identificar todos los puntos específicos de tales actividades en los que pueda existir una probabilidad

significativa de contaminación y adoptar medidas específicas para reducir al mínimo dicho peligro (Codex, 1999).

El objetivo principal es eliminar los peligros significativos asociados al consumo de alimentos. Consiste en descubrir cualquier operación o condición desde la formulación hasta el consumo, que pueda afectar la inocuidad y al tiempo de detectarlas, introducir una acción correctiva. Actualmente muchas compañías han adoptado este sistema, por ser requisito obligatorio para la exportación.

De acuerdo a Bryan y Lyon (1984), este sistema tiene aplicación en la operación de servicios masivos y es una forma más efectiva para controlar peligros microbianos que la inspección y los procesos de control de calidad tradicionales.

2.2.7.2 Análisis de riesgos (AR)

El análisis de riesgos microbiológicos es un procedimiento que consta de tres componentes, siendo su objetivo global garantizar la protección de la salud pública. Sus componentes son:

1. Evaluación de riesgos: se puede definir como un proceso científico que consiste en determinar la probabilidad y gravedad de un efecto perjudicial para la salud en una población expuesta a una determinada concentración de patógenos en un alimento.
2. La gestión de riesgos: proceso de ponderación de las distintas opciones normativas con objeto de aceptar, minimizar o reducir los riesgos evaluados y de seleccionar y aplicar opciones apropiadas.
3. La comunicación en torno a los riesgos: proceso interactivo de intercambio de información y opiniones sobre los riesgos entre asesores en la materia, gestores de riesgos y otras partes interesadas (FAO-OMS, 1995).

2.2.7.3. Evaluación de riesgos (ER)

La recomendación del Codex Alimentarius se expresa en los Principios y Directrices para la Evaluación de los Riesgos Microbianos (ER) (CAC/GL 30-

1999). Este proceso de evaluación de riesgos, se propone asegurar la inocuidad de alimentos para la población (Codex 1999). La ER es aplicable a cualquier tipo de peligro que pueda afectar la integridad o salud humana; en el caso particular de los peligros microbianos lo referimos como evaluación de riesgos microbianos (ERM) (Fernández Escartín, 2008). Recientemente Miliotis *et al* (2008) apuntan que la evaluación de riesgos microbianos es un instrumento sistemático para evaluar la probabilidad de exposición a patógenos transmitidos por alimentos y su impacto en la salud del consumidor. Se aplica a la evaluación del impacto en la salud pública de las medidas de intervención y control que se hayan diseñado para prevenir o reducir los patógenos en algunas o todas las etapas del complejo sistema de producción de los alimentos.

Su estructura y concepción son tales, que permiten, por un lado, organizar de manera sistemática toda la información científica disponible para caracterizar la naturaleza y magnitud del riesgo, y por otra, conocer el nivel de certeza que puede asignarse a todos los datos, modelos y presunciones que para tal fin se utilicen (Lammerding *et al.*, 1997).

Resumido: el término se utiliza para responder al planteamiento: cuantos casos de enfermedad A (en exceso a la prevalencia) se presentarán en la población B, como consecuencia de una exposición al patógeno C (la ingestión con un alimento contaminado) ante niveles de dosis D (Malilay *et al.*, 1997).

En esencia, el proceso de evaluación de riesgos recopila y analiza información científica y otros datos de valor para identificar qué patógenos o sus toxinas, alimentos, o situaciones pueden llevar a una ETA. Se identifican factores que participan y se determinará finalmente, la magnitud del impacto que puedan tener en el riesgo a la salud humana (Jouve *et al.*, 2002).

Dentro de la ER se atienden de manera preponderante (Codex, 1999):

La identificación del peligro

La evaluación de la exposición

La caracterización del peligro, (incluida la relación dosis respuesta)

La caracterización del riesgo

2.2.7.3.1 Identificación del peligro

Se define como la identificación de agentes biológicos capaces de causar efectos adversos para la salud, y que pueden estar presentes en un alimento o grupo de alimentos en particular (FAO-OMS, 1999). Es la etapa inicial de la ER, con un carácter eminentemente cualitativo. La información acerca de los peligros potenciales que pueden estar presentes en los alimentos puede obtenerse de la literatura científica, de bases de datos de la industria alimentaria, de organismos gubernamentales, de organizaciones internacionales y de opiniones de expertos.

Es fundamental aquella generada por los estudios clínicos, de la vigilancia e investigación epidemiológicas, de estudios en animales de laboratorio, de investigaciones sobre las características de patogenicidad y virulencia de los microorganismos, y de la interacción entre los mismos y su medio ambiente a través de la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo mismo (Codex, 1999).

2.2.7.3.2. Evaluación de la exposición

Significa conocer la concentración de microorganismos de interés al tiempo de ser ingerido, y la cantidad de alimento consumido. Una estimación cabal exige conocer: a) la probabilidad de que el agente patógeno esté presente en el alimento, b) la influencia que tienen los tratamientos que reciba (incluido su procesamiento en la industria) previo al consumo sobre la presencia y concentración del patógeno, y c) la frecuencia de la exposición (es decir, con la que es consumido) (Fernández Escartín 2008). Para atender el inciso b) resulta fundamental la aplicación de la microbiología predictiva, asunto que forma parte de la presente investigación.

La evaluación de la exposición proporciona una estimación ya sea del número de bacterias patógenas o del nivel de toxinas bacterianas consumidas con el alimento. A diferencia de lo que ocurre con la concentración de productos químicos en los alimentos (que sólo varía ligeramente durante su elaboración y almacenamiento), las poblaciones de bacterias patógenas son dinámicas y

pueden aumentar o disminuir en las matrices del alimento. Los cambios varían en función de la compleja interacción de diversos factores tales como: a) los de naturaleza ecológica de la bacteria de interés; b) las condiciones de elaboración, envasado y almacenamiento del alimento; c) etapas críticas como la cocción, que pueden inactivar los agentes bacterianos; y d) factores culturales de las formas de consumo por la población (WHO-FAO, 1995).

Por tanto, conocer el número de microorganismos, o concentración de toxina al tiempo del consumo, es tan primordial como problemático. Implica disponer de restos de alimentos que fueron consumidos por las personas afectadas o no, o enfrentarnos a la realidad de no disponer de sobrantes de ellos.

Si tenemos suerte de disponer de estos, debe considerarse que las condiciones ambientales en las que se conserven no provoquen cambios significativos en las poblaciones microbianas que dar lugar a interpretaciones erróneas de los resultados.

Para evaluar la exposición, es necesario reproducir las condiciones de elaboración, realizando pruebas de laboratorio de reto (dinámicas) del patógeno en aquellos alimentos considerados más riesgosos o identificados como el vehículo de transmisión. Se requiere adicionalmente, otras herramientas entre las que destaca la microbiología predictiva.

La magnitud de la exposición guarda relación además, con la cantidad de alimento que ordinariamente se consume. En algunos casos se establece una porción típica de consumo (250 ml de leche fluida, 50-100 g de yogurt, 1 huevo); en otros, la cantidad suele ser pequeña (miel de abeja, salsa picante).

Para generar información verdaderamente útil en esta etapa del proceso de evaluación, es fundamental contar con una lista no discriminativa de todos los posibles patógenos, independientemente de que la probabilidad de su presencia sea remota (Brown *et al.*, 2002).

Para el modelaje de la evaluación de la exposición se requiere información acerca de la concentración inicial del microorganismo implicado, condiciones de almacenamiento y potencial de desarrollo (desde contaminación hasta consumo

del alimento), prevalencia del microorganismo (en el punto crítico del proceso del campo a la mesa), hábitos de consumo (cuánto y con qué frecuencia), y susceptibilidad general de los consumidores potenciales del alimento (Fernández Escartín, 2008). Estos señalamientos están considerados dentro de la metodología del trabajo que realizamos.

Desde otro ángulo, la probabilidad de que un individuo enferme por consumo de un alimento contaminado por microorganismos patógenos, es sólo un componente del riesgo cuando se contempla la población en su conjunto. Entonces, será importante considerar la posibilidad de que el alimento se encuentre contaminado por el fabricante, y el porcentaje de la población que se estima podrá estar expuesta a la severidad del padecimiento (Martin *et al.*, 1995).

2.2.7.3.3. Caracterización del peligro y relación dosis respuesta (D-R)

Los factores a considerar en la caracterización del peligro, se relacionan tanto con el microorganismo como con el huésped humano. En su relación revisten importancia aspectos como que los microorganismos son capaces de duplicarse; que la virulencia e infectividad de los organismos puede cambiar en función de su interacción con el huésped y el medio ambiente; que el material genético se puede transferir de un microorganismo a otro, lo que conlleva la transferencia de características como la resistencia a los antibióticos y factores de virulencia.; que los síntomas clínicos pueden presentarse bastante tiempo después de la exposición; que los microorganismos puede perdurar en determinados individuos, causando una excreción continua del microorganismo mismo y un constante riesgo de difusión de la infección. En algunos casos, dosis bajas de ciertos microorganismos pueden provocar un efecto grave; y que los atributos de un alimento pueden modificar la patogenicidad microbiana, por ejemplo en caso de alto contenido de grasa de un vehículo alimentario (FAO-OMS, 2004).

Por lo que la diversidad de las características individuales conduce a la obtención de variadas respuestas ante la ingesta de alimentos contaminados con

patógenos o sus toxinas. Mientras unos presentan náusea, vómito, diarrea simple, en otros el daño es agudo o disentérico que llega a hacer necesaria su hospitalización. Estos signos y síntomas pueden ser más graves dependiendo del consumidor; los más afectados suelen ser aquellos considerados como grupos vulnerables (niños, ancianos, embarazadas, hospitalizados e inmunodeprimidos).

Un aspecto importante de la identificación del peligro es llegar a establecer una D-R. La finalidad de la D-R es disponer de una estimación cuantitativa de la gravedad y duración de los efectos adversos asociados a diferentes niveles de exposición del agente patógeno en el alimento. Los datos sobre la dosis-respuesta pueden ser útiles también ante problemas causados por bacterias toxigénicas. Para muchas de las bacterias patógenas transmitidas por alimentos, los datos sobre la relación dosis respuesta son limitados o inexistentes. Es difícil obtener información adecuada para estimar respuesta a la dosis, y dicha información, además, adolece a veces de imprecisión por diversas razones, (WHO/FNU/FOS 1995):

- i. la susceptibilidad de las personas a las bacterias es muy variable;
- ii. la frecuencia de ataques por un agente patógeno específico varía considerablemente;
- iii. la virulencia entre las cepas de una especie patógena suele ser muy variable;
- iv. la patogenicidad es afectada por factores genéticos que pueden dar lugar a mutaciones;
- v. el antagonismo por microorganismos asociados a los alimentos o en el sistema digestivo, puede influir en el nivel de daño entre los consumidores;
- vi. algunos componentes de los alimentos pueden modular la capacidad de la bacteria para infectar o afectar de cualquier otra manera al huésped.

Una dificultad radica en la obtención de datos para caracterizar la infección o la traducción de la infección en enfermedad con diferentes resultados. En algunos casos el análisis puede sólo describir la relación entre una dosis y enfermedad clínica (FAO-OMS, 2004). Debe considerarse: tipo de organismo y cepa, vía de

exposición, nivel de exposición (dosis), efecto adverso considerado (respuesta), características de la población expuesta, y duración y multiplicidad de la exposición (ILSI, 2000).

Dos hipótesis pueden plantearse para describir la relación dosis-respuesta: mínima dosis infectante (modelo de umbral), y caso de célula única (modelos de no umbral) (Brown y Stringer, 2000).

Con el análisis descriptivo de la información (datos clínicos o epidemiológicos), se han creado modelos matemáticos para definir la relación dosis-respuesta (Cuadro 7). El modelo describe la probabilidad de una respuesta específica a partir de la exposición a un patógeno específico con una población determinada en función de la dosis. Al establecer un modelo se debe considerar cuidadosamente aspectos biológicos de interacción patógeno-huésped-matriz (Brown y Stringer, 2002).

El uso de modelo de D-R admisible, debe responder a la siguiente serie de acontecimientos condicionales: probabilidad de infección dada la exposición; probabilidad de enfermedad aguda dada la infección; y probabilidad de secuelas o mortalidad dada la enfermedad aguda (FAO-OMS, 2004). Al respecto, se han aplicado dos ecuaciones matemáticas que describen la relación exponencial (1) y Beta-Poisson (2) (Hass, 1983; Buchanan *et al.*, 2000).

Cuando los organismos se distribuyen de forma aleatoria (Poisson) y la probabilidad de infección para cualquier organismo es igual a r , entonces:

$$P[\text{inf}] = 1 - e^{-r\text{Dosis}} \quad (1)$$

donde:

e = factor exponencial

r = probabilidad de infección ya definida

Dosis = exposición al patógeno

Cuando la probabilidad r no es constante, pero tiene una probabilidad de distribución (β -distribución) debido a la naturaleza del organismo o a la población expuesta, dos parámetros, α y β , describen la relación como:

$$P[\text{inf}] \sim 1 - (1 + \text{Dosis}/\beta)^{-\alpha} \quad (2)$$

donde:

Dosis: exposición al patógeno

β = parámetros definidos

α = parámetros definidos

Cuadro 7. Ejemplo de modelos de dosis-respuesta y constantes utilizadas en los cálculos de riesgos.

Organismo	Modelo	Constantes	Referencia
<i>Salmonella</i> (variedades múltiples, no tifoidea)	Beta-Poisson	$\alpha = 0.3126$; $\beta = 2,884$	Haas <i>et al</i> (1999)
<i>Campylobacter</i>	Beta-Poisson	$\alpha = 0.145$; $\beta = 7.589$	Teunis <i>et al</i> (1996)
<i>Rotavirus</i>	Beta-Poisson	$\alpha = 0.253$; $\beta = 0.422$	Teunis <i>et al</i> (1996)
<i>Giardia intestinalis</i>	Exponencial	$r = 0.0199$.	Teunis <i>et al</i> (1996)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Exponencial	$r = 0.00405$	Teunis <i>et al</i> (1996)
<i>Legionella</i> spp.	Exponencial	$r = 1$	Teunis y Havelaar, 2000.

Un valor esencial es la información respecto a la dosis ingerida por porción de consumo. Para tal efecto nos apoyaremos en una herramienta moderna, la microbiología predictiva, que permitirá predecir o modelar el crecimiento bacteriano y obtener la probable dosis para cada tiempo requerido.

2.2.7.3.4. Microbiología predictiva como herramienta de la ER

El punto de partida para evaluar la probabilidad de exposición a un patógeno en la población, es el conocimiento de la presencia de tales agentes patógenos en los alimentos. Sin embargo, para conocer el riesgo de enfermedad es necesario saber además la cantidad actual de patógeno en el alimento al tiempo de ser consumido (Fernández Escartín, 2008). Esta premisa que puede ser un tanto obvia, se dificulta en la medida de la escasez de información para evaluar el nivel de exposición y más aún la cantidad de patógeno necesaria para desarrollar la enfermedad.

El problema se atiende con el concurso de la microbiología predictiva, rama de la microbiología de alimentos que permite estimar la tasa de crecimiento, supervivencia y/o muerte de los microorganismos en relación a factores críticos que los afectan, como son temperatura, actividad de agua, pH y otros. (McMeekin, *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1997). Se describe matemáticamente la dinámica de los microorganismos patógenos en alimentos bajo condiciones ambientales específicas. El crecimiento o disminución de un microorganismo específico está gobernado por el efecto de los factores ecológicos prevalentes en su entorno. Pueden ser intrínsecos del alimento (pH, actividad de agua, nutrientes disponibles), del microorganismo (estado fisiológico, número y tipo, adaptación al sustrato), y extrínsecos (temperatura, humedad relativa, composición de la atmósfera), así como sus interrelaciones (Fernández Escartín, 2008).

Diversos modelos matemáticos, han sido desarrollados con el objeto de predecir el comportamiento de las poblaciones bacterianas cuando crecen en condiciones controladas de laboratorio. Muchos de ellos validados en condiciones de producción, transporte y almacenamiento de alimentos (Demarigny *et al.*, 1994; Wijtzes *et al.*, 1995; Zwietering *et al.*, 1990).

Aunque el modelaje usualmente no pone de manifiesto un comportamiento microbiano inesperado, permite cuantificar efectos de interacciones entre dos o más factores y la interpolación de factores no probados explícitamente. La literatura acerca de los microorganismos de los alimentos, antes del advenimiento

de la microbiología predictiva, definió las condiciones limitantes para su crecimiento cuando todos los demás factores se encontrasen próximos a su condición óptima. Sin embargo, muchas prácticas de control de los patógenos dependen de una combinación de factores de preservación, ninguno de los cuales por sí mismos pueden no ser capaces de inhibir a los microorganismos. Los modelos matemáticos constituyen un medio confiable para hacer predicciones en estas circunstancias (Whiting *et al.*, 1995).

El modelado matemático se realiza, generalmente, asumiendo condiciones constantes para determinar los valores de parámetros cinéticos de crecimiento. Sin embargo, en la práctica condiciones tales como temperatura, pH o composición de la atmósfera gaseosa no suelen mantenerse constantes durante el almacenamiento refrigerado (Labuza y Taoukis, 1992). Por tal razón, en la actualidad el modelado matemático está orientado a la obtención de modelos dinámicos, es decir, modelos que permitan predecir la seguridad o vida útil de los alimentos bajo condiciones cambiantes. Uno de los factores que más fluctúa es la temperatura de almacenamiento, y también el más investigado (Roos y McMeekin, 1994). Los modelos propuestos pueden ser primarios, secundarios y terciarios.

La propiedad más importante de un modelo primario describirá el crecimiento microbiano y permitirá obtener estimaciones precisas de los parámetros que lo caracterizan. La variabilidad en las estimaciones dependerá de la técnica de monitoreo seguida del modelo usado (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Baty *et al.*, 2002). Un ejemplo de modelo primario es la ecuación de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1991).

Los modelos secundarios describen respuestas de parámetros de modelos primarios con base en cambios en las condiciones ambientales tales como temperatura, pH, o actividad del agua. Los modelos terciarios son rutinas de software computacional que convierten los modelos primarios y secundarios en programas de fácil empleo por el usuario. Estos programas pueden calcular respuestas microbianas para condiciones cambiantes, comparar efectos de

diferentes condiciones, o contrastar el comportamiento de varios microorganismos (Whiting et al, 1995).

En nuestro trabajo se construirán cinéticas de desarrollo y se modelarán empleando el programa Dmfit de Combase que se sustenta en el Combase Consortium (Baranyi y Tamplin, 2004). Este programa modela en forma independiente cada cinética y calcula duración de la fase Lag, máxima velocidad de desarrollo (V_{max}) y máxima población alcanzada, de acuerdo con los factores ecológicos utilizados. Estos factores son importantes cuando se desea estimar niveles de exposición de patógenos. Se accede libremente desde www.combase.cc

2.2.7.3.5. Caracterización del riesgo

Se refiere al proceso de integración de los tres componentes anteriores. Es la estimación cualitativa y/o cuantitativa (incluidas las incertidumbres que conlleva), de la probabilidad de aparición y gravedad de efectos adversos conocidos o potenciales para la salud de una población dada, sobre la base de la identificación del peligro, su caracterización y la evaluación de la exposición (FAO-OMS, 1999).

Para la evaluación cualitativa se desarrollan modelos que perfilan situaciones en las que un individuo puede exponerse al peligro. Sin embargo, los modelos cuantitativos son de mayor complejidad, por lo que hay que recurrir a los modelos predictivos, expresiones matemáticas que describen los cambios del contenido del patógeno en el alimento a través del tiempo y en qué términos resulta afectado por las condiciones ambientales en las que se le maneja (Fernández Escartín, 2008).

El análisis cuantitativo de los riesgos genera un enunciado matemático que asocia la probabilidad exponerse a un agente patógeno contenido en un alimento con la probabilidad de enfermar entre aquellos que lo consumen (ICMSF, 1998).

En nuestro caso para expresar en forma cuantitativa la evaluación de riesgo, utilizaremos el modelo descrito por Paoli y Harnett (2006), para *Cronobacter sakazakii*.

Consideraremos 3 variables: a) la concentración inicial en la leche en polvo, b) el volumen consumido y c) la temperatura del agua empleada para rehidratar la leche en polvo.

$$N_{Es} = \Theta \cdot C_m \cdot P_{ill}$$

donde:

N_{Es} = es el número de casos por millón de niños que consumen LP

Θ = es la concentración de *C. sakazakii* en la LP en la preparación

C_m = a tasa de consumo de leche en polvo diario por millón de niños

P_{ill} = probabilidad de enfermar resultante de consumir LP con una contaminación inicial de 1 UFC al tiempo de preparar.

La evaluación de riesgos de este modelo se traduce en la interacción de 3 componentes:

- El componente A se ocupa del nivel de *C. sakazakii* en la LP al momento de la preparación (nivel inicial de contaminación).
- El componente B se refiere al consumo de LP, que corresponde a la estimación de la cantidad de polvo consumida por cada millón de niños por día.
- El componente C se basa en la magnitud del cambio en la población de *C. sakazakii* durante la preparación, almacenamiento y prácticas de alimentación.

Estos componentes se combinan para dar un número de casos por millón de niños por día, que a su vez es una estimación del riesgo relativo (Figura 3).

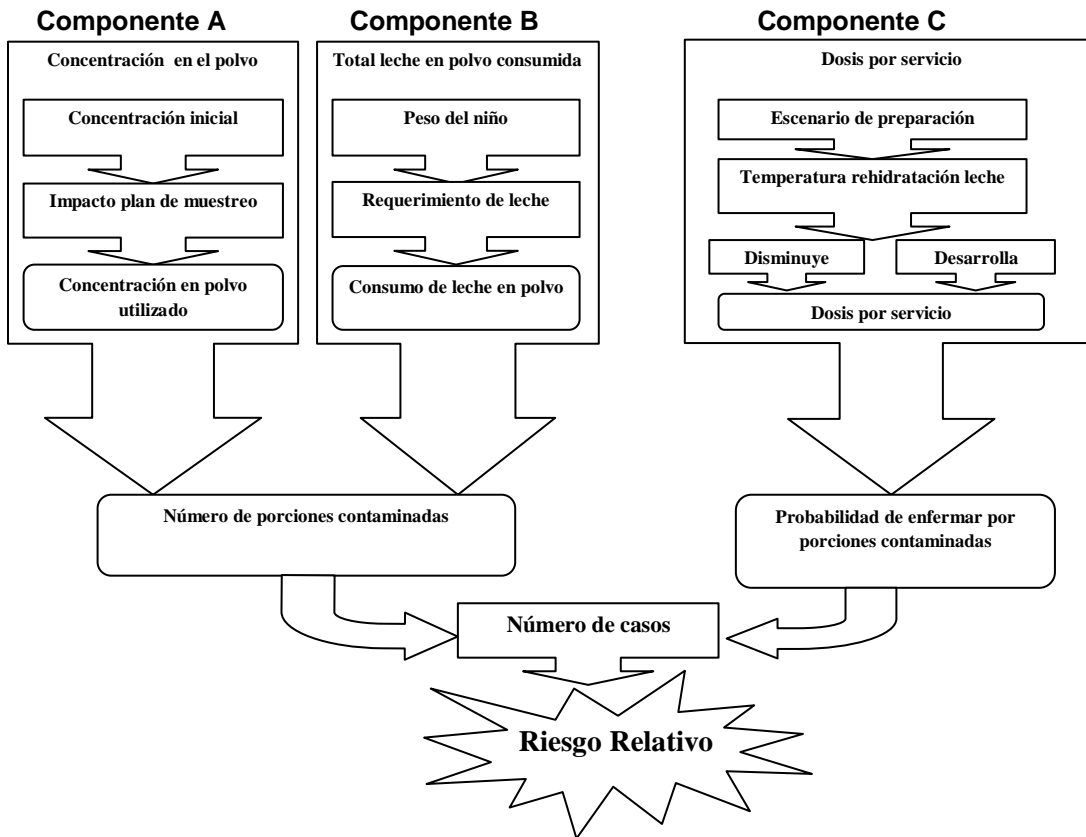


Figura 3. Modelo de Evaluación de Riesgos de *C. sakazakii* (Paoli y Harnett, 2006).

El modelo está disponible en la página: <http://www.mramodels.org/esakmodel/ESAKRAModelWizard.aspx>

2.3. La evaluación de riesgos aplicada a los alimentos

El reciente incremento en la incidencia de brotes de ETAs en muchos países y la participación de ciertos microorganismos, ha llevado a las autoridades de salud a nivel mundial, a elaborar medidas preventivas que garanticen un adecuado comercio internacional y la protección de la salud de los consumidores.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), conscientes de los inadecuados niveles de seguridad de los alimentos, han implementado nuevos instrumentos en tal sentido. Uno de ellos, es la Evaluación de Riesgos Microbianos antes descrito.

La División de Nutrición y Protección del Consumidor (FAO) y el Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades Transmitidas por Alimentos de la OMS, han liderado este enfoque mediante una serie de documentos técnicos que sirvan de referencia a escala internacional. Estos documentos, denominados series de Evaluación de Riesgos Microbiológicos, proveen un rango de datos e información que facilitan una comprensión cabal de la ER. A la fecha se han elaborado 19 documentos (Figura 4). En el caso de los patógenos se ha considerado: *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae* O1 y O139, *Cronobacter* spp, *Campylobacter* spp, *Vibrio parahaemolyticus* y *Escherichia coli* enterohemorrágica.

FAO/WHO MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT SERIES

- 1 Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens: Interpretative Summary, 2002
- 2 Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens, 2002
- 3 Hazard characterization for pathogens in food and water: Guidelines, 2003
- 4 Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Interpretative Summary, 2004
- 5 Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical Report, 2004
- 6 *Enterobacter sakazakii* and microorganisms in powdered infant formula: Meeting Report, 2004
- 7 Exposure assessment of microbiological hazards in food: Guidelines, 2008
- 8 Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters: Interpretative Summary and Technical Report, 2005
- 9 Risk assessment of choleraogenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 in warm-water shrimp in international trade: Interpretative Summary and Technical Report, 2005
- 10 *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting Report, 2006
- 11 Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Interpretative Summary, 2009
- 12 Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Technical Report, 2009
- 13 Viruses in food: Scientific Advice to Support Risk Management Activities: Meeting Report, 2008
- 14 Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report, 2008
- 15 *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula: Meeting Report, 2008
- 16 Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative Summary and Technical Report, 2009
- 17 Risk characterization of microbiological hazards in food: Guidelines, 2009.
- 18 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in meat and meat products: Meeting report. 2009
- 19 *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: Meeting Report. 2009

Figura 4. Serie de MRA publicadas por la OMS y FAO.

2.3.1. Microorganismos patógenos asociados a alimentos preparados en hospitales.

Bryan y Lyon (1984), plantean que los servicios de alimentación de los hospitales emplean métodos de preparación y conservación de alimentos altamente especializados, donde sin embargo, es posible que existan fuentes y mecanismos de contaminación, y oportunidades de sobrevivencia y desarrollo de bacterias patógenas.

Los principales agentes etiológicos asociados a brotes en hospitales son de origen viral (norovirus), aunque los agentes bacterianos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* tienen un papel importante (Youssef *et al.*, 2000). Réglie–Poupet *et al* (2005), esboza que en un brote intrahospitalario puede no ser fácil distinguir los síntomas productos del brote, de los que son comunes a la condición de hospitalización.

Existen reportes de brotes en hospitales donde se evidencian las diversas vías y mecanismos de contaminación. He aquí algunos ejemplos, O’Brien *et al* (2001), reportan un brote que afectó a 37 personas, producido por *E. coli* O157:H8 verotoxigénica asociado a pasteles con crema. Gianella y Brasile (1979), describen un brote de diarrea por *Bacillus cereus* en 28 pacientes asociado al consumo de pan con pavo. Stevenson *et al* (1994), informa de un brote por virus *Norwalk* que afectó a 65 personas entre pacientes y trabajadores, por consumir sándwiches contaminados probablemente por el cocinero que los preparó.

Palmer y Rowe (1983), en un estudio prospectivo de 2 años, detectaron *Salmonella* en 55 brotes en hospitales de Inglaterra y Gales, cuyo medio de transmisión estaba asociado a una relación persona a persona. En los mismos países entre 1992-1994, el 15% de los brotes (189) estaban relacionadas con enfermedades intestinales y *Salmonella* fue el patógeno más importante en 22/189 brotes (12%). El mecanismo de transmisión mas frecuente fue de persona a persona (Wall *et al.*, 1996).

En hospitales infantiles, los brotes de ETAs también son frecuentes. Un brote por *Salmonella* Muenchen afectó a 28 niños en un hospital en Londres, dos de ellos con inmunodeficiencia desarrollaron septicemia y 3 murieron. No se pudo

establecer el vehículo de la contaminación y se controló el brote clausurando el ingreso de pacientes por 5 días (Kumarasinghe *et al.*, 1982).

Umasankar *et al* (1996), reportan un brote por *Salmonella* Enteritidis en una maternidad y unidad de cuidados intensivos neonatal, que afectó a 6 niños y 3 madres; se estableció que el resucitador de la sala de partos era el reservorio del patógeno.

En un brote ocurrido en St. Louis, Estados Unidos, 101 niños fueron afectados por *Salmonella* Javiana, asociado con cocineros infectados asintomáticos (Elward *et al.*, 2006). En Australia en el 2005, 12 niños adquirieron *Salmonella* Typhimurium en un hospital de alta especialidad, también asociado con una transmisión persona a persona (Alam *et al.*, 2005).

2.3.1.1 *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*

Salmonella es el microorganismo más ampliamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Su hábitat natural es el contenido intestinal de los animales, incluido el hombre. Se libera al medio ambiente expulsada por las heces. Muestra capacidad para sobrevivir a diversas condiciones ambientales, cualidad que favorece su aislamiento de diversos materiales. Se le ha aislado del medio ambiente, hortalizas, animales silvestres, domésticos, de explotación, humanos enfermos, asintomáticos o convalecientes, de equipo y utensilios, y de fomites (Fernández Escartín, 2008).

Existen numerosos reportes de infección por este patógeno en hospitales. En Inglaterra y Gales entre 1992 y 2000, el 3.7% de los brotes ocurridos en hospitales fue causado por *Salmonella* (51/1,396). Los factores asociados más relevantes fueron la contaminación cruzada y trabajadores infectados asintomáticos (Meakins *et al.*, 2003).

Son vía y factores en brotes, la contaminación persona a persona en un hospital psiquiátrico (Galloway *et al.*, 1987), por alimentos (Heissenhuber *et al.*, 2005, Chávez de la Peña *et al.*, 2001, Mason *et al.*, 2001), manejo inadecuado de los alimentos (Maguire *et al.*, 2000), y cocineros infectados y asintomáticos

(Dryden *et al.*, 1994 y Khuri-Bulos *et al.*, 1994). La enfermedad no sólo afecta a pacientes hospitalizados, sino a los trabajadores, tal como lo describen Opal *et al* (1989) y Molina Gamboa *et al* (1997).

L. monocytogenes es un patógeno ambiental, con baja mortalidad y alta letalidad en pacientes inmunodeficientes tales como niños, embarazadas y adultos mayores. Por su carácter psicrótrofo se le considera un problema de primer orden en la industria de alimentos. Muestra una elevada capacidad para formar biopelículas en cualquier superficie y mayor resistencia a los procesos de desinfección comúnmente aplicados en la industria.

En una revisión del control de *L. monocytogenes* en plantas productoras de alimentos Tompkin (2005), refiere que este patógeno puede albergarse en el equipo, a manera de reservorio, en donde se mantiene hasta por 12 años.

2.3.1.2. Cronobacter spp

Enterobacter sakazakii fue originalmente definido como una nueva especie bacteriana por Farmer *et al* (1980). Es una bacteria gram negativa, productora de un pigmento amarillo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. En un principio se le conoció como *Enterobacter cloacae*. Se le asignaron 15 biogrupos mediante pruebas bioquímicas y de hibridación DNA:DNA. Sin embargo, Iversen *et al* (2007), tras analizar una extensa colección de cepas de *E. sakazakii* mediante f-AFPL, ribotipificación, hibridación ADN:ADN y secuenciación de 16S rRNA, propusieron un nuevo género, *Cronobacter* spp. El mismo grupo (Iversen *et al.*, 2008), lo reclasificó, proponiendo seis especies: *C. sakazakii*; *C. turicensis*; *C. malonaticus*; *C. muytjensii*; y *C. dublinensis*. La sexta fue denominada genomoespecie. En este contexto *Cronobacter* spp resulta sinónimo de *Enterobacter sakazakii* (WHO-FAO, 2008).

2.3.1.3 Cronobacter sakazakii

C. sakazakii es considerado un patógeno emergente, psicrótrofo, especialmente agresivo en individuos lactantes. Los grupos de población más

afectados presentan algún grado de inmunodeficiencia, entre ellos, niños prematuros, recién nacidos y adultos mayores. Dado su carácter ubicuo puede ser aislado de diversas fuentes; alimentos (leche en polvo y rehidratada), agua, superficies, hogares y hospitales (Fiore *et al.*, 2008).

Gran número de los incidentes de infección se han registrado en el ambiente hospitalario, frecuentemente en forma de brotes. El cuadro clínico consiste principalmente en meningitis, septicemia o enteritis necrozante en lactantes (Nazarowec-White y Farber, 1997; Van Acker *et al.*, 2001), aunque también se han observado cuadros diarreicos, infecciones urinarias y septicemia (Friedemann, 2009). Se le considera un patógeno del grupo A (OMS -FAO, 2004), por su elevada letalidad que ha alcanzado niveles de 40 a 80%. La enfermedad se ha asociado al consumo de leches rehidratadas como vehículo del patógeno, con eventual participación de los utensilios y equipo como reservorios (Friedemann, 2008).

La metodología para la identificación de las cepas recuperadas de casos clínicos y del ambiente ha evolucionado desde exámenes microscópicos, producción de pigmento y pruebas bioquímicas cuando la bacteria originalmente se reconocía como un coliforme de la especie *E. cloacae* en 1958, hasta el empleo de nuevas técnicas de cultivo y moleculares que han conducido a la creación de la especie *C. sakazakii* (Iversen *et al.*, 2008). La dosis mínima infectante es desconocida aunque se han detectado niveles de 0.002 y 0.92 NMP/gr (Fanning *et al.*, 2008) en la fórmula láctea en polvo usada en la preparación del producto suministrado a lactantes. Aún cuando existen métodos bioquímicos recomendados para su identificación (API 20E, RAPID, BIOLOG microarray), la certeza de su identificación por estos métodos no se ha resuelto plenamente (Giannmanco *et al.*, 2011).

2.3.2 Detección, identificación, caracterización y rastreo molecular de bacterias patógenas

2.3.2.1 Detección mediante cultivos:

El monitoreo directo de microorganismos patógenos, provee evidencia directa del peligro microbiano aunque en algunos casos estos patógenos no son fácilmente detectables, entre otras razones porque suelen encontrarse en bajos números en los alimentos. *Salmonella* es una de las especies bacterianas más estudiadas en términos de fisiología, genética, estructura y desarrollo. La identificación de *Salmonella*, según el manual Bergey (Holt *et al.*, 1994) sigue criterios fenotípicos y genotípicos en el cultivo puro aislado de diferentes materiales.

En los alimentos los medios de cultivo para la detección de bacterias patógenas e indicatoras suelen recurrir a los descritos por la AOAC y la FDA en el Bacteriological Analytical Manual (Andrews y Hammack, 1998; AOAC, 1984). Debido a su baja concentración, heterogénea distribución, y condición de estrés fisiológico que caracteriza su presencia en los alimentos, las técnicas para su detección mediante cultivo, se extienden hasta por 7 días.

2.3.2.2 Detección de patógenos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Ante los prolongados periodos requeridos por las técnicas de cultivo para la identificación de los microorganismos a partir de gran diversidad de materiales (clínicos, alimentos, ambiente), han surgido y se mantiene el interés por disponer de procedimientos que proporcionen resultados en el menor tiempo posible. Evidentemente, el factor tiempo no es el único motivo de atención. Otras cualidades, tales como la especificidad y sensibilidad no pueden ser pasadas por alto. Entre las técnicas que han encontrado amplia aceptación se encuentra la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Específicamente, la técnica para *Salmonella* en los alimentos puede completarse dentro de 24 h (notable contraste con el cultivo tradicional) (Hoorfar *et al.*, 2000).

El PCR es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN usando un par de oligonucleótidos como inicio de la

replicación que hibridiza los extremos opuestos de ambas cadenas del ADN blanco y delimita la sección del ADN que será repetidamente copiada con la participación de enzimas que se incorporan al sistema. Se selecciona como blanco un gen de secuencia exclusiva de la especie microbiana de interés, con frecuencia un gen de virulencia (Orozco, 2008). El producto de la amplificación, (de tamaño definido y que contiene la secuencia de iniciadores en sus extremos), puede ser detectado en varias formas. La más común es la electroforesis en gel. El PCR amplifica específicamente la secuencia del ADN blanco en una mezcla de ADN de células asociadas al material analizado (Fratamico *et al.*, 2001).

La sensibilidad en la detección de una especie biológica mediante PCR se reconoce como mayor que la técnica tradicional de cultivo (Orozco, 2008). Las diferencias entre ambas podría deberse a la incapacidad de PCR de diferenciar entre células vivas o muertas, así como diferentes condiciones de cultivo y morfologías coloniales atípicas en medios diferenciales/selectivos (Feder *et al.*, 2001). Higuchi *et al* (1988), evidenciaron la amplificación de una sola molécula de ADN de una hebra de cabello de mamífero. Así, el límite de detección teórico de PCR puede ser una célula, o una copia de ADN en 1 µl de la muestra.

Los alimentos, especímenes clínicos y muestras ambientales generalmente contienen sustancias que inhiben de manera parcial o total la reacción. Los inhibidores actúan en una de tres posibles formas: interfieren en la lisis celular, degradan o capturan ADN blanco e inhiben la actividad de la polimerasa (Wilson *et al.*, 1997). Algunos compuestos identificados como inhibidores incluyen polvo, polisacáridos, ácidos, glucógeno, proteasas, y la propia microflora (Atmar *et al.*, 1993).

El uso de caldos de pre o enriquecimiento previo a la prueba de PCR permite no solamente diluir sustancias inhibitorias sino favorecer la multiplicación del organismo blanco hasta niveles que facilitan la detección, diluir células muertas y aislar entonces el microorganismo para realizar pruebas complementarias (Sharma y Carlson, 2000). En el trabajo de rutina la inhibición de la reacción

puede ser monitoreada por adición de ADN blanco como control interno en cada reacción (Malorny *et al.*, 2003; 2007).

Una aplicación de gran interés de PCR, se encuentra en el recuento del patógeno en un alimento: una vez obtenido un resultado positivo, en la muestra (que ha sido refrigerada durante 24 h) se puede efectuar la técnica de NMP para estimar la concentración de la *Salmonella*.

2.3.2.3 Identificación bioquímica

Desde el siglo pasado, se comercializan dispositivos miniaturizados para la identificación de microorganismos con resultados que tienden a reproducir los obtenidos por las técnicas tradicionales de cultivo. Dentro de los más usados para la identificación de géneros y especies de *Enterobacteriaceae* están el API 20E, RAPID ID, Biotype 100 y BIOLOG. Para la identificación fenotípica de *Cronobacter* spp, Iversen *et al* (2008), recurrieron al sistema Biotype 100 (BioMérieux), y para diferenciar entre las distintas especies, al sistema Biolog Phenotype MicroArray.

Algunas respuestas a las pruebas bioquímicas, (producción de indol, utilización de lactulosa, maltitol, putrescine, 1-0 Methyl D α glucopiranosido, 4 aminobutirato y no utilización de sorbitol), han sido consideradas básicas para la identificación de *C. sakazakii* (Iversen *et al.*, 2008). Con los cambios asociados a la nueva clasificación del patógeno la validez de algunas pruebas muestran ciertas inconsistencias. Este trabajo es una contribución para una identificación más completa del patógeno mediante la inclusión de una diversidad de cepas (clínicas, de alimentos y ambientales), haciendo uso del sistema BIOLOG, que cuenta con amplia cobertura de pruebas de metabolismo y otros estudios que se mencionan a continuación.

2.3.2.4 Perfil de resistencia a antibióticos

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos están indicadas cuando se sospecha que un cierto microorganismo causante de un proceso infeccioso es susceptible de presentar resistencia a los agentes antimicrobianos de uso común

(CLSI, 2006). Desde otro ángulo, resulta de interés reconocer cualquier grado de asociación en los perfiles de resistencia entre cepas provenientes de alimentos, ambiente y materia fecal de individuos infectados asintomáticos o no, durante el estudio de un brote de ETA. Adicionalmente, el perfil de resistencia a los antibióticos es fundamental en la definición de estrategias de tratamiento y prevención de los individuos expuestos. La determinación de este perfil y su interpretación ha sido objeto de estandarización por organismos internacionales de reconocida seriedad (CLSI, 2006).

2.3.2.5 Electroforesis en gel por campos pulsados (EGCP)

En los estudios epidemiológicos de las ETAs o de infecciones nosocomiales, la EGCP permite identificar la fuente de infección o de contaminación del microorganismo causante del incidente (CDC, 2007). Ha encontrado un valor de gran significado en los sistemas activos de vigilancia epidemiológica. Es el caso del PulseNet (CDC, 2004), que identifica la huella genética de las cepas del patógeno recuperadas en diferentes brotes de ETAs, su identidad permite establecer un agente etiológico común entre los brotes, aún cuando aparentemente no parezcan estar relacionados en el tiempo y en el espacio (Barret *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2005).

La técnica se basa en la incisión del ADN mediante endonucleasas de restricción. La digestión del genoma resulta en largos oligonucleótidos que usualmente miden entre 10 y 800 kb, y que se conocen como fragmentos de restricción (Tenover *et al.*, 1995). La electroforesis de los fragmentos permite la visualización de un perfil genético. Este patrón de fragmentos es un conjunto de bandas, cada una del tamaño de la porción de ADN cortada. El perfil de EGCP de cada cepa es comparada con otras cepas en parejas para calcular el número de bandas compartidas. El número de bandas de cada cepa y de bandas compartidas se usa para calcular el coeficiente de similitud. Finalmente, se genera una agrupación de cepas en función de su similaridad genética y se expresa

gráficamente mediante un dendrograma. La relación entre las cepas bacterianas se infiere a partir de la similaridad.

3. JUSTIFICACIÓN

- * Entre la diversidad de sitios en donde se gestan y ocurren los brotes de enfermedades transmisibles por los alimentos, destacan las cocinas y lactarios de hospitales.
- * La revisión bibliográfica, no parece contar con registros de estudios epidemiológicos de enfermedades por alimentos con carácter prospectivo, en tales sitios y grupos de población.
- * Existe escasa información respecto de la exposición a *C. sakazakii* entre lactantes prematuros y menores de 6 meses por consumo de leches rehidratadas.
- * Las medidas de control que se ponen en operación regularmente hacen énfasis en el muestreo de los alimentos con el propósito de detectar agentes patógenos y en función de los resultados decidir acerca de su inocuidad. Este enfoque es de valor muy cuestionable ante la eventualidad de resultados negativos en muestras provenientes de lotes de alimentos contaminados.
- * A escala mundial, aunque se aplican programas de prevención y control de las ETAs, su incidencia no muestra una sostenida tendencia descendente. Con frecuencia dichas acciones no inciden sobre las causas y factores que verdaderamente conducen a la pérdida de la inocuidad de los alimentos.
- * Está ampliamente reconocido que el problema de las ETAs puede ser significativamente abatido en un país cuando se aplican los conocimientos científicos sobre la ecología de los microorganismos implicados y la información de los estudios epidemiológicos de los incidentes y brotes de tales enfermedades.
- * En consecuencia, resulta de interés llevar a cabo un estudio de los factores de riesgo que con mayor impacto son determinantes en la preparación y servicio de alimentos en la cocina de hospitales.
- * El aprendizaje que se generará para el estudiante, al realizar un estudio aunque limitado de evaluación de riesgos microbiológicos, es una oportunidad para

adquirir una visión más objetiva del problema de las ETAs y de la configuración de los riesgos microbianos.

* Un hospital de la ciudad de Querétaro ha manifestado su interés por el presente proyecto de investigación. Por otra parte, el Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro cuenta con la infraestructura humana, instalaciones y equipo necesarios para desarrollar dicho proyecto.

* La información generada en este trabajo puede ser aprovechada ventajosamente por los responsables de la atención a la salud de las poblaciones involucradas, y de manera general como base de datos que permitan diseñar programas de vigilancia y control sanitario de los alimentos en los hospitales del país, sustentados en el conocimiento científico.

* La formación de recursos humanos especializados en el área de la inocuidad microbiana de los alimentos es una necesidad sentida dentro de las políticas de salud en todos los países.

* En el transcurso de la ejecución de este trabajo, se presentó un episodio de gastroenteritis hemorrágica entre lactantes hospitalizados. Este evento motivó que el estudio se enfocara prioritariamente hacia la evaluación del riesgo en el lactario y los recién nacidos expuestos.

IV. OBJETIVOS

General:

4.1. Aplicar los principios de la evaluación de riesgos microbianos en los alimentos preparados en un hospital materno infantil

Específicos:

4.1.1. Obtener un perfil microbiológico de los alimentos y la cocina del hospital donde son preparados.

4.1.2. Identificar *C. sakazakii* dentro de un lactario en términos de su incidencia, fuentes de contaminación y prácticas de trabajo que propician su actividad o sobrevivencia en la leche rehidratada.

4.1.3. Efectuar un estudio epidemiológico prospectivo ante un brote de infección bacteriana que se presentó entre los lactantes del hospital.

4.1.4 Caracterizar las cepas de *C. sakazakii* implicadas en el brote, mediante cultivo, pruebas de metabolismo, factores de virulencia, pulsotipos, y perfil de resistencia a antibióticos.

4.1.5 Evaluar la exposición a *C. sakazakii* entre los lactantes afectados mediante pruebas de reto en las fórmulas lácteas aplicando un modelo predictivo, como recurso para caracterizar al riesgo.

5. METODOLOGÍA

5.1 Equipos y materiales

5.1.1. Equipos

Agitador mecánico Vortex, velp scientifica, ns/113123

Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C (Market-Forge, Sterilimatic)

Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)

Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g, Modelo No. CT200-S (OHAUS)

Baño María de precisión de 43 ± 0.2 °C, Modelo 251 (Precisión Scientific)

Baño María de precisión de 44.5 ± 0.2 °C Modelo 251 (Precisión Scientific)

Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial diferentes tamaños

Cámar Kodak, Edas 290

Campana de flujo laminar (Alder y Veco)

Centrifuga de mesa (HermLe)

Cuenta colonias (Québec Reichert-Jung)

Equipo de electroforesis, BioRad, CHEF-DR-II

Espectrofotómetro de luz ultravioleta, ConRaled, Mod. 1252-B

Fuente de poder para electroforesis Amercham Pharmacia Biotech, EPS 301

Homogenizador (Stomacher, Seward 400)

Horno para esterilización (Shel-lab)

Incubadora de 35° (Pecision Scientific, Seward 400)

Incubadora de 22° (Pecision Scientific, Seward 400)

Lámpara de luz U.V. Modelo 56 (Blas-Ray)

Microscopio luminoso (Leica) Micropipetas 5-1000 µl (Labsystems)

Micropipetas 5-1000 µl (Labsystems)

Potenciómetro óptico (Jenway), modelo 3510

Refrigerador OSEDA

Refrigerador REVCO, Thermo Scientific

Termociclador Tech-gene, Mod. 512

Transiluminador Hoefffer, Mod. 115VAC

Vortex, modelo G650 Scientific Industries Inc (Daiger Vortex Genie 2)

Ultracentrifuga Haraeus, Biofugue pico, Kendro

Unidades de filtración (Millipore)

5.1.2 Medios de cultivo

Agar base sangre (ABS), (BD Bioxon)

Agar cuenta estándar (ACE), (BD Bioxon)

Agar rojo violeta bilis con 1% glucosa (ARVBG), (BD Bioxon)

Agar sulfito bismuto (ASB), (BD Bioxon)

Agar xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD), (BD Bioxon)

Agar soya tripticasa (AST), (BD Bioxon)

Agar eosina azul de metileno (EMB), (Becton Dickinson)

Agar hierro y triple azúcar (TSI), (BD Bioxon)

Agar hierro lisina (LIA), (BD Bioxon)

Agar movilidad indol ornitina (MIO), (BD Bioxon)

Agar cromogénico Drugan-Forsythe-Iversen (DFI), Oxoid

Agar oxford modificado (MOX), Acumedia

Agar Mc Conkey, Merck

Caldo lactosado (CL), (BD Bioxon)

Caldo lauril sulfato mas MUG (CLF), (BD Bioxon)

Caldo tetrionato (CTT), (BD Bioxon)

Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV), (BD Bioxon)

Caldo soya tripticasa (CST), (BD Bioxon)

Caldo urea, (BD Bioxon)

Caldo gram negativos (GN) (Bioxon)

Caldo Fraser, Acumedia

Caldo University Vermont médium (UVM) (Difco)

Caldo enriquecimiento enterobacterias (EE Mossel)

5.1.3 Soluciones

Diluyente de peptona 0.1% (Peptona de caseína, BD Bioxon) (DP)

Agua peptonada 1% (Peptona de caseína, BD Bioxon) (AP)

Solución salina isotónica (SSI) 0.85% (cloruro de sodio, Prod. Químicos Monterrey)

5.1.4 Reactivos y colorantes

Ácido clorhídrico 5 y 20%

Agarosa bajo punto de fusión, BioRad

Agarosa Ultrapura, Invitrogen

Bromuro de etidio a 1 ppm

Buffer 10x Bluejuice, Invitrogen

Coloración de Gram (cristal violeta, safranina, lugol, alcohol etílico 95%), (Sigma Chemical Co.)

Duodecil Sulfato de Sodio (SDS), BioRad

EDTA- $\text{Na}_2\text{2H}_2\text{O}$, USB

Glicerol, Drogas la paz

Marcador de peso molecular, DNA ladder 50, 100 pb, Invitrogen

Platinum PCR Supermix, Invitrogen

Proteinasa K, Invitrogen

Sarcosyl, BioRad

TBE 10x Buffer, Invitrogen

TAE 50x

Tris, Sigma

Tris-HCl, Sigma

Rojo de metilo, (Sigma Chemical Co.)

2,3,4 trifenil tetrazolium (Sigma Chemical Co.)

D-sorbitol (Sigma Chemical Co.)

Antisuero polivalente A-I & Vi para *Salmonella* (DIFCO)

Antisuero Poly 0 1-4 *Listeria monocytogenes*

Endonucleasa XbaI, Invitrogen

5.1.2 Material biológico

Cepas		Fuente
<i>Cronobacter dublinensis</i>	CF 5237 LMG 23823	Hosp. Fco. Gómez, México
<i>Cronobacter malonaticus</i>	825 COC 1058-77	Hosp. Fco. Gómez, México
<i>Cronobacter muytjensii</i>	ATCC 51329	CIATEJ, Guadalajara
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 12868	Hosp. Fco. Gómez, México
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 29004	Hosp. Fco. Gómez, México
<i>Cronobacter turicensis</i>	3032 LMG 23827	Hosp. Fco. Gómez, México
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	Lab. Inoc. microbiana, UAQ
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	I.N.S.P , Morelos
<i>E. coli</i> enterotóxico	1620 TL 326	Lab. Inoc. Microbiana, UAQ
<i>E. coli</i> enterotóxico	881 TL 491	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>E. coli</i> enterotóxico	802 gm 339	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>E. coli</i> enterotóxico	260 TL 428	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>E. coli</i> enterotóxico	1028 gm 280	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090 LNA 104	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>Listeria monocytogenes</i>	Scott A (PG)	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>Salmonella</i> . Typhimurium	ATCC 14028	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>Salmonella</i> Agona	PG SAL-001	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>Salmonella</i> Montevideo	PG	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>Salmonella</i> Gaminara	SAL-004 F-2712(PG)	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ
<i>Shigella Flexneri</i>	ATCC 91999	Lab. Inoc. Microbiana,UAQ

5.1.3 Enfoque general del estudio

La Figura 5 y 6 muestran los aspectos relevantes del estudio y que fueron abordados en esta investigación. Este trabajo aborda dos áreas bien definidas y que son la cocina general y el lactario.

Figura 5. Perfil microbiano de los alimentos y ambiente de la cocina del hospital

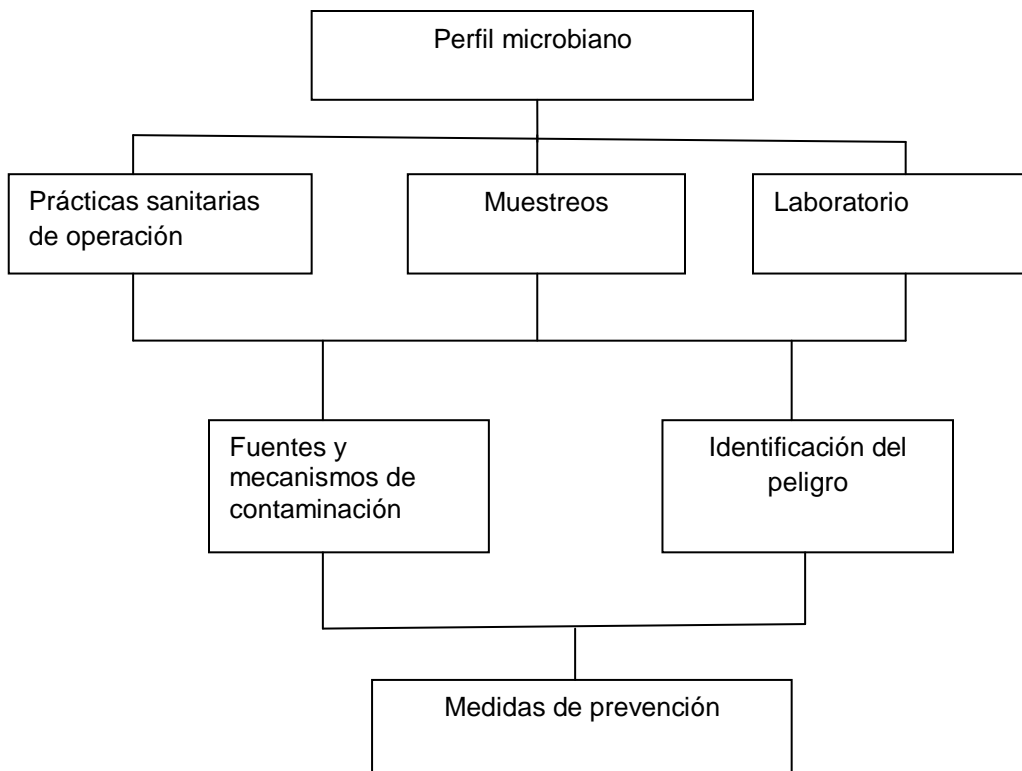
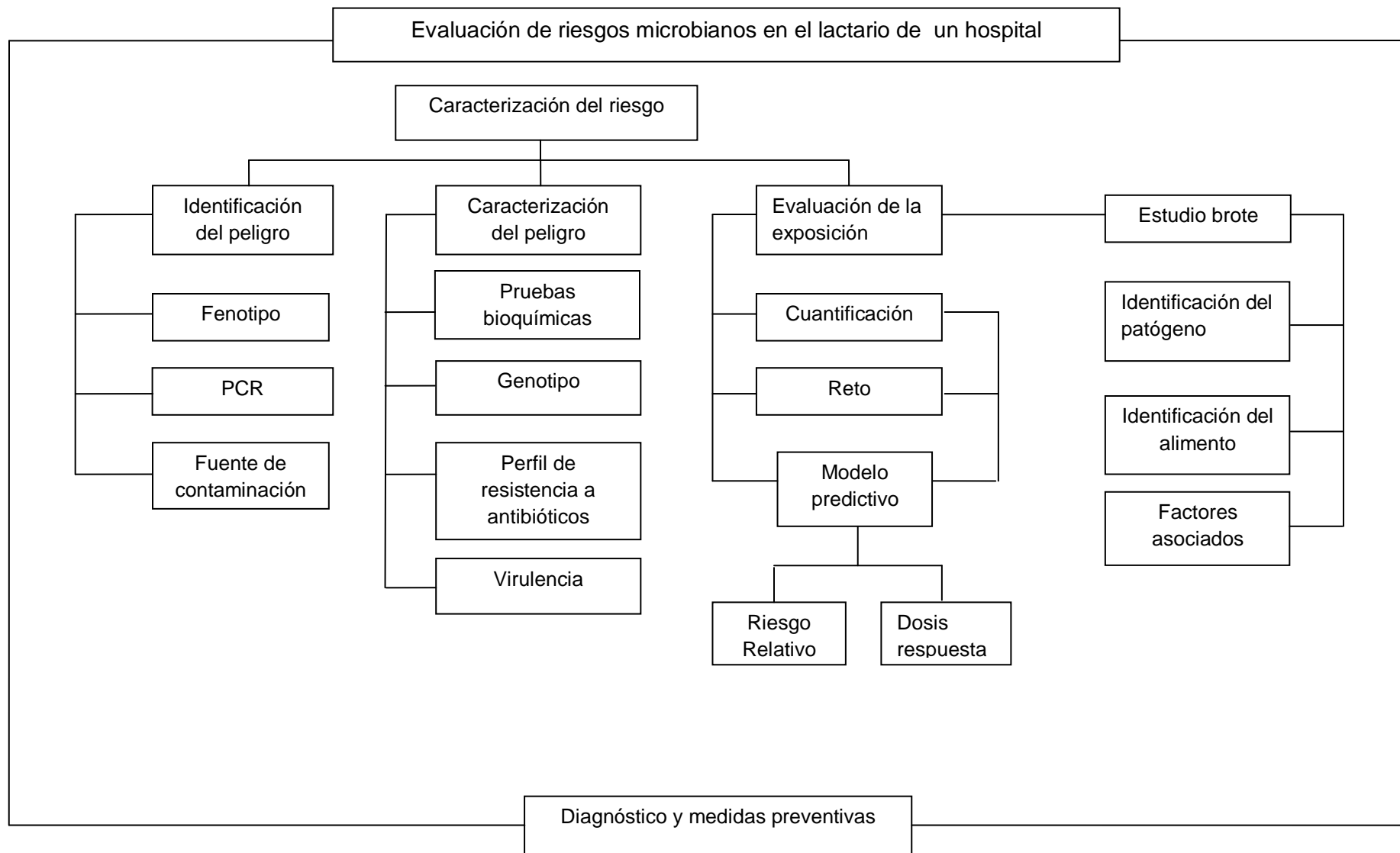


Figura 6. Enfoque general para la E.R.



La metodología para evaluar cada objetivo se describe a continuación.

5.2 Obtener un perfil microbiológico de los alimentos y la cocina del hospital donde son preparados

5.2.1 Estudio observacional cocina general

Como se ha señalado, originalmente se planeó un estudio orientado hacia los alimentos preparados en la cocina general del hospital y la presentación eventual de incidentes de enfermedad. Apoyados en cifras del CDC (2004) sobre la evaluación y control de la inocuidad en alimentos en diversos sitios de preparación y su relación con los brotes de ETAs, se elaboró un formato-guía de monitoreo (Anexo A), que se aplicó en cada visita a la cocina del hospital, en coordinación con las nutriólogas del hospital. Consta de 5 factores que se reconocen entre los más frecuentemente implicados en la gestación de los brotes en los servicios de alimentos. Estos son:

- **alimentos de fuente insegura:** tener la certeza de que únicamente se utilizan materias primas y alimentos que proceden de sitios que cuentan con la autorización de la Secretaría de Salud.
- **inadecuada cocción:** asegurarse que durante el tratamiento térmico aplicado en la preparación de los alimentos listos para su consumo se alcanzan temperatura de 70°C o más, en su centro geométrico.
- **inadecuada temperatura de conservación:** asegurarse que los alimentos perecederos se almacenan oportunamente (por más de 2 hs) a temperaturas no mayores de 4-7°C ni menores de 60°C hasta antes de su servicio.
- **equipo contaminado:** constatar que se aplica lavado y desinfección de las superficies que entran en contacto con los alimentos, incluidos los utensilios y equipo.
- **prácticas de manejo higiénico del personal:** constatar que se siguen tales prácticas durante las operaciones de preparación, almacenamiento y servicio de los alimentos.

Con un mes de anticipación, nos hacían llegar la planificación de comidas para enfermos y trabajadores del hospital, a fin de seleccionar los alimentos o comidas consideradas de mayor riesgo. Diariamente se conservaba en refrigeración hasta por 48 horas una porción de estos alimentos o comidas, de manera que ante la sospecha de un brote de enfermedad imputable al consumo de alimentos, se dispusiera del alimento para su estudio como posible vehículo del patógeno implicado.

Se mantuvo la norma de comentar con la nutrióloga jefe las prácticas de trabajo en función de los resultados de los muestreos y análisis practicados la ocasión anterior.

5.2.2 Muestreo cocina general

5.2.2.1 Alimentos crudos y cocinados.

Se obtuvieron aproximadamente 250 g. de cada alimento, y se colocaron en bolsas estériles (Whirl pack) para su traslado al laboratorio en un contenedor refrigerado entre 4° y 7°C.

5.2.2.2 Agua de red municipal influente y efluente del filtro purificador de luz ultravioleta (UV)

Se desinfectó el grifo aplicando una torunda estéril con etanol al 70%, en la superficie externa e interna por 30 segundos. Después de escurrir el agua por 30 segundos, se colectó aproximadamente 200 ml en bolsa estéril (Whirl pack) con tiosulfato de sodio al 1%, para inactivar el cloro residual.

5.2.2.3 Superficies de equipos, mesas de preparación y vajilla

Con torunda de gasa humedecida en 20 ml de diluyente de peptona (0.1%), se frotaron superficies irregulares (manijas de puertas acceso a refrigeradores, manijas de vitrinas refrigeradas, rejillas de aire acondicionado, cortadores, licuadoras, jarros, vajilla), y mesas de preparación de alimentos crudos y cocidos en una superficie de 900 cm² (30x30 cm).

5.3 Identificar *C. sakazakii* dentro de un lactario en términos de su incidencia, fuentes de contaminación y prácticas de trabajo que propician su actividad o sobrevivencia en la leche rehidratada.

5.3.1 Estudio observacional Lactario

Al cabo de 24 semanas de iniciado el estudio se presentó el incidente de diarrea sanguinolenta en tres lactantes. Se decidió entonces centrar el trabajo específicamente en el estudio epidemiológico correspondiente que generaría información con valor muy significativo para la evaluación de riesgos.

Como primer aspecto a monitorear, se valoraron las prácticas y operaciones que se realizaban en el lactario. Para tal efecto, se elaboró una guía de observación derivada de la mencionada en el Anexo A, que cubriera los procedimientos y operaciones que se seguían en la preparación de fórmulas lácteas. Se incluyó la descripción de infraestructura y dependencias (bodegas, cuartos fríos, áreas de producción, sanitarios), mobiliario y equipos, detallando las condiciones que afecten directa o indirectamente la inocuidad de los alimentos. Adicionalmente se valoró el cumplimiento de programas y procedimientos de higienización de materias primas, maquinarias y equipos, utensilios, infraestructura y personal.

Los aspectos considerados fueron:

- **alimento fuente insegura:** tener la certeza que los niños reciben sólo leche rehidratada preparada en el lactario.
- **temperatura de hidratación de la leche:** aspecto fundamental para inactivar *C. sakazakii* (70°C, recomendado por la OMS (WHO, 2007).
- **temperatura de conservación:** mantener la leche rehidratada a $\leq 6^{\circ}\text{C}$ en atención al carácter psicrótrofo del *C. sakazakii*.
- **tiempo de distribución:** las leches son consumidas antes de 4 horas desde que son entregada en la salas.
- **equipo y utensilios desinfectados:** contar con registro y control de los procedimientos de higienización de superficies y utensilios de trabajo.

- **prácticas de manejo higiénico del personal:** de acuerdo con los señalamientos de la Norma oficial Mexicana NOM-251-SSAI-2009.

Esta pauta de observación (Anexo A), se aplicó en cada visita, establecida en un cronograma de muestreo. Eventualmente se llevaron a cabo muestreos ante situaciones imprevistas que sugieran algún tipo especial de peligro.

5.3.2 Muestreo lactario:

5.3.2.1 Leche en polvo

Se colectaron las muestras directamente de las latas selladas o recién abiertas.

5.3.2.2 Leche rehidratada

Se retiró 100 a 150 ml del producto rehidratado en los mismos envases dispensados para su envío a las salas de hospitalización. Para su traslado al laboratorio se refrigeraron a 4-7°C.

5.3.2.3 Agua utilizada en la rehidratación de leche en polvo

Se colectaron aproximadamente 200 ml en bolsas Whirl pack de agua tratada en autoclave a 104°C por 5 minutos, directamente del contenedor de acero inoxidable utilizado.

5.3.2.4 Superficies

Con torunda de gasa humedecida en 20 ml de diluyente de peptona (0.1%), se frotaron las superficies irregulares (manijas de puertas acceso a refrigeradores, manijas de vitrinas refrigeradas, rejillas de aires acondicionados, cortadores, licuadoras, jarros, frascos de vidrio y tarjas). En mesas de preparación y en carro de traslado a salas de hospitalización, se muestrearon una superficie de 900 cm² (30x30 cm).

5.3.2.5 Materia fecal

El pañal completo se colocó en un contenedor sellado y refrigerado. Todos los pañales contenían identificación de su procedencia (nombre del niño, fecha, edad, tipo de leche consumida y sala). Se analizó no después de 1 hora desde su recolección.

5.3.3 Análisis microbiológicos

Se recurrió al uso de microorganismos indicadores, y la detección de bacterias patógenas para valorar la calidad y preparación higiénica de los alimentos y del ambiente en donde se confeccionan.

5.3.3.1 Grupos indicadores

Los microorganismos indicadores utilizados fueron: bacterias coliformes totales (CT), *E. coli* en agua, *Enterobacteriaceae* (ENT), bacterias mesófilas aerobias (BMA) (Cuadro 8). Los esquemas de asilamiento se describen en el Anexo B.

5.3.3.2 Bacterias patógenas

Las seleccionadas fueron: *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Shigella*, *Cronobacter spp*, *Cronobacter sakazakii* y *E. coli* enterotoxigénica (Cuadro 9), con sus diagramas de detección en el Anexo C. Se utilizaron como referencia bacterias del cepario del Laboratorio de Microbiología e Inocuidad de los alimentos.

Cuadro 8. Analisis microbiológicos con bacterias indicadoras según tipo de muestra

Muestras	Agua	Alimentos	Leche en polvo	Leche rehidratada	Superficies	Referencia
Bacterias indicadoras						
BMA	X	X	X	X	X	Beuchat <i>et al</i> (2001)
C.T.	X				X	Komachi <i>et al</i> (2001)
E. coli	X	X			X	Feng <i>et al</i> (1998); Swanson <i>et al</i> (2001)
ENT	X	X	X	X	X	Morton, 2001; Beuchat <i>et al</i> (2001)

Cuadro 9. Detección de patógenos según tipo de muestra

Muestra	Agua	Alimentos	Leche en polvo	Leche rehidratada	Materia fecal	Superficies	Referencia
<i>C.sakazakii</i>	X		X	X	X	X	Stoop <i>et al</i> (2009)
<i>Cronobacter spp</i>	X		X	X	X	X	FDA, 2002; Lehner <i>et al</i> (2004)
<i>E. coli</i> enterotoxigénico				X ¹	X ¹		Sjólín <i>et al</i> (2007)
<i>L. monocytogenes</i>						X	Donnelly y Brackett (1992)
<i>Salmonella spp</i>		X		X ¹	X ¹		Flowers <i>et al</i> (1992)
<i>Shigella spp</i>		X		X ¹	X ¹		Fernández Escartín (2008)

¹ Utilizados solamente en el brote

5.3.4 Detección de patógenos por PCR

Se confirmaron todas las cepas de los patógenos por PCR con la técnica descrita por Liu *et al* (2002) (Anexo D). Previamente, se valoraron los medios de enriquecimiento (Cuadro 10), con cada patógeno en términos de lograr la máxima especificidad y sensibilidad con los iniciadores seleccionados. La incorporación de esta técnica a la del NMP permitió la cuantificación.

Una vez purificadas las cepas se realizó un enriquecimiento a 35°C por 24 h, con objeto de revitalizar las células y alcanzar la densidad necesaria para su detección.

Del caldo enriquecido, se colocó una alícuota de 1 mL en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 4500 rpm x 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en agua destilada estéril y se colocó en baño de agua hirviendo por 20 minutos (lisis).

El ADN liberado se mezcló con los iniciadores específicos para cada patógeno con un producto comercial (Platinum PCR Supermix, Invitrogen), para *Salmonella*, *Shigella* y *L. monocytogenes*, y para *C. sakazakii* y especies, con GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI). Se realizó la amplificación del ADN en un termociclador de acuerdo con las características particulares de cada patógeno (Cuadro 11).

Terminada la amplificación, se realizó la electroforesis en gel de agarosa 1.5% con condiciones de 100 V, 90 mA y por 120 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb (pares de bases) para determinar el peso de los productos amplificados (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

El gel de agarosa se reveló en una solución de bromuro de etidio 1 ppm (10 mg/ml) por 20 minutos y la imagen se capturó con el sistema Kodak EDAS 290 (Eastman Kodak, Rochester, NY).

Se consideró como positiva la imagen de una banda con un peso molecular específico para cada producto de amplificación.

Cuadro 10. Caldos de enriquecimiento utilizados para PCR

Patógeno	Caldo enriquecimiento
<i>Salmonella</i> spp	Caldo soya tripticaseína
<i>E. coli</i> enterotóxico	Caldo lactosado
<i>Cronobacter</i> spp	Caldo enriquecimiento Enterobacterias MOSSEL
<i>L. monocytogenes</i>	Caldo University of Vermont Médium
<i>Shigella</i> spp	Caldo gram negativos

Cuadro 11. Iniciadores específicos para cada patógeno y condiciones de la PCR.

Patógeno	Gen blanco	Secuencia de bases	Condiciones de la reacción
<i>Salmonella</i> spp	<i>InvA</i> (1)	CTGTTGAACAACCCATTTGT	93 °C/5 min; 30 ciclos de 93 °C/1 s, 42 °C/1 s y 72° C/45 s; una extensión final a 72 °C/10 min.
		CGGATCTCATTAAATCAACAAT	
<i>E. coli</i> enterotóxico	<i>Lt</i> (2)	ACGGCGTACTATCCTCTC	94°/5 min; 4° ciclos 94°/30 s; 52°C/30 s; 72°C/30 s; una extensión final a 72°C/ 5 min.
		TGGTCTCGGTCAGATATGTG	
	<i>LTI</i> (3)	CCGGTATTACAGAAATCTGA	93°C/5 min; 35 ciclos de 93°C/60 s, 55°/60 s, 72° C/120 s; una extensión final 72°C/ 5 min
		GTGCATGATGAATCCAGGGT	
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i> (4)	CCTAAGACGCCAATCGAA	94°C/5 min; 30 ciclos de 93°C/10 s; 42°C/10 s; 72°C/45 s; una extensión final de 72°C/10 m
		AAGCGCTTGCAACTGCTC	
<i>Shigella</i> spp	<i>ipaH</i> (5)	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGAT ACCGTC	94°C/4 min; 30 ciclos 94°C/45 s; 60°C/90 s; 72°C/60 s; una extensión final 72°C/7 min.
		GCCGGTCAGCCACCCTCTGAG AGTAC	

<i>Cronobacter</i> spp.	16S (6) rRNA	GCTYTGCTGACGAGTGGCGG	94°C/120 s; 29 ciclos 94°C/ 30 s; 60°C/60 s ;72°C/ 90 s; extension final 72°C/ 5 min
		ATCTCTGCAGGATTCTCTGG	
<i>C. sakazakii</i>	<i>rpoB</i> (7)	ACGCCAAGCCTATCTCCGCG	94°C/180 s; 30 ciclos 94°C/60s; 67°C/ 60 s; 72°C/60 s; extension final 72°/ 5 min.
		ACGGTTGGCGTCATCGTG	
<i>C. malonaticus</i>	<i>rpoB</i> (8)	CGT CGT ATCTCT GCT CTC	94°C/180 s; 30 ciclos 94°C/60s; 67°C/ 60 s; 72°C/60 s; extension final 72°/ 5 min.
		AGG TTG GTGTTC GCC TGA	
<i>C. dublinensis</i>	<i>rpoB</i> (9)	GCA CAA GCG TCG TAT CTC C	94°C/180 s; 30 ciclos 94°C/60s; 67°C/ 60 s; 72°C/60 s; extension final 72°/ 5 min.
		TTG GCG TCA TCG TGT TCC	
<i>C. muytjensii</i>	<i>rpoB</i> (10)	TGT CCG TGT ATG CGC AGA CC	94°C/180 s; 30 ciclos 94°C/60s; 67°C/ 60 s; 72°C/60 s; extension final 72°/ 5 min.
		TGT TCG CAC CCA TCA ATG CG	
<i>C. turicensis</i>	<i>rpoB</i> (11)	CGG TAA AAG AGT TCT TCG GC	94°C/180 s; 30 ciclos 94°C/60s; 67°C/ 60 s; 72°C/60 s; extension final 72°/ 5 min.
		GTA CCG CCA CGT TTC GCC	
<i>C. genomoespecies</i>	<i>rpoB</i> (12)	ACA AAC GTC GTA TCT CTG CG	94°C/180 s; 30 ciclos 94°C/60s; 67°C/ 60 s; 72°C/60 s; extension final 72°/ 5 min.
		AGC ACG TTC CAT ACC GGT C	

Referencias:

1. Liu *et al* (2002)
2. Sjölin *et al* (2007)
3. Victor *et al* (1991)
4. Borders *et al* (1990)
5. Hartmann *et al* (1990)
6. Lehner *et al* (2004)
- 7-12. Stoop *et al* (2009).

5.4 Efectuar un estudio epidemiológico prospectivo ante un brote de infección bacteriana que se presentó entre los lactantes del hospital

5.4.1 Detección de casos

Se mantuvo una vigilancia diaria entre los lactantes hospitalizados a lo largo de 16 meses con el propósito de conocer oportunamente de casos de gastroenteritis. Se instruyó al personal para que revisara en toda ocasión la presencia de heces diarreicas en los pañales. El 24 de enero de 2010 se detectó la presencia de heces fecales diarreicas sanguinolentas en dos lactantes. Se inició el muestreo de materiales pertinentes que permitieran demostrar la etiología y vehículo del agente patógeno implicado. Se mantuvo la vigilancia en el resto de los lactantes para descubrir nuevos casos y se estudiaron clínicamente los afectados. El estudio epidemiológico se hizo extensivo a las condiciones de preparación y manejo de la leche suministrada, incluida específicamente la muestra de resguardo que, según acuerdo previo, se conservaba como norma en el lactario de manera cotidiana. Otra información de interés fue la fuente comercial de la leche deshidratada utilizada en la preparación de la fórmula y la cantidad de leche consumida.

Se investigó la presencia de *Salmonella*, *Shigella*, *Cronobacter* spp, *C. sakazakii* y *E. coli* patógena en la materia fecal, de acuerdo con las técnicas descritas en el Anexo C.

C. sakazakii se investigó además, en superficies de puertas de acceso al área de preparación de leches, puerta del refrigerador, mesas de preparación de leches rehidratadas, tarjas, rejilla de aire acondicionado y en agua utilizada para rehidratar leche y agua de red municipal durante el brote y posteriormente durante 6 meses.

5.4.2 Investigación de la configuración del brote

Durante el estudio prospectivo se recabó información exhaustiva sobre las condiciones de preparación de las leches a fin de identificar operaciones y condiciones que pudieron haber contribuido a la gestación del brote. En las muestras positivas a *C. sakazakii* se efectuó (24 h después de la detección mediante PCR, como se ha descrito), el recuento del patógeno siguiendo la técnica de NMP. Cada tubo de cada dilución se confirmó mediante PCR, para estimar la concentración del patógeno en el material.

La electroforesis en gel con campos pulsados de las cepas de *C. sakazakii*, se efectuó en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos (UAQ) y se confirmó en el Instituto Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud, Cuernavaca, Morelos.

A partir de los resultados de los estudios moleculares, se preparó un dendrograma que agrupa todas las cepas en función de su imagen genética empleando el software Gel Compar II system. La fuente de contaminación de la leche implicada en el brote fue rastreada de acuerdo con los pulsotipos identificados en el estudio de EGCP.

5.5 Caracterizar las cepas de *C. sakazakii* implicadas en el brote, mediante cultivo, pruebas de metabolismo, factores de virulencia, pulsotipos, y perfil de resistencia a antibióticos

Cronobacter spp., fué confirmado en las muestras y cepas de leche en polvo, leche rehidratada, superficies, agua y material fecal, mediante PCR con los iniciadores Esakf and Esakr descritos por Lehner *et al* (2004). Se utilizó como control positivo la cepa *C. sakazakii* ATCC 51329.

Se realizó la identificación en las cepas que no fueron positivas a *C. sakazakii* por PCR, utilizando los iniciadores específicos para cada especie según lo señalado por Stoop *et al* (2009) y señalado en el cuadro 11.

C. sakazakii se identificó con pruebas bioquímicas y PCR a través de la amplificación de la región *rpoB*- PCR con los iniciadores Csakf y Csakr diseñados por Stoop *et al* (2009). Se caracterizó más extensivamente con pruebas de

virulencia y perfil de resistencia a antibióticos. Los controles positivos fueron *C. sakazakii* ATCC 12868 y 29004.

5.5.1 Pruebas bioquímicas

La identificación bioquímica de las cepas se realizó empleando microplacas™ GN2 marca BIOLOG para bacterias gram negativas con 96 pruebas bioquímicas. Las cepas puras de *C. sakazakii* se incorporaron al fluido de inoculación hasta alcanzar una transmitancia de 63% a 600 nm. Se inoculó 150 µL en cada pozo de las placas y se incubó a 35°C por 24 horas. Se efectuó la lectura en el sistema automatizado BIOLOG MICRO STATION (Anexo E).

5.5.2 Pruebas de virulencia

Este trabajo se realizó en el Hospital Infantil de Federico Gómez de la ciudad de México. Se realizaron ensayos de adherencia cuantitativos infectando las células HEp-2 por 3 h con las cepas de *C. sakazakii*. Las células infectadas se rompieron con una solución de tritón X-100 al 0.1% (Amresco, OH, USA). Finalmente se realizó una cuenta viable de las células del patógeno.

Los ensayos de invasividad: se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente infectando la misma línea celular e incubando por tres horas. Las células se lavaron con buffer de fosfatos salino en condiciones de esterilidad y se agregó Caldo Luria (LBB) con gentamicina y lisozima para eliminar las bacterias incapaces de invadir la célula. Se incubó por tres horas y se siguió el procedimiento mencionado en el párrafo anterior.

5.5.3 Perfil de resistencia a antibióticos

La prueba de susceptibilidad a antibióticos fue realizada por el método de difusión con discos y siguiendo las guías establecidas por Bauer *et al.*, (1966) y recomendaciones de la Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) (Anexo F). Se usaron discos de 12 antibióticos comerciales (Bio-Rad™), con ampicilina (10 µg), amikacina (30 µg), levofloxacino (5 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxime (30

µg), ceftriaxone (30 µg), cloramfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoina (300 µg), cefepime (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg).

La caracterización de los perfiles de resistencia/susceptibilidad de las cepas se determinó midiendo la zona de inhibición e interpretando los diámetros de inhibición según el instructivo del fabricante. Se utilizó como referencia la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

5.5.4 Rastreo molecular de *C. sakazakii* por electrofóresis en gel por campos pulsados (EGCP)

Se preparan bloques de ADN agarosa de acuerdo con la metodología propuesta por la CDC (Ribot *et al.*, 2006). El ADN de cada cepa se secciona con la endonucleasa de restricción XbaI (25 U de enzima y 17 h de incubación a 37°C). La EGCP se realizó en gel de agarosa al 1% con 2 condiciones de electroforesis (6 V/cm por 19 h a 14° C, pulso inicial de 2.16 s y pulso final de 63.8 s, y 6 V/cm por 23 h con un pulso inicial de 1 s y un pulso final de 30 s y con un ángulo de 120°. Los geles se revelaron por 20 min a temperatura ambiente con bromuro de etidio. La imagen del gel se capturó con el sistema Kodak EDAS 290 (Eastman Kodak, Rochester, NY) (Anexo G). Se generaron dendogramas con agrupación de pares sin peso con promedio matemático (UMPGA). Las cepas se consideraron del mismo pulso tipo cuando el número y posición de las bandas fueran idénticos (Tenover *et al.*, 1995), o con ≥95% similaridad (Molloy *et al.*, 2009). La similaridad entre huellas genéticas se determinó con el programa computacional de análisis de imágenes Gel Compar II (Applied Maths NV) el cual construyó los dendogramas.

5.6 Evaluar la exposición a *C. sakazakii* entre los lactantes afectados mediante pruebas de reto en las fórmulas lácteas aplicar un modelo predictivo como recurso para caracterizar al riesgo.

5.6.1 Cuantificación de *C. sakazakii* por la técnica de NMP

La exposición al patógeno en las formulas lácteas se realizó mediante la técnica NMP reportada por Thomas (1942) (Figura 7), y los software LCFMPNCalculator.exe Versión 1.5 (Lempel *et al.*, 2009) y MNP Calculator.exe Build 6 (Curiale, 2004). La cuantificación se realizó en 25 g de leche en polvo, 100 mL de leche rehidratada y en una superficie de 900 cm² utilizando caldo Mossel como medio de enriquecimiento. La presencia de *C. sakazakii* se confirmó en cada tubo mediante PCR.

$$\text{Fórmula} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ tubos (+)}}{\sqrt{\text{Volumen total} \times \text{volumen negativo}}}$$

Figura 7. Fórmula de Número Más Probable (NMP) (Thomas, 1942)

5.6.2 Prueba de reto

Previamente en el lactario, se controló la temperatura de la leche en el interior de los envases utilizados para almacenamiento, después de la rehidratación. Se utilizaron termopares permanentes durante las 12 h que duró la prueba. Las mediciones se registraron cada 30 min.

Posteriormente se realizó la prueba de reto simulando las condiciones en la que se preparó y almacenó la leche rehidratada durante el brote.

La prueba se efectuó considerando tres factores (tiempo, temperatura y volumen) y un nivel de inóculo.

Para evitar la influencia de la flora asociada contenida en la leche rehidratada durante el conteo, se utilizaron tres cepas de *C. sakazakii* resistentes a 100 ppm de rifampicina. Estas cepas mostraron idéntico genotipo y fueron aisladas de la leche rehidratada consumida por los niños afectados y de su materia fecal. Las cepas se incubaron a 35°C por 24 h. con 2 pases sucesivos en CST con rifampicina a 100 ppm.

Se inocularon en leche rehidratada de manera independiente 50 células por mL en 2 volúmenes seleccionados (3,000 mL y 100 mL), que son los utilizados para almacenar la leche rehidratada y dispensar en los biberones que se van a sala de hospitalización para su consumo.

Se probaron dos temperaturas (7° y 35°C), con muestreos periódicos de incubación de 0, 1, 2, 3, 4, 8, 9, 12 y 24 horas para los recuentos. Se utilizó AST con rifampicina a 100 ppm y trifenil tetrazolium al 0.5%, para mejorar la visualización de las colonias. Cada estudio se realizó por triplicado.

Se construyeron las cinéticas de comportamiento del patógeno con el programa Dmfit (www.Combase.cc).

Se utilizó la prueba de varianza con un nivel significancia estadística $p < 0.05$ para establecer la asociación de las variables temperatura, producto y tiempo con la velocidad de desarrollo de *C. sakazakii* en leches rehidratadas e incubadas a 2 temperaturas. Se utilizó el paquete estadístico JMP 5.0.1 (SAS Institute Inc, 2003)

5.6.3 Caracterización del Riesgo

Se utilizó el software risk assessment model for *Cronobacter sakazakii* (Paoli y Harnett, 2009). Los datos incorporados al modelo fueron obtenidos del estudio observacional y de los datos cuantitativos de *C. sakazakii* en la leche en polvo. Los factores utilizados y sus niveles son:

Contaminación leche en polvo

- Concentración inicial: - 0.7722 log CFU/g
- Desviación estándar: - 0.005

Temperaturas de reconstitución:

- Temperaturas de reconstitución: 45° y 70°C

Escenarios de preparación y manipulación

- Temperatura ambiente: 27°C y 35°C
- Duración preparación LR: 0.5 h
- Almacenamiento: 7°C
- Duración almacenamiento: 12 h
- Recalentar LH en salas: 37°C
- Tiempo de traslado LH a salas: 0.45 h
- Temperatura ambiente durante : 27°C
consumo.
- Tiempo máximo de consumo: 4 h

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El enfoque prospectivo concebido en el inicio del estudio, se orientaba a valorar los riesgos microbianos en los alimentos que se preparaban y consumían en el hospital materno infantil, conocer su perfil de contaminación y la posibilidad de estudiar un brote de ETA. A los 12 meses de iniciado el estudio, se presentó un brote por *C. sakazakii* en 2 niños de 6 meses posterior al consumo de leche rehidratada. Nuestro trabajo entonces, se orientó principalmente a esclarecer el proceso de gestación, configuración y expresión del brote, con el fin de establecer medidas preventivas y evitar otros incidentes de enfermedad. Los resultados y discusión se presentarán abordando en primer orden todo lo concerniente a la cocina, para después, abordar en profundidad todos los aspectos estudiados del lactario del hospital.

6.1 Estudio observacional de la cocina general

La investigación se llevó a cabo en el Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer, con una capacidad de 120 menores y sus madres y con una antigüedad de 7 años, siendo uno de los hospitales más modernos del estado. La cocina tiene una extensión de 140 mts², distribuidas en 10 espacios de trabajo. Cuenta con vajilla, maquinarias y equipos en buen estado de conservación.

El estudio se extendió por 5 meses, desde el 17 de Febrero hasta el 21 de Julio de 2009, con un total de 15 visitas y la recolección de 181 muestras.

Su enfoque fué esencialmente preventivo. Nos permitió detectar operaciones o prácticas de trabajo que afectaban la inocuidad de los alimentos preparados en la cocina y lactario del hospital, lo cual en su caso, se verificó mediante estudios de laboratorio.

Los factores que participan en la configuración de brotes de ETAs difieren en algunos rubros según el sitio de preparación del alimento implicado (Bryan, 1988). Específicamente en el caso de los alimentos que se preparan en las cocinas de los hospitales, los factores de riesgo en los alimentos cocinados están determinados por dos componentes básicos (Fernández Escartín, 2008):

- a) el empleo de materiales contaminados o la exposición a la contaminación durante la preparación y previo al servicio, y
- b) las prácticas que propician la supervivencia o el desarrollo de microorganismos patógenos.

Ambos componentes no son excluyentes; más de un factor suele participar en un mismo brote (Bryan, 1988) (Cuadro 12).

Debido a la gran diversidad de alimentos cocinados, ingredientes utilizados y formas en las que se preparan, resultan también muy variables los factores y mecanismos por los cuales adquieren peligrosidad

Cuadro 12. Factores asociados en la presentación de 660 brotes de ETAs que se configuraron en servicios de alimentos. Estados Unidos. 1973-1982.

Factor	Número	%
Inadecuado enfriamiento	366	55.8
Más de 12 h entre preparar y consumir	203	30.8
Manejador del alimento infectado	160	24.2
Inadecuado recalentamiento	130	19.7
Inadecuada conservación en caliente	107	16.2
Materias primas contaminadas	58	8.8
Alimento de fuente insegura	42	6.4
Equipo/utensilios mal saneados	38	5.8
Contaminación cruzada	31	4.7
Uso de sobrantes	31	4.7
Insuficiente cocción	29	4.4
Recipientes/tuberías tóxicas	23	3.5
Aditivos intencionales de mala calidad	13	2.0
Aditivos accidentales de mala calidad	9	1.4
Inadecuada descongelación	6	0.9
Uso de agua contaminada	2	0.3
Lavado deficiente de loza/contaminación	1	0.2
Confusión con alimentos no comestibles	1	0.2

En nuestro estudio hemos considerado algunos de estos factores listados para el monitoreo de las prácticas y operaciones que se realizan en la cocina. El grupo de alimentos cocinados constituye un riesgo especial, y de acuerdo con las estadísticas, es el tipo de alimento más comúnmente implicado en brotes de ETAs. En los países que cuentan con estudios epidemiológicos, generalmente estos productos se identifican con mayor insistencia que los procesados, como vehículos de los agentes patógenos implicados en los incidentes (Fernández Escartín, 2008).

En servicios de comedor instalados en grandes empresas e instituciones, el volumen de alimento demandado suele ser elevado (120 personas). Se generan entonces riesgos de notable singularidad que demandan atención específica para su prevención y control. Aunque los principios científicos en los que se apoya el manejo sanitario de los alimentos son los mismos para cualquier establecimiento, con frecuencia se observan diferencias marcadas en la ejecución de las prácticas de trabajo. En junio de 1988, un brote masivo de infección por *E. coli* enterotoxigénica fue estudiado en Illinois, EUA (Beatty *et al.*, 2006). La cocina implicada preparaba y distribuía alimentos para atender eventos entre clientes de la población. Carecía de facilidades adecuadas para el lavado de manos, no existía una protección contra posibles retornos de agua residual hacia el sistema de agua potable, la tarja de la cocina mostraba problemas de desague y prevalecían prácticas antihigiénicas de almacenamiento y transporte de los alimentos

A continuación se hace referencia a prácticas de trabajo que son de interés para valorar las condiciones sanitarias en las que se preparan los alimentos en la cocina del hospital que estudiamos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Prácticas registradas en 15 visitas a la cocina del hospital del niño y la mujer.

Aspectos evaluados	Si	Observaciones
1. Alimentos fuente insegura	15	
2. Inadecuada cocción	2/15	Uso de alimentos crudos
3. Inadecuada temperatura de conservación	15	
4. Equipo contaminado	9/15	Mesa de preparación no higienizada que alterna uso de alimentos cocidos y crudos
5. Prácticas de manejo higiénico del personal	10/15	No lavar las manos antes de cada maniobra y urgarse la nariz

La norma general establece que ningún alimento perecedero deberá mantenerse por más de 4 h en intervalos de temperatura de 5 a 60°C. La temperatura deberá ser medida y registrada al menos cada 2 h entre aquellos que están listos para ser servidos; este aspecto era monitoreado ocasionalmente en la cocina del hospital. Por otra parte, la justificación de establecer y aplicar medidas que eviten la contaminación cruzada en las cocinas está bien establecida, no sólo a través de estudios epidemiológicos, sino experimentalmente (De Boer y Hahne, 1990). La eventualidad de contaminación cruzada durante la preparación de alimentos en las cocinas es muy amplia. Sólo en una oportunidad pudimos observar que en una misma mesa se preparaba ensalada picada y se trozaba carne cruda, siendo esta acción de elevado riesgo. Stevenson y Hanson (1996), reportaron un brote por *E. coli* O157:H7 en donde la investigación epidemiológica concluyó que carne cruda y alimentos cocidos habían compartido en varias oportunidades la misma superficie. Inadecuadas prácticas de higiene, como no lavarse las manos antes de servir los alimentos, se observó en forma frecuente. Esta situación no es extraña, ya que por regla las operaciones peligrosas no

ocurren en el momento de la inspección o ésta es de corta duración para poder ser observada (Bryan, 1988).

Con especial cuidado observábamos a las cocineras cuando abandonaban la cocina y luego regresaban a reanudar la actividad que realizaban. Sólo en el 22% de las veces, las cocineras se lavaban las manos antes de preparar ensaladas o frutas, ya que estos alimentos no llevan ningún tratamiento posterior de desinfección. Strohbehn *et al* (2008), encontró que en centros de cuidado infantil los trabajadores se lavaban las manos sólo en el 40% de las veces (que era necesario y que estaba reglamentado), y en restaurantes, sólo el 33% de las veces. El no uso de guantes al momento de porcionar alimentos, que posteriormente no eran sometidos a tratamiento térmico, también era una práctica habitual. Las manos sucias pueden ser un vehículo de transmisión de virus (Todd *et al.*, 2007), de bacterias patógenas ya que los guantes sirven como una barrera de contaminación hacia los alimentos (Tood *et al.*, 2008). Bajo estas prácticas, el riesgo de contaminar los alimentos es muy alto. En un estudio en Chile, el 34% de los trabajadores que preparaban alimentos estaban colonizados por *S. aureus* y el 54% de las cepas eran enterotoxigénica (Figueroa *et al.*, 2002).

En ocasiones es difícil identificar u observar este tipo de mecanismos de contaminación durante una inspección rutinaria, ya que por lo general son de corta duración. Al principio, observábamos como las cocineras ponían cuidado en cada maniobra que realizaban, pero a medida que avanzaba el tiempo y teníamos su confianza, quedaban de manifiesto prácticas inadecuadas, que habían sido abordadas durante su capacitación. Un ejemplo ilustrativo, era la preparación de la solución clorada; estando presente una nutrióloga medían cuidadosamente el volumen de cloro a utilizar; en su ausencia, simplemente agregaban una cantidad de cloro, de acuerdo a su voluntad. Esto subraya la necesidad de realizar un monitoreo permanente de operaciones que son decisivas en la protección de la inocuidad de los alimentos.

La capacitación de los empleados de las cocinas es un renglón crucial para la protección de la inocuidad de los alimentos. Como regla general entre este

grupo de empleados, su comportamiento dista mucho de ajustarse permanentemente a proteger los alimentos contra contaminaciones peligrosas, aplicar tratamientos efectivos de inactivación de microorganismos patógenos y la cancelación irrestricta de oportunidades para su multiplicación.

6.2 Incidencia de microorganismos indicadores y patógenos en la cocina del hospital

6.2.1 Bacterias indicadoras

Los resultados proporcionaron un diagnóstico de la exposición de los alimentos a diversas fuentes de contaminación, de la efectividad de los procesos de desinfección, de las condiciones de almacenamiento y de las prácticas sanitarias de operación. Una amplitud mínimo-máximo acentuada de las cifras de BMA (Cuadro 14), así como coliformes (Cuadro 15) y *Enterobacteriaceae* (Cuadro 16), puede entenderse como la expresión de un régimen de operación en la cocina, que carece de control efectivo. El mínimo ilustra que es posible alcanzar o disponer de niveles bajos de poblaciones bacterianas en cada material examinado y en las condiciones de operación de la cocina. El máximo, el extremo al que pueden llegar tales poblaciones cuando se descuida el control de las operaciones; por ejemplo: el saneamiento, la desinfección del agua y las oportunidades de contaminación y desarrollo microbiano en alimentos.

Cuadro 14. Contenido de Bacterias Mesófilas Aerobias en muestras colectadas en la cocina del hospital.

Muestra	n	Mínimo	B M A (UFC)		
			Media	Mediana	Máximo
Alimentos/g	56	30	2100 000	100 000	28 000 000
Superficies /cm ²	87	20	1 300 000	15 000	35 000 000
Agua influente purificador cocina/ml	25	<10	1100	20	5 300
Agua efluente purificador cocina/ml	13	<10	600	10	5 200

Los recuentos en los alimentos y superficies son más bien bajos en términos de la mediana, lo que sugiere buena calidad sanitaria de las materias primas, o bien eficacia de los tratamientos de desinfección de alimentos y superficies. En el agua sin embargo, en cuatro oportunidades los valores sobrepasaron el nivel permitido por la Norma Mexicana, problema asociado a deficiencias debido a fallas en el purificador con luz ultravioleta ubicado en la cocina. Aún cuando el significado de BMA en el agua es virtualmente nulo para decidir acerca de peligros potenciales (Fernández Escartín, 2008), estos valores alertan sobre el peligro asociado con algunas bacterias que son capaces de proliferar en el agua y que se han identificado frecuentemente con infecciones nosocomiales, como *Pseudomonas spp* (Bou *et al.*, 2009).

Cuadro 15. Contenido de coliformes totales en 4 tipos de muestras colectadas en la cocina del hospital.

Muestra	n	C.T (NMP)			
		Mínimo	Media	Mediana	Máximo
Alimentos/g	56	<10	900 000	900	30 000 000
Superficies/cm ²	87	1	40 000	200	320 000
Agua influente purificador cocina/ml	23	< 0.3	21	21	40
Agua efluente purificador cocina/ml	13	< 0.3	2	2	2

Las medianas de coliformes en los alimentos y superficies, pueden usarse como punto de referencia, para introducir acciones que disminuyan la frecuencia de las cifras máximas, y favorecer los hallazgos hacia valores mínimos. El valor máximo en los alimentos (Cuadro 15), está dado por un alimento sin proceso de desinfección.

Los valores de *E. coli* encontrados suelen asociarse con la ausencia de contaminación fecal en alimentos listos para el consumo, superficies y agua, toda vez que están por debajo del límite de detección (Cuadro 16).

Cuadro 16. Contenido de *E. coli* en 4 tipos de muestras colectadas en la cocina de un hospital

<i>E.coli</i> (NMP)			
Muestra	n	Mínimo	Máximo
Alimentos/g	56	< 3	4
Superficies/ cm ²	87	< 0.1	< 0.1
Agua influente purificador cocina/ml	14	< 2	< 2
Agua efluente purificador cocina/ml	6	< 2	< 2

Estos hallazgos difieren de lo detectado por Hernández (2006) en un estudio de tres cocinas de hospitales, en donde la positividad para *E. coli* era elevada. En superficies de empaque de materias primas encontró 29%, en mesas acero inoxidable 14%, en trapos de limpieza 22% y en picaportes de puertas de cocina 13%. Entre los alimentos: cilantro sin lavar 66%, en jamón 5.3% y en queso 19.5%. Es inaceptable que se utilice cilantro sin desinfectar en preparaciones que son posteriormente consumidas por pacientes hospitalizados. Este alimento fue asociado como vehículo de *Salmonella* Thompson en un brote reportado por Campbell et al (2001) y en dos brotes por *E. coli* enterotóxigena en restaurantes (Naimi et al., 2003).

En nuestro caso, el único resultado positivo a *E. coli* consistió en cilantro sin desinfectar, el cual luego de su desinfección, se mostró por debajo del límite de detección (< 3 NMP/g).

Cuadro 17. Contenido de *Enterobacteriaceae* en alimentos de un hospital

<i>ENT</i> (UFC)					
Muestra	n	Mínimo	Media	Mediana	Máximo
Alimentos/g	8	400	1 900 000	210 000	12 000 000

En los últimos muestreos (Cuadro 17), se incluyó a las *ENT* como grupo más amplio que los C.T. Los valores encontrados son más elevados y por tanto resultan más sensibles para evidenciar prácticas sanitarias deficientes de operación. En nuestro caso, la utilidad de este indicador es significativa en los alimentos cocidos. En estos alimentos se asocia primariamente con una contaminación poscocción del alimento o con el empleo de un ingrediente contaminado incorporado después del tratamiento térmico. Es decir un número elevado de *Enterobacteriaceae*, es compatible con una intensa contaminación, seguido de una adecuada preservación, o con una discreta contaminación seguida de una deficiente preservación (Hernández, 2006).

6.2.2 Incidencia de patógenos

Este estudio se diseñó con el antecedente de Hernández (2006), quién detectó *Salmonella* en 2 hospitales de Querétaro.

La incidencia del patógeno resultó muy baja (Cuadro 18). La única muestra positiva se observó mediante PCR, no por cultivo. Los resultados negativos al cultivo con la técnica de NMP (series de 3-3-3 tubos) son compatibles con resultados positivos cuando se analizan porciones de 25 g de muestra. Hara-Kudo *et al* (2006), bien señalan esta aparente discrepancia, tomando en cuenta que dicha técnica de NMP tiene sensibilidad menor a la de la prueba cualitativa. Por otra parte, la discrepancia entre el resultado positivo y negativo mediante PCR y cultivo podrían explicarse por un muy bajo nivel de concentración del patógeno, y consecuentemente de grandes porciones de alimentos libres de *Salmonella*.

Existen reportes de brotes por *Salmonella* en hospitales, principalmente asociados a inadecuadas prácticas por parte de los cocineros (Maguire *et al.*, 2000, Opal *et al.*, 1989) o por un inadecuado proceso térmico al que se someten los alimentos (Evans *et al.*, 1996).

Cuadro 18. Incidencia de *Salmonella* y *Shigella* en alimentos y superficies por 2 técnicas de detección

Patógeno	Muestra	N° de muestras positivas			
		n	cultivo	PCR	%
<i>Salmonella</i> spp	Alimentos	37	0	1	2.7
	Superficies	26	0	0	0
<i>Shigella</i> spp	Alimentos	28	0	0	0

Hernández (2006) encontró que en 46 muestras de ensaladas crudas que se prepararon en 2 hospitales, la incidencia de *Salmonella* fué de 21.9%, en contraste con 2.7% que encontramos en nuestro estudio. La misma autora, comunica que en otros alimentos la positividad fue de 10.5% para jamón y 9.8% para queso panela. En las manos de cocineros la positividad alcanzó 17.2%, en utensilios de cocina 16.7% y en el piso 15.6%.

Es común entregar en los hospitales alimentos como jamón y queso panela, que no reciben ningún tratamiento térmico antes de servirlos a los enfermos. Esta práctica es peligrosa, cuando involucra individuos enfermos, obviamente hipersensibles.

Las frutas y verduras que se adquieren para la alimentación de enfermos y trabajadores resultaron muy seguras. Son sometidas a un eficiente proceso de desinfección, que contribuye a explicar la negatividad de *Shigella* spp (Cuadro 18).

La sensibilidad de la técnica molecular empleada para *Shigella* spp (previamente valorada), permite detectar el patógeno con 5 células presentes en una muestra de 20 g, sin que influya de alguna manera la flora asociada. Con frecuencia la infección por *Shigella* está asociado al consumo de ensaladas. Así ocurrió en un brote reportado en un hospital naval, dónde se afectaron 107 personas al consumir ensaladas contaminadas por 2 cocineros infectados asintomáticos (CDC, 1983).

Nuestro estudio se extendió a la *L. monocytogenes* en alimentos y superficies durante 2 períodos de muestreo (Cuadro 19). Este patógeno tiene relevancia para 2 grupos de población, menores de 6 años y mujeres embarazadas.

No se detectó su presencia en alimentos que se entregan crudos y que se conservan en refrigeración. Sin embargo, en superficies de trabajo la positividad fue elevada (32%), especialmente en refrigeradores de frutas y verduras y en el de carnes (Cuadro 20). Adicionalmente fue detectada en restos de alimentos en el piso.

Cuadro 19. Positividad general por cultivo y PCR de *L. monocytógenes* en la cocina del hospital en dos períodos de muestreo

Muestreo	n	(+)	%
Periodo 1	38	10	26
Periodo 2	60	7	12
Total	98	17	17

Período 1: junio 2009

Período 2: junio 2010

No se observó diferencia significativa ($P < 0.05$), en la positividad durante el período 1 con respecto del período 2.

Es evidente un riesgo potencial de contaminación a los alimentos, y por ende de un incidente de enfermedad. Debido al carácter psicrotrofo del patógeno, es posible su desarrollo en algunos alimentos conservados en refrigeración. Tompkin (2002) destaca que este patógeno puede permanecer hasta por 12 años en superficies de fábricas de alimentos, favorecido por su capacidad para formar biopelículas. Nos fue posible aislar al germen en los mismos sitios en más de una oportunidad, inclusive con un intervalo de 12 meses entre el muestreo,

especialmente en el piso del montacargas, que es la vía de acceso de todos los alimentos a la cocina del hospital.

Cuadro 20. Positividad a *L. monocytogenes* en diversas superficies de la cocina

Superficies	n	(+)	%
Piso del montacargas	8	4	50
Piso de refrigerador de carnes y lácteos	3	2	66
Repisa de refrigerador de carnes y lácteos	5	2	40
Paredes de refrigerador de carnes y lácteos	2	1	50
Piso lado derecho de refrigerador de frutas y verduras	7	2	28
Piso lado izquierdo de refrigerador de frutas y verduras	6	2	33
Paredes de refrigerador de frutas y verduras	1	1	100
Rejilla de ventilador de refrigerador de frutas y verduras	10	1	10
Paredes de refrigerador general	8	1	12
Tarja de lavado general	2	1	50
Total	52	17	32

Los estudios de laboratorio tienen valor como medio para verificar la eficacia de las acciones preventivas que se instrumenten en una cocina, especialmente dentro del S-APPCC. Por ejemplo, Cenci-Goga *et al* (2005), llevaron a cabo en la cocina de un servicio de restaurante universitario (mil comidas diarias), estudios microbiológicos para determinar patógenos (*S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella*), y recuentos de grupos indicadores (BMA, coliformes y *E. coli*) antes y después de la implementación del sistema, auxiliada con una capacitación previa de los trabajadores en el manejo sanitario

de los alimento. Los resultados mostraron una disminución significativa de *S. aureus* y *B. cereus* en muestras de alimentos incluidos cocidos y servidos calientes o fríos, así como diversas ensaladas frías. El estudio subraya los beneficios del énfasis en una capacitación con énfasis en la motivación, y en una adecuada identificación y monitoreo de los Puntos Críticos de Control.

6.3. Estudio observacional lactario

El lactario está adosado a la cocina con una extensión de 10 mts² (Figura 8), distribuidos en 3 espacios. Área blanca, dónde se prepara la leche rehidratada, el área gris que es recepción de material estéril y almacenamiento de leches en polvo, y el área de lavado y recepción de material. (Figura 9).

Existe 1 nutrióloga y 1 cocinera exclusiva para el lactario. El personal en general está capacitado y entrenado.



Figura 8. Imágenes del lactario hospital



Figura 9. Áreas de trabajo en el lactario

Se realizaron 35 visitas en un período de 16 meses donde se recolectaron 404 muestras de diversas fuentes, que con la observación de las condiciones sanitarias prevalentes en el lactario, proporcionan una imagen del escenario en el cual se gestó el brote de ETA que se comenta más adelante.

La leche rehidratada se preparaba siguiendo un diagrama de flujo (Figura 10) desafortunadamente no escrito. Todo el proceso, desde la recepción de latas de leche en polvo hasta la distribución de la leche preparada en las salas de hospitalización se encontraba relativamente bien controlado. Sin embargo, en ocasiones se cambiaba la marca de la leche en polvo sin registro alguno, coincidente en algunos casos con problemas de distensión abdominal en los

niños. El estudio observacional proporcionó una imagen muy positiva de las prácticas y operaciones, de la infraestructura y de la calidad de las materias primas. No obstante, el trabajo de laboratorio puso de manifiesto deficiencias en las prácticas sanitarias durante la preparación de las fórmulas rehidratadas y de la calidad del agua del filtro.

Por regla, se cumplían los procedimientos de higienización de las superficies de trabajo a base de hipoclorito de sodio a 200 ppm 2 veces por semana.

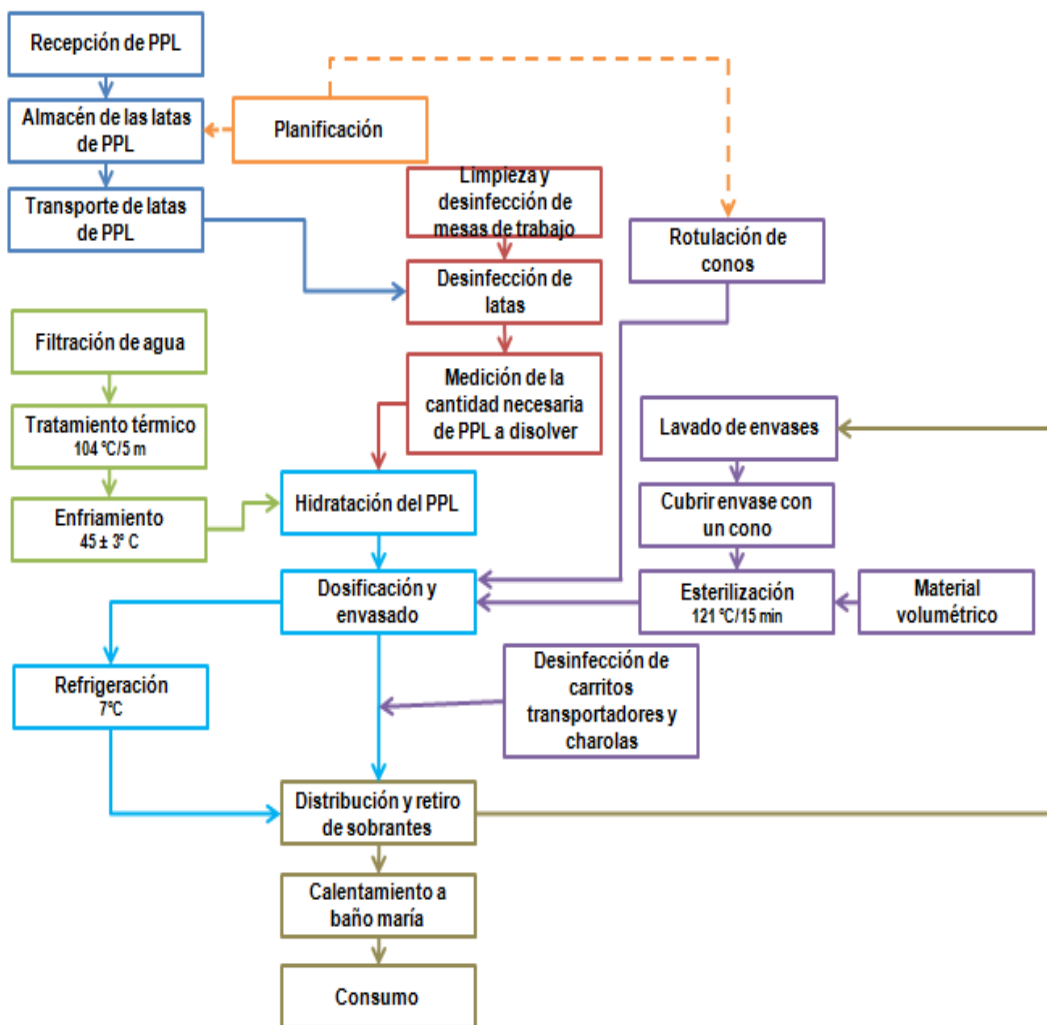


Figura 10. Proceso de preparación y distribución de leche rehidratada en el hospital.

Para rehidratar la leche, se utilizaba inicialmente agua procedente del filtro de luz UV, que posteriormente se sustituyó por agua tratada a 104°C por 5 minutos. La leche rehidratada una vez preparada permanecía hasta por 12 horas en refrigeración, condición un tanto riesgosa debido al carácter psicrótrofo de *C. sakazakii* (Nazorowec-White y Farber, 1997). Sin embargo, el componente más riesgoso, consiste en no seguir la recomendación de la OMS sobre la temperatura del agua para hidratar la leche, que debe ser 70°C (WHO, 2007).

La temperatura utilizada era de aproximadamente 45±3°C. La leche una vez preparada se almacenaba en refrigeración en un volumen de reserva de 3,000 mL, que se utilizaba a lo largo de las 12 horas y en frascos de vidrio para consumo de los niños en volúmenes de 30 a 150 mL. Diariamente se conservaba un recipiente con 100 mL de leche rehidratada para disponer de ella ante un eventual incidente. De acuerdo con lo expuesto, la presencia de *C. sakazakii* en la leche en polvo debe entenderse como un factor de riesgo considerable en la gestación de un brote de ETA. Un resumen de observaciones de interés en el lactario se ilustra en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Observaciones de 25 muestreos al lactario del hospital materno infantil desde el 24 de Julio 2009 al 30 de Julio 2010

Aspectos evaluados	Cumplimiento	Observaciones
	Si	
1. Alimentos fuente segura	25/25	Se registra lote, fecha de elaboración y caducidad de cada lata de fórmula láctea en polvo que ingresa al servicio. Son de marca definida
2. Temperatura de hidratación	0/25	La OMS recomienda hidratar a 70° C los preparados en polvo, sin embargo las temperaturas de hidratación en lactario oscilan entre los 42 y 48°C

3. Temperatura de conservación	25/25	La fórmula hidratada se prepara para las próximas 12 horas y se mantiene a 7°C.
4. Tiempo de distribución	25/25	La leche rehidratada no permanece más de 2 horas a temperatura ambiente. El tiempo de distribución hacia la sala de hospitalización es de 15 minutos aprox. Si el producto no es consumido en un lapso de 4 horas se elimina.
5. Equipo y utensilios desinfectados	25/25	Se utiliza una solución de cloro (240 y 260 ppm). 15 minutos antes de preparar las fórmulas lácteas se aplica esta solución a todas las superficies a utilizar, incluidas las latas de leche. También se desinfectan los biberones y superficies de los carros de transporte.
6. Prácticas de manejo higiénico del personal	25/25	Se aplica lavado de manos y desinfección previo a iniciar el trabajo. Se utilizan guantes estériles en cada preparación, que no se reutilizan. Sólo se ingresa con vestimenta estéril, recibiendo un traje para la jornada de mañana y uno para jornada tarde.

6.4. Incidencia de microorganismos indicadores y patógenos en el lactario del hospital

6.4.1 Bacterias indicadoras

Las leches rehidratadas preparadas en el lactario se incorporaron al estudio a partir de agosto de 2009, debido a que es un alimento destinado a una población extremadamente hipersensible, como son los recién nacidos, prematuros de bajo y de muy bajo peso al nacer.

Los grupos indicadores se utilizan para evaluar la exposición de los alimentos a diversas fuentes de contaminación, evaluar procesos de desinfección y condiciones de almacenamiento, así como de las prácticas sanitarias de operación (Fernández Escartín, 2008). Resultan especialmente convenientes en los materiales del Cuadro 25 y en particular de la leche.

Cuadro 22. Contenido de Bacterias Mesófilas Aerobias en 5 tipos de muestras colectadas en el lactario de un hospital

	n	BMA (ufc)			
		Mínimo	Media	Mediana	Máximo
Leche en polvo /g	36	<10	3 400	100	64 000
Leche hidratada/ml	83	<10	1 400 000	645	80 000 000
Superficies /cm ²	71	20	35 000	250	16 000
Materiales diversos	61	<10	150 000	1 000	6 800 000
Agua	86	<10	8 200	12	150 000
Total	334				

Tradicionalmente se ha reconocido que las leches maternizadas que se producen en el país son de excelente calidad, con contenidos de bacterias indicadoras por debajo de la norma (Fernández Escartín, comunicación personal).

Los niveles de BMA encontrados en leche en polvo son bajos (Cuadro 22). Sin embargo una vez rehidratadas tales contenidos tienden a elevarse ante violaciones a las condiciones de temperatura y tiempo a las que se conservan. Los

valores máximos se refieren principalmente a muestras de leche que estuvieron cuatro horas en la incubadora de la sala de hospitalización y que no fueron consumidas.

El nivel elevado en materiales diversos (manijas de puertas de acceso, refrigeradores y autoclave, tarjas, rejilla de aire acondicionado), se refiere principalmente a muestras de la tarja en el área de recepción y lavado. El nivel de BMA en el agua del lactario, llegó a niveles inaceptables por lo que se suspendió el uso del purificador a base de luz UV. Estos resultados fueron coincidentes con los reportes entregados por el laboratorio estatal de Salud Pública, que analiza la calidad microbiológica del agua cada 15 días.

Cuadro 23. Contenido de *Enterobacteriaceae* en 5 tipos de muestras colectadas en el lactario de un hospital

	n	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC)			
		Mínimo	Media	Mediana	Máximo
Leche en polvo /g	36	<10	461	10	6 000
Leche hidratada/ml	83	<10	207	15	3 700
Superficies /cm ²	71	10	50	15	200
Materiales diversos	61	<10	500	20	1 300
Agua/ml	86	<10	16	1	240
Total	334				

La población de *Enterobacteriaceae* en los diversos materiales muestreados confirma que se siguen buenas prácticas sanitarias de operación y en general un adecuado sistema de refrigeración de las leches preparadas (Cuadro 23).

Nuestros resultados son menores que los reportados por Palcich *et al* (2009). Esta investigadora (en 3 hospitales de Brasil) reportó que el 20% (8/60) de sus muestras de leche rehidratada contenían de 10² a 10⁵ UFC/ mL, el 5% (5/94)

de los utensilios de preparación de 10^2 a 10^5 UFC/cm², y un 67% (16/24) de los paños y esponjas de limpieza entre 10^2 a 10^6 UFC/unidad.

6.4.2 Detección de *Cronobacter* spp y *C. sakazakii*

Se siguieron 2 técnicas: cultivo y molecular.

6.4.2.1 Detección por cultivo

Según el protocolo de detección de *Cronobacter* spp y *C. sakazakii* de la FDA (2002), en ABRVG se observan características muy típicas del patógeno en relación con su extensión, elevación, consistencia y coloración (Figura 11).



Figura 11. Morfología colonial de *C. sakazakii* en agar ABRVG después de la incubación a 35°C durante 24 h.

Otro medio de aislamiento (no contemplado por la FDA) el EMB, provee una caracterización más avanzada (Figura 12).

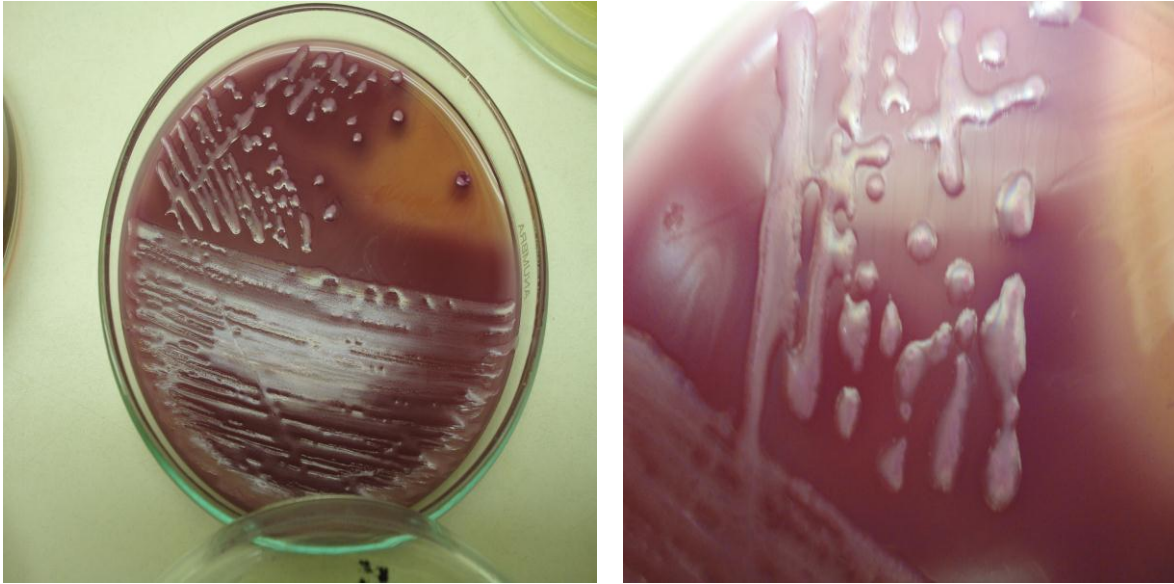


Figura 12. Morfología colonial de *C. sakazakii* en agar EMB después de la incubación a 35°C durante 24 h.

Al reincubar las colonias aisladas y sospechosas en AST a 22°C, se apreció la formación de un pigmento amarillo (Figura 13). La producción de este pigmento distingue a *Cronobacter* spp de otras enterobacterias (Farmer *et al.*, 1998).

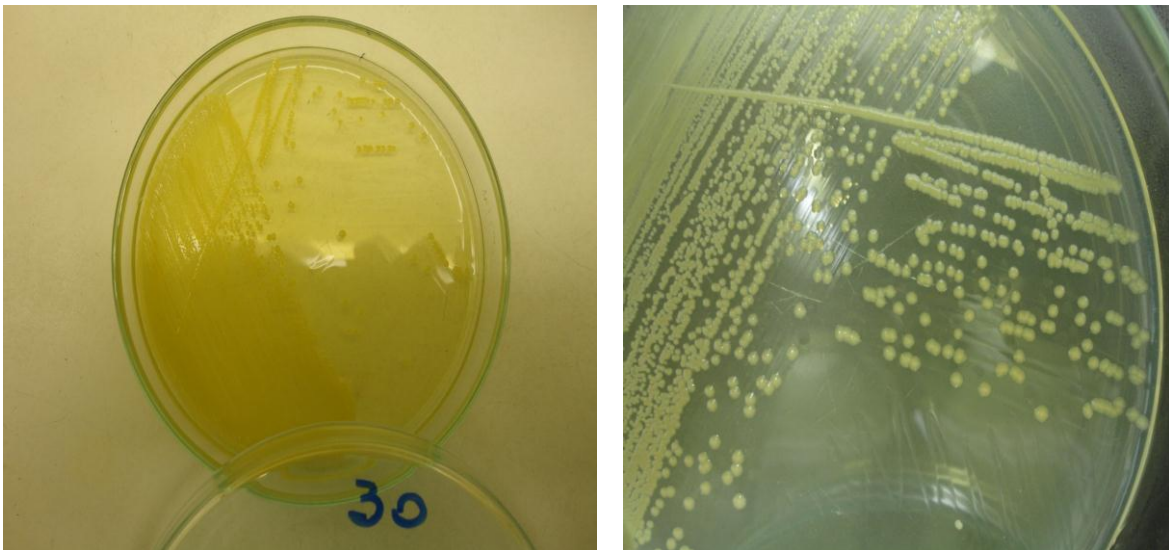


Figura 13. Producción de pigmento amarillo al someter a cepas de *C. sakazakii* a temperatura de 22°C.

Una respuesta más, la producción de un cromógeno por acción de la enzima α glucosidasa (presente en las especies de *Cronobacter* spp), le confiere a las colonias un color verde o azulado en agar cromogénico Drugann-Forsythe-Iversen (DFI) (Figura 14).

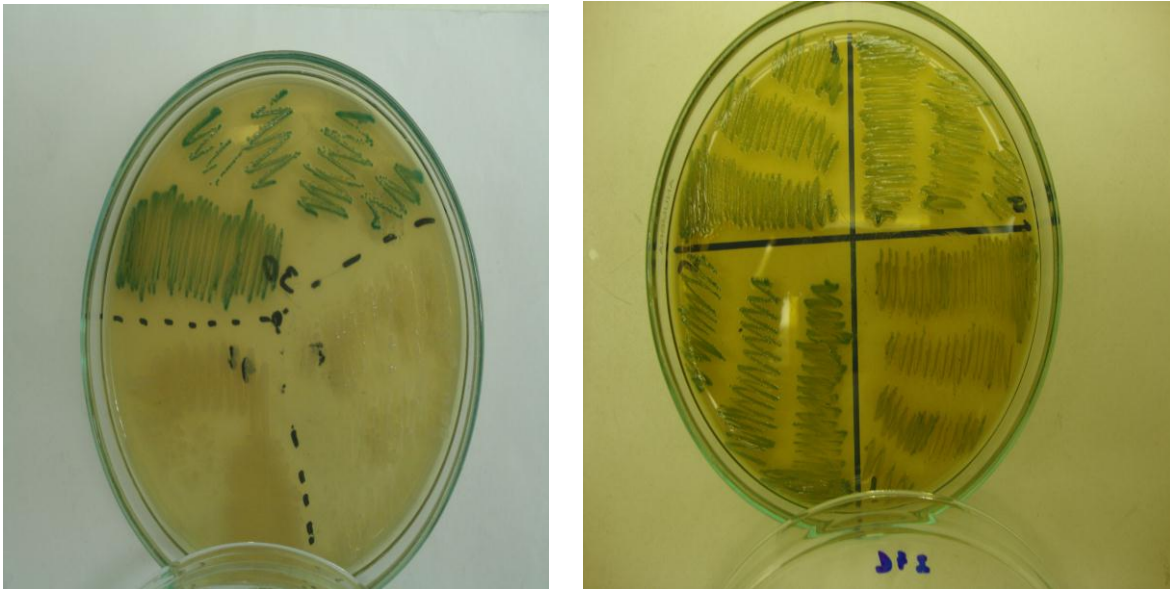


Figura 14. Reacción cromogénica por acción de la α glucosidasa en cepas de *C. sakazakii* en agar DFI.

Para fines prácticos (y como ocurre con otras bacterias como *Salmonella*), la identificación se realiza de manera que hasta una cierta etapa, se llega a la detección de “sospechoso”. La confirmación de las cepas se llevó a cabo recurriendo a la prueba molecular de PCR. De acuerdo con algunos investigadores (Lehner *et al.*, 2004) se ha logrado un nivel de especificidad y de sensibilidad con esta prueba, suficiente para la identificación definitiva (Stoop *et al.*, 2009).

6.4.2.3. Confirmación mediante pruebas metabólicas

La identificación fenotípica clásica de *C. sakazakii* se basa en la descripción de la 1° clasificación de *Cronobacter* (Iversen *et al.*, 2007) y posterior reclasificación (Iversen *et al.*, 2008). Debido a que recientemente han aparecido cepas confirmadas como *C. sakazakii* mediante pruebas moleculares, las cuales no se comportan metabólicamente como las cepas clásicas (El-Sharoud *et al.*, 2009), extendimos la investigación sobre el comportamiento metabólico de las cepas aisladas.

Cuadro 24. Comportamiento de 50 cepas de *C. sakazakii* aisladas de diversas fuentes a prueba BIOLOG.

Positividad por prueba					
100%	99-95%	94 -90%	10-5%	1-4%	0%
Dextrina	b galactosa	Tween 80	i-erythritol	y-acido hidroxibutirico	itaconic acid
N- acetyl- D- glucosamine	D-mannitol	L-arabinosa	α-acido hidroxibutirico	L-leucine	sebacic acid
D-fructose	D-manosa	cellobiose	α-keto butyric acid	L-pyrogutamic acid	succinamic acid
α-D-glucosa	D-sorbitol	gentobiosa	α-keto glutaric acid		D,L-carnitine
Maltosa	D-acido gluconico	D-melibiose	α-keto valeric acid		phenyl ethylamine
β-methyl D-glucoside	L-alanina	D- raffinose	Hidroxy L-proline		2,3-butanediol
D-psicose		L-rhamnose	γ-amino butyric acid		2,3-butanediol
D-trehalose		sucrosa	2-amino etanol		
metil piruvato		mono -methyl succinate			
Glicerol		mono -methyl succinate			
		D,L-acido lactico			
		Acido succinico			

		Bromo succinic acid			
		alaninamide			
		D-alanina			
		L-alanyl glycine			
		L-asparagina			

Inicialmente la prueba fundamental de identificación de *Cronobacter* spp, era la producción de α glucosidasa (Iversen *et al.*, 2007), y para tal efecto se recomendaba la utilización del sistema Api 20E (Lempel *et al.*, 2009). Sin embargo la utilización de las pruebas metabólicas, no garantiza una identificación completa del patógeno. Gianmannco *et al* (2011), reporta que la identificación de *C. sakazakii* mediante el API 20E no es definitiva. En consecuencia caracterizamos metabólicamente 50 cepas con las 92 pruebas bioquímicas de las placas Biolog™. El cuadro 24, muestra en términos de positividad los resultados de la prueba .La principal diferencia en nuestras cepas con la caracterización clásica de Iversen *et al* (2008), fue la utilización del sorbitol por el 99-95% de las cepas de *C. sakazakii*. Esta información puede contribuir a mejorar el nivel de confiabilidad en la identificación y confirmación de las cepas sospechosas.

6.4.2.4 Evaluación de la detección molecular de *Cronobacter* spp (PCR)

Previo al uso de los iniciadores para la detección de *Cronobacter* spp en fórmulas lácteas, superficies, agua y materia fecal por PCR, se realizaron pruebas de sensibilidad y especificidad. Se utilizó como control positivo la cepa ATCC 51329, donada por el CIATEJ de Guadalajara, México. (*C. muytjensii*).

Se utilizaron los iniciadores Esakf y Esakr, siguiendo la técnica de Lehner *et al* (2004). Inicialmente no fue posible detectar a *Cronobacter* spp. Se evaluó la prueba con el fin de ajustar las concentraciones de los iniciadores y de la enzima Taq polimerasa. Finalmente, las mejores condiciones se ajustaron al elevar la concentración de iniciadores de 1 pM a una concentración de 1 μ M, con la adición

de 0.5 U de Taq polimerasa y 0.2µl de buffer 5x por reacción, el cual originaba un amplicón a 929 pb (Figura 15).

El nivel mínimo de detección en cultivo puro en CST fué en 10^4 UFC por mL, lo que equivale a 10 UFC por µL. Este resultado es concordante con la experiencia de Cawthorn *et al* (2008).

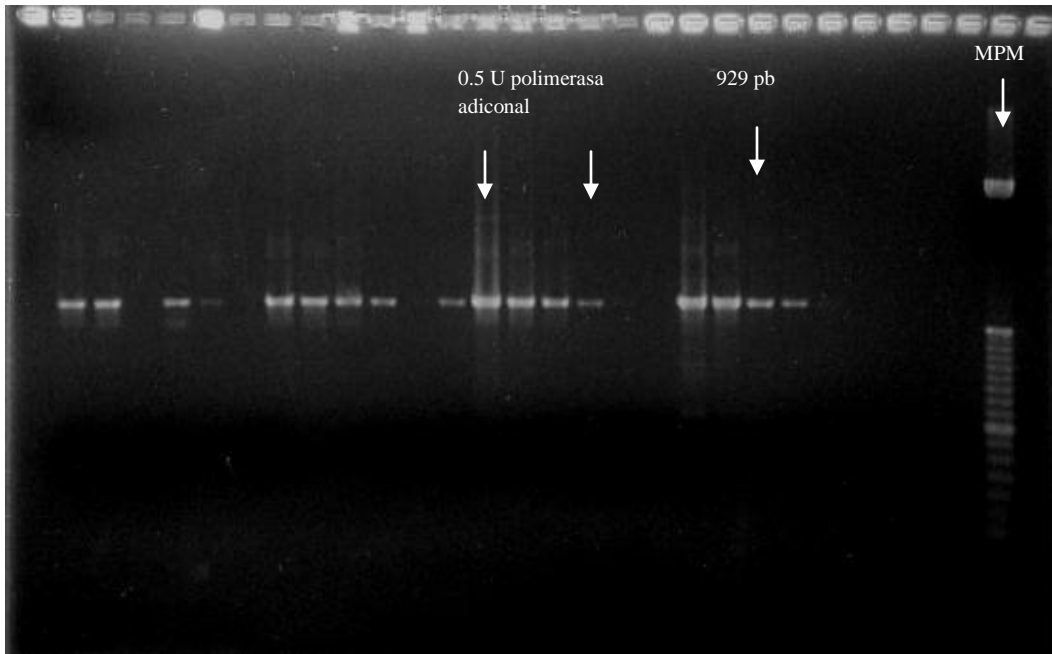
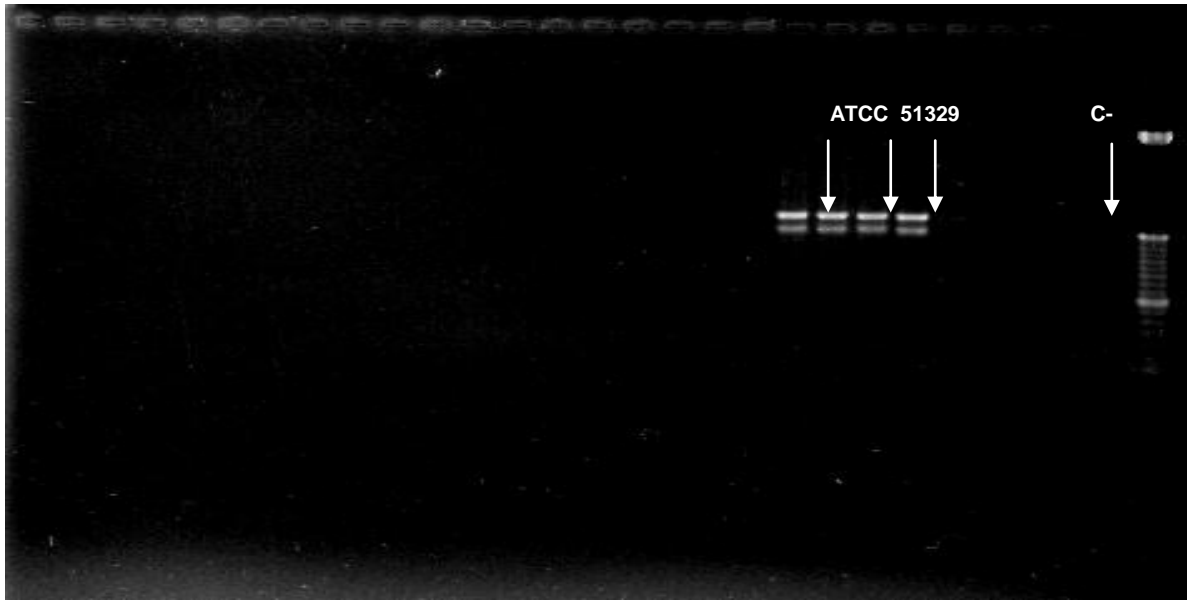


Figura 15. Ajuste de iniciadores Esakf y Esakr con 4 niveles adicionales de Taq polimerasa, 0,5 U, 1 U, 1,5 U y 2 U.

Cawthorn *et al* (2008), reportaron la valoración de todos los iniciadores disponibles en el mercado para detectar *Cronobacter* spp. Los iniciadores Esakf y Esakr, presentaban un 92% de especificidad y mostraban el mejor nivel de detección e identificación de cepas de *Cronobacter* spp. Propusieron combinar el uso de los iniciadores con el medio cromogénico para mejorar su identificación.

El estudio de especificidad de los iniciadores se realizó con 18 cepas de referencia y no hubo otros productos de amplificación (Figura 16).



1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
 Distribución: 1.espacio libre, 2 *Bacillus cereus*, 3 *Bacillus subtilis*, 4 *Bordetella bronchiséptica*, 5 *Enterobacter aerogenes*, 6 *E.coli enterotóxigenica* ,7 *E. coli* O157:H7 , 8 *Klebsiella pneumoniae* , 9 *Listeria inocua*, 10 *Listeria monocytogenes* Scott A, 11 *Proteus mirabilis*, 12 *Pseudomonas aeruginosa*, 13 *Salmonella abaetetuba*, 14 *Salmonella* Thompson, 15 *Serratia marcescens* no pigmentada, 16 *Shigella flexneri*, 17 *Staphylococcus aureus*,18 *E coli* ATCC 8739 , 19 C -, 20 a 28 *Croobacter muytjensii*(ATCC 51329), 29 MPM.

Figura 16. Especificidad de iniciadores Esakf y Esakr para detección de *Cronobacter* spp.

Ante la eventualidad de interferencia en la reacción de PCR debido a sustancias presentes en las muestras, evaluamos el efecto de la materia fecal en la detección de *Cronobacter* spp. En el diseño del estudio se incluyeron el nivel del inóculo, el tiempo de incubación en Caldo Mossel (EE), y el tiempo de incubación en CST (Cuadro 25).

Cuadro 25. Detección de *Cronobacter* spp por PCR en materia fecal de niños hospitalizados inoculada con 10 y 200 células en 30 horas e incubado a 35° C.

Subcultivo en CST por 24 horas

Nivel inóculo (células)	horas	Caldo Mossel (EE)	6 h	12 h	18 h	24 h
10	6	-	-	+	-	-
	12	-	-	-	-	-
	18	-	+	+	-	-
	24	+	++	-	-	-
	30	++	-	-	-	-
200	6	-	-	++	-	-
	12	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-
	30	++	-	-	-	-

++++= banda con intensidad alta
 +++ = banda con intensidad mediana
 ++ = banda con intensidad baja
 + = banda con intensidad muy baja
 - = banda negativa

El patógeno se detectó a las 24 horas previo enriquecimiento en CEE Mossel o resemebrando a las 6 horas un subcultivo de CST.

6.4.3 Incidencia de *Cronobacter* spp por PCR en leche en polvo, leche rehidratada, superficies, agua y materia fecal.

La OMS y OPS (2004), elaboraron la guía “*Enterobacter sakazakii* y otros microorganismo para los preparados en polvo para lactantes”, poniendo en evidencia el interés que el patógeno había adquirido en los últimos años.

La existencia de brotes por esta bacteria con su elevada letalidad, hasta 80% (Lai *et al.*, 2001), su asociación con el consumo de leche rehidratada como vehículo de infección, y el desconocimiento de las fuentes y mecanismos de contaminación, nos indujo a investigar ampliamente al patógeno en el lactario.

En consecuencia, la investigación se extendió más allá de la incidencia y se implementó su cuantificación en leche en polvo, leche hidratada lista para el consumo, medio ambiente en el lactario del hospital y en la materia fecal de los niños. La información resulta esencial para la Evaluación de Riesgos (OMS, 2004).

Como medio de preenriquecimiento (ampliamente evaluado para *Cronobacter* spp), se recurrió a la leche descremada. Dos señalamientos justifican esta elección: conserva la viabilidad del patógeno hasta por 2 años, y se utiliza exitosamente para revitalizar células estresadas (Forsythe *et al.*, 2009).

Inicialmente se identificó *Cronobacter* spp por PCR en todas las muestras. Las pruebas bioquímicas utilizadas (sorbitol, ornitina descarboxilasa, lisina descarboxilasa, producción de indol y producción de α glucosidasa) (Iversen *et al.*, 2008), no eran concluyentes, aún cuando la morfología era muy típica.

Las cifras de positividad en leche en polvo (30.6%), es similar a la descrita por otros autores (WHO-OPS, 2008). Sin embargo, encontramos cifras elevadas en leche hidratada, superficies, materiales diversos y agua (Cuadro 26). Situación un tanto extraña, que contrasta con los escasos incidentes de enfermedad que se registran.

Cuadro 26. Identificación por PCR de cepas de *Cronobacter* spp aisladas de muestras que resultaron positivas por cultivo.

Muestras	n	Positivos	%
Leche en polvo	36	11	30.6
Leche hidratada	83	45	54.2
Superficies	71	51	71.8
Materiales diversos	55	41	74.5
Agua	57	17	29.8
M. fecal	102	26	25.5
Total	404	191	47.2

La cuantificación de *Cronobacter* spp en las muestras de leche en polvo y leche rehidratada, es fundamental para estimar el nivel de exposición al patógeno por los niños que consumían el producto. Los niveles encontrados en nuestro estudio (Cuadro 27), fueron superiores a los reportados por Healy (2010) con 0.22 a 1.61 CFU/100g y Palcich *et al* (2009), con 0.3 NMP/100 g.

Cuadro 27. Contenido mínimo, máximo y promedio de *Cronobacter* spp en 5 tipos de muestra colectadas en el lactario de un hospital

Muestra	n	NMP			
		Mínimo	Media	Mediana	Máximo
Leche en polvo/g	10	0.0079	0.014	0.136	0.33
Leche hidratada/ml	39	0.0051	13	0.094	24
Superficies/cm ²	10	0.19	96.2	0.8	240
Materiales diversos	12	0.012	89.05	6.8	240
Agua/ml	1	-	-	-	> 2.4
Total	72				

Friedemann (2009) en una recopilación sobre *Cronobacter* spp de diferentes países del Sistema Europeo de Alerta Rápida para Alimentos y Bebidas (RASFF), consigna *Cronobacter* spp en leches en polvo producida en Alemania (2002) y distribuida en Bélgica con 4 UFC/100g, en leche producida en Holanda (2007) y distribuida en Alemania, Austria, Luxemburgo, España y Eslovenia con 3 UFC/100g y en Alemania (2007) y distribuida en Austria, República Checa, Eslovaquia, Croacia y Eslovenia con 3.6 UFC/100g. Hay que reconocer que la presencia del germen en este alimento no es del todo excepcional, si bien, como se indicó, en concentraciones muy reducidas.

La cuantificación de *Cronobacter* spp en superficies de trabajo en el lactario pone de manifiesto el riesgo potencial de recontaminación de los productos que allí se preparan.

6.4.4 Evaluación de la detección de especies de *Cronobacter* spp por PCR

Esclarecida la magnitud de la incidencia y grado de contaminación de *Cronobacter* spp en la leche y ambiente del lactario, el estudio se extendió a la identificación de las otras especies de este patógeno por medio de la amplificación de la región *rpoB* (Stoop *et al.*, 2009). Realizamos pruebas de especificidad de los iniciadores con cinco especies del género *Cronobacter* spp, logrando una buena amplificación por cada especie siendo esto confirmado con cepas ATCC.

Con mayor atención nos centraremos en la especie *C. sakazakii*, típicamente asociada con los procesos infecciosos que se han descrito en los lactantes. Se utilizaron los iniciadores Csakf y Csakr, diseñados por Stoop *et al* (2009). Amplifican secuencias específicas que codifican el gen de expresión β de la polimerasa (*rpo β*) generando un amplicón a 514 pb (Figura 17). Se realizaron pruebas para evaluar su especificidad en muestras de leche en polvo utilizada en el lactario (Figura 18), con excelente resultado. Se incluyeron 2 cepas ATCC de *C. sakazakii*, donadas por la Dra. Ariadna Cruz, del Hospital Federico Gómez de ciudad de México.

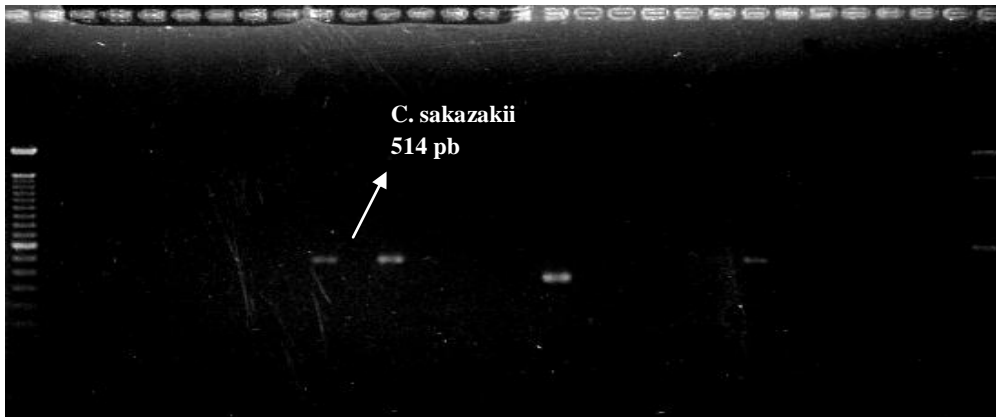


Figura 17. Prueba de especificidad para detección de *C. sakazakii*



Figura 18. Amplificación de *C. sakazakii* en una muestras de leche en polvo

6.4.5 Incidencia de *C. turicensis*, *C. malonaticus*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. genomoespecie* y de *C. sakazakii* en leche en polvo, leche rehidratada, agua, superficies y materia fecal de niños por PCR

Todas las cepas confirmadas como *Cronobacter* spp, se sometieron a su vez, a una confirmación para cada una de las especies de *Cronobacter* spp.

Del total de muestras, la mayor positividad fue para *C. dublinensis* con un 32%, aislado principalmente de superficies, leche hidratada y agua. *C. malonaticus* con un 16%, en superficies, leche hidratada y materia fecal. *C. turicensis* con un 4% sólo en superficies y *C. muytjensii* en un 2% en leche rehidratada, superficies y materia fecal (Cuadro 28). Estos resultados son coincidentes por lo reportado por Iversen *et al.*, 2008. No se comprobó la presencia de *C. genomoespecie*.

Cuadro 28. Incidencia de 5 especies de *Cronobacter* spp según tipo de muestra e identificadas por *rpoB*-PCR

Especies							
Muestra	<i>Cronobacter</i> spp	<i>C.</i> <i>turicensis</i>	<i>C.</i> <i>malonaticus</i>	<i>C</i> <i>dublinensis</i>	<i>C</i> <i>muytjensii</i>	<i>C.</i> genomoespecie	no identificadas
Leche en polvo	23	0	2	1	0	0	6
Leche hidratada	55	0	15	13	1	0	15
Superficies	185	15	16	68	4	0	47
Agua	17	0	7	9	0	0	1
Materia fecal	71	0	17	23	2	0	9
Total	351	15	57	114	7	0	78

C. sakazakii se confirmó en un 23% (Cuadro 29). La mayor frecuencia se detectó en leches y materia fecal. Este hallazgo es preocupante en la medida que sugiere una exposición constante al patógeno por parte de los niños hospitalizados y su excreción, aunque sin evidencias de enfermedad. Como patógeno emergente y oportunista, debe reconocerse la eventualidad de detección en ausencia de enfermedad.

Cuadro 29. Distribución de *C. sakazakii* según tipo de muestra

Muestra	n	<i>Cronobacter</i> spp	<i>C. sakazakii</i>	%
Leche en polvo	36	23	11	48
Leche hidratada	83	55	17	31
Superficies	126	185	35	19
Agua	57	17	0	0
Materia fecal	102	71	17	25
Total	404	351	80	23

Entre 351 cepas de *Cronobacter* spp identificadas de diferentes fuentes, 80 correspondieron a la especie de *C. sakazakii* (Cuadro 29). En ningún caso el agua resultó positiva. Superficies, leche hidratada y materia fecal fueron la que mostraron la mayor frecuencia. Estas cepas fueron utilizadas posteriormente para extender la investigación fenotípica (BIOLOG) y genética (EGCP).

Puede reconocerse como natural que *Cronobacter* spp muestre frecuencias elevadas en las superficies y aún en la materia fecal, toda vez que se trata de niveles cuantitativos muy discretos. Más preocupante es el hecho de que en muchos casos la especie *C. sakazakii* forme parte de esa flora coliforme, si bien numéricamente reducido.

Las 21 muestras de superficies del lactario (Cuadro 30), fueron positivas a *C. sakazakii*, evidencia de su amplia distribución y posibles reservorios en el lactario, condición que puede asociarse a su capacidad para formar biopelículas (Kim *et al.*, 2006).

Cuadro 30. Distribución de cepas de *C. sakazakii* aisladas de diversas superficies

Superficies	muestras	cepas
Carro transportador sala	2	3
Charola interior refrigerador	1	1
Manijas entrada área blanca	2	3
Manijas refrigerador área blanca	3	4
Mesa área sucia	4	9
Mesa escritorio área gris	1	2
Mesa preparación lado derecho	3	6
Mesa preparación lado izquierdo	2	2
Rejilla aire acondicionado	1	1
Tarja área sucia	2	4
Total	21	35

Fue adicionalmente detectado en todas las leches de uso común en el lactario (Cuadro 31). Los tratamientos de desinfección de las superficies, de la leche rehidratada y una baja temperatura de refrigeración $\leq 4^{\circ}\text{C}$, resultan decisivas para garantizar la inocuidad de la leche.

Cuadro 31. Muestras de leche hidratada positivas a *C. sakazakii*

Leches hidratadas	positivos	Cepas
leche polimérica	1	1
leche prematuros	1	6
leche etapa 1	2	10
Total	4	17

6.5 Caracterización de cepas de *C. sakazakii*

6.5.1 Perfil de resistencia a antibióticos

El 39% de las cepas estudiadas resultó resistente a más de 2 antibióticos (Cuadro 32). Merece estudios más a fondo el hecho de descubrir cepas resistentes aisladas de la leche en polvo es decir de una fuente externa al hospital.

El tratamiento con antibióticos como kanamicina y ampicilina, que generalmente se administra a los niños recién nacidos con algún factor de riesgo materno (vaginitis, placenta previa, antecedentes de infecciones urinarias), puede proteger contra infecciones por *C. sakazakii*. Su abuso o uso indiscriminado, favorecería la selección de cepas resistentes en el ambiente hospitalario.

Algunas características sobre la resistencia de las cepas a los antibióticos, su similitud genética y su fuente de aislamiento, merecen ser destacadas.

Cuadro 32. Perfil de resistencia a antibióticos de cepas de *C. sakazakii* según fuente de aislamiento

Fuente de cepa	Perfil	LEV(5 µg)	FEP(30 µg)	CF (30 µg)	CTX (30 µg)	SXT (25 µg)	AM (10 µg)	CRO (30 µg)	NF (300 µg)	NET (30 µg)	GE (10 µg)	AK (30 µg)	CL (30 µg)
Leche en polvo	Sensible	14	13	1	12	13	5	12	6	14	13	14	14
	Intermedio	0	0	0	1	0	2	2	4	0	1	0	0
	Resistente	0	1	13	1	1	7	0	4	0	0	0	0
	Total	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
Leche rehidratada	Sensible	11	10	4	8	9	6	8	6	11	11	11	11
	Intermedio	0	0	1	2	0	1	3	1	0	0	0	0
	Resistente	0	1	6	1	2	4	0	4	0	0	0	0
	Total	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Superficies	Sensible	35	26	16	26	32	17	26	32	35	35	35	35
	Intermedio	0	1	4	2	0	6	5	0	0	0	0	0
	Resistente	0	8	15	7	3	12	4	3	0	0	0	0
	Total	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35

Materia fecal	Sensible	17	15	5	11	14	3	11	10	17	15	17	17
	Intermedio	0	0	4	3	0	1	3	4	1	1	2	0
	Resistente	3	5	11	6	6	16	6	6	2	4	1	3
	Total	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Todas	Sensible	77	64	26	57	68	31	57	54	77	74	77	77
	Intermedio	0	1	9	8	0	10	13	9	1	2	2	0
	Resistente	3	15	45	15	12	39	10	17	2	4	1	3
	Total	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80

LEV levofloxacino, FEP Cefepime, CF Cefalotina, CTX Cefotaxima, SXT Trimetoprim-Sulfametoxazol, AM Ampicilina, CRO Ceftriaxona , NF Nitrofurantoína, NET Netilmicina, GE Gentamicina, AK Amikacina, CL Cloranfenicol

El 49% de las cepas se comportan resistentes a ampicilina, antibiótico del primer esquema de tratamiento, y 56% resistentes a cefalotina, antibiótico del segundo esquema que se sigue en el hospital. Otro hecho relevante es la resistencia que presentan las cepas aisladas de superficies y materia fecal a cefatoxima (19%), antibiótico betalactámico de última generación, hecho que sugiere la producción de betalactamasas, y que debe ser motivo de monitoreo, como lo recomienda la OMS (2007).

El Cuadro 33 evidencia que las cepas resistentes a más de 7 antibióticos provienen de la materia fecal y las sensibles a leches y superficies.

Cuadro 33. Frecuencia de cepas de *C. sakazakii* aisladas de 4 fuentes según número de antibióticos a los que mostraron resistencia

N° antibióticos	n° de cepas resistentes	Fuente de aislamiento			
		Leche hidratada	Leche en polvo	Superficies	Materia fecal
0	20	4	1	14	1
1	16	1	5	6	4
2	13	3	4	3	3
3	18	1	3	9	5
4	6	2	0	2	2
5	3	0	1	1	1
7	1	0	0	0	1
8	3	0	0	0	3

6.5.2 Electroforesis en Gel por Campos Pulsados de *C. sakazakii*

Aunque la diferenciación entre *Cronobacter* spp y *C. sakazakii* permite valorar el nivel del peligro implicado en los alimentos y en el medio ambiente del lactario, una identificación más refinada es requerida para rastrear la fuente de contaminación del patógeno identificado en un alimento como vehículo en algún brote de enfermedad. Este problema se resuelve actualmente haciendo uso de pruebas moleculares que permiten la identificación de diferentes clonas dentro de las cepas aisladas a propósito del brote (Tauxe, 2006).

Inicialmente se utilizó la técnica descrita por Mullane *et al* (2007), que dió lugar a imágenes mal definidas (Figura 19). La situación no mejoró después de algunos ajustes en los protocolos sugeridos por otros autores (Molloy *et al.*, 2009; Rabid-El Benour *et al.*, 2009).

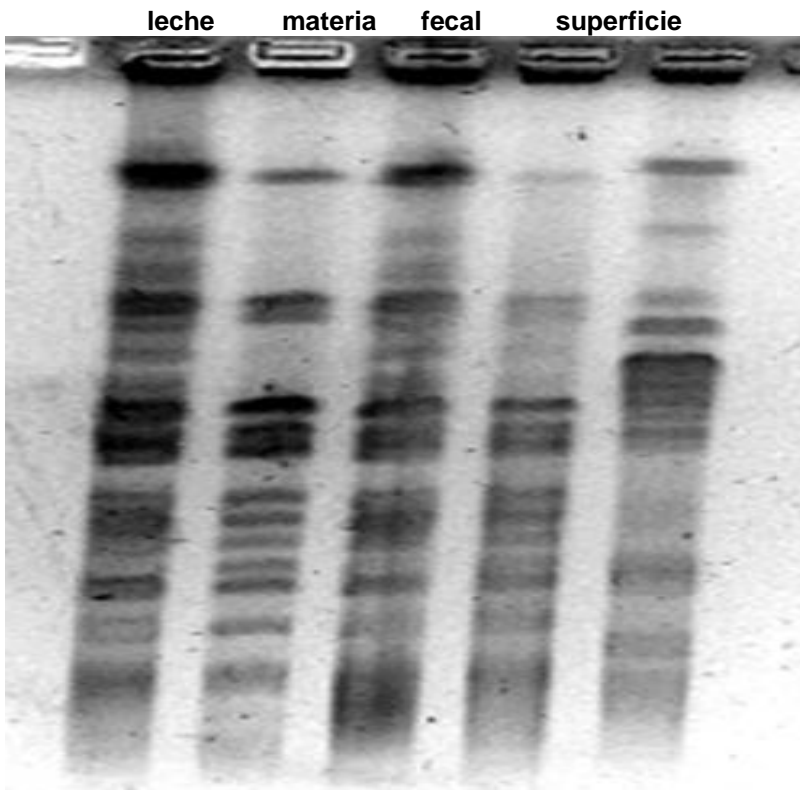


Figura 19. Similaridad genética entre cepas de *C. sakazakii* aisladas del brote utilizando el protocolo del CDC (Pulsenet, 2010).

Se recurrió a la Unidad de Epidemiología Diagnóstica del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos con una estancia del estudiante por una semana para valorar la técnica (Kaufmann *et al.*, 2005) (Figura 20).

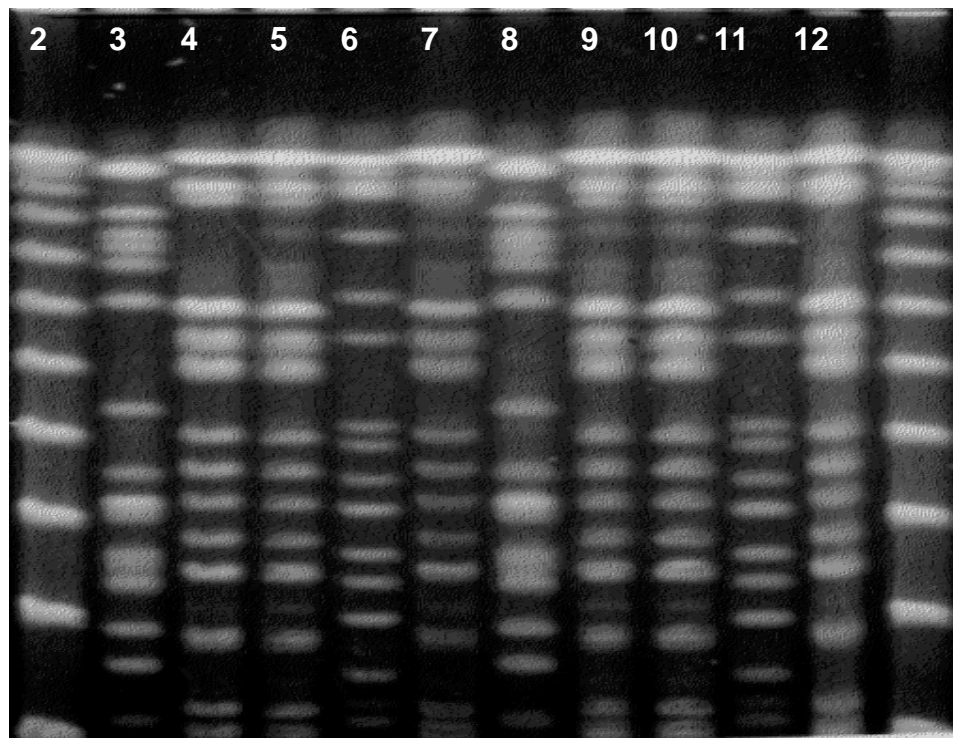
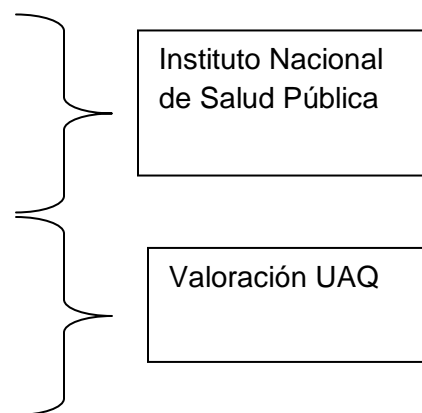


Figura 20. Valoración preliminar de la técnica de EGCP para 5 cepas de *C. sakazakii*.

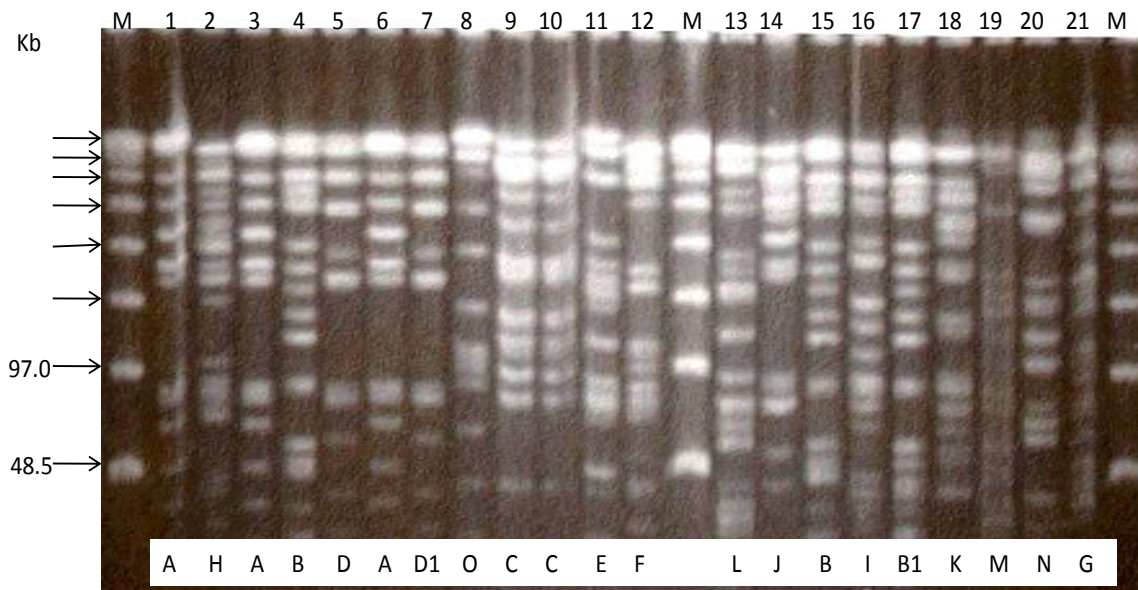
1. MPM
2. 8703 Materia fecal 2 aislada 24/01/2010
3. 8706 Materia fecal 1 aislada 24/01/10
4. 8709 Materia fecal 2 aislada 24/01/10
5. 8711 Materia fecal RN (asintomático), aislada 28/6/2010
6. 8712 Leche hidratada consumida brote
7. 8703 Materia fecal 2 aislada 24/01/2010
8. 8706 Materia fecal 1 aislada 24/01/10
9. 8709 Materia fecal 2 aislada 24/01/10
10. 8711 Materia fecal RN (asintomático) aislada 28/6/2010
11. 8712 Leche hidratada consumida brote
12. MPN



Como se ha señalado, el origen de la contaminación usando métodos genotípicos, conocido como rastreo molecular (Scott *et al.*, 2002),

permite establecer un nexo entre la fuente o reservorio de un patógeno y su presencia en alimentos y en las personas enfermas.

La imagen permite poner de manifiesto la similitud, como ocurre con las cepas de la 5 a la 8 y de la 15 a la 18 (Figura 21). Se hacen muy evidentes en el dendrograma de la Figura 22, donde las similitudes genéticas llegan al 100%.



PFGE DE *C. sakazakii* digeridas con XbaI

Carriles M, marcador lambda de peso molecular.

Carril 1 (cepa 8732), carril 2 (cepa 8734), Carril 3 (cepa 8736), carril 4 (cepa 8740), Carril 5 (cepa 8744), carril 6 (cepa 8748), Carril 7 (cepa 8745), carril 8 (cepa 8756), Carril 9 (cepa 8757), carril 10 (cepa 8759), Carril 11 (cepa 8760), carril 12 (cepa 8761), carril 13 (cepa 8764), Carril 14 (cepa 8766), carril 15 (cepa 8767), carril 16 (cepa 8770), Carril 17 (cepa 8775), carril 18 (cepa 8777), Carril 19 (cepa 8779), carril 20 (cepa 8782), carril 21 (cepa 8784).

SEGUNDO ENVÍO

Figura 21. Imagen EGCP de 23 cepas de *C. sakazakii* de leche en polvo, leche rehidratada, ambiente y materia fecal aisladas fuera del brote.

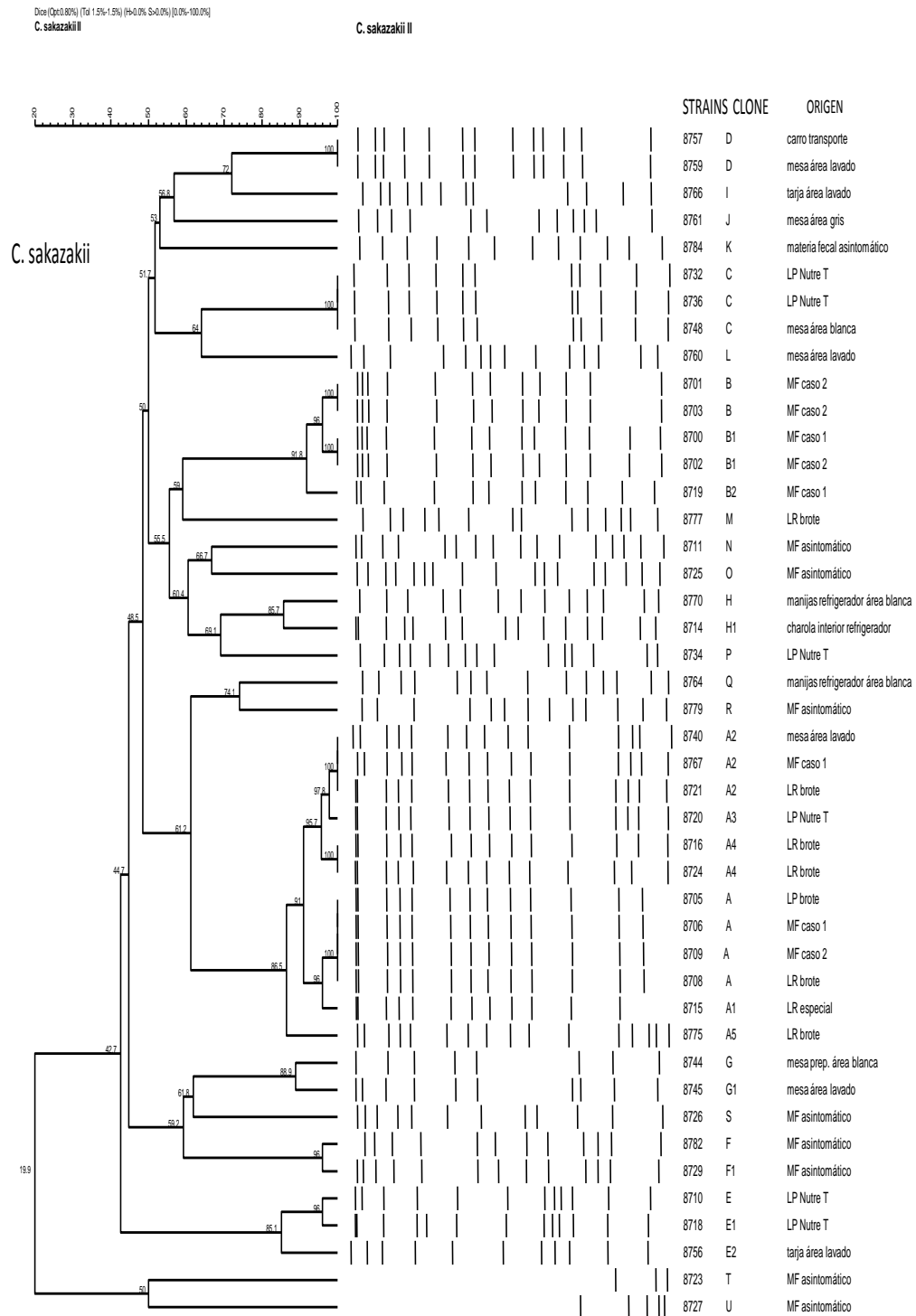


Figura 22. Dendrograma de 46 cepas de *C. sakazakii* aisladas durante el muestreo.

Es posible confirmar la presencia de varios grupos clonales de *C. sakazakii* dentro del mismo genotipo: el grupo clonal D presente en el carro de transporte y mesa área de lavado (cepas 8757 y 8759), el grupo clonal C en la mesa área blanca y leche en polvo (8732, 8736 y 8748), grupo clonal G en la mesa área blanca y mesa área lavado (cepas (8744 y 8745) y en grupo E en la leche en polvo y tarja en área de lavado (8710, 8718 y 8756) (Figura 22). Estas relaciones constituyen evidencia de posibles reservorios, y de ahí la eventual fuente de contaminación del patógeno a las leches rehidratadas cuando se preparan en el lactario.

Si analizamos el grupo clonal con el perfil de resistencia a antibióticos, encontramos que la cepa 8732 aislada de LP presenta el mismo perfil de resistencia que las cepas 8720 y 8740 que comparte con 3 cepas aisladas durante el brote (8705, 8724, 8709). De manera interesante se encontró similitud genética y de resistencia a antibióticos en las cepas 8720 y 8740. La primera fue aislada de leche en polvo y la segunda de la superficie de la mesa de lavado. Otro tanto ocurre con las cepas 8710 y 8718, ambas recuperadas de leche en polvo (Cuadro 34).

Las cepas 8744 aislada de la mesa de preparación del área blanca y la 8745 de la mesa del área de lavado son genéticamente iguales y sensibles a todos los antibióticos probados.

Cuadro 34. Perfil de resistencia a antibióticos de cepas aisladas durante el estudio según fuente y grupo clonal

Cepas	Fuente	Grupo clonal	Perfil de Resistencia a antibióticos
8715	LR	A.	
8720	LP	A	CF, AM, NF
8740	Mesa área lavado	A	CF, AM, NF
8732	LP	C	CF, AM, NF
8736	LP	C	CF
8748	Mesa area blanca	C	AM, CF
8757	Carro transporte	D	SXT, AM
8759	Mesa area lavado	D	CF, SXT, AM
8710	LP	E	CF
8718	LP	E	CF
8756	Tarja area lavado	E	
8782	MF asintomático	F	FEP, AM
8729	MF asintomático	F	CF, SXT, AM
8744	Mesa area blanca	G	
8745	Mesa area lavado	G	
8770	Manijas refrigerador AB	H	
8714	Charola refrigerador AB	H	CF
8766	Tarja area lavado	I	
8761	Mesa area gris	J	
8784	MF asintomático	K	CF, CTX, AM

Cepas	Fuente	Grupo clonal	Perfil de Resistencia a antibióticos
8760	Mesa area lavado	L	
8711	MF asintomático	N	CF, AM, NET, CL
8725	MF asintomático	O	LEV, FEP, CF, CTX, SXT, AM, CRO, GE
8734	LP	P	CF, AM
8764	Manijas refrigerador AB	Q	CF
8779	MF asintomático	R	
8726	MF asintomático	S	SXT, AM
8727	MF asintomático	U	FEP, CRO, AK

LEV Levofloxacino, FEP Cefepime, CF Cefalotina, CTX Cefotaxima, SXT Trimetoprim-Sulfametoxazol, AM Ampicilina, CRO Ceftriaxona, NF Nitrofurantoína, NET Netilmicina, GE Gentamicina, AK Amikacina, CL Cloranfenicol.

6.6 Estudio del brote por *C. sakazakii*

Desde su clasificación inicial como *E. sakazakii* (Farmer, 1980), este patógeno ha estado asociado a varios casos de infecciones neonatales con altas tasas de letalidad y secuelas crónicas. A la fecha 150 casos han sido descritos afectando principalmente al cerebro y aparato digestivo (Friedemann, 2009). Basado en los datos del CDC, se estima que al año se producen 6 casos nuevos por *Cronobacter* spp en el mundo. Sin embargo, esta estimación no tiene en cuenta el número de identificaciones erróneas (falsos negativos) que pueden ocurrir por cepas de *Cronobacter* spp (Friedemann, 2009).

Después de 12 meses de iniciado nuestro estudio se presentó un incidente con 2 casos de enteritis hemorrágica que fue motivo de investigación.

El estudio prospectivo que realizamos permitía disponer de información sobre la microbiología de la leche y del ambiente que prevalecían en el lactario del hospital. Tal circunstancia nos colocó en una situación muy favorable para estudiar oportunamente los factores que hubieran contribuido al incidente de diarrea. Datos acumulados al episodio mostraron que la incidencia de *C. sakazakii* en PIF del lactario era de 23%. De acuerdo con Friedemann (2009), la fuente principal de *C. sakazakii* en casos de infección neonatal ha sido LP contaminada, tanto en brotes como en casos esporádicos.

6.6.1 Detección de casos

Se mantuvo una vigilancia durante 12 meses en los niños hospitalizados para detectar oportunamente cuadros diarreicos (Cuadro 35). Se muestreó leche en polvo, leche hidratada lista para el consumo, ambiente y materia fecal de niños. La información generada con un enfoque prospectivo, permitió una hipótesis más clara respecto de la configuración del brote. Situación única ya que generalmente los estudios de brotes de ETAs son retrospectivos y por tanto se debe simular, con su margen de incertidumbre, las situaciones que propiciaron el evento. Un aspecto fundamental fue la excelente coordinación que se estableció con la unidad de epidemiología y la unidad de nutrición del hospital.

Cuadro 35. Casos de diarrea positivos a *Cronobacter* y a *C. sakazakii* en niños hospitalizados entre mayo 2009 y mayo 2010

Hospitalizados	Diarreas			
	(+) <i>Cronobacter</i>	%	(+) <i>C.sakazakii</i>	%
230	4	1.7	3	1.3

La incidencia de diarrea fue muy baja. De los 3 casos de diarrea positivos a *Cronobacter* spp 3 correspondían a la especie *C. sakazakii*.

El 25 de enero se informa de tres casos de diarrea mucosanguinolenta. Se muestrea leche en polvo, leche hidratada preparada en el día, leche hidratada que fue consumida por los lactantes, su materia fecal y ambiente.

Cuadro 36. Antecedentes de niños involucrados en el brote

	sexo	Peso al nacer (g)	Edad	Diagnóstico secundario	Tipo de leche	Tto. Antibióticos
Caso 1	M	2 650	5 meses	Daño cerebral-Gastrostomía	Etapa 1	Si
Caso 2	F	2 500	5 meses	Daño cerebral laringomalasia	Etapa 1	Si
Caso 3	M	2 700	6 meses	Sindrome Down	Etapa 1-Soya	Si

Todos los menores tenían antecedente de peso insuficiente al nacer, 2 con secuelas cerebrales y 1 con problema genético (Cuadro 36).

En la leche en polvo que se utilizó para preparar la leche consumida, la concentración de *C. sakazakii* fue de 0.33 NMP/g. Tres meses antes la concentración del patógeno fue de 0.26 NMP/cm² en la charola utilizada para almacenar la leche rehidratada en el refrigerador. En la leche hidratada de resguardo del mismo día que ocurrió el brote se encontró 24 NMP/mL (Cuadro 37).

Cuadro 37. Detección y cuantificación por PCR de *C. sakazakii* en leche en polvo y rehidratada.

Muestra	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>	
			Leche en polvo NMP/g	Leche rehidratada NMP/mL
Leche prematuros	+	+	-	24
Leche Etapa 1	+	+	0.33	24

De los tres casos positivos a *Cronobacter*, 2 fueron positivos a *C. sakazakii*. En el caso 3, el menor empezó 1 día antes con el cuadro diarreico. Se le reforzó el tratamiento con antibióticos, que se utilizaba para tratar la enfermedad que produjo su hospitalización, y que podría explicar una condición de falso negativo para el patógeno (Cuadro 38).

Cuadro 38. Detección de *C. sakazakii* en materia fecal

	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
Caso 1	+	+
Caso 2	+	+
Caso 3	+	-

La presencia por cultivo de *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *Shigella* y molecular de *E. coli* enterotoxigénica en leches y materia fecal resultó negativa, descartando a estos patógenos como causantes del incidente de enfermedad.

6.6.2 Configuración del brote

La temperatura del agua adicionada a la leche en polvo fue de 45°C, lejos de 70°C como recomienda la OMS (2004). En un reciente reporte de Forsythe (2009), se concluye que la inactivación del patógeno se consigue al rehidratar la leche a 70°C.

Ocasionalmente, detectamos la presencia de *Cronobacter* en muestras ambientales del lactario, tales como manijas de la puerta de acceso al lactario y del refrigerador, la tarja de lavado, y la rejilla del aire acondicionado. Sin embargo, ninguna de las cepas de *C. sakazakii* recuperadas del ambiente mostró el mismo genotipo que la cepa aislada de la leche y materia fecal de las víctimas. Deficientes condiciones higiénicas ya han sido señaladas por Friedemann (2009) como factor de contaminación por *Cronobacter* spp durante la preparación de la

leche en polvo. Una posibilidad más es la sobrevivencia del patógeno al utilizar agua a <70°C para rehidratar la leche, tal como lo han descrito Van Acker *et al* (2001) y Nazarowec-White *et al* (2007).

La concentración de *Cronobacter* spp en la leche rehidratada hasta la presentación del incidente había sido reducida, con media de 0.72 NMP/ml y límites de 0.0081 y 2.3 MPN/ml en 7 muestras y en LP entre 0.0014 y 0.25 NMP/g con media de 0.081 NMP/g para 4 muestras. *C. sakazakii* fue detectado solamente en una muestra de PIF con una concentración de 0.0079 NMP/g. En la muestra de resguardo conservada en refrigeración por 24 h, y analizada el día del evento, se detectaron 24 MPN/ml de *C. sakazakii* (Cuadro 39). El PIF utilizado para la preparación de la leche rehidratada que se consumió, mostró 0.33 NMP/g. Tal concentración podría corresponder a células que provenían de la fórmula en polvo o de una cierta multiplicación del patógeno durante el almacenamiento. Este valor es similar a lo reportado por otros autores, que oscilan entre 0.002 y 0.92 NMP/gr (Fanning y Forsythe, 2008).

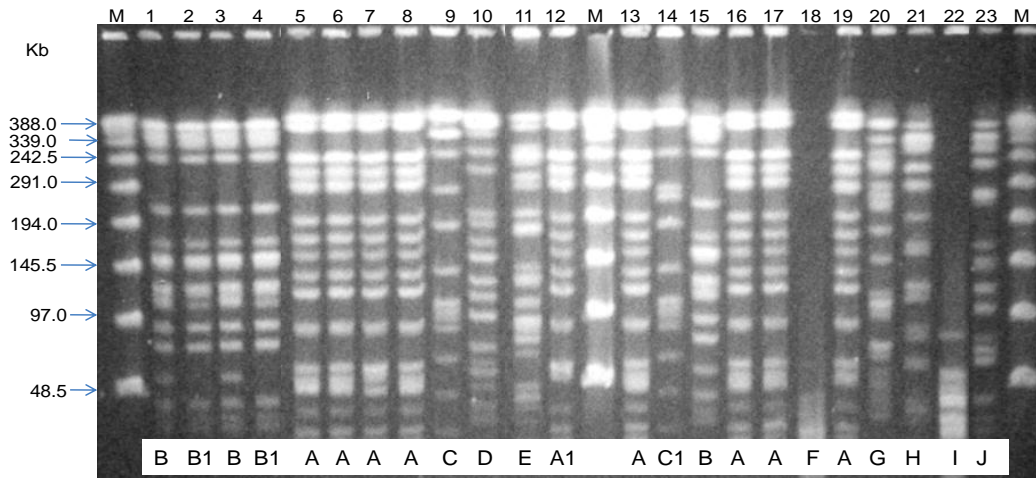
Cuadro 39. Estimación de la exposición a *C. sakazakii* por porción de consumo

	Consumo por toma de leche (mL)	NMP / mL	<i>C. sakazakii</i> por porción (NMP)
Caso 1	90	24	2,160
Caso 2	150	24	3,600
Caso 3	150	24	3,600

A pesar de los datos cuantitativos disponibles sobre la presencia de *C. sakazakii*, no es fácil establecer el número de bacterias en la leche ingerida que pudo haber causado el cuadro diarreico. La exposición al patógeno no ocurrió en una sola ocasión, lo que es común que ocurra en los brotes. Sin embargo, lo que fue posible estimar es que en una primera exposición (aproximadamente a las 24

hs del día previo a la presentación de los síntomas) los lactantes ingirieron (con fundamento en el volumen ingerido), alrededor de 24 NMP/mL de leche, es decir, un total de entre 2,160 y 3,600 células viables de *C. sakazakii* (Cuadro 39). Mantenido en refrigeración, esta dosis se repitió hasta en 4 ocasiones antes del episodio. La cuantificación de la leche en el frasco de resguardo que tuvimos la oportunidad de obtener se acerca a la dosis estimada por Iversen y Forsythe (2004) de 1,000 UFC, aunque difiere de la sugerida por la FAO/OMS, de 10,000 UFC como mínima infectante (OMS, 2007). Así, la población total de *C. sakazakii* que ingirieron los lactantes fue de aproximadamente entre 8,000 y 14,000 al cabo de 12 hs, cuando se agotó la leche preparada para ese periodo. Gurther y Beuchat (2004) encontraron que *C. sakazakii* sobrevive hasta 72 h pero no desarrolla a 4°C, aunque puede desarrollar lentamente a 8°C. En el monitoreo de la temperatura que posteriormente se realizó con una muestra de la leche conservada bajo condiciones similares a las realizadas durante el incidente (según versión de la empleada del lactario) se observó un valor de 40°C al ser ingresada al refrigerador; después de 180 min alcanzó 8°C y durante el almacenamiento (hasta completar las 12 h que normalmente se programan su consumo), osciló entre 7.2° y 9.0°C. Aparentemente las oportunidades para un incremento en la población de *C. sakazakii* en la LP fueron poco significativas. La evidencia apunta en el sentido de que la fórmula láctea fue el vehículo del patógeno debido a la similitud de los perfiles genéticos de las cepas recuperadas de la leche y de la materia fecal de los niños. El uso de PCR para detectar el género *Cronobacter* spp y rpoB-PCR para la especie *C. sakazakii*, permite una detección y confirmación más precisa del patógeno.

Aún cuando la dosis infectante es desconocida, no existen reportes de brotes que hayan establecido su asociación con el cuadro clínico de enfermedad. La única referencia que encontramos es de Pagotto *et al* (2003), el cuál mostró que con 10^5 ufc/mL, el patógeno inyectando intraperitoneal provocaba la enfermedad y muerte en ratas.



PFGE DE *C. sakazakii* DIGERIDAS CON *XbaI*.
 Carriles M, marcador lambda de peso molecular.
 Carril 1 (cepa 8700), carril 2 (cepa 8701), carril 3 (cepa 8702), carril 4 (cepa 8703), carril 5 (cepa 8705), carril 6 (cepa 8706), carril 7 (cepa 8707), carril 8 (cepa 8708), carril 9 (cepa 8710), carril 10 (cepa 8711), carril 11 (cepa 8714), carril 12 (cepa 8715), carril 13 (cepa 8716), carril 14 (cepa 8718), carril 15 (cepa 8719), carril 16 (cepa 8720), carril 17 (cepa 8721), carril 18 (cepa 8723), carril 19 (cepa 8724), carril 20 (cepa 8725), carril 21 (cepa 8726), carril 22 (cepa 8727), carril 23 (cepa 8729).

Figura 23. Imagen de EGCP de cepas de *C. sakazakii* aisladas durante el brote.

Durante el incidente, en total se dispuso de 19 cepas de *C. sakazakii* aisladas de materia fecal (7), la leche consumida (9) y la leche en polvo (3). Se determinó el genotipo de 13 cepas de *C. sakazakii*, 1 procedente del lote de leche en polvo utilizado para preparar la LR implicada (cepa 8705), 5 de LR consumida (cepas 8707, 8708, 8716, 8721 y 8724) y 7 de los 2 pacientes que estuvieron involucrados en incidente (cepas 8706, 8709, 8700, 8719, 8701, 8702, 8703). El resultado de la EGCP (Figura 23) y posterior análisis de la agrupación por el dendrograma (Figura 24), identificó dos grupos clonales mayoritarios A y B. El grupo A incluyó cepas de *C. sakazakii* del PIF consumido (cepa 8705) y materia fecal de dos paciente (cepas 8706 y 8709); el grupo clonal B incluyó muestras de dos pacientes (cepas 8700, 8719, 8701, 8702 y 8703).

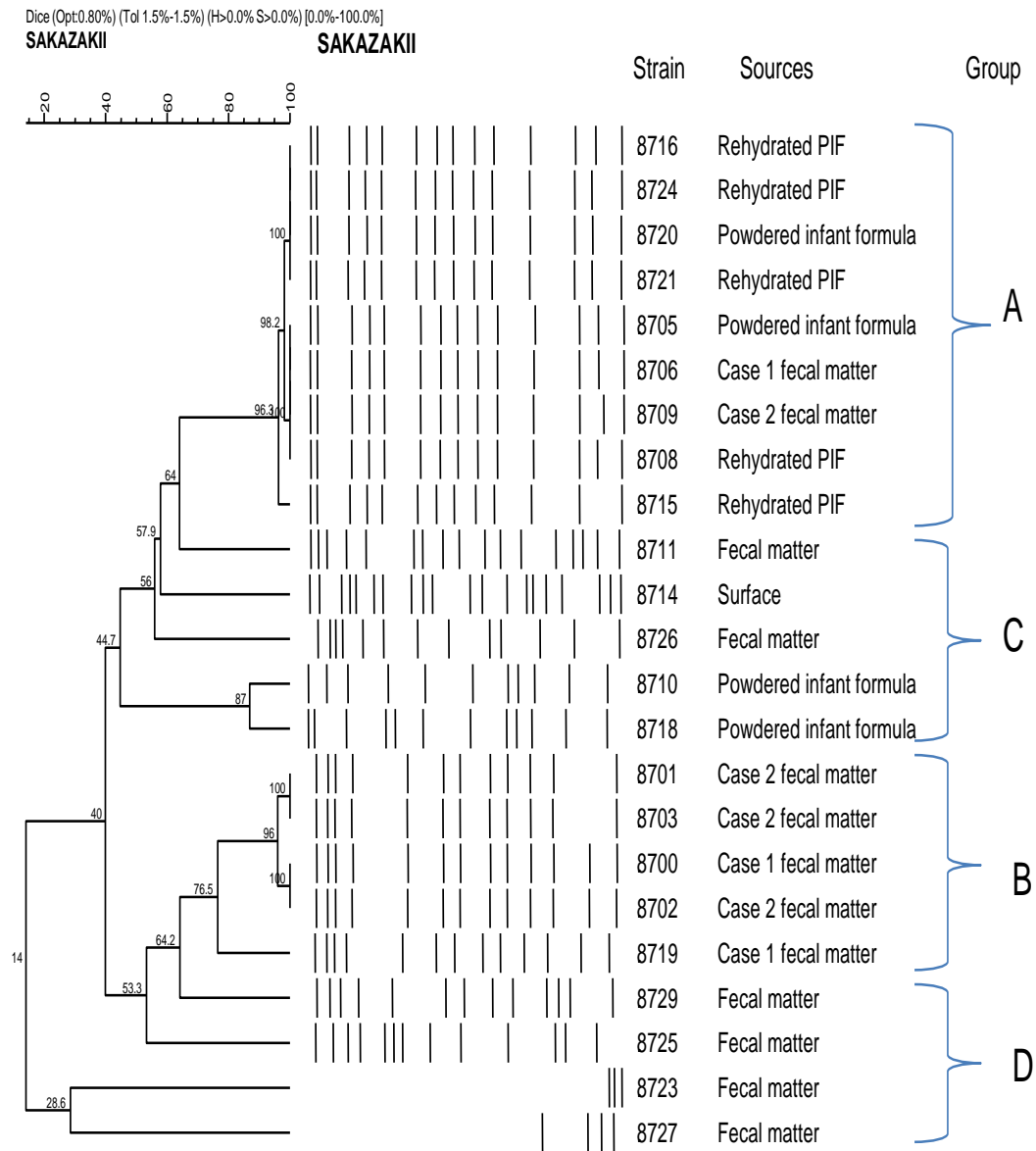
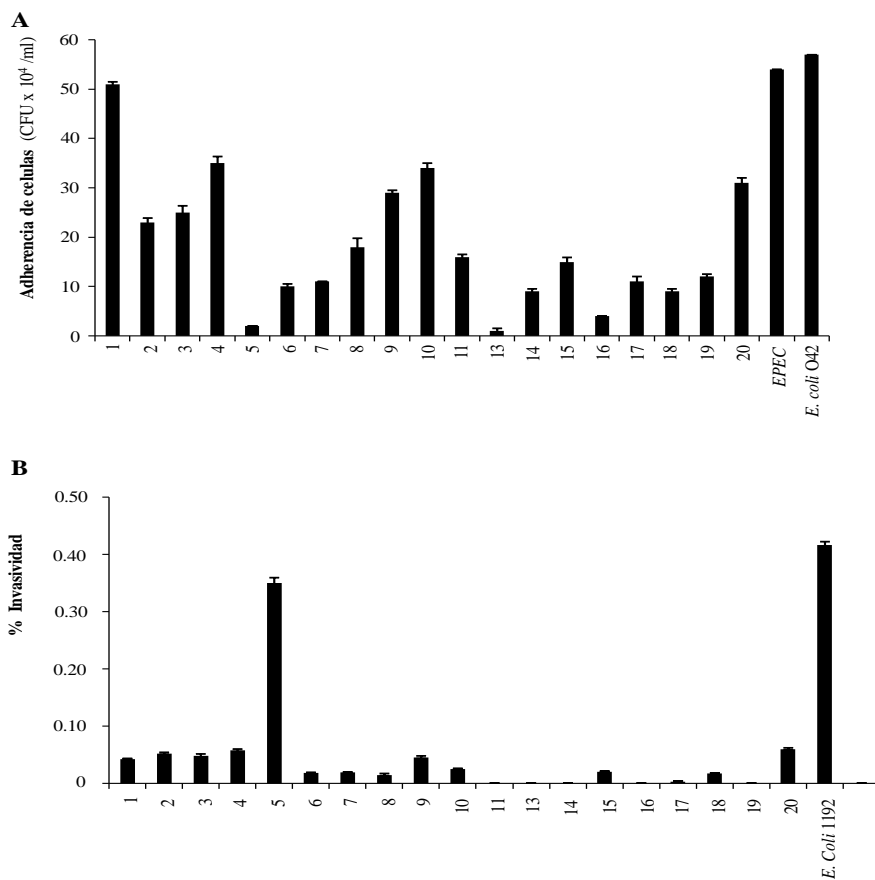


Figura 24. Dendrograma de 23 cepas de *C. sakazakii* aisladas de diferentes fuentes. Bloques A y B pertenecen a cepas recuperadas durante el brote. C y D a cepas aisladas de diferentes fuentes antes y después del brote.

Se realizaron pruebas de adherencia e invasividad a 19 cepas confirmadas como *C. sakazakii* que fueron aisladas de leche rehidratada, superficie y materia fecal (Figura 25). Las 14 cepas del brote resultaron positivas a la investigación de dos factores de virulencia (adhesión e invasividad) a células HEP-2. El comportamiento de *C. sakazakii* en células Hep2, es similar a lo reportado por Mange *et al* (2006) para la capacidad de adherencia e invasión de líneas celulares y para provocar enfermedad.



A: Adherencia a células Hep-2 .
B: Frecuencia de invasión a células Hep-2.

Figura 25. Capacidad de adherencia e invasividad a 19 cepas de *C. sakazakii*

Cinco cepas 11 (8720), 13 (8717), 14 (8741), 16 (8715) y 19 (8714) presentaron adherencia pero no fueron invasivas en células Hep-2. Estas cepas fueron aisladas antes y después del brote (Figura 25).

Las pruebas de resistencia a antibióticos realizadas en 13 cepas de *C. sakazakii*, mostraron que 11 resultaron resistentes a cefalotina, 9 a ampicilina, 8 a nitrofurantoína, 4 a cloranfenicol, 3 a cefotaxima y ceftriazona, y 2 a netilmicina y gentamicina. Existe similitud en el perfil de resistencia a antibióticos y genotipo en las cepas 8721, 8708 y 8716 para los antibióticos CF y NF, entre las cepas 8705, 8724 y 8709 para CF, AM, NF, presentando diferencias cuando son aisladas desde la materia fecal. No existe en cambio, similitud de antibiotipo en las cepas del grupo clonal A, existiendo sí similitud en 8 antibióticos de 2 cepas (8700 y 8719) recuperadas de materia fecal del grupo clonal B. Generalmente se describe a *Cronobacter* como sensible a los antibióticos de uso común (Healy *et al.*, 2010); sin embargo, Molloy *et al* (2009) reportan que de las 33 cepas aisladas del ambiente, 7 fueron sensibles a 8 antibióticos, pero llaman la atención de que el 51% de las cepas fueran resistentes a cefalotina. Kleiman *et al* (2001), en un caso de meningoencefalitis reportan también resistencia moderada a cefalotina.

El cuadro de diarrea sanguinolenta mostrado por los dos lactantes es relativamente benigno si se consideran los casos de septicemia y meningitis letales causados por *C. sakazakii* que se han reportado en la literatura (OMS-FAO, 2007; Nazarowec-White y Farber, 1999 y Van Acker *et al.*, 2001). La epidemiología entre neonatos por *C. sakazakii* registra algunos incidentes de diarrea, infecciones urinarias y conjuntivitis (Friedemann, 2009). El episodio de diarrea se resolvió en 24 -48 hs, lo que podría asociarse con la administración de antibióticos. Aparentemente incidentes similares al descrito en esta comunicación no son frecuentes en un hospital. Fue el único, y sólo afectó a 2 individuos del que tuvimos reporte en el transcurso de los 16 meses previos. Este número no parece ser una situación excepcional. En 34 reportes de infección hospitalaria recabados en 17 países, el número más frecuente de lactantes afectados fue 1 o 2, con casos extremos raros de 10 y 12 (Friedemann, 2009).

Tres acontecimientos negativos merecen destacarse en el incidente: a) una temperatura de rehidratación de la leche (40°C aproximadamente) muy por debajo de la recomendada por la OMS (70°C), b) la contaminación de origen de la leche en polvo y c) la detección de *C. sakazakii* en el ambiente del lactario.

Los resultados de este estudio subrayan la necesidad de atender con rigor las prácticas de sanidad dentro de un lactario y verificarlas mediante pruebas de laboratorio. La capacitación a fondo de las trabajadoras del lactario es fundamental, de manera que comprendan las consecuencias que pueden resultar de un comportamiento que ignore las reglas básicas diseñadas para prevenir riesgos a la salud entre los lactantes.

6.7 Prueba de reto

Los estudios de reto simulan las condiciones en las que fue elaborado un alimento o preparación y permiten predecir el comportamiento bacteriano. Si se incorporan en el diseño los mismos factores ecológicos utilizados en su preparación, es posible estimar la concentración de patógeno, a partir del momento en que fue elaborado hasta el consumo. Esta información resulta muy útil para valorar el proceso de exposición al patógeno que precedió el desarrollo de la enfermedad.

El estudio se realizó en leche rehidratada recién preparada con diferentes volúmenes. En el caso específico de *C. sakazakii* en la LR, había que conocer la influencia de algunos parámetros en su comportamiento, específicamente, el tiempo en el cual la leche rehidratada alcanza los 6°C partiendo de la temperatura del agua de rehidratación de 45°C con un volumen de leche de 3,000 mL (Figura 26a) y de 100 mL (26b).

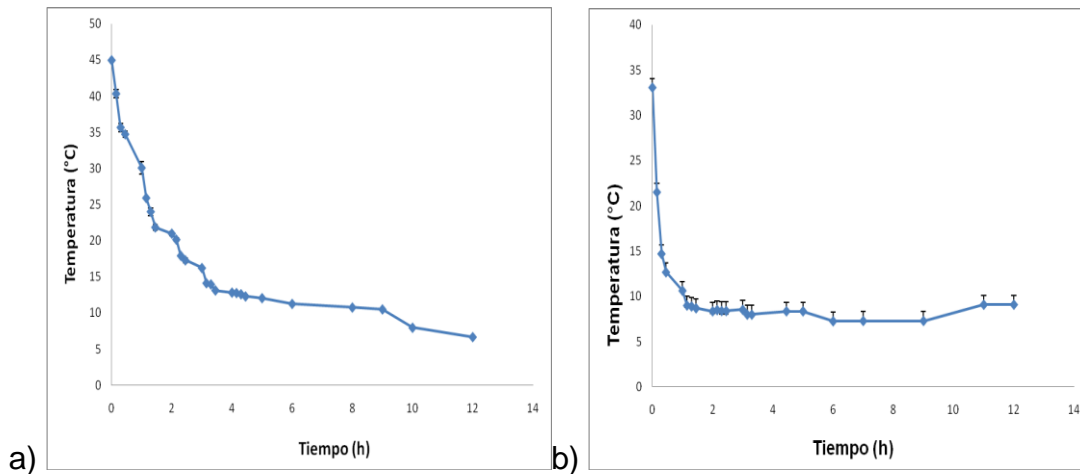


Figura 26. a) Tiempo requerido en alcanzar 6°C a partir de 3000 mL de leche rehidratada con agua a 45°C, b) Tiempo requerido en alcanzar 6°C a partir de 100 mL de leche rehidratada con agua a 45°C.

En los 3,000 mL de leche rehidratada demora de 10 a 12 horas para alcanzar los 6°C (Figura 26a). En el volumen de 100 mL, la demora fue cercana a 6 horas. Sin embargo, la temperatura en este último volumen prácticamente no se afectó a lo largo de 12 h (Figura 26b). En otro experimento se midió el tiempo requerido en baño maría para alcanzar 37°C en un volumen de 100 mL rehidratada (Figura 27).

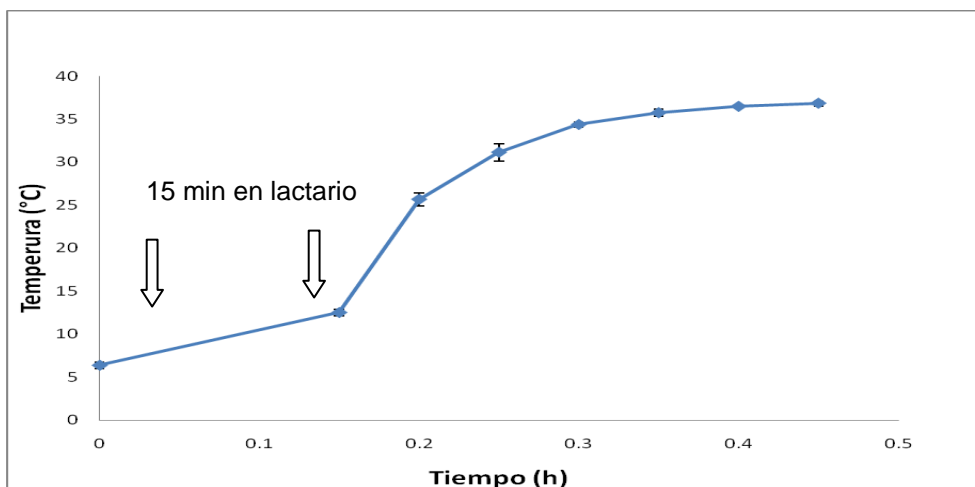


Figura 27. Tiempo requerido en alcanzar 37°C en 100 mL de leche rehidratada que se había conservado en refrigeración.

Una situación preocupante se presenta cuando se retira la leche del refrigerador y se envía a la sala donde se coloca en baño maría a 37°C. Este tránsito demora aproximadamente 15 min, y la temperatura se eleva a 14°C. En 30 minutos, alcanza la temperatura de 37°C deseable. En caso de estar presente *C. sakazakii*, podrían ocurrir al menos 2 generaciones por hora. Situación similar observaron Biering *et al* (1989), en un brote de meningitis causado por *E. sakazakii* asociado consumo de leche rehidratada. Las botellas de leche que consumían los niños habían permanecido por extensos períodos de tiempo almacenadas de 35 a 37°C.

Aplicando el modelado por Dmfit los datos se ajustaron al modelo primario de Baranyi y se calcularon las velocidades de desarrollo del patógeno a 2 temperaturas.

Como ya se ha señalado, se evaluó el comportamiento de *C. sakazakii* en 2 volúmenes de leche (3,000 mL y 100 mL), incubando tanto a 7°C como a 35°C, simulando las condiciones de almacenamiento en refrigeración y eventual abuso de temperatura señaladas.

En la leche temperada a 45°C se inoculó por separado 1.71 log UFC/mL en un volumen de 3,000 mL y 1.79 log UFC/mL en otro de 100 mL. Al llevarlos a refrigeración, en éste último el desarrollo fue más lento con una fase lag que llega a durar 20 h, y una velocidad de crecimiento de 0.04 log UFC/h (Figura 28). En el volumen de 3,000 mL, la fase lag fue más corta con 5 h (Figura 45), y una velocidad de desarrollo de 0.139 UFC/h. El CST de referencia se inoculó con 1.79 log UFC/mL, dando lugar a un crecimiento lento, una fase lag de 7 horas y una velocidad de desarrollo de 0.029 log UFC/h. La máxima población alcanzada para 3,000 mL y 100 mL de leche, y 100 mL de caldo soya fue de 2,73, 2,21 y 2,54 log UFC/mL respectivamente.

La acción más eficaz que puede ponerse en operación, es evitar el desarrollo del patógeno considerando su carácter psicrótrofo. Aún en refrigeración la población de *C. sakazakii* llega a elevar casi 1 log en la leche almacenada en volúmenes de 3,000 mL. El incremento del germen implicado es 10 veces en 12 h,

lo que constituye un riesgo que debe ser evitado. Se debería disminuir el volumen de leche manejado, o disminuir la temperatura de refrigeración. Ciertamente en una condición crítica de riesgo, la temperatura recomendada de refrigeración es no > a 4°C.

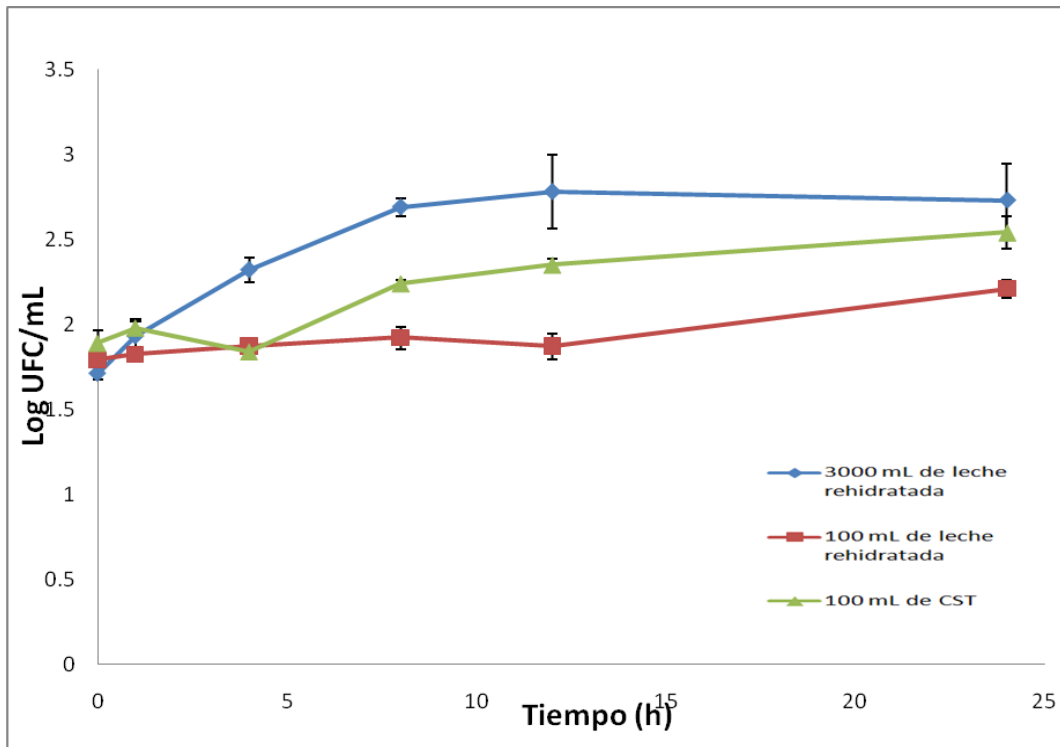


Figura 28. Comportamiento de *C. sakazakii* a 7°C en leche rehidratada (3,000 mL y 100 mL) y 100 mL de CST.

En 3,000 mL de leche se inoculó el patógeno con 1.7 log UFC/mL. Incubado a 35°C mostró una fase lag muy corta (menos de 1 hora), y una velocidad de desarrollo de 0.728 log UFC/h (Figura 29). La máxima población alcanzada fue de 9 log UFC/mL al cabo de 12 h.

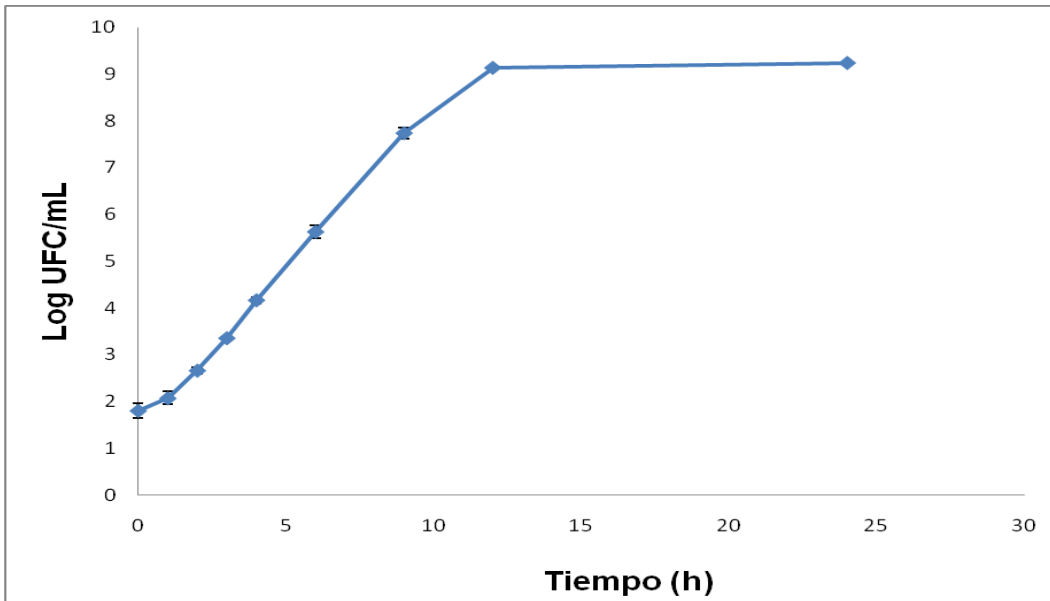


Figura 29. Comportamiento de *C. sakazakii* a 35°C en 3,000 mL de leche inoculada con 1.7 log UFC/mL.

Para evaluar el desarrollo en 100 mL a 35°C se inoculó 1.7 log de UFC/mL. Al modelar el comportamiento del patógeno, la fase lag es de aproximadamente 0.5 h y una velocidad de desarrollo de 0.749 UFC/h. Se alcanzó una máxima población de 9.1 log UFC/mL (Figura 30).

Como se ha señalado, la velocidad de desarrollo expresa la dinámica de *C. sakazakii* para prosperar en la leche rehidratada. Los resultados muestran lo favorable que resulta el alimento para sostener un desarrollo activo del patógeno conforme la temperatura se acerca a la óptima de 37°C. Lo favorable de la leche para *C. sakazakii* se puede ilustrar cuando se compara con los parametros de desarrollo que se observan en el CST, un sustrato reconocido universalmente como idoneo para el cultivo de bacterias especialmente exigentes (Figura 31 y Cuadro 40).

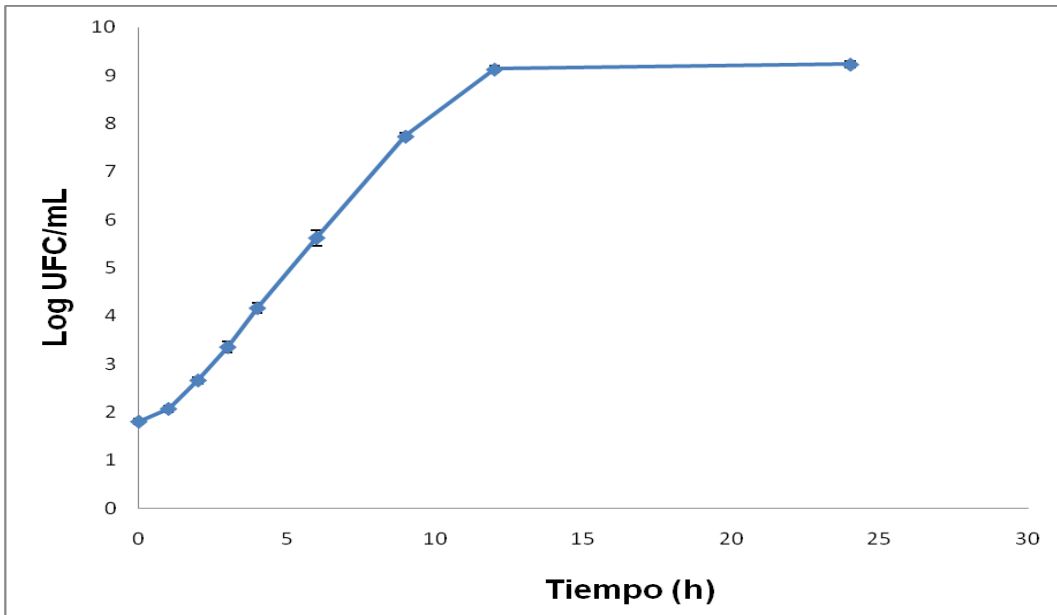


Figura 30. Comportamiento de *C. sakazakii* a 35°C en 100 mL de leche inoculada con 1.71 log UFC/mL.

El comportamiento en 100 mL de CST inoculando 1.8 UFC/mL, no fue diferente a leche incubada a 35°C. La fase lag fue corta de 0.6 h y una velocidad de desarrollo de 0.76 UFC/h. La máxima población alcanzada fue 9.26 log UFC/mL (Figura 48).

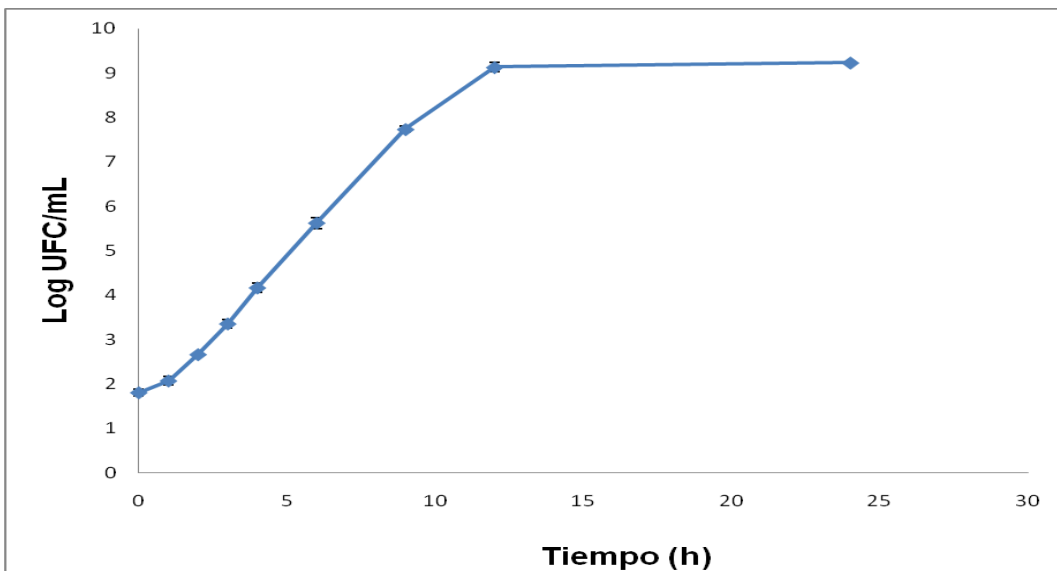


Figura 31. Comportamiento de *C. sakazakii* a 35°C en 100 mL de caldo soya tripticaseína inoculada con 1.81 log UFC/mL.

Si comparamos la velocidad de desarrollo en leche rehidratada y CST a las 2 temperaturas (Figura 32), resulta evidente que la velocidad de desarrollo está en función de la temperatura, independiente del sustrato.

Cuadro 40. Velocidad de desarrollo de *C. sakazakii* a 7°C y 35°C en leche rehidratada y caldo soya tripticaseína.

Producto	Temperatura (°C)	Volumen (mL)	Velocidad (log UFC/h)	Tiempo generación (h)	Total generaciones (24 h)
Leche	7	3,000	0.1399 ± 0.034 ¹	7.1	3.38
Leche	7	100	0.0436 ± 0.003	18.2	1.32
CST	7	100	0.0292 ± 0.005	11.2	2.15
Leche	35	3,000	0.7281 ± 0.027	0.96	24.58
Leche	35	100	0.7491 ± 0.038	0.96	24.91
CST	35	100	0.7622 ± 0.030	0.98	24.50

¹media ± error estándar

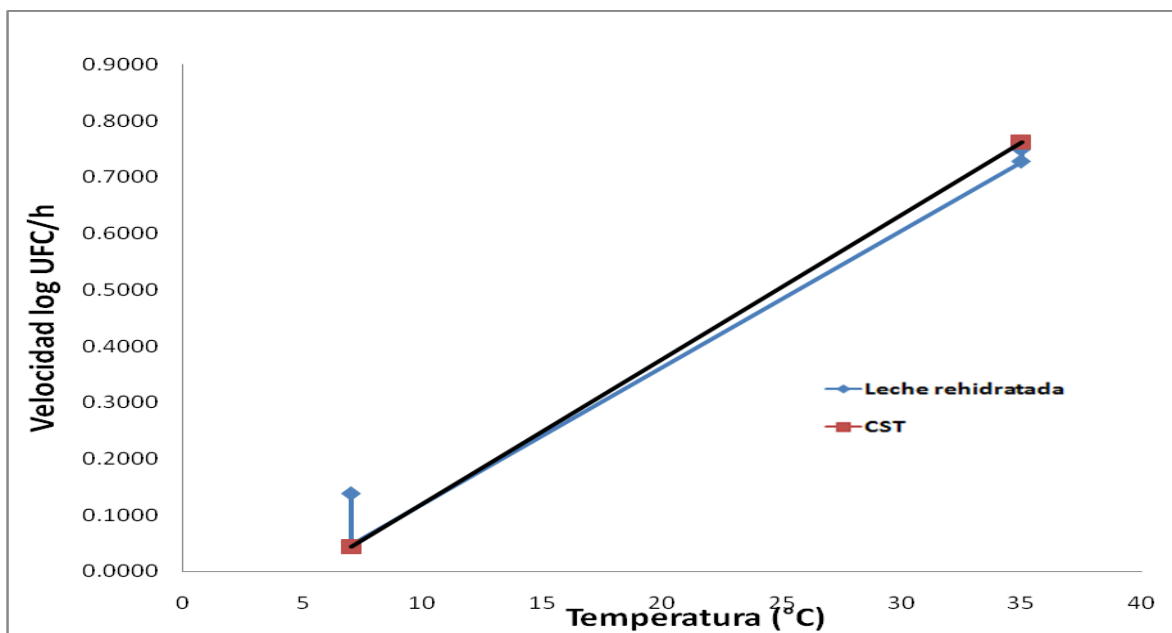


Figura 32. Velocidad de desarrollo de *C. sakazakii* a 7° y 35°C en leche rehidratada y en CST.

El análisis de varianza (Cuadro 41) confirma que la temperatura es el factor con mayor impacto sobre la velocidad de desarrollo de *C. sakazakii* ($P < 0.0001$).

Cuadro 41. Análisis de varianza de la velocidad de desarrollo de *C. sakazakii* en función del producto, temperatura y volumen.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Ratio	Prob > F
Modelo	4	2.0625458	0.515636	319.6652	<.0001
Error	13	0.0209697	0.001613		
C. Total	17	2.0835155			

La conclusión es obvia, la leche hidratada constituye un excelente medio de cultivo para *C. sakazakii*; y cualquier desatención en la preservación del alimento se traduce en un desarrollo peligroso que afecta directamente su inocuidad.

6.7 Caracterización del riesgo

Según fue definida en los Antecedentes, la caracterización del riesgo se define como la estimación cuantitativa y/o cualitativa incluida su incertidumbre, de la probabilidad de ocurrencia y severidad de que un desconocido y potencial riesgo afecte la salud de la población (FAO-OMS, 1995; Codex, 1999).

Considerando lo limitado de nuestro estudio y utilizando los parámetros establecidos en el modelo de Evaluación de Riesgo de *C. sakazakii* (Paoli y Hartnett., 2009), estamos en condiciones no obstante de estimar la reducción en el riesgo relativo, bajo las condiciones (temperatura de rehidratación, población inicial y temperatura previa al consumo), prevalentes durante la preparación, manejo y consumo de leche.

El modelo estima el riesgo de enfermar al utilizar agua a distintas temperaturas para hidratar la fórmula y condiciones ambientales. En el programa se debe señalar el valor que se tomará como base para calcular la disminución del riesgo cuando se modifica la temperatura del agua de rehidratación. En nuestro caso se consideró como condición base 45°C (valor de 1 en Cuadro 42) por ser la temperatura del agua normalmente utilizada en el lactario para rehidratar la leche.

La reducción del riesgo finalmente fue calculada por el programa como número de veces que se reduce el riesgo cuando se emplea agua a 55, 65 y 70°C, respecto a la de 45°C (Cuadro 42). Como se puede observar en el Cuadro 42, a temperatura ambiente de 27°C y almacenamiento por 12 h a 7°C, el valor de la reducción de riesgo es 1 cuando se emplea agua a 45 o 55°C; lo que implica que el riesgo de enfermar es el mismo cuando se utiliza agua a cualquiera de estas dos temperaturas. En contraste, cuando se hidrata la leche con agua a 70°C, el riesgo se disminuye 100,000 veces con respecto al uso de agua a 45°C.

Cuadro 42 Reducción del Riesgo Relativo en función de temperatura ambiente, tiempo de almacenamiento en refrigeración y temperatura del agua de hidratación.

Temperatura del agua de rehidratación	Temperatura ambiente del lactario			
	27 °C		35°C	
	Tiempo de refrigeración de la leche (7°C)		Tiempo de refrigeración de la leche (7°C)	
	12h	4h	12h	4h
45 ¹	1	1	1	1
55	1	1.1	3.23	3.08
65	>100,000	>100,000	>100,000	>100,000
70	>100,000	>100,000	>100,000	>100,000

¹ Condición de referencia para cálculo de la reducción del riesgo, en función del modelo

Edelson-Mammel y Buchanan (2004), estimaron que utilizar agua con temperaturas superiores a 70°C para rehidratar la leche en polvo contaminada con *C. sakazakii*, reducían 4 log UFC y con ello se lograba una reducción del riesgo superior a 10,000 veces (FAO-OMS, 2004).

Esta reducción del riesgo es dependiente de la temperatura de rehidratación del agua, siendo este factor muy importante a considerar cuando se prepara leche para niños muy hipersensibles y evitar futuros incidentes de enfermedad.

7. CONCLUSIONES

- En la preparación de los alimentos en la cocina del hospital, se incurre en prácticas de trabajo que propician la contaminación y eventual sobrevivencia y desarrollo bacteriano.
- Los procedimientos de desinfección del agua, alimentos y superficies no resultan en general efectivos para abatir la presencia de microorganismos patógenos.
- La incidencia de patógenos en alimentos y superficies de la cocina general fue: *Shigella* 0%, *Salmonella* 1.5% y *L. monocytogenes* 24%.
- Dentro del lactario *Cronobacter* spp muestra una elevada incidencia (47.2%), y una amplia distribución.
- La concentración del patógeno entre las muestras positivas es muy baja (0.0079 a 0.33 NMP/g en la leche en polvo, y 0.0051 a 24 NMP/mL en la leche rehidratada), congruente con lo publicado en la literatura científica.
- El 23% de las cepas de todos los materiales corresponden a *C. sakazakii*. El 55% de las cepas de la leche en polvo y el 28% de la leche rehidratada se confirmaron como *C. sakazakii*.
- Las pruebas moleculares resultan decisivas para la confirmación e identificación del género y especies de *Cronobacter* spp.
- Se ha confirmado un brote de ETA con etiología por *C. sakazakii*. Se obtuvo una similaridad genética de 100% entre los pulsotipos recuperados de leche

en polvo utilizada en la preparación, leche rehidratada consumida y materia fecal de los niños afectados.

- En el brote asociado a *C. sakazakii* la dosis ingerida por los niños afectados con la fórmula láctea fue de 2,160 – 3,600 NMP por toma.
- Catorce de 19 cepas de *C. sakazakii* aisladas del brote mostraron adherencia e invasividad en células Hep-2.
- El 39% de las cepas de *C. sakazakii* estudiadas resultó resistente a más de 2 antibióticos. Cuatro cepas aisladas de la materia fecal fueron multiresistentes a 7 antibióticos. Del total de cepas, 49% fueron resistentes a ampicilina, 19% a cefatoxima y 56% a cefalotina.
- En 3,000 mL de leche temperada e incubada a 35°C, la fase lag de *C. sakazakii* es muy corta (menos de 1 hora) y muestra una velocidad de desarrollo de 0.728 log UFC/h. En 100 mL del mismo producto, la fase lag es de aproximadamente 0.5 h y una velocidad de desarrollo de 0.749 UFC/h.
- La velocidad de desarrollo de *C. sakazakii* está en función de la temperatura, independiente del sustrato. Ciertamente en una condición crítica de riesgo, la temperatura recomendada de refrigeración debe ser no > a 4°C.
- La temperatura es el factor con mayor impacto sobre la velocidad de desarrollo de *C. sakazakii* en leche hidratada ($p < 0.0001$), independiente del tiempo de incubación.

- El riesgo relativo se reduce 100,000 veces cuando se utiliza agua a 70°C para rehidratar la leche si se compara con agua a 45°C, y con una población inicial de 0.33 NMP/g de *C. sakazakii*. La reducción es independiente del tiempo de almacenamiento y de la temperatura ambiente al preparar la leche.
- Como parte de la evaluación de riesgos se ha demostrado la participación de *C. sakazakii* como agente patógeno asociable al consumo de leche maternizada, se ha valorado el nivel de exposición y la dosis respuesta en un brote de enteritis hemorrágica por este alimento en lactantes de un hospital, y se ha demostrado el peligro implicado en términos de su potencial para proliferar en las leches rehidratadas que se suministran a los lactantes.
- La amplia colaboración lograda entre el Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la UAQ y el personal del Hospital del Niño y la Mujer, pone de manifiesto la factibilidad de generar información científica fundamental en instituciones similares para establecer medidas específicas de prevención de enfermedades nosocomiales por alimentos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alam, N.K, P.K. Armstrong, O.T. Nguyen, A. M. Kesson, T. M. Cripps and, S. J. Corbett. 2005. *Salmonella* Typhimurium phage type 170 in a tertiary pediatric hospital with person-to-person transmission implicated. *Commun. Dis. Intell.* 29(4):374-378.

Andrews, W.H., and T.S. Hammack. 1998. Chapter 5: *Salmonella*, p. 5.05-5.20. In *Bacteriological Analytical Manual*. 8th ed. Revision A.U.S. Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, Md.

AOAC. Association of Official Analytical Chemist. 1984. *Official methods of Analysis of the Association of Official analytical Chemist*. 14th ed, Arlington, Va. Association of Official Analytical Chemist, Inc.

Archer, D.L. and Kvenberg, J.E. 1985. Incidence and cost of foodborne diarrhea disease in the United States. *J. Food Prot.* 48: 887-894

Asao, T., Y. Kumeda and, Y., Kawai. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130:33-40

Atmar, R., L.T.G. Metcalf, F.H. Neill, and M.K. Estes. 1993. Detection of enteric viruses in oyster by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59. 631-635

Balakrish Nair, G., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S, K. et al. 1994. Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. *J. Inf. Dis.* 169:1029-1034

Barret, T.J., P. Gerner-Smidt, and B. Swaminathan. 2006. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog. Dis.* 3:20-31

Baty, A.S., J.P. Flandrois y M.L. Delignette-Müller. 2002. Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (12), 5816-5825

Bauer, A. W., W.M Kirby, J. C. Sheris, M. Turck. 1966. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.

Batz, M., M.P. Doyle, J.G. Morris, J. Painter, R. Singh, R.V. Tauxe, M.R. Taylor and D.M-A. Lo Fo Wong. 2005. Attributing illness to food. *Emerg. Infect. Dis.* 11(7):993-999.

Beckers, H.J., D. Bosman, and, M.S.M Ament, A. 1985. Two outbreaks of salmonellosis caused by *Salmonella indiana*. A survey of the European Summit outbreak and its consequences. *Internat. J. Food Microbiol.* 2:185-195

Beuchat, L. and M. Cousin. 2001. Cap. 20 p.209-216. En Pouch, F and Ito, K. 2001. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods.* 4th Ed. American Public Health Association.

Beatty, M., P. Adcock, S. Smith, K. Quinlan, L. Kamimoto, S. Rowe, K. Scott, C. Conover et al. 2006. Epidemic diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* 42(3):329:334.

Bou, R., L. Lorente, A. Aguilar, J. Perpiñan, P. Ramos, M. Peris and, D. Gonzalez. 2009. Hospital economic impact of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Hosp. Infect.* 71:138-142

Bowen, A, and C. Braden. 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1185-1189

Brown, M. 2002. Hazard identification: 65-76. En: Brown, M. and Stringer, M. (Eds). *Microbiological Risk Assessment in Food Processing*. Woodhaed Publ. Ltd. Cambridge, England

Bryan, F.L. 1988. Risk of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases *J. Food Prot.* 51:663-673

Bryan, F. and J. Lyon. 2004. Critical control points of hospital fooservice operation. *J. Food. Prot.* 47(12):950-963.

Baranyi, J and M. Tamplin. 2004. ComBase: A common database on Microbial Responses to Food Environments. *J. Food Prot.* 67:1967-1971

Brown, M and Stringer, M. 2002. *Microbiological risk assessment in food processing*. Woodhead Publishing in Food Sc. Tec.

Buchanan, R. L., J. L. Smith and W. Long. 2000. Microbial risk assessment: dose response relations and risk characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 58:159-172.

Campbell, J., J. Mohle-Boetani, R. Reporter, S. Abbott, J. Farer, R. Mandrell, and S. Werner. 2001. An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. *J. Infect. Dis.* 183:984-987

Carrico, J. A, F. R. Pinto, C. Simas, S. Nunes, N. G. Sousa, N. Fraza, H. Lencastre, J. S. Almeida. 2005. Assessment of Band-Based Similarity Coefficients for Automatic Type and Subtype Classification of Microbial Isolates Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* Vol 43.11:5483-5490

Caubilla-Barron, J., E. Hurrell, S. Townsend, P. Cheetham, C. Loc-Carrillo, O. Fayet, M. F. Prère and J. Forsythe. 2007. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J. Clin. Microbiol.* 12:3979-3984

Cawthorn, D. M; S. Botha, R.C. Witthuhn. 2008. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *Inter. J. Food Microbiol.* 127(1-2): 129-138

CDC. Center for Disease Control and Prevention. 2007. Preliminary FoodNet data on the incidence of infections with pathogens transmitted commonly through food-10 states 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 56:336-339

CDC. Center for Disease Control and Prevention. 2004. *Salmonella* Surveillance: annual summary, 2003. Atlanta, Georgia: U.S Department and Human Services, CDC.

Centers for Disease Control. 1993. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States. 1992-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 42:258-263

Centers for Disease Control. 1983. Hospital-associated outbreak of *Shigella dysenteriae* type 2, Maryland. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 32(19) 250-252

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 9th ed. M2-A9. Vol. 26 n°1

Codex Alimentarius, Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 3 (1997), Amended 1999

Codex Alimentarius: Principios y directrices para la aplicación de la Evaluación de Riesgos Microbiológicos. CAC/GL 30 1999.

Collins, N.R., Treger, M.D., Goldsby, J.B. et al. 1968. Interstate outbreak of *Salmonella newbrunswick* infection traced to powdered milk. J. Am. Med. Assoc. 203:838-844

Committee on the Control of Foodborne Illness. 1999. Procedures to Investigate Foodborne Illness. International Association for Food Protection. Fifth Edition. IA. USA

Chavéz, M., A. Higuera-Iglesias, M. Huertas, R. Báez, J. Morales, F. Arteaga, S. Rangel, F. Ponce de León. 2001. Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. Revista de Salud Pública de México. 43:211-214

Curiale, M. 2004. MNP calculator Build 6.
<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>. Accesado 10 Febrero 2009.

Dalgaard, P. and, K. Koutsoumanis. 2001 Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. J. Microbiol. Methods 43 (3), 183-196

D'Aoust, J.Y., B.J. Arisand and, P. Thisdale. 1975. *Salmonella* eastbourne outbreak associated with chocolate. J. Inst. Can. Sci. Technol. 8:181-184

D'Aoust, J.Y., C. Maishment, D. M. Burgener, D. R. Conley, A. Loit, A., M. Milling and, U. Purvis. 1980. Detection of *Salmonella* in refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. J. Food Prot. 43:343-345

De Boer, E., and H. Hahne.1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. J. Food Prot. 53:1067-1068

Donnelly, C. W., R.E. Bracket.1992. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Vanderzant. and Solittstoedder. 3° Ed. American Public Health Association (APHA). U.S.A.

Duffy, E. A., L. M.Lucia, J. M. Kells, A. Castillo, S.D .Pillai and, G.R. Acuff. 2005. Concentrations of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotics resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment and fresh produce in Texas. J. Food Prot. 68:70-79.

Demarigny, Y.; Juillard, V.; Deschamps, N.; Richard, J. 1994 Comparison of three practical methods for studying the kinetics of lowering the pH of milk by culturing with strains of *Lactococcus lactis*. Lait. 74(1): 23-32

Dryden, M.S., N. Keyworth, R. Gabb and K. Stein. 1994. Asymptomatic foodhandlers as the source of nosocomial *salmonellosis*. J.Hosp. Infect. 28(3):195-208

Duncan, S.E. and, C.R. Hackney. 1994. Relevance of O157:H7 to the dairy industry. Dairy Food Environ. Sanit. 14:656-660

Edelson-Mammel,S. G. and R. L. Buchanan. 2004. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. J. Food Prot. 67:60-63

Elward, A., A. Grim, P. Schroeder, P. Kiefer, P. Sellenriek, R. Ferrett, H.C. Adams, V. Phillips, R. Bartow, D. Mays, S. Lawrence, P. Seed, G. Holzmann-Pazgal, L.

Polish, T. Leet and V. Fraser. 2006. Outbreak of *Salmonella javiana* infection at a children's hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27(6):586-592

Escartín, E. F. 1998. Riesgos microbianos relacionados con el consumo de alimentos. Más allá del síndrome diarreico. *Enf. Infec. Microbiol.* 18:130-136

Evans, M.R., P.G. Hutchings, C.D. Ribeiro and, D. Westmoreland. 1996. A hospital outbreak of *Salmonella* food poisoning due to inadequate deep-fat frying. *Epidemiol. Infect.* 116:155-160

FAO OMS 1995. Código de prácticas de higiene para la elaboración y expendio de alimentos en la vía pública (Norma regional - América Latina y el Caribe) CAC/RCP 43-1995

FAO-OMS 1999 Principios y directrices para la aplicación de la evaluación de riesgos microbiológicos. CAC/GL 30 pág. 1-6

FAO OMS 2000. Hazard identification and hazard characterization of *Salmonella* in broilers and eggs. Microbiological risk assessment series N° 2 .Pág.1-110

FAO OMS 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Serie de evaluación de riesgos N° 4. Resumen interpretativo. Pág. 1-54

FAO OMS 2004. *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos N° 6. Informe de la reunión. Pág.1-67

Fanning, S. and S. Forsythe. 2008. Isolation and identification of *Enterobacter sakazakii*, pag. 27-59. In. J. M. Farber and S. J. Forsythe (ed.), *Enterobacter sakazakii*. Emerging issues in food safety series. ASM Press, Washington, DC.

Farmer, J.J., M. A. Asbury, F. W. Hickman, D. J. Brenner. The *Enterobacteriaceae* Study Group. 1980. *Enterobacter sakazakii*, new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:569–584.

Feder, I., J. C. Nietfeld, J. Galland, T. Yearly, J. M. Sargeant, R. Oberst, M. L. Tamplin, and J. B. Luchansky. 2001. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *J.Clin. Microbiol.* 39:2477-2484

Feng, P., S. D. Weagant, and M. A. Grant. 1998. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Food and Drugs Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual. 7-12. 8th Ed. AOAC, Arlington, VA. USA

Fernández E, E. 2008. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. 2^o edición. Pág .1-962.

Figueroa, G., P. Navarrete, M. Caro, M. Troncoso and G. Faundez. 2002. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. *Rev. Med. Chile.* 130:859-864

Fiore, A., M. Casale and P. Aureli. 2008. *Enterobacter sakazakii*: epidemiology. Clinical presentation, prevention and control. *Ann. Ist. Super Sanità.* 44(3)275-280.

Flowers, R. S., J. Y. D'aoust, W. H. Andrews and, J. S. Bailey. 1992. *Salmonella*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.

Fratamico, P. M. 2001. Applications of the polymerase chain reaction for detection, identification, and typing of foodborne microorganisms, p. 95- 115. In C. L. Wilson, and S. Droby (ed.), *Microbial Food Contamination*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Food and Agriculture Organization and World Health Organization. 2008. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp) in powdered follow-up formulae. Microbiological Risk Assessment Series No.15. Rome. 90pp

Food and Drug Administration (FDA). 2004. Report on the Occurrence of Foodborne Illness Risk Factors in Selected Institutional Foodservice, Restaurant, and Retail Food Store Facility Types .Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Forsythe, S. J. 2009. Bacteriocidal preparation of powdered infant formula. Available at : http://www.foodbase.org.uk/results.php?f_report_id=395. Accessed 23 March 2011.

Friedemann, M. 2009. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28:1297-1304.

Galloway A., C. Roberts and, E. J. Hunt. 1987. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium gastroenteritis in a psychiatric hospital. *J. Hosp. Infect.* 10(3):248-254

Gianella, R.A., L. Brasile. 1979. A hospital food-borne outbreak of diarrhea caused by *Bacillus cereus*: clinical, epidemiologic, and microbiologic studies. *J. Infect. Dis.* 139(3):366-370

Griffith, C. J., R. A. Cooper, J. Gilmore, C. Davies and, M. Lewis. 2000. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. *J. Hosp. Infect.* 45:19-28

Grimont, P.A.D, F. Grimont and P. Bouvent. 2001. Rapport de activité du Centre National de Référence des salmonelies. Institut Pasteur, Paris. In Eurosurveillance 8:151-156

Gouws, T., M. Visser and, V. Brözel. 1998. A Polymerase Chain Reaction Procedure for the Detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. J. Food Prot. 61:1039-1042.

Gurtler, J. B. and L. R. Beuchat. 2007. Growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula as affected by composition and temperature. J. Food Prot. 70:2095-2103.

Haas, C. N, J. B. Rose and C. P. Gerba. 1999. Quantitative Microbial Risk Assessment. John Wiley and Sons Inc., Nueva York.

Hass, C. N. 1983. Estimation of risk due to low doses of microorganisms: A comparison of alternative methodologies. Am. J. Epidemiol. 118:573-582.

Haas, C. and J. Rose. 1994. Reconciliation of microbial risk models and outbreak epidemiology: the case of the Milwaukee outbreak. Proc. Amer. Water Works Assoc. Denver. Amer. Water Works Assoc. 86:517-523

Hara-Kudo, Y; K. Ohtsuka, Y. Onoue, Y. Otomo, I. Furukawa, Y. Segawa and, K. Takatori. 2006 *Salmonella* Prevalence and total microbial and spore populations in spices imported to Japan. J. Food Prot. 69(10): 2519-2523

Hartaman, A. B., M. Venkatesan, E. V. Oaks and J. M. Buysee. 1990. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *lpaH*, of *Shigella flexneri*. J. Bacteriol. 172:1905-1915

Harris, L. and Griffiths 1992. The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction (PCR). *Food Res. Internat.* 25:457-469

Hernández G, Maria. 2006. Detección y valoración de fuentes y mecanismos de contaminación microbiana durante la elaboración de alimentos en cocinas de servicio masivo. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. PROPAC-Universidad Autónoma de Querétaro.

Hennessy, T.W., Hedberg, C.W. and Slutsker, L. 1996. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infection from ice cream. *New Engl. J. Med.* 334:1281-1286

Heissenhuber, A., W. Hautmann, S. Arenz, R. Kugler, W. Kleih, S Ludwig and, M Wildner. 2005. Accumulated occurrence of illnesses with *Salmonella enteritidis* in hospitals and nursing homes in the district Oberallgaeu, Bavaria, in July 2004. *Gesundheitswesen* 67:845-852

Higuchi, R., C.H. von Beroldingen, G.F. Sensabaugh and H.A. Erlich. 1998. DNA typing from single hairs. *Nature* 332:543-546

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S.T. Williams. 1994. *Bergey,s Manual of Determinative Bacteriology.* 9th. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.MD, EUA

Hoorfar , J.P. Ahrens , and P. Radstrom . 2000. Automated 5, nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enteric.* *J. Clin. Microbiol.* 69: 548-553

ILSI Research Foundation. 2005. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis a risk based approach. *J. Food Prot.* 68:1932-1994

International Association for Food Protection 1999. Procedures to Investigate Foodborne Illness. 5° edition pág. 1-137.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1998. Potential application of risk assessment techniques to microbiological issues related to international trade in foods and food products. *J. Food Prot.*61:1075-1086.

International Organization for Standardization .www.iso.org. consultada 10 marzo 2009.

Iversen, C., N. Mullane, B. Mc Cardell, B. D. Tall, A. Lehner, S. Fanning, R. Stephan, H. Joosten. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1442–1447.

Iversen, C., A. Lehner, N. Mullane, E. Bidlas, I. Cleenwerck, J. Marugg, S Fanning, R. Stephan, H. Joosten. 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. *BMC Evol. Biol.* 7:64-74.

Iversen, C., M. Lane and S. J. Forsythe. 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:378–382.

Jouve, J. L. 2002. Microbiological risk assessment (MRA): an introduction: 47-63. In: Microbiological Risk Assessment in Food Processing. Woodhead Publ. Limited, England

Kaufmann, M. E. 1998. Pulse-field gel electrophoresis. *Meth. Mol. Med.* 15:17-31

Khon, M., T. Farley, T. Ando, M. Curtis, S. Wilson, Q. Jin, S. Monroe, R. Baron, L. McFarland and, R Glass. 1995. An outbreak of norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. *J. Am. Med. A.* 6:466-471

Khuri-Bulos, N. A, M. Abu Khalaf, A. Shehabi and K. Shami. 1994. Foodhandler-associated *Salmonella* outbreak in a university hospital despite routine surveillance cultures of kitchen employees. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 15 (5):311-314

Kim, H., J. H. Ryu and, L. Beuchat. 2006. Attachment of and Biofilm Formation by *Enterobacter sakazakii* on Stainless Steel and Enteral Feeding Tubes. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 72(9):5846-5856

Komachi, J. and Johnson. 2001. *Enterobacteriaceae*, coliform and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. Cap.8 Pouch, F. And Ito, 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th Ed. American Public Health Association. p.74-76.

Kumarasinghe, G., W. J. Hamilton, J. D. M. Gould, S. R. Palmer, J. A. Dudgeon and W. C. Marshall. 2004. An outbreak of *Salmonella* Muenchen infection in a specialist pediatric hospital. *J. Hosp. Infect.* 3(4):341-344

Labuza, T. P., B. Fu and, P. Taoukis. 1992 Prediction for shelf life and safety of minimally processed CAP/ MAP chilled foods: a review. *J. Food Prot.*, 55-74.

Lammerding, A. M. and, G. M. Paoli. 1997. Quantitative risk assessment: an emerging tool for emerging foodborne pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*34:1991-1996

Lai, K. K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and review of the literature. *Medicine*. 80:113–122.

Lehner, A., T. Tasara and, R. Stephan. 2004. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.*4:43-49.

Lempel, K.A and, Y. Chen. 2009. Method for isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. *Inter. J. Microbiol.* 136:179-184.

Liu, T., K. Liljebjelke, E. Bartlett, C. Hofrace, S. Sanchez and, J. Maurer. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *J.Food Prot.* 65:1227-1232

MacKenzie, W. R., N. J. Hoxie, M. E. Procter, et al. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Engl. J. Med.* 331:161-167

Maguire,H., P. Pharoah, B. Walsh, C. Davison, D. Barrie, E. J. Threlfall and, S. Chambers. 2000. Hospital outbreak of *Salmonella* Virchow possibly associated with a food handler. *J. Hosp. Infect.* 44(4):261-266.

Malilay, J., A. Henderson, M. McGeehin and, W. D. Flanders. 1997. Estimating health risks from natural hazards using risk assessment and epidemiology. *Risk Analysis*. 17:353-358.

Malorny, B., P. T. Tassios, P. Radstrom, N. Cook, M. Wagner, and J Hoorfar. 2003. Standardization of diagnostic PCR for detection of food.borne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 83:39-48

Malorny ,B. D. Made, P. Teufel, C. Berghof-Jager, I. Huber, A. Anderson and, R. Helmuth. 2007. Multicenter validation study of two blockcycler-and one capillary – based real-time PCR methods for detection of *Salmonella* in milk powder. *Int. J. Food Microbiol.* 117:211-218

Mange, J. P., R. Stephan, L. Borel, P. Wild, K. S. Kim, A. Pospischil and A. Lenher. 2006 Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol.* 6:58-68.

Martin, S. A., T. S. Wallsten and, N. D Beaulieu. 1995. Assessing the risk of microbial pathogens: application of a judgment-encoding methodology. *J. Food Prot.* 58:289-295

Martinez, J. M. 1973. Estudio epidemiológico de disentería bacilar. *Bol Of. Sanit. Panam.* 75:213-224

Mason, B.W., N. Williams, R.L. Salmon, A. Lewis, J. Price, K.M. Johnston and R.M. Trott. 2001. Outbreak of *Salmonella* Indiana associated with egg mayonnaise sandwiches at acute NHS hospital. *Commun. Dis. Public Health.* 4(4):300-304.

Mead, G. C. 2000. Fresh and further-processed poultry: 445-471. In: The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol. I. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W. (Eds.). Aspen Publishers, Inc., Maryland, EUA.

Meakins, S. M., G. K. Adak, A. Lopman and S. J. O'Brien. 2003. General outbreaks of infectious intestinal disease (IID) in hospitals, England and Wales, 1992-2000. J. Hosp. Infect. 53:1-5.

Medina A., Gustavo. 2005. Dinámica de bacterias patógenas en alimentos de alto riesgo elaborados en cocinas de hospitales. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. PROPAC-Universidad Autónoma de Querétaro.

Ministerio de Salud de Chile (Minsal) 2009. www.minsal.cl

Molina-Gamboa, J. D., S. Ponce de León Rosales, M.L. Guerrero Almeida, A.C. Carvalho et al. 1997. *Salmonella* gastroenteritis outbreak among workers from a tertiary care hospital in Mexico City. Rev. Invest. Clin. 49(5): 349-353.

Molloy, C., C. Cagney, S. O'Brien, C. Iversen, S. Fanning and G. Duffy. 2009. Surveillance and characterisation by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. Int. J. Food Microbiol. 136:198-203.

Morton, R. D. 2001. Aerobic Plate Count. In Pouch, F. and K. Ito. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th Ed. American Public Health Association. p.63-68.

Mossel, D. A. and, B. Moreno García. 1982. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A. España.

Mossel, D.A and, D. M Drake. 1990. Processing food for safety and reassuring the consumer. *Food Technol.* 44(12):63-67

Miliotis, M., S. Dennis, R. Buchanan AND, M. Potter. 2008. Food Additives & Contaminants: Part A. Volume 25, Issue 9: 1052 – 1057

McMeekin, T. A., J. N. Olley, T. Ross and, D. A Ratkowsky. 1993. Predictive Microbiology: Theory and Application. Research Studies Press, LTD., Taunton, England. 358

Mintz, E.D., M.L. Cartter, J. L. Hadler, J. T. Wassell, J. A. Zingeser and R. V. Tauxe. 1994. Dose–response effects in an outbreak of *Salmonella* enteritidis. *Epidemiol. Infection.* 112:13-23

Mossel, D. A. and, B. Moreno García. 1982. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A. España

Nabbut, N. H., E. K. Barbour, H. M. Al-Nakhli and, S. I. Zamel. 1982. A food illness outbreak caused by *Salmonella* Muenster. *J. Food Prot.* 45:23-25

Naimi, T.S, J. H. Wicklund and, S. J. Olsen. 2003. Concurrent outbreaks of *Shigella sonnei* and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections associated with parsley: implications for surveillance and control foodborne illness. *J. Food Prot.* 66:535-541.

Nazarowec-White, M. and, J. M. Farber. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J. Med. Microbiol.* 48:559–567.

Nazarowec-White, M. and, J. M. Farber. 1997. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Prot.* 60:226–230.

NORMA Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Disponible: <http://www.dof.gob.mx/documentos/3980/salud/salud.htm>. Consultado: Febrero 2009.

O'Brien, S. J., P. S. Murdoch, A. H. Riley, I. King, M. Barr, S. Murdoch, A. Grieg, R. Main, W. J. Reilly and, F. M. Thomson-Carter. 2001. A foodborne outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H type in hospital. 2001. *J. Hosp. Infect.* 49:167-172

Opal, S. M., K. H. Mayer, F. Roland, J. Brondum, J. Heelan and, L. Lyhte. 1989. Investigation of a food-borne outbreak of salmonellosis among hospital employees. *Am. J. Infect. Control.* 17(3):141-147.

Osterholm, M. T., J. C. Forgang, T. L Ristemen et al. 1981. An outbreak of foodborne giardiasis. *New Engl. J. Med.* 304:24-38

Palmer, S. R. 1995. Outbreak investigation: the need for “quick and clean” epidemiology. *Internat. J. Epidemiol.* 24(3):S34-S38

Palmer S. R. and, B. Rowe. 1983. Investigation of outbreak of *Salmonella* in hospitals. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 24:891-893

Paoli, G. and, E. Hartnett. 2009. Overview of a Risk Assessment Model for *Cronobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula. FAO .OMS <http://www.mramodels.org/esakmodel/ESAKRAModelWizard.aspx>

Perez Miravete, A. 1973. Infecciones producidas por *Shigella dysenteriae* 1 en México. Bol. Of. Sanit. Panam. 74:392-400

Potter, M., Archer, A. Benson. 2000. IFT Expert on Emerging Microbiological in Food Safety Issues. Implications for Control in the 21 st. Century

Réglier-Poupet, H., C. Parain, R. Beauvais, P. Descamps, H. Gillet, J. Le Peron, P. Berche, and A. Ferroni. 2005. Evaluation of the quality of hospital food from the kitchen to the patient. J. Hosp. Infect. 59:131-137

Ribot, M., M. A. Fair, R. Gautom, S. Cameron, B. Hunter, B. Swaminathan and, T. Barret. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathogens Dis. 3:59-65

Roberts, T. A. 1997. Microbial growth and survival: developments in predictive modeling. Food Technol. 51(4): 88-90.

Roos, T. and, T.A. McMeekin. 1994. Predictive microbiology. Int. J. Food Microbiol. 23: 241-246

Scott, M. T., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R Farrah, and, J. Lukasic. 2002. Microbial source tracking; current methodology and future directions. Appl. Environ. Microbiol. 68:5796-5803

Seals, J. E., J. D. Snyder, T. A. Edell et al. 1981. Restaurant-associated type A botulism: transmission by potato salad. Am. J. Epidemiol. 113:436-444

Sharpe, A. 2001. Detection of microorganisms in Foods: Principles of Physical methods for Separation and Associated Chemical and Enzymological Methods of detection. Edit. Frances Pouch Downes 4° edition. 61: 1734-1760

Sharrar, R. G. 1987. General principles of epidemiology: 15-34. In: Preventive Medicine and Public Health. Cassens, B.J. (Ed.). John Wiley & Sons

Simone, E., M. Goosen, S. H. W. Notermans and, M. W. Borgdorf. 1997. Investigations of foodborne diseases by food inspection services in The Netherlands, 1991-1994. J. Food Prot. 60:442-446

Sjöling, A, G. Wiklund, S. J. Savarino, D. I. Cohen, and, A.-M. Svennerholm. 2007. Comparative Analyses of Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Toxins and Colonization Factors. J. Clin. Microbiol. 45(10):3295-3301.

Stevenson, P., R. McCann, R. Duthie, E. Glew and, L. Ganguli 1994. A hospital outbreak due Norwalk virus. J. Hosp. Infec. 26:261-272

Stevenson, J., and S. Hanson. 1996. Outbreak of *E. coli* O157:H7 phage type 2 infection associated with eating precooked meat. Public Health laboratory. Communicable Disease Report. 6(8):116-118

Stoop, B., A. Lenher., C. Iversen, S. Fanning, S. 2009. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. Int. J. Food Microbiol. 136:165–168

Swanson, K., R. Petran and, J. Hanlin. 2001. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods. Edit. Frances Pouch Downes. 4^o edition. 6:53-67

Strohbehn, C., J. Sneed, P. Paez and, J. Meyer. 2008. Hand Washing Frequencies and Procedures Used in Retail Food Services. J. Food Prot. 71:1641-1650.

Teunis, P. F. M. and, A. H. Havelaar. 2000 . The Beta Poisson dose-response model is not a single hit model. Risk Anal. 20(4), 513-520.

Teunis, P. F. M., O.G. Van der Heijden, J. W. Van der Giessen and, A. Havelaar. 1996. The dose response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens. RIVM. 28450002.

Thomas, H. A. 1942. Bacterial densities from fermentation tube test. J. Am. Water Works Assoc. 34:572-576

Todd, E.C.D. 1985 Economic loss from foodborne disease outbreaks associated with foodservice establishment. J. Food Prot. 48:169-180

Todd, E.C.D. 1989. Preliminary estimates costs of foodborne disease in the United States. J. Food Prot. 52:595-601

Todd, E. C. D. 1994. Surveillance of foodborne disease. In: Foodborne Disease Handbook. Vol. 1. Ed: Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D. and Cliver, D.O. (Rds.). Marcel Dekker, Inc. N.Y. referido en Fernández Escartín 2008

Todd, E. C. D., J. D. Greig, C. A. Bartleson and, B. S. Michaels. 2008. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part. 4. Infective doses and pathogen carriage. J. Food Prot. 70:2339-2373

Todd, E. C. D., J. D. Greig, C. A. Bartleson and, B. S. Michaels. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part. 2. Description of outbreaks by size, severity, and settings. J. Food Prot. 70:1975-1993

Todd, E. C. D., J. D. Greig, C. A. Bartleson and, B. S. Michaels. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part.

3. Factors contributing to the outbreak and description of outbreak categories. J. Food Prot. 70:2199-2217.

Tompkin, R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food- Processing Environment. J. Food Prot. . Vol 64.(4) :709-725.

Telzac, E. E., L. D. Budnick, M. S. Greenberg et al. 1990. A nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* infection due to the consumption of raw eggs. New Engl. J. Med. 323:394-397

Teneover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. J. Clin.Microbiol. 33:2233-2239

Umassankar, S.,E.U. Mrinda, M. M Hannan, C. M. fry and, B.S. Azadian. 1996. An outbreak of *Salmonella enteritidis* in a maternity and neonatal intensive care unit. J. Hosp. Infect. 34(2):117-122.

Vaillant, V., H. De Valk, E. Baron et al. 2005. Foodborne infections in France. Foodborne Patog. Dis. 2:221-232

Van Acker J., F. De Smet, G. Muyldermans, A. Bougatef, A. Naessens and, S. Lauwers. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. J Clin Microbiol. 39:293–297

Vanderzant, C. and, D. F. Splittstoesser. (ed.). 3th. ed. American Public Health Assoc. Washington, D. C. pp: 371-422

Victor, T, R. du Toit, J. Van Zyl , A. J. Bester and P. D. Van Helden. 1991. Improved method for the routine identification of toxigenic *Escherichia coli* by DNA amplification of a conserved region of the heat-labile toxin A subunit. J. Clin Microbiol. 29:158–161.

Wall, P. G., M. J. Ryan, L. R. Ward and, B. Rowe. 1996. Outbreak of salmonellosis in hospitals in England and wales: 1992-1994. J. Hosp. Infect. 33(3):181-190.

Wijtzes, T.; J. C. Wit, J. H. Huis, K. Vant Riet and, M. H. Zwietering. 1995. Modelling bacterial growth of *Lactobacillus curvatus* as a function of acidity and temperature. Appl. Environ. Microbiol. 61(7): 2533-2539.

WHO/FNU/FOS 1995 Aplicación del análisis de riesgos a cuestiones de normas alimentarias Informe de la Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos Ginebra, Suiza 3-17 de Marzo de 1995 /95.3

WHO/FAO 2003. Guidelines on Hazard Characterization for pathogens in Food and water. Microbiological risk assessment series N° 3 .Pág.1-73

WHO/FAO. 2008. Exposure assessment of microbiological hazards in food. Guidelines. Microbiological risk assessment series N° 7 .Pág.1-92

World Health Organization. 2007. Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula. Available at: <http://www.who.int/foodsafety>. Accessed 05 November 2010.

Whiting, R. C.and, R. L. Buchanan. 1994. Microbial modeling. Food Technol. 48 (6): 113-120

Whiting, R. C. 1995. Microbial modeling. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 35: 467 – 494.

Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol.63:3741-3751

Youseff, M., A, M. Shurman, M. Bougnoux, M. Rawashdeh, S. Bretagne and, N. Strockbine. 2000. Bacterial, viral and parasitic pathogens associated with acute diarrhea en hospital children northern Jordan. FEMS. Inmunol. Med. Microbiol. 28:257-263.

Zwitering, M. H., H. G. Cuppers, J. C. de Wit and, K. Van't Riet. 1994 Evaluation of data transformation and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. Appl. Environ. Microbiol. 60(1): 195-203.

Zwitering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts and, K. Van't Riet. 1990 Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56(6): 1875-1881.

Zwietering, M, J. DE Koos, B. Hasenack, J. DE Witt and K. Van'T Riet. 1991. Modelling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Biol. 57:1094-1101.

9. ANEXOS

Anexo A

1. Formato de registro de violaciones a prácticas y operaciones higiénicas a evaluar en la cocina del hospital materno infantil

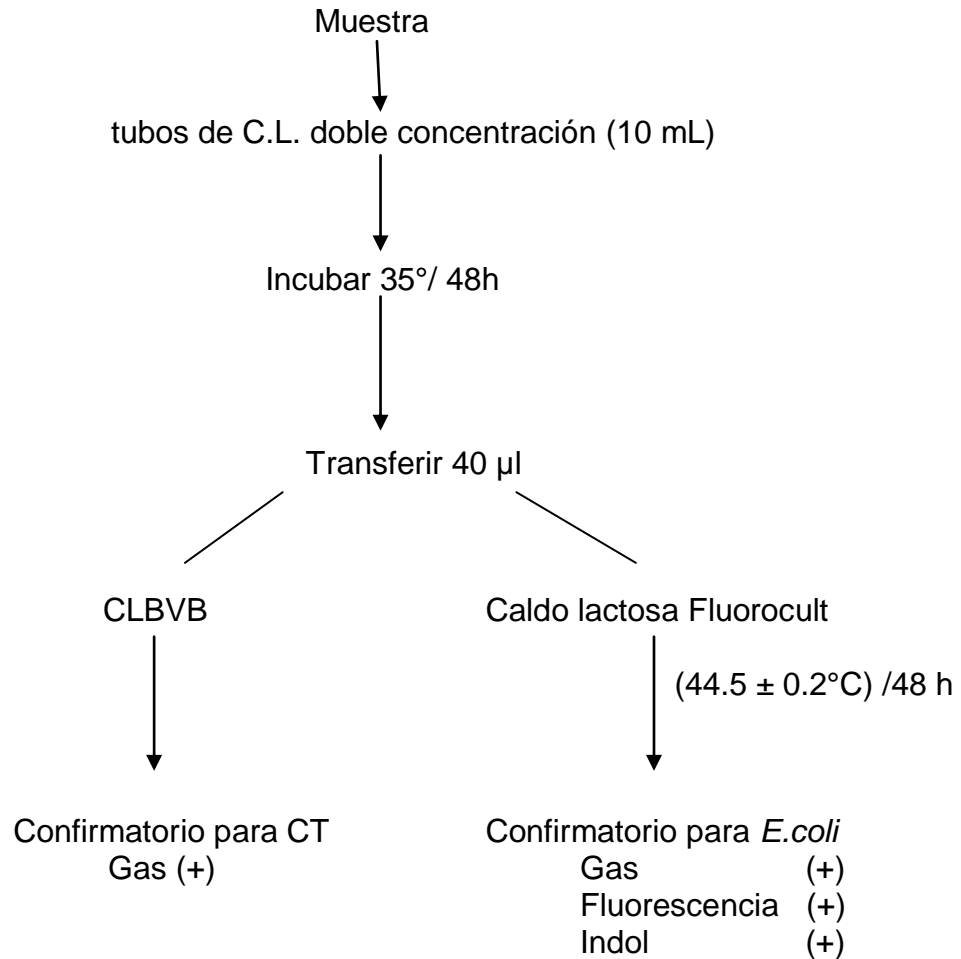
Aspectos observados	Si	No	Observaciones
1. Alimentos fuente insegura			
2. Inadecuada cocción			
3. Inadecuada temperatura de conservación			
4. Equipo contaminado			
5. Prácticas de manejo higiénico del personal			

2. Formato de registro de violaciones a prácticas y operaciones higiénicas en visitas realizadas al lactario del hospital materno infantil

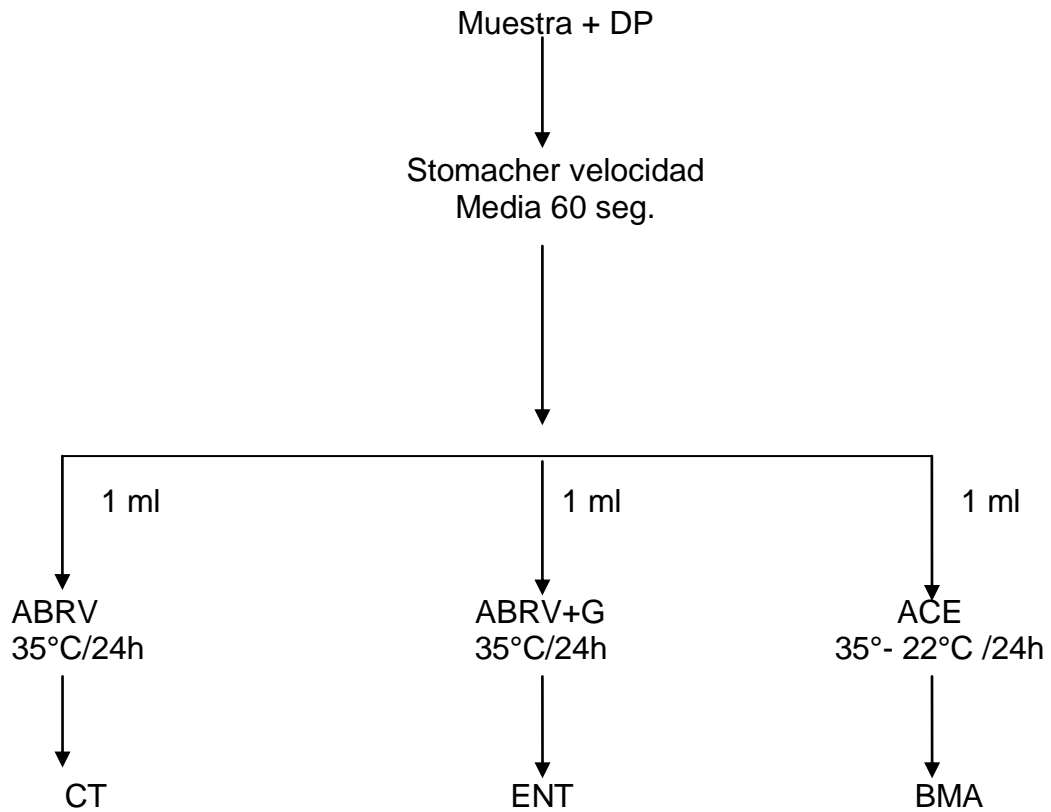
Aspectos evaluados	Si	No	Observaciones
1. Alimentos fuente insegura			
2. Temperatura de hidratación			
3. Temperatura de conservación			
4. Tiempo de distribución			
5. Equipos y utensilios desinfectados			
6. Prácticas de manejo higiénico del personal			

ANEXO B

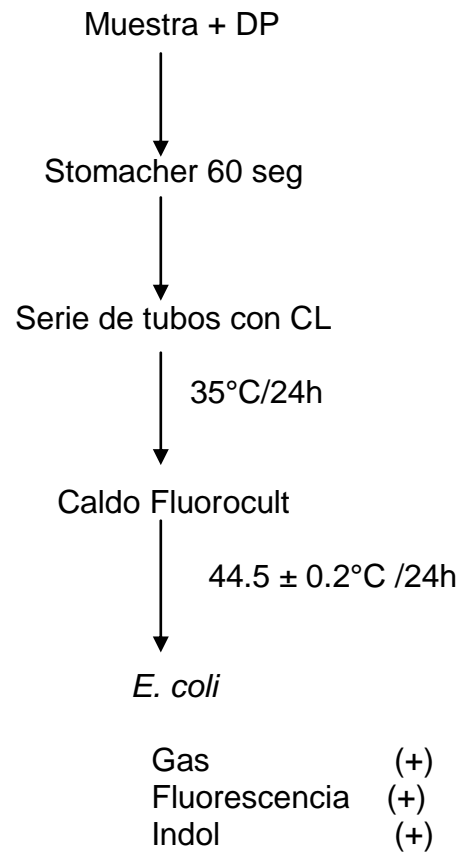
1. Cuantificación de coliformes totales y *E. coli* en agua por la técnica de número más probable



2. Cuantificación de C.T., ENT, BMA por vaciado en placa a partir de alimentos



3. Cuantificación de *E. coli* por la técnica de NMP.



4. Aislamiento e identificación *Salmonella*

Preenriquecimiento

Muestra + CST

35°C/24 h

Stomacher, 60 seg.

1 ml

PCR

Enriquecimiento

CTT, CRV

43°C/24 h

Aislamiento

XLD, VB, ASB

35°C/24 h

Pruebas bioquímicas	Incubación
TSI, LIA, MIO	35°/ 24 h
Ureasa (-)	35°/ 24 h
VP (-)	35°/ 48 h
Citrato (+)	35°/ 96 h
RM (+)	35°/ 5 días.

Confirmación serológica

Antisuero Poli A & Vi

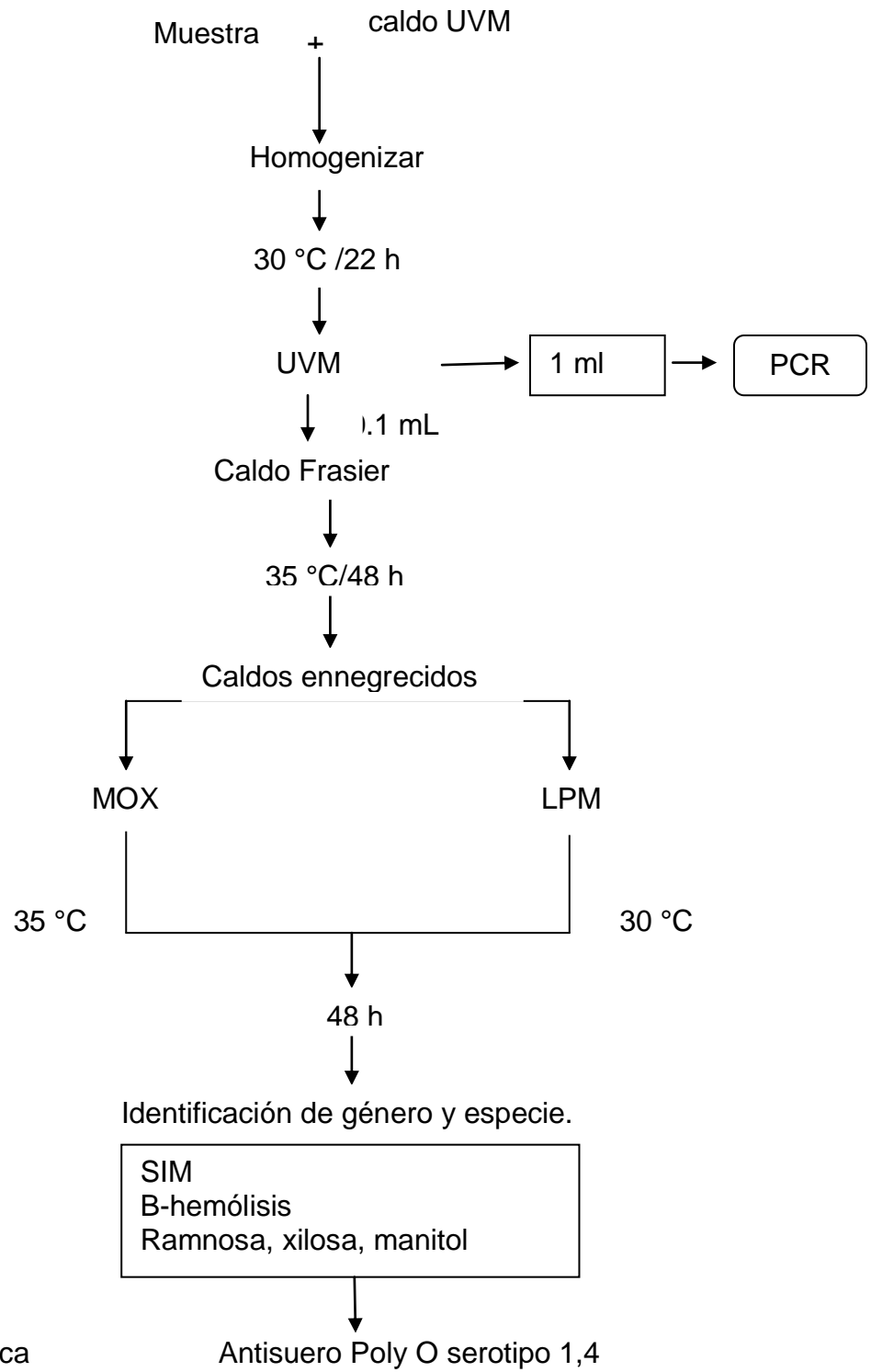
5. Aislamiento e identificación de *L. monocytogenes*

Preenriquecimiento

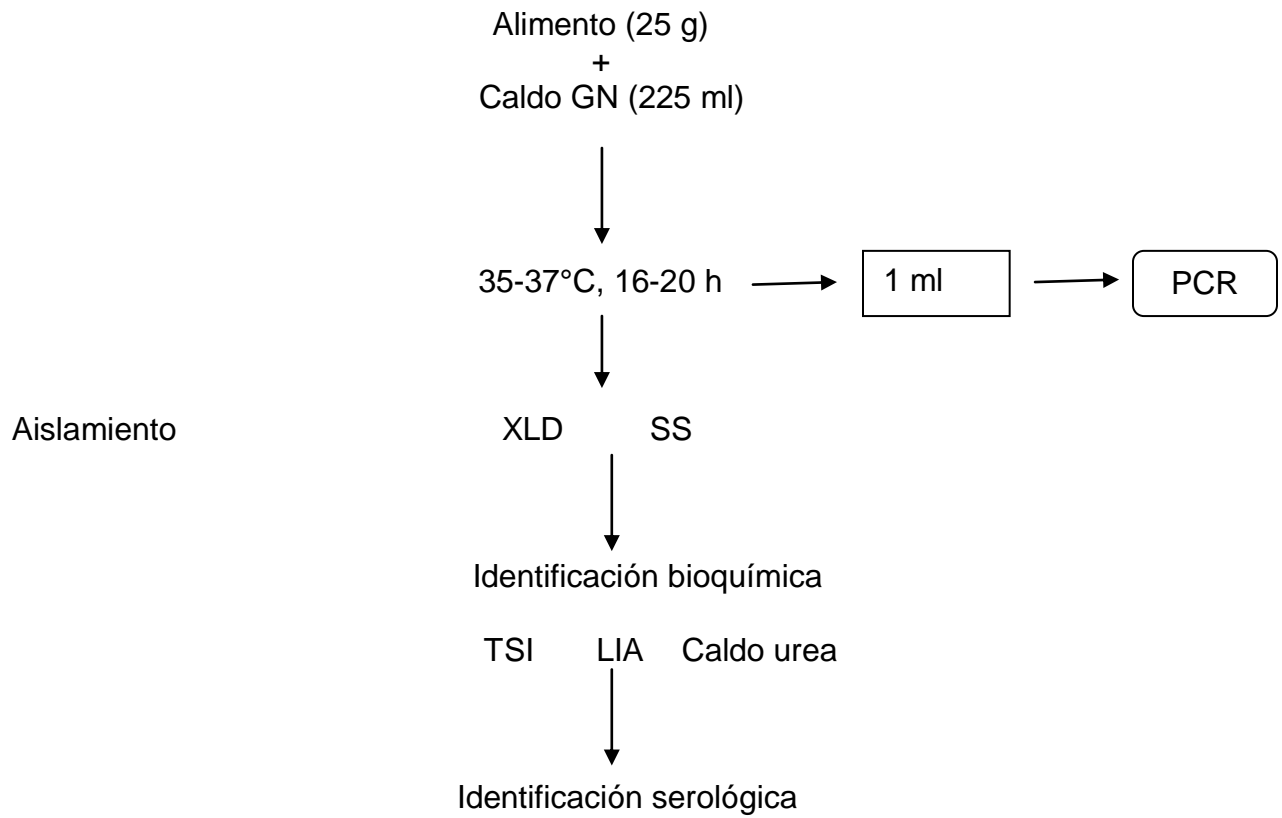
Enriquecimiento

Aislamiento

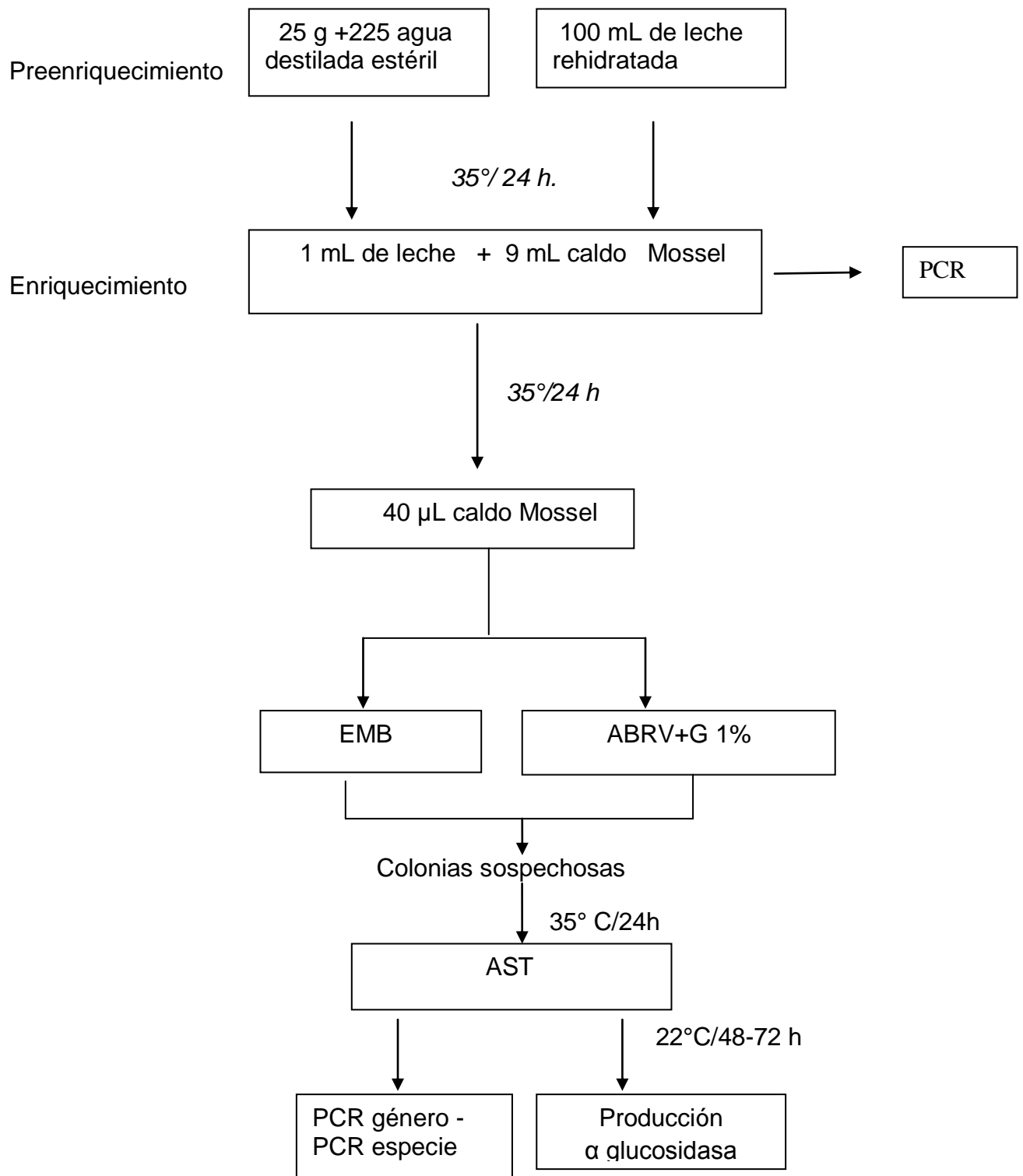
Confirmación serológica



6. Aislamiento de *Shigella* spp a partir de alimentos

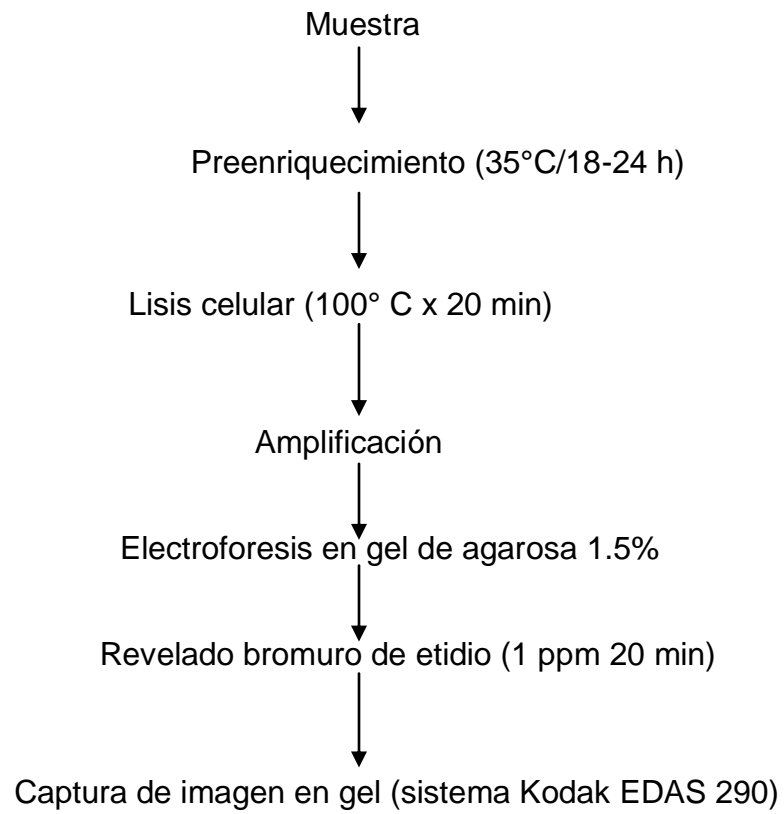


7. Aislamiento e identificación de *Cronobacter* spp y sus especies



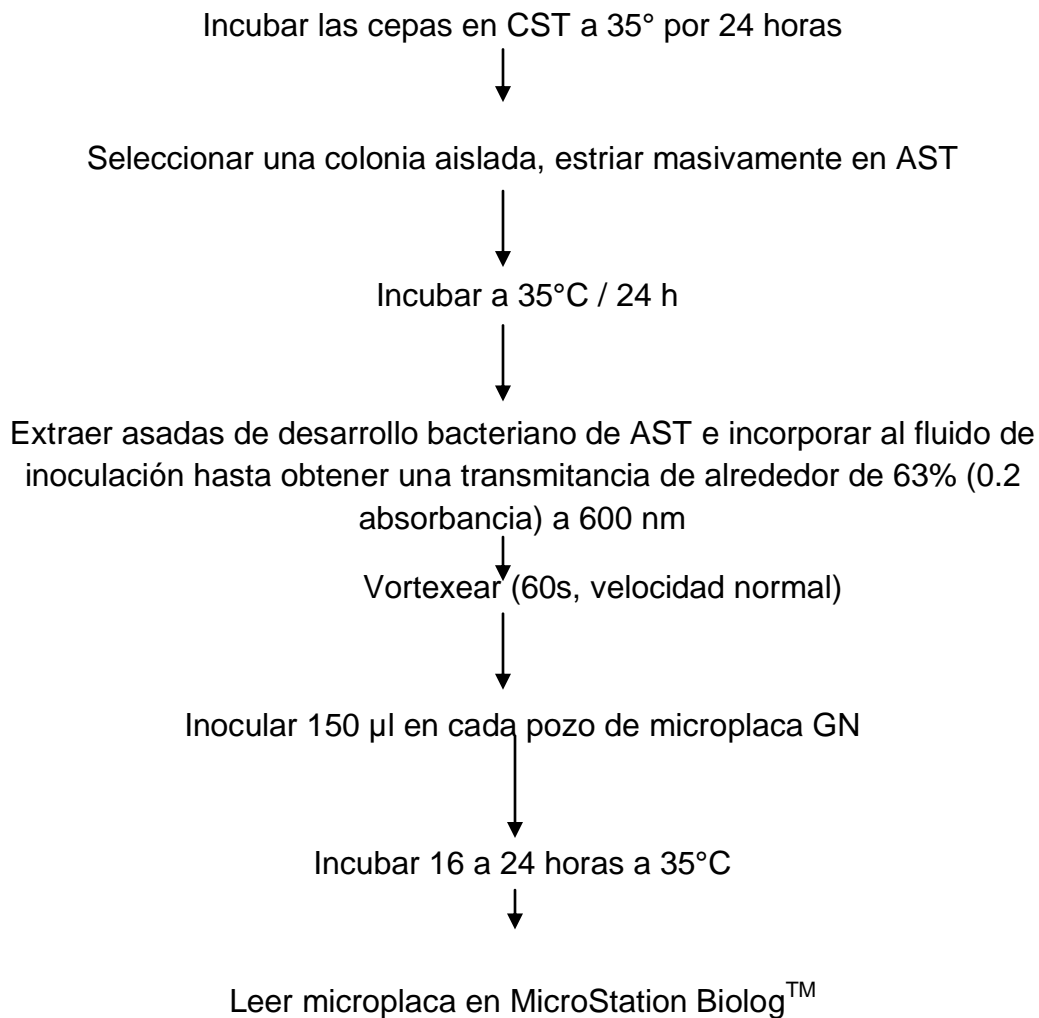
Anexo D

1. Técnica general de la reacción en cadena de la polimerasa



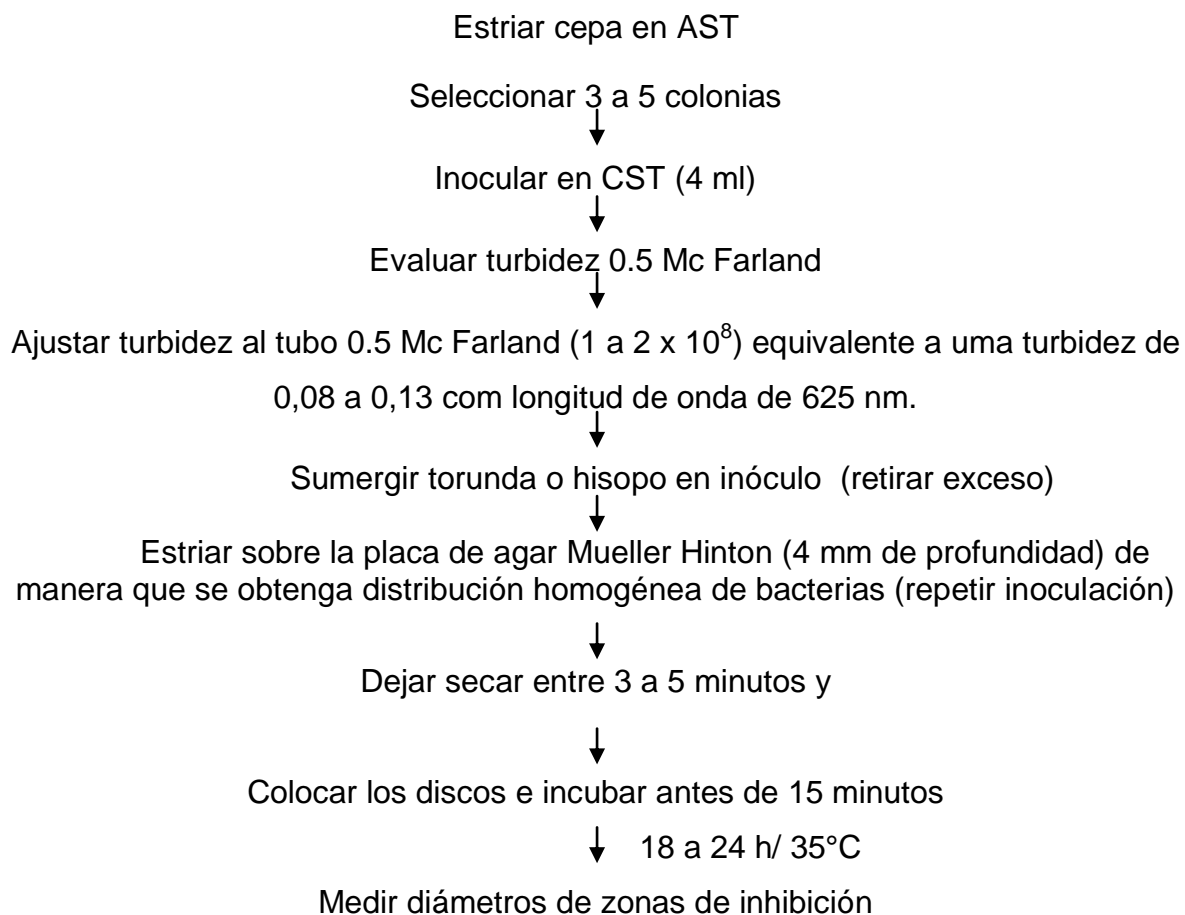
Anexo E

1. Identificación fenotípica de cepas de *C. sakazakii* con equipo BIOLOG



Anexo F

1. Evaluación del perfil de resistencia a antibióticos de cepas de *C. sakazakii* (CLSI, 2006).



Anexo G

1. Técnica de Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (EGCP)

