



Universidad de Panamá

Campus central

Facultad de Ciencias Naturales y Tecnología

Escuela de Biología

Departamento de Microbiología y Parasitología

**Trabajo de graduación para obtener la Licenciatura en Biología con
Orientación en Microbiología y Parasitología**

**Detección de *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles obtenidas
de un hospital de Panamá**

Presentado por:

Valentina Quiceno

EC-43-12763

Asesor principal:

Ricardo Sousa

Asesor:

Alberto Mena

Asesor:

Cecilio Puga

2023

DEDICATORIA

Dedico mi tesis principalmente a Dios, por abrirme las puertas y darme la fuerza necesaria para culminar esta meta en mi vida. A mis padres Juan Carlos y María Claudia, por todo su amor y por motivarme a seguir hacia adelante. A mi esposo César, y a mis hijos Mía y Sebastián por ser mi pilar y brindarme su paciencia y comprensión en este largo camino.

Y, finalmente, a los que no creyeron en mí, que me ayudaron a mantenerme firme y me instruyeron a lo largo de mi trayectoria.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar les agradezco a mis padres y a mi esposo que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos, ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades, también son los que me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlo.

Le agradezco muy profundamente a mi asesor por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada. Gracias por su guía y todos sus consejos.

Le agradezco infinitamente a todos los docentes que han sido parte de mi camino universitario, y a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos necesarios para hoy poder estar aquí.

También le agradezco a Expert Lab por haberme abierto las puertas y brindarme la oportunidad de realizar esta importante investigación.

Índice de contenido

1.	ANTECEDENTES	4
1.1.	Breve historia del Género <i>Cronobacter</i>	5
1.2.	Morfología y características fisiológicas.....	5
1.3.	Características bioquímicas del Género	6
1.4.	Taxonomía y clasificación.....	7
1.5.	Hábitat.....	9
1.6.	Fuentes de contaminación por <i>Cronobacter sakazakii</i>	9
1.7.1.	Lácteos	10
1.7.2.	Productos alimenticios.....	11
1.8.1.	Virulencia.....	12
1.8.2.	Mecanismo de patogenicidad	14
1.9.	Brotos	16
2.	Objetivo general.....	19
2.1.	Objetivos específicos	20
3.	Hipótesis	21
4.	Metodología.....	23
4.1.	Ámbito de estudio.....	24
4.2.	Selección de la muestra	24
4.3.	Preparación de medios	25
4.3.1.	Agua Peptonada bufferada.....	25
4.3.2.	Caldo lauril sulfato triptosa modificado + vancomicina (LSTm)	25
4.3.3.	Chromagar	25
4.3.4.	MRD.....	25
4.3.5.	Caldo soja triptona.....	25
4.4.	Técnicas	26
4.4.1.	Preenriquecimiento:	26
4.4.2.	Enriquecimiento selectivo	26
4.4.3.	Aislamiento presuntivo.....	26
4.4.4.	PCR Tiempo Real	26
8.	Bibliografía.....	51

Índice de tablas

1.1. Reacciones bioquímicas características de <i>C. sakazaki</i>	7
1.2. Clasificación taxonómica.....	8
5.1. Resultados de la prueba presuntiva para <i>Cronobacter sakazakii</i> en muestras de 25 gramos de fórmulas lácteas infantiles	29
5.2. Resultados de la prueba confirmativa para <i>Cronobacter sakazakii</i> en muestras de 25 gramos de fórmulas lácteas infantiles	34
5.3. Resultados del recuento de Enterobacterias en 30 gramos de fórmula láctea infantil.....	39
5.4. Resultados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 100 mL de agua potable empleada para la reconstitución de fórmulas lácteas infantiles	40
5.5. Resultados de <i>E. coli</i> en 100 mL de agua potable empleada para la reconstitución de fórmulas lácteas infantiles	40
5.6. Resultados de Coliformes Totales en 100 mL de agua potable empleada para la reconstitución de fórmulas lácteas infantiles	41
5.7. Resultados del recuento Aerobios Mesófilos en manos de un colaborador del laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá	41
5.8. Resultados del recuento de hongos y levaduras en manos de un colaborador del laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá	42
5.9. Resultados de <i>E. coli</i> en manos de un colaborador del laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá	42
5.10. Resultados de recuento de aerobios mesófilos en superficies del laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá	43
5.11. Resultados de recuento de hongos y levaduras en superficies del laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá	44
5.12. Resultados de recuento de <i>E. coli</i> en superficies del laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá	44
5.13. Resultados del recuento de Aerobios Mesófilos en una muestra ambiental de 200 L / min	45
5.14. Resultados del recuento de hongos y levaduras en una muestra ambiental de 200 L / min	46

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii was investigated in powder infant formulas (PIF) obtained of a hospital from Panama Republic. In this investigation were observed some parameters, like this: good practices during the preparation of the milk, microbiology analysis in water reconstitution, microbiology analysis in hands of the sanitary personal and microbiology analysis in the environmental where milk is prepared. Chromagar technique was used for identification of the microorganism and the PCR technique like a confirmatory test. It was studied 87 samples of the reconstituted milk. There was no presence of *Cronobacter* in the milk. However, there was the presence of *Escherichia coli* in one sample of water. It could be for inadequate hand washing of the sanitary people or some cross contamination. Results of the microbiology analysis of the environment and the good practices were within the permitted limits. Monitoring of the different parameters is recommended for minimized risk of the presence of *Cronobacter*.

1. ANTECEDENTES

1.1. Breve historia del Género Cronobacter

En 1980 se conoce este microorganismo como *Enterobacter sakazakii* y posteriormente se le cambia el nombre a *Cronobacter sakazakii* en honor al microbiólogo Richi Sakazakii.

Enterobacter sakazakii, fue el nombre propuesto inicialmente para el organismo que previamente era conocido bajo el término de *Enterobacter cloacae* pigmentado de amarillo. Para la clasificación de este organismo se propuso un cambio basado en diferencias entre los organismos nombrados oficialmente como *E. cloacae* y *Cronobacter sakazakii*, principalmente en el proceso de hibridación del ADN, diferentes reacciones bioquímicas, producción de pigmentos y la susceptibilidad a antibióticos (Farmer, J.J. y col., 1980).

1.2. Morfología y características fisiológicas

Cronobacter spp. Son bacterias Gram negativas, de forma de bastoncillos, móviles, anaeróbicos facultativos (Feeney y col., 2014). Cuenta con un tamaño de 3 μm de largo y 1 μm de ancho aproximadamente; la disposición de sus flagelos es peritrica y es un bacilo no esporulado (Petrola, 2012). La temperatura óptima para el desarrollo de este patógeno se encuentra entre 37 °C y 43 °C; a pesar de ello, se da sin inconvenientes entre los 6 °C y 45 °C en caldo cerebro-corazón y a un pH que oscila entre 5 - 10. Se ha reportado que ninguna cepa de este patógeno crece a valores menores de 4.5 en la escala de pH (Iversen, 2008). Su crecimiento es posible en concentraciones de hasta 100 mM de sulfato de amonio, nitrato de sodio y nitrito de sodio; la bacteria no crece en presencia de concentraciones mayores a 20 mM de benzoato de sodio. Este patógeno es conocido por su resistencia térmica y posee un pH óptimo de crecimiento (5 - 10) que varía entre las diferentes cepas (Iversen, C. y col., 2008; Montero, 2012; Singüenza, 2014; Medina, L. y col., 2014).

Según Farmer, J.J. y col. (1980) se trata de un microorganismo capaz de crecer empleando como única fuente de carbono el citrato, sin ningún requerimiento aparente de vitaminas, aminoácidos o factores de crecimiento.

Se descubrió que se trata de una bacteria anaerobia facultativa, eso debido a su facilidad para crecer sin importar la disponibilidad de oxígeno (Petrola, 2012). Además, se conoce sobre sus capacidades para reducir nitrato, hidrolizar esculina y arginina. Produce ácido de D-manitol, D-manosa, L-rhamosa, L-arabinosa, D-xilosa, trealosa, galacturonato y maltosa. En la prueba del rojo de metilo no presenta reacción, no obstante, suele ser positivo en cuanto a la producción de acetoina, lo que indica la utilización de la ruta metabólica conocida como 2-3 butanodiol, más que una fermentación ácida mixta (Medina, L. y col., 2014).

La fermentación en este tipo de patógenos se basa en la oxidación de hidratos de carbono, con la producción o no de gas. Las bacterias del género *Cronobacter*, pueden sobrevivir por un periodo de hasta 2 años en ambientes con humedades relativamente bajas, como lo son las fórmulas lácteas infantiles (PIF), con una actividad de agua (A_w) de 0.14 - 0.27. Este patógeno cuenta con un periodo de latencia muy corto, el cual dura aproximadamente 1,7 horas, lo que beneficia su crecimiento rápido en PIF reconstituidas y almacenadas de forma incorrecta (Sigüenza, 2014)

Por otro lado, es importante reconocer que este patógeno cuenta con la capacidad de formar una cápsula de polisacárido que le ayuda a resistir a la desecación y protegerlo de los diferentes agentes desinfectantes, de este modo le confiere la propiedad de adherirse fácilmente a materiales como el silicón, látex, policarbonato y aunque en menor medida, al acero inoxidable (Medina, L. y col., 2014).

1.3. Características bioquímicas del Género

C. sakazakii presenta reacciones bioquímicas muy similares a las que presenta *E. cloacae*. Además, posee zonas de inhibición más amplias alrededor de discos de antibióticos de ampicilina y cefalotina, aspecto que también ayuda a diferenciarlo de *E. cloacae*. Por otro lado, tenemos que *C. sakazakii* crece en revestimiento no selectivo, pero sí diferencial, medio que es comúnmente empleado en la rama de la bacteriología entérica. Sin embargo; la eficiencia en placa de este patógeno se muestra reducida en los medios de placa entéricos con potencial mayormente inhibitorio (Farmer, J.J. y col., 1980). (ver tabla 1.1.)

Tabla 1.1. Reacciones bioquímicas características de *C. sakazakii*

Producción de indol	Negativo
Oxidasa	Negativo
Catalasa	Positivo
Fuente de carbono	
Dulcitol	Negativo
Lactosa	Positivo
Malonato	Negativo
Maltitol	Positivo
Palatinosa	Positivo
Putrescina	Positivo
Turanosa	Positivo
Cis-Aconitato	Positivo
Trans-Aconitato	Negativo
1-0-metil-a-D-glucopiranososa	Positivo

Fuente: Chen, L. y col., 2012

1.4. Taxonomía y clasificación

A continuación, se menciona la clasificación taxonómica (ver tabla 1.2.), y se señalan algunos de los aspectos importantes del género *Cronobacter* y las especies que le componen.

Tabla 1.2. Clasificación taxonómica

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Cronobacter</i>
Especie	<i>sakazakii</i>

Fuente: Inversen y col., 2007

El género *Cronobacter* está genéticamente relacionado con los géneros *Citrobacter* (97,8%) y *Enterobacter* (97,0%); hasta hace poco este género constaba de 10 especies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter dublinesis*, *Cronobacter condimento*, *Cronobacter univeraslis*, *Cronobacter pulveris*, *Cronobacter helveticus*, *Cronobacter zurichensis*. Dentro de estas 10 especies, existen 3 que han sido relacionadas con infecciones neonatales, las cuales son: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus* y *Cronobacter turicensis*. Según un estudio reciente las especies *C. helveticus*, *C. pulveris* y *C. zurichensis* pasan a conformar sus propios subclados, genéticamente diferentes de *Cronobacter* (Feeney y col., 2014).

Basados en el estudio de Farmer, J.J. y col., (1980) se reconoce la existencia de 15 biogrupos pertenecientes a *C. sakazakii*, no obstante; en un estudio más reciente realizado por Iversen y col., (2007), se reconoce la existencia de otro biogrupo y la correlación entre el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr, que separo las cepas de *C. sakazakii* en 16 biogrupos (Iversen y col., 2007).

La actual clasificación de los biogrupos se da en cuatro diferentes grupos de diferenciación, los cuales están basados en el porcentaje de similitud existente entre los biogrupos al comparar la información presente en su ARNr gen 16S, dicha clasificación se observa a continuación (Iversen y col. 2007)

- Grupo de diferenciación 1: incluye los biogrupos: 1-5, 7-9, 11, 13 y 14.
- Grupo de diferenciación 2: Nuevo biogrupo 16

- Grupo de diferenciación 3: Biogrupo 15.
- Grupo de diferenciación 4: Biogrupos 6, 10 y 12 (13).

1.5. Hábitat

C. sakazakii es una bacteria ubicua, encontrada en una gran variedad de embalses en el medio ambiente, donde se incluyen: moscas, plantas, carne, alimentos con alto contenido de almidones y formula láctea deshidratada para bebés (Medina, L. y co., 2014). La amplia variedad de ambientes en los que *C. sakazakii* se encuentra, indica el desarrollo de rasgos que aumentan la supervivencia en condiciones difíciles, como lo son los rayos UV, la capacidad de adherirse a superficies gracias a la formación de fimbrinas, la formación de biopelículas y la capacidad de sobrevivir a la desecación. Esta última estrategia de supervivencia al estrés en particular, ayuda a la resistencia y supervivencia de este patógeno en la PIF, sujeto a la A_w de 0,2 la cual resulta inhóspita para la mayoría de los microorganismos (Feeney y col., 2014).

1.6. Fuentes de contaminación por *Cronobacter sakazakii*

Las principales fuentes de contaminación de los alimentos por *Cronobacter sakazakii* son el suelo, agua y hortalizas, además, de los vectores mecánicos como moscas y roedores (Medina, L. y col., 2014).

C. sakazakii cuenta con una increíble capacidad de formar biopelículas sobre las superficies abióticas, lo cual es un factor importante a la hora de estudiar la fuente de contaminación de las PIF y demás alimentos; adicional a esto, es demostrado que este patógeno cuenta con una alta resistencia a desinfectantes, sin importar que los mismos sean de grado hospitalario, esta característica se denota al estar el patógeno sobre sustancias orgánicas (Petrola, 2012). Estas características le confieren grandes facilidades a la hora de contaminar los alimentos, debido a su presencia en los mesones, instrumentos de preparación de alimentos y en el caso de las PIF se puede encontrar fácilmente en las máquinas involucradas en su fabricación.

Este microorganismo ha sido cultivado en más de 13 países a partir de productos de PIF (Acker y col., 2001). Esto debido a que si bien, es poco probable que sobreviva a la pasteurización de la leche en su estado líquido, existen diferentes etapas previas a su distribución que pueden ser la fuente de

contaminación. Entre estas fuentes de contaminación tenemos la modificación química de la leche, ya que se agregan sustancias extras al ser convertida en polvo y maternizada para cumplir exitosamente su finalidad de alimentar balanceadamente a bebés lactantes. Otra fuente de contaminación pudiera ser el envase. No obstante, este proceso de fabricación no es el único factor de riesgo, ya que la misma se puede contaminar por prácticas inadecuadas de higiene en los hospitales, hogares y demás lugares donde es necesaria la reconstitución de la misma. Además, de que el almacenamiento deficiente de la leche reconstituida, es un factor de riesgo que considerar. (Biering y col., 1989).

Según diferentes estudios, es necesario que el agua empleada para la reconstitución de una PIF este a 50 °C, ya que así se logra inactivar el patógeno en cuestión. Es de tener en cuenta que después de su reconstitución es necesaria la pronta ingesta, ya que el periodo de latencia de *C. sakazakii* es muy corto y puede multiplicarse rápidamente. Es allí, donde el almacenamiento para aquellas formulas reconstituidas en gran cantidad, como es el caso de los hospitales, debe tenerse en cuenta la necesidad de almacenar la fórmula a temperaturas de 4 °C para evitar la multiplicación de *C. sakazakii* (de Simón, S. y col. 2010)

1.7. Asociación de *Cronobacter* con productos lácteos y otros productos alimenticios

C. sakazakii al igual que otras especies de su género, es un microorganismo perteneciente al grupo de los patógenos transmitidos por alimentos, encontrados comúnmente en las plantas, carnes y demás productos alimenticios frecuentes en el hogar (Feeney y col., 2014).

1.7.1. Lácteos

Si bien, no existe una relación directa entre *C. sakazakii* y los productos lácteos, hay que resaltar su prevalencia en las PIF, esto principalmente debido a que las mismas cuentan con todas las condiciones para su crecimiento y sobrevivencia, de esta manera, se ha puesto la mirada especialmente en ellas debido a las graves consecuencias de esta infección sobre sus consumidores, los lactantes.

Otro factor importante se debe a la inexistencia de técnicas para la esterilización del producto después de fabricado, que hace que una ligera contaminación en las instalaciones de la fábrica, llegue hasta el consumidor, impidiendo así que se garantice la inocuidad del producto (Medina, L. y col., 2014).

1.7.2. Productos alimenticios

Cronobacter spp. es frecuentemente aislado del medio ambiente, material proveniente de plantas (trigo, arroz, hierbas y especias) y diversos productos alimenticios, en donde se incluye la fórmula infantil en polvo (PIF). Las diferentes especies pertenecientes a este género llegaron a tener una gran importancia debido a su asociación con infecciones neonatales graves, que pueden llegar a ser fatales (Joseph y col., 2011).

1.8. Patología y sintomatología

La infección por *C. sakazakii*, es reconocida por el amplio cuadro clínico que le representa. Este patógeno es reconocido por causar infección sistémica, además de enterocolitis necrotizante, sepsis, o meningitis; (Biering y col., 1989). De igual manera, se reportan casos menos leves en donde los pacientes presentan diarrea como único síntoma. Los lactantes que sobreviven a la infección por *C. sakazakii* regularmente sufren síntomas neurológicos retardados, como lo son el retraso en el desarrollo cerebral, abscesos cerebrales o hidrocefalia, tetraplejia y retraso en el desarrollo neuronal (de Simón, S. y col., 2010). En 2011, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) recibió unas cepas de *C. sakazaki*, de las cuales se obtuvieron los datos de síntomas de los pacientes, tipo de cepa, posible causa de infección y el lugar en donde fue aislado. De estos datos, podemos resaltar la prevalencia de la cepa ST4, la cual suele causar infección cerebral y con esto las consecuencias más graves. Sin embargo, la cepa ST8, comúnmente produce cuadros diarreicos (Hairiri y col., 2013). La infección por *C. sakazakii* cuenta con una alta tasa de letalidad, siendo esta del 10%-80%, lo que representa un peligro potencial para la vida de quienes la desarrollan (Medina, L. y col., 2014).

La enterocolitis necrotizante neonatal (ECN) es resultado de la colonización del intestino por *C. sakazakii*, este cuadro clínico se da con mayor frecuencia en aquellos bebés prematuros o que obtuvieron bajo peso al nacer. La enterocolitis necrotizante se caracteriza por la inflamación y muerte del tejido intestinal, se trata de una de las afecciones más comunes que puede ocurrir en los recién nacidos, gracias a la cual se identifica a *C. sakazakii* como el responsable de hasta un 80% de muertes infantiles asociadas a infección. Tiene una tasa de incidencia del 2% al 5% en bebés prematuros, dicha tasa aumenta al 13% en bebés que pesan 1500 g a la hora del nacimiento. La ECN tiene una tasa de mortalidad del 10% al 55%, al presentarse la triada de isquemia intestinal neonatal, colonización microbiana del intestino y el exceso de sustrato proteico, asociado con la alimentación con PIF, lo cual al parecer es un requisito previo en la aparición de la ECN (Feeney y col., 2014; Acker y col., 2001).

1.8.1. Virulencia

C. sakazakii es un patógeno que cuenta con un fenómeno de osmotolerancia único, el cual le proporciona acceso a un huésped altamente susceptible a través de las PIF. Los genes de *C. sakazakii* que codifican la capacidad de adherirse e invadir células de revestimiento interno del intestino representan sus principales factores de virulencia (Feeney y col., 2014).

Los factores de virulencia más allá de la invasión se basan en las toxinas, la inmunoevasión e inmunotoxicidad. Los primeros factores de virulencia identificados en *Cronobacter* fueron enterotoxinas, gracias a diferentes estudios, se conoció sobre las proteínas de 66 kDa que era más estable a pH 6. No obstante, la capacidad de estas toxinas para soportar altas temperaturas (90 °C durante 30 minutos), junto con su potente toxicidad celular (LD50D56pg), representa un factor de virulencia significativo para este patógeno transmitido por alimentos. Este microorganismo cuenta con la capacidad de evadir la respuesta inmune innata al sobrevivir e incluso replicarse en macrófagos. Sin embargo, la supervivencia de este organismo en macrófagos varía significativamente entre cepas, la presencia de genes superóxido dismutasa (SOD), encargados de codificar una SOD, ayuda a la supervivencia en fagosomas, en los cuales, las bacterias están sujetas a

condiciones ácidas y con actividad de oxidasa de macrófagos. Se conoce de la persistencia de *C. sakazakii* en macrófagos de hasta 48 horas, lo que demuestra la capacidad que presenta para sobrevivir en un medio ambiente extremo (Feeney y col., 2014).

Otra adaptación que favorece a su virulencia se debe a los flagelos presentes en las cepas ST1 y ST4 que estimulan la activación de citosinas pro y antiinflamatorias en monocitos humanos, como lo son factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina-8 (IL8) e Interleucina-10 (IL10); esta respuesta depende del receptor 5 tipo Toll (TLR5). El genoma de *C. sakazakii* codifica varios factores de virulencia, el huésped contribuye significativamente a través de su toxicidad celular relacionada con el sistema inmunológico. (Feeney y col., 2014)

Según el análisis comparativo de *Cronobacter*, presente en la base de datos Multi-Locus Sequence Typing (MLST), que cubre aislamientos de todas las fuentes; se muestra un especial interés sobre la cepa ST4, esta no solo predomina, también denota una agresividad mayor en cuanto al porcentaje de cepas que ataca a recién nacidos y la forma en que lo hace. Como muestra de esto tenemos que de un total de 20 cepas, 10 de estas pertenecían a recién nacidos; de forma similar, la mayoría de los casos de meningitis eran causados por esta cepa, la cual también se encontró causando bacteremia, enterocolitis necrotizante y diferentes infecciones. Estas cepas ST4 procedían de Países Bajos, Francia, Estados Unidos; Nueva Zelanda, Republica Checa y Canadá, fueron aisladas durante 1977-2008 (Joseph y col., 2011).

Un estudio comparativo realizado por Hariri, Joseph, & Forsythe (2013), que comenzó en 1953 y terminó en 2008, analizó la relación entre el tipo de secuencia genética del microorganismo con la gravedad de la infección. Este análisis se realizó mediante la recopilación de los datos del paciente, la muestra empleada para el aislamiento, los signos y los síntomas clínicos de las cepas aisladas en diferentes lugares del mundo. Durante estos 30 años de estudio se determinó que el agente causal de la mayoría de los casos clínicos graves de meningitis en recién nacidos, fue la cepa ST4. Un método extenso de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) identificó la secuencia de *C. sakazakii* tipo 4 como la secuencia predominante encontrada en el líquido

cefalorraquídeo de los casos de meningitis neonatal, lo cual explica la situación expuesta anteriormente (Feeney y col., 2014).

En el 2011, la CDC recibió cepas de *C. sakazakii* aisladas de una lata de PIF abierta y de dos muestras fecales de un cuadro diarreico en un bebe. Estas muestras presentaban la variante ST8 (Hairiri y col., 2013).

1.8.2. Mecanismo de patogenicidad

C. sakazakii presenta un fenotipo de osmotolerancia único, el cual le ayuda a proporcionarle entrada al huésped a través de las PIF. *C. sakazakii* debe infectar directamente las células del revestimiento interno del intestino o cruzar esta barrera para llegar así al torrente sanguíneo; es conocido, por infectar las membranas mucosas, gástricas e intestinales, los tejidos epiteliales y endoteliales (Feeney y col., 2014).

El primer paso de infección consiste en el cruce de la barrera intestinal, en donde se inicia con la invasión del tracto gastrointestinal gracias a la adherencia de las bacterias a la superficie del tejido. Para que esta adherencia ocurra de forma exitosa, es necesaria la presencia de fibronectina. Esta es una glicoproteína que forma parte de la matriz extracelular del tejido eucariótico, encargada de jugar un papel muy importante en la célula huésped, en cuanto a adhesión, movimiento, crecimiento y diferenciación. Se trata de uno de los objetivos principales en el proceso de adhesión de varios patógenos. La reducción de los niveles de fibronectina perjudica la adhesión de *C. sakazakii* a las células intestinales, esto probablemente sea el resultado de la interacción entre los receptores del huésped y las adhesinas en la superficie de las células bacterianas. La membrana externa de *C. sakazakii* posee la proteína A (OmpA), la cual fue identificada como una de las principales causas de unión a la fibronectina. La adherencia a los tejidos del huésped es seguida por la invasión del tejido; lo que permite que el patógeno cruce la primera línea de defensa. Este microorganismo cuenta con una tasa de invasión moderada de 0,2% en 60 minutos, de igual manera, hay que tener en cuenta que el mecanismo de invasión aún no ha sido totalmente estudiado, pero se conocen varios de los factores involucrados, como el mencionado anteriormente. Otro factor importante, se basa en la presencia de uniones estrechas intercelulares en el epitelio del intestino, las cuales representan un

factor de prevención, de esta forma se evita el paso de moléculas y bacterias en individuos sanos. Cuando estas uniones se interrumpen posiblemente por lipopolisacáridos (LPS) presentes en la Gram negativo, es posible la invasión de bacterias como *C. sakazakii* cepa ATCC 29544. Algunas PIF contienen altos niveles de LPS, si le sumamos a esto la presencia de *C. sakakzakii* y la microflora inmadura en los recién nacidos, se podría proporcionar un mecanismo para la tasa de incidencia diez veces mayor observada de la infección en lactantes alimentados con PIF, en comparación a lactantes alimentados con leche materna (Feeney y col., 2014).

Se trata de uno de los pocos microorganismos capaz de penetrar la barrera hematoencefálica, esta característica facilita la invasión del cerebro humano, las células endoteliales microvasculares (HBMEC), una característica esencial en los microorganismos que causan meningitis. La proteína OmpA también se ha visto implicada en la invasión de HBMEC, se ha demostrado que la falta de esta proteína resulta en la disminución de invasión de HBMEC en un 83%, mientras que OmpA y OmpX, desempeñan un papel importante en la penetración de la barrera hematoencefálica. El mecanismo que conlleva a la muerte de las células cerebrales aun es desconocido. La respuesta inmune del huésped pudiese jugar un papel importante en este aspecto. Por otro lado, se conoce de la presencia del gen ZPX en *C. sakazakii*, que codifica una metaloproteasa que contiene Zinc, la que es responsable de la lisis del colágeno y permite que el patógeno cruce la barrera hematoencefálica (Feeney y col., 2014).

La caracterización de OmpA dio a conocer que la interrupción del epitelio desencadena la liberación de varios pro y quimiocinas antiinflamatorias, citosinas como el factor de crecimiento transformante b (TGF-b) y el óxido nítrico (NO). La TGF-b es esencial para las funciones inmunitarias adecuadas, como el crecimiento, la reparación y desarrollo, por lo cual, es producido en grandes cantidades por dendríticos celulares que conducen a la interrupción de la unión estrecha y la muerte celular en presencia del patógeno. El óxido nítrico (NO) se ha asociado con la enterocolitis necrotizante como resultado de la falla en la barrera intestinal, causada por altas concentraciones

localizadas de NO que desencadenan la apoptosis celular o necrosis (Feeney y col., 2014).

1.9. Brotes

A lo largo de la historia se han dado una gran variedad de brotes de *C. sakazakii*, sin embargo, no todos los pacientes afectados han sufrido las mismas consecuencias. Esto depende en gran medida del estado inmunológico del huésped. En recién nacidos y bebés de hasta 12 meses de edad, existe la particularidad de la inmunodeficiencia resultado de un sistema inmunológico inmaduro que en muchos casos se ve empeorado por partos prematuros o traumáticos, al igual que de enfermedad materna o ciertas drogas. Por otro lado, su microflora intestinal competidora aún no se ha establecido completamente (Feeney y col., 2014).

Los dos primeros casos conocidos de meningitis neonatal y septicemia causada por *C. sakazakii*, fueron reportados por Urmenyi y Franklin en 1965; desde entonces, una serie de infecciones neonatales causadas por este organismo han sido reportadas. En este caso, se realizó un escrutinio riguroso del proceso de preparación de las PIF en la cocina del hospital, en donde no se reveló ninguna falla que pudiese ser la causante de la contaminación o multiplicación de microorganismos. El microorganismo no fue aislado del ambiente ni de la cocina del hospital, sino de una placa directa de una botella de fórmula preparada que se había almacenado en un refrigerador durante un periodo de tiempo desconocido (Biering y col., 1989).

Años después, en el Hospital universitario Nacional (Reykjavfk, Islandia) se diagnosticaron tres casos de meningitis neonatal causada por *C. sakazakii* en 1986 y 1987; en donde 2 casos fueron diagnosticados en un mismo mes, lo que provocó un diagnóstico epidemiológico, la investigación terminó por centrarse en la PIF cuando la literatura la introdujo como una posible fuente de infección (Biering y col., 1989).

Uno de los casos más graves por infección de *C. sakazakii*, tuvo lugar en Francia en 1994 en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UICN). Se reportaron 17 niños recién nacidos, de los cuales 7 sufrieron enterocolitis necrotizante, un caso de septicemia y un caso de meningitis. No obstante, no

se identificaron síntomas clínicos en 8 bebés que fueron infectados y colonizados; como resultado final de este brote se produjeron 3 muertes. La causa del brote se remonta a las prácticas alimentarias empleadas en esta UICN. Se realizó un estudio como respuesta del brote, en donde se encuentran las mismas cepas de este patógeno en el tracto intestinal de los lactantes sanos y de los que presentaron síntomas, por lo cual se concluyó que la respuesta inmune del huésped es un factor primordial en cuanto a la gravedad de la infección por *C. sakazakii* (Feeney y col., 2014).

Durante los meses de junio y julio de 1998, se identificaron 12 pacientes con signos de ECN en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Bruselas, Bélgica. En este caso cuatro de ellos requirieron tratamiento quirúrgico y otros dos neonatos que eran gemelos, fallecieron. Del total de 12 infantes, 10 de ellos recibieron la misma fórmula semielemental con baja osmolaridad. Al realizarse cultivos de los infantes presentes en la UCIN, especialmente de los que habían sido alimentados con fórmula, 6 resultaron positivos a la presencia de *C. sakazakii*, de los cuales se aislaron un total de 11 cepas (Acker y col., 2001).

El 5 de junio de 2007, en el centro hospitalario de Cataluña se notificó a la entidad regente un caso de infección neonatal por *C. sakazakii*. En esta ocasión el neonato afectado era un prematuro de 33 semanas, que peso al nacer 1 600 g y contó con un estado de salud bueno. Tras su quinto día de vida presentó un cuadro de meningoencefalitis, el cual como consecuencia dio lugar a un absceso cerebral, formación de quistes e hidrocefalia, con secuelas posteriores de retraso neurológico grave. En este caso fue posible aislar el patógeno en el líquido cefalorraquídeo, sangre y heces. Después de este caso sobrevino una exhaustiva investigación, la cual reveló el empleo de temperaturas de reconstitución de las PIF inadecuadas y un prolongado periodo de conservación de los biberones en temperaturas superiores a la temperatura mínima de crecimiento (5,5°C). De igual manera, denotaron la total ausencia de trazabilidad en la administración de biberones, carácter importante en caso de infección (de Simón, S. y col. 2010).

Sin duda, *Cronobacter sakazakii* es un microorganismo de gran importancia a evaluar al momento de determinar la inocuidad de las PIF, dado que es un patógeno con alto porcentaje de supervivencia en este producto y su infección suele ocasionar consecuencias graves o fatales en los lactantes que la padecen. Es necesario mantener mayor vigilancia en todo el proceso de elaboración y manipulación de este producto lácteo, ya que la manipulación inadecuada del mismo, suele ser una de las principales causas de contaminación.

2. Objetivo general

- Detectar *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles para pacientes lactantes empleadas en un hospital de Panamá

2.1. Objetivos específicos

- Identificar a través de método selectivo (Cromagar) la presencia de *Cronobacter sakazakii*
- Aplicar la técnica de PCR en tiempo real
- Evaluar los resultados obtenidos para tener un registro en el hospital de la presencia/ausencia del microorganismo en las PIF.

3. Hipótesis

Ha: Se detecta *Cronobacter sakazakii* en fórmulas infantiles empleadas en un hospital de Panamá

Ho: No se detecta *Cronobacter sakazakii* en fórmulas infantiles empleadas en un hospital de Panamá

4. Metodología

4.1. **Ámbito de estudio**

Se llevará a cabo con muestras de fórmulas lácteas infantiles obtenidas de un hospital de la provincia de Panamá.

4.2. **Selección de la muestra**

La toma de muestra se realizará utilizando un plan de muestreo de 2 atributos que se define por el valor de n (30) y el valor de c (0) donde la aceptación o rechazo del lote depende de que el número de “ n ” cumpla con los valores del número de “ c ”. (FAO, 2006; ICMSF 2002)

Para obtener las muestras requeridas es necesario realizar el protocolo pertinente con la finalidad de garantizar la asepsia en las mismas. (Figura 4.1.)

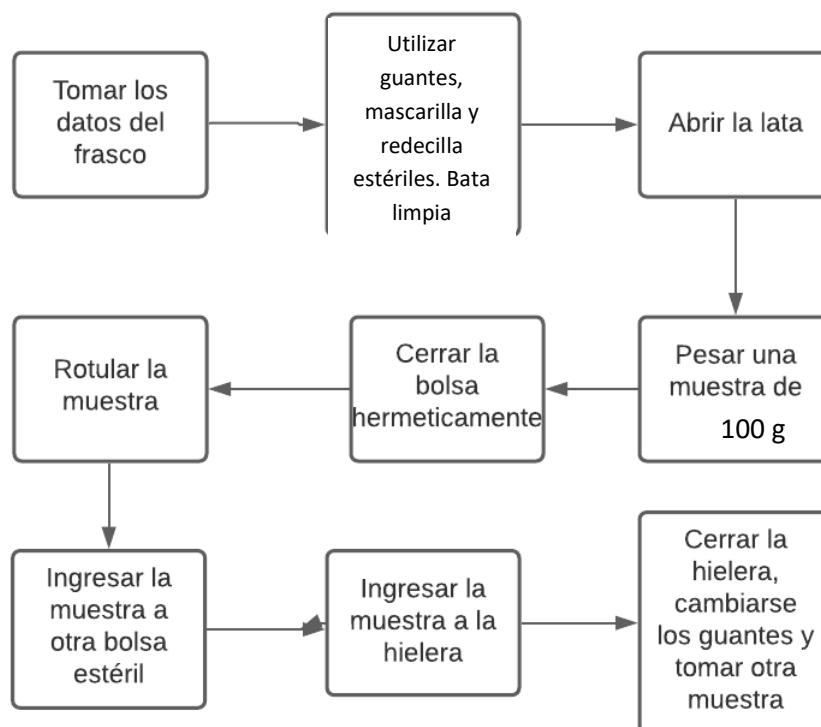


Figura 4.1. Procedimiento de muestreo

Las muestras serán tomadas de diferentes lotes del laboratorio de fórmulas del hospital. El tamaño de la muestra será de 100 gramos, en caso de la fórmula en polvo, mientras con la formula reconstituida se tomarán 100 mL. Las latas deben contar con su fecha de expiración y número de lote.

4.3. Preparación de medios

4.3.1. Agua Peptonada bufferada

Para la reconstitución de la formula se emplea agua peptonada obtenida de una casa comercial (ISO 6579)

4.3.2. Caldo lauril sulfato triptosa modificado + vancomicina (LSTm)

Para la elaboración de este medio se debe agregar 0.1 ml de solución de vancomicina a 10 ml del caldo LSTm (ANMAT Federal, 2011).

El protocolo utilizado para la preparación del caldo lauril sulfato triptosa corresponde a la norma ISO 4831 y el de la preparación de la vancomicina corresponde a la ISO TS/22964:20061.

4.3.3. Chromagar

Se llevará a cabo su preparación según las instrucciones establecidas por la casa comercial. (ISO 22964:2017)

4.3.4. MRD

Se llevará a cabo su preparación según las instrucciones establecidas por la casa comercial. (ISO 6887)

4.3.5. Caldo soja triptona

Se llevará a cabo su preparación según las instrucciones establecidas por la casa comercial. (ISO 10560)

4.3.6. Agar glucosado de Sabouraud (SDA) + cloranfenicol

Se llevará a cabo su preparación según las instrucciones establecidas por la casa comercial (ISO 11133 / ISO 16212)

4.3.7. Agar triptona-soja

Se llevará a cabo su preparación según las instrucciones establecidas por la casa comercial (ISO 11133 / ISO 11930 / ISO 18415 / ISO 18416)

4.4. Técnicas

Para aislar e identificar a *Cronobacter sakazakii* se seguirá el protocolo de ANMAT Federal (2011), que consiste en:

4.4.1. Preenriquecimiento:

Pesar 30 gramos de la muestra en 210 ml de agua Peptonada bufferada (dilución 1/10). Dejar que la muestra se disuelva en el líquido, sin agitación. Si al cabo de 30 min la muestra no se disuelve, mezclar suavemente. Incubar a 37 °C por 18 h.

4.4.2. Enriquecimiento selectivo

Transferir 0.1 ml del cultivo de preenriquecimiento a 10 ml de LSTm/vancomicina. Incubar a 44 °C durante 24h.

4.4.3. Aislamiento presuntivo

Se toma una asada del enriquecimiento selectivo y se estria en una placa de agar cromogenico para aislamiento de *Cronobacter sakazakii*. Se incuba a 44 °C durante 24h, en condiciones aeróbicas. Después de la incubación se observa en el plato Petri la presencia de colonias típicas de *Cronobacter sakazakii*, estas son de tamaño mediano (1 mm a 3 mm) y de color verde a verde azulado.

4.4.4. PCR Tiempo Real

Se sigue el protocolo establecido en la ficha técnica para Assurance GDS Cronobacter Tq II Assay (ISO 22964:2017)

4.4.5. Simplate para Enterobacterias

Se hidratan 10 mL de muestra en 90 mL de MRD, posteriormente se hidratan los tubos del kit simplate con 9 mL de agua destilada estéril y se agrega 1 mL de la muestra anteriormente hidratada.

4.4.6. **Media Pad para Aerobios mesófilos, *E. coli*, hongos y levaduras**

Se sigue el protocolo establecido por la casa comercial de cada kit de Media Pad. (ISO 16140)

4.4.7. **Colilert**

Se sigue el protocolo establecido en la ficha técnica del kit Colilert (ISO 9308-2:2012)

4.4.8. **Pseudalert**

Se sigue el protocolo establecido en la ficha técnica del kit Pseudalert (ISO 16266-2:2018)

4.4.9. **Muestreador de aire DUO-SAS-SUPER-360**

Se sigue el protocolo establecido en la ficha técnica para el muestreador de aire DUO-SAS-SUPER-360, empleando placas Petri con medio TSA y SDAC (ISO 100/180)

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron dos pruebas para las 87 muestras seleccionadas. Una prueba fue la presuntiva, utilizando Chromagar y la otra prueba fue la confirmativa, por medio de la técnica de PCR. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 5.1 y 5.2. Según la guía de referencia del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.54:18), debe haber ausencia de *Cronobacter sakazakii* en 25 gramos de muestra. A continuación, en la tabla 5.1. se muestran los resultados obtenidos para la prueba presuntiva.

Tabla 5.1. Resultados de la prueba presuntiva para *Cronobacter sakazakii* en muestras de 25 gramos de fórmulas lácteas infantiles.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4633-AL-01	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
4634-AL-02	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
4635-AL-03	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2	Ausencia
4636-AL-04	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO DE 1	Ausencia
4637-AL-05	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO DE 1.	Ausencia
4638-AL-06	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO DE 1.	Ausencia
4641-AL-07	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA DE 1.	Ausencia
4642-AL-08	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4643-AL-09	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4644-AL-10	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
4645-AL-11	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4646-AL-12	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4680-AL-13	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
4681-AL-14	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4682-AL-15	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4683-AL-16	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
4684-AL-17	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4685-AL-18	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4764-AL-19	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
4765-AL-20	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4766-AL-21	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
4767-AL-22	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4768-AL-23	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4769-AL-24	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4796-AL-25	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4797-AL-26	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4798-AL-27	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4799-AL-28	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
4800-AL-29	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
4801-AL-30	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4869-AL-31	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4870-AL-32	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4871-AL-33	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4872-AL-34	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4873-AL-35	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4874-AL-36	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4892-AL-37	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
4893-AL-38	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4894-AL-39	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4895-AL-40	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4896-AL-41	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4897-AL-42	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4902-AL-43	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2	Ausencia
4903-AL-44	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
4904-AL-45	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2	Ausencia
4905-AL-46	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
4906-AL-47	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
4907-AL-48	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
5125-AL-49	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
5126-AL-50	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
5127-AL-51	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5128-AL-52	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
5129-AL-53	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5130-AL-54	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5169-AL-55	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5170-AL-56	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5171-AL-57	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5172-AL-58	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5173-AL-59	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5174-AL-60	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5195-AL-61	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
5196-AL-62	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
5197-AL-63	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
5198-AL-64	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
5199-AL-65	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
5200-AL-66	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
5201-AL-67	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5202-AL-68	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
5203-AL-69	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5204-AL-70	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5205-AL-71	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5206-AL-72	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
5294-AL-73	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5295-AL-74	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5296-AL-75	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5297-AL-76	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5298-AL-77	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5299-AL-78	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
5361-AL-79	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5362-AL-80	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5363-AL-81	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5364-AL-82	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5365-AL-83	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5366-AL-84	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
6239-AL-85	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
6240-AL-86	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
6241-AL-87	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia

A continuación, se muestra la Tabla 5.2. que presenta los resultados de la prueba confirmativa.

Tabla 5.2. Resultados de la prueba confirmativa para *Cronobacter sakazakii* en 25 gramos de fórmula láctea infantil.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4633-AL-01	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
4634-AL-02	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
4635-AL-03	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2	Ausencia
4636-AL-04	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO DE 1	Ausencia
4637-AL-05	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO DE 1.	Ausencia
4638-AL-06	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO DE 1.	Ausencia
4641-AL-07	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA DE 1.	Ausencia
4642-AL-08	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4643-AL-09	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4644-AL-10	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
4645-AL-11	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4646-AL-12	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
4680-AL-13	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
4681-AL-14	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4682-AL-15	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4683-AL-16	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4684-AL-17	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4685-AL-18	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4764-AL-19	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
4765-AL-20	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4766-AL-21	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
4767-AL-22	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4768-AL-23	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4769-AL-24	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4796-AL-25	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4797-AL-26	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4798-AL-27	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4799-AL-28	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
4800-AL-29	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
4801-AL-30	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4869-AL-31	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4870-AL-32	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4871-AL-33	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4872-AL 34	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4873-AL-35	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4874-AL-36	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4892-AL-37	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4893-AL-38	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4894-AL-39	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
4895-AL-40	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4896-AL-41	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4897-AL-42	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
4902-AL-43	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2	Ausencia
4903-AL-44	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
4904-AL-45	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2	Ausencia
4905-AL-46	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
4906-AL-47	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
4907-AL-48	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
5125-AL-49	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
5126-AL-50	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5127-AL-51	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5128-AL-52	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
5129-AL-53	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5130-AL-54	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
5169-AL-55	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1ª	Ausencia
5170-AL-56	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5171-AL-57	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5172-AL-58	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5173-AL-59	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5174-AL-60	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5195-AL-61	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
5196-AL-62	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
5197-AL-63	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 1.	Ausencia
5198-AL-64	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
5199-AL-65	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
5200-AL-66	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	Ausencia
5201-AL-67	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5202-AL-68	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1.	Ausencia
5203-AL-69	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5204-AL-70	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5205-AL-71	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5206-AL-72	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
5294-AL-73	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
5295-AL-74	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5296-AL-75	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5297-AL-76	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5298-AL-77	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5299-AL-78	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2	Ausencia
5361-AL-79	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5362-AL-80	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5363-AL-81	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
5364-AL-82	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5365-AL-83	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
5366-AL-84	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	Ausencia
6239-AL-85	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
6240-AL-86	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia
6241-AL-87	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 1	Ausencia

Según el RTCA, el parámetro establecido es ausencia de *Cronobacter sakazakii* en 25 gr de fórmulas lácteas para lactantes (0 a 12 meses), categoría a la cual pertenecen las PIF. Como se deja ver las tablas 5.1. y 5.2. se encuentran dentro de los márgenes establecidos por esta normativa. Por lo que podemos inferir que las muestras presentan resultados satisfactorios y cumplen con una condición aceptable.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que en la reconstitución de una fórmula láctea existen algunos parámetros importantes como es el recuento de enterobacterias en las muestras, la calidad microbiológica del agua, la higiene de los manipuladores y la calidad del aire donde se reconstituye la fórmula láctea.

Según el Reglamento Técnico Centroamericano, el límite máximo permisible de Enterobacterias en complementos para lactantes (0 a 6 meses) en 30 gramos de muestra es de <10 UFC / mL o g. A continuación, la tabla 5.3 muestra los resultados del recuento de Enterobacterias.

Tabla 5.3. Resultados del recuento de Enterobacterias en 30 gramos de fórmula láctea infantil

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
5198-AL-64	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL EN POLVO 2.	2,1 UFC/g
5366-AL-84	MUESTRA DE FORMULA INFANTIL RECONSTITUIDA 2.	<0.2 UFC/mL

Según lo establecido en el RTCA para enterobacterias, de las 87 muestras 85 presentaron ausencia de enterobacteria y 2 muestras presentaron valores dentro del parámetro establecido, por lo cual se infiere que los resultados son satisfactorios.

El agua empleada para la reconstitución de las PIF, según la normativa nacional DGNTI-COPANIT 21-2019 y DGNTI-COPANIT 77-2007, las *Pseudomonas* cuentan con un límite máximo de 0 UFC / 100 mL, por lo que se recomienda ausencia en las muestras de agua potable. Para el criterio de *E. coli* y coliformes totales su límite máximo permisible es de <1,1 NMP / 100 mL. En la tabla 5.4. se observan los resultados de *Pseudomonas aeruginosa* en agua potable.

Tabla 5.4. Resultados de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 mL de agua potable empleada para la reconstitución de fórmula láctea infantil.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4639	Água embotellada ÁREA: LABORATORIO DE FORMULAS	Ausencia/100mL
4640	Água embotellada ÁREA: LABORATORIO DE FORMULAS	Ausencia/100mL
6243	Água de grifo autoclavada AREA: LABORATORIO DE FORMULAS	Ausencia/100mL

Según lo establecido por la normativa DGNTI-COPANIT 21-2019 y DGNTI-COPANIT 77-2007, las muestras estudiadas cumplen con los parámetros establecidos para *Pseudomona aeruginosa*, siendo esta ausente en todas las muestras.

En la tabla 5.5. se muestran los resultados de *E. coli* en agua potable.

Tabla 5.5. Resultados de *E. coli* en 100 mL de agua potable empleada para la reconstitución de fórmulas lácteas infantiles.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4639	Água embotellada ÁREA: LABORATORIO DE FORMULAS	<1 NMP/100mL
4640	Água embotellada AREA: LABORATORIO DE FORMULAS	<1 NMP/100mL
6243	Água de grifo autoclavada AREA: LABORATORIO DE FORMULAS	<1 NMP/100mL

Según la normativa DGNTI-COPANIT 21-2019 y DGNTI-COPANIT 77-2007 para *E. coli*, las muestras estudiadas cumplen con el parámetro establecido de <1,1 NMP / 100 mL.

En la tabla 5.6. se muestran los resultados de Coliformes Totales en agua potable.

Tabla 5.6. Resultados de Coliformes Totales en 100 mL de agua potable empleada para la reconstitución de fórmulas lácteas infantiles.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4639	Água embotellada ÁREA: LABORATORIO DE FORMULAS	<1 NMP/100mL
4640	Água embotellada ÁREA: LABORATORIO DE FORMULAS	<1 NMP/100mL
6243	Água de grifo autoclavada ÁREA: LABORATORIO DE FORMULAS	<1 NMP/100mL

Según la normativa DGNTI-COPANIT 21-2019 y DGNTI-COPANIT 77-2007 para Coliformes Totales, las muestras estudiadas cumplen con el parámetro establecido de <1,1 NMP / 100 mL.

Los manipuladores de alimentos cumplen un rol fundamental en la reconstitución de la fórmula láctea, por lo tanto, también deben ser considerados como posible factor de contaminación. Según la Norma 093- SSA1-1994 el Recuento de Aerobios debe ser ≤ 400 UFC/manos, el Recuento de Hongos y Levaduras de ≤ 10 UFC/manos y el Recuento de *E. coli* ≤ 0 UFC / manos. A continuación, en la Tabla 5.7. se dejan ver los resultados del recuento de Aerobios Mesófilos en las manos de los manipuladores.

Tabla 5.7. Resultados del recuento de Aerobios Mesófilos en manos de un colaborador del laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4726-MAN-01	MANOS COLABORADOR ÁREA: LABORATORIO DE FÓRMULAS	20 UFC/mano
6242-MAN-02	MANOS COLABORADOR ÁREA: LABORATORIO DE FÓRMULAS	60 UFC/mano

Según la Norma 093- SSA1-1994 el Recuento de Aerobios debe ser ≤ 400 UFC/manos, por lo tanto, las muestras estudiadas se encuentran dentro del límite permisible.

En la Tabla 5.8 se muestran los resultados del recuento de hongos y levaduras en las manos de los manipuladores.

Tabla 5.8 Resultados del recuento de hongos y levaduras en manos de un colaborador del laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4726-MAN-01	MANOS COLABORADOR ÁREA: LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ mano
6242-MAN-02	MANOS COLABORADOR ÁREA: LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ mano

Según la Norma 093- SSA1-1994 el Recuento de Hongos y levaduras debe ser ≤ 10 UFC/manos, por lo tanto, las muestras estudiadas se encuentran dentro del límite permisible.

La tabla 5.9. presenta los resultados de *E. coli* en las manos de los manipuladores.

Tabla 5.9. Resultados de *E. coli* en manos de un colaborador del laboratorio de fórmulas en un hospital de Panamá.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4726-MAN-01	MANOS COLABORADOR ÁREA: LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ mano
6242-MAN-02	MANOS COLABORADOR ÁREA: LABORATORIO DE FÓRMULAS	80 UFC/ mano

Según la Norma 093- SSA1-1994 el Recuento de *E. coli* debe ser ≤ 1 UFC/manos, en la muestra 6242 se encontró un nivel de *E. coli* mayor al recomendable según lo establecido en la norma citada anteriormente. Esto puede ser causado por una higiene inadecuada al momento del lavado de manos. Se debe tener en cuenta que al ser personal de salud que maneja un alimento tan delicado debe realizar un correcto lavado de manos de forma profesional con la finalidad de eliminar la posibilidad de contaminación por esta fuente. El lavado de manos debe realizarse después de ir al baño o manipular alimentos, ya que estas son las principales fuentes de contaminación con *E. coli*.

Las superficies empleadas en el área de reconstitución de formula tienen un rol muy importante, ya que su inadecuada limpieza puede conllevar a una contaminación cruzada en las formulas reconstituidas. Según la Norma 093- SSA1-1994 el recuento de aerobios mesófilos debe ser ≤ 3000 UFC/m², el recuento de hongos y levaduras debe ser ≤ 10 UFC/m² y el recuento de *E. coli* debe ser ≤ 100 UFC/m². A continuación en la tabla 5.10 se presentan los resultados del recuento de aerobios mesófilos en superficies.

Tabla 5.10. Resultados del recuento de aerobios mesófilos en superficies del laboratorio de fórmulas en un hospital de Panamá

Código de recibo	Descripción	Resultado obtenido
4723-SUP-01	MUESTRA DE MESA DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m2
4724-SUP-02	MUESTRA DE BIBERON DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m2
4725-SUP-03	MUESTRA DE CUPON PARA BIBERONES DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m2
6238-SUP-04	MUESTRA DE MESA DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE FORMULAS	<115 UFC/ m2

Según la Norma 093- SSA1-1994 el Recuento de aerobios mesófilos debe ser ≤ 3000 UFC/m², por lo tanto, las muestras estudiadas se encuentran dentro del límite permisible.

La tabla 5.11. presenta los resultados del recuento de hongos y levaduras en superficies

Tabla 5.11. Resultados del recuento de hongos y levaduras en superficies de un laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá

Código de recibo	Descripción	Resultado obtenido
4723-SUP-01	MUESTRA DE MESA DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m ²
4724-SUP-02	MUESTRA DE BIBERON DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m ²
4725-SUP-03	MUESTRA DE CUPON PARA BIBERONES DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m ²
6238-SUP-04	MUESTRA DE MESA DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE FORMULAS	<1 UFC/ m ²

Según la Norma 093- SSA1-1994 el Recuento de hongos y levaduras debe ser ≤ 10 UFC/m², por lo tanto, las muestras estudiadas se encuentran dentro del límite permisible.

En la tabla 5.12. se observan los resultados obtenidos en el recuento de hongos y levaduras en superficies

Tabla 5.12. Recuento de *E. coli* en superficies de un laboratorio de fórmulas de un hospital de Panamá

Código de recibo	Descripción	Resultado obtenido
4723-SUP-01	MUESTRA DE MESA DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m ²
4724-SUP-02	MUESTRA DE BIBERON DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m ²
4725-SUP-03	MUESTRA DE CUPON PARA BIBERONES DEL LABORATORIO DE FÓRMULAS	<1 UFC/ m ²
6238-SUP-04	MUESTRA DE MESA DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE FORMULAS	<1 UFC/ m ²

Según la Norma 093- SSA1-1994 el Recuento *E. coli* debe ser ≤ 100 UFC/m², por lo tanto, las muestras estudiadas se encuentran dentro del límite permisible.

Por último, la contaminación ambiental en un recinto hospitalario es muy común debido a las circunstancias que allí se maneja, sin embargo, dentro del lactario es imprescindible mantener vigilancia en la calidad del aire, puesto que en este lugar se da la reconstitución de las fórmulas y serán expuestas por pequeños lapsos de tiempo al ambiente en donde podrán contaminarse si la calidad del ambiente no es la adecuada. Es imposible tener un ambiente libre de microorganismos, por lo tanto se han fijado niveles seguros de los mismos que no debiesen causar mayores problemas. Según el anteproyecto ANAM / DINAPROCA – URS HOLDING, INC el recuento de aerobios mesófilos tiene un límite máximo permisible de ≤ 500 UFC/m³ y el recuento de hongos y levaduras tiene un límite máximo permisible de ≤ 300 UFC/m³. A continuación la tabla 5.13. donde se observan los resultados del recuento de aerobios mesófilos en ambiente

Tabla 5.13. Resultados del recuento de aerobios mesófilos en una muestra ambiental de 200 L / min.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4901-AMB-01	MUESTRA DE AMBIENTE LABORATORIO DE FORMULAS	70 UFC/m ³

Según lo establecido en el anteproyecto ANAM / DINAPROCA – URS HOLDING, INC el límite máximo permisible de aerobios mesófilos en una muestra ambiental es superior a los valores obtenidos, por lo tanto, los resultados se encuentran dentro del parámetro establecido y son satisfactorios.

A continuación, la tabla 5.14. donde se encuentran los resultados del recuento de hongos y levaduras en una muestra de ambiente.

Tabla 5.14. Resultados del recuento de hongos y levaduras en una muestra ambiental de 200 L / min.

Código de Recibo	Descripción	Resultado Obtenido
4901-AMB-01	MUESTRA DE AMBIENTE LABORATORIO DE FORMULAS	225 UFC/m ³

Según lo establecido en el anteproyecto ANAM / DINAPROCA – URS HOLDING, INC el límite máximo permisible para hongos y levaduras en una muestra ambiental es superior a los valores obtenidos, por lo tanto, los resultados se encuentran dentro del parámetro establecido y son satisfactorios.

6. Conclusiones

- Según, los parámetros establecidos por el RTCA, para las fórmulas lácteas infantiles, mencionados a detalle en la discusión, los resultados obtenidos son aceptables y permisibles.
- Según lo establecido, en reglamentos internacionales como el RTCA y el Codex Alimentarius, el monitoreo en las fórmulas lácteas se debe hacer en cada lote.
- Debido a que el resultado de E. coli en manos presento un valor no permisible, es necesario vigilar el correcto lavado de manos establecido por la OMS, teniendo en cuenta la importancia de evitar las fuentes de contaminación en un lactario.
- Las superficies involucradas en la reconstitución de fórmulas deben ser evaluadas semanalmente, con la finalidad de vigilar la asepsia de las mismas y evitar la contaminación cruzada
- El agua empleada para la reconstitución de las fórmulas debe ser analizada cada semana, independientemente si se trata de agua embotellada o agua de grifo autoclavada, con la finalidad de descartar posible contaminación.
- La calidad microbiológica del aire dentro del lactario debe ser monitoreada por lo menos una vez al mes, con la finalidad de mantener bajo control los niveles de contaminación.
- La esterilización de las superficies en donde se manipulan estos alimentos debe seguir los parámetros indicados por la OMS y ser monitoreadas al menos una vez a la semana.

7. Recomendaciones

- Se debe resaltar la necesidad de fomentar las buenas prácticas y la higiene al momento de reconstituir la fórmula.
- Realizar un correcto lavado de manos para evitar la contaminación en las fórmulas e instrumentos que allí se encuentran presentes.
- Se debe dar seguimiento microbiológico al agua empleada para la reconstitución de fórmulas sea agua de grifo autoclavada o agua embotellada.
- Se recomienda realizar muestreos para detectar *Cronobacter sakazakii* por lo menos cada vez que el lote se renueve, con la finalidad de detectar su posible presencia en la leche desde su fabricación.
- Se debe realizar una vez al mes los análisis microbiológicos de la calidad del aire, debido a que en el ambiente hospitalario circulan una gran variedad de microorganismos por diversas causas y el lactario al ser parte del hospital debe cuidar especialmente los niveles de contaminación interna.

8. Bibliografía

- Acker, J. V., De Smet, F., Muyltermans, G., Bougateg, A., Naessens, A., & Lauwer, S. (2001). Outbreak of Necrotizing Enterocolitis Associated with *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk Formula. *Journal of Clinical Microbiology*, 293-297.
- Administración Nacional de Medicamentos, A. T. (22 de Julio de 2011). *Ministerio de Salud. Presidencia de la nación*. Obtenido de Principios de Microbiología de los Alimentos aplicados a las Tareas de Fiscalización Sanitaria de los Alimentos: <https://diamundialdelasalud2015.files.wordpress.com/2015/03/presentacion-planes-de-muestro.pdf>
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) Federal, R. M. (2011). Metodología analítica oficial. *Análisis microbiológico de los alimentos*, 158 - 173.
- Autoridad Panameña de Seguridad de Alimentos (AUPSA). (2007). *Aclaración sobre productos lácteos en polvo*. Obtenido de Autoridad Panameña de Seguridad de Alimentos: http://www.aupsa.gob.pa/index.php/aclaracion-sobre-productos-lacteos-en-polvo/?utm_source=rss&utm_medium=rss&utm_campaign=aclaracion-sobre-productos-lacteos-en-polvo
- Biering, G., Karlsson, S., Clark, N. C., Jónsdóttir, K. E., Lúdvígsson, P., & Steingrímsson, Ó. (1989). Three Cases of Neonatal Meningitis Caused by *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 2054-2056.
- Chen, Y., Lampel, K., & Hammack, T. (2012). BAM chapter 29: Cronobacter. *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*.
- CHROMagar, E. (s.f.). Instructions For Use.
- de Simón, M., Sabaté, S., Osanz, A. C., Bartolomé, R., & Ferrer, M. D. (2010). Investigación de un caso de infección neonatal por *Enterobacter sakazakii* asociada a un preparado en polvo para lactantes. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 713-715.
- Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., Brenner, D. J., & The Enterobacteriaceae Study Group. (1980). *Enterobacter sakazakii*: A New Species of "Enterobacteriaceae" Isolated From Clinical Specimens. *Internacional Journal of Systematic Bacteriology*, 569-584.
- Feeney, A., Kropp, K. A., O'Connor, R., & Sleator, R. D. (2014). *Cronobacter sakazakii*: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. *Gut microbes*, 711-718.
- Hariri, S., Joseph, S., & Forsythe, S. J. (2013). *Cronobacter sakazakii* ST4 Strains and Neonatal Meningitis, United States. *Emerging Infectious Diseases*, Vol 19.
- ICMSF. (2002). Microorganisms in Foods 7. *Microbiological Testing in Food Safety*.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., . . . Joosten, H. (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus. *BMC Evolutionary Biology*.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., Lehner, A., Fanning, S., . . . Joosten, H. (2008). *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter*

sakazakii, and proposal of *Cronobacter sakazakii* ge. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov.,...
Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1442-1447.

- Joseph, S., & Forsythe, S. J. (2011). Predominance of *Cronobacter sakazakii* Sequence type 4 in neonatal infections. *Emerging Infectious Diseases*, Vol 17.
- Luján Medina, G. A., Loredó Treviño, A., & Aguilar, C. N. (2014). *Cronobacter sakazakii*: Un patógeno emergente transmitido por alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*.
- Montero, M. V. (4 de febrero de 2012). *asociacion sina*. Obtenido de <http://www.asociacionsina.org/2012/02/04/cronobacter-sakazakii/>
- Petrola, M. E. (2012). *Evaluación de algunos factores que afectan el desarrollo de Cronobacter sakazakii en fórmulas lácteas infantiles*. Caracas, Venezuela: Universidad central de Venezuela.
- Sigüenza, T. (2014). *Brotos causados por Cronobacter sakazakii*. Valladolid, España: Universidad de Valladolid.