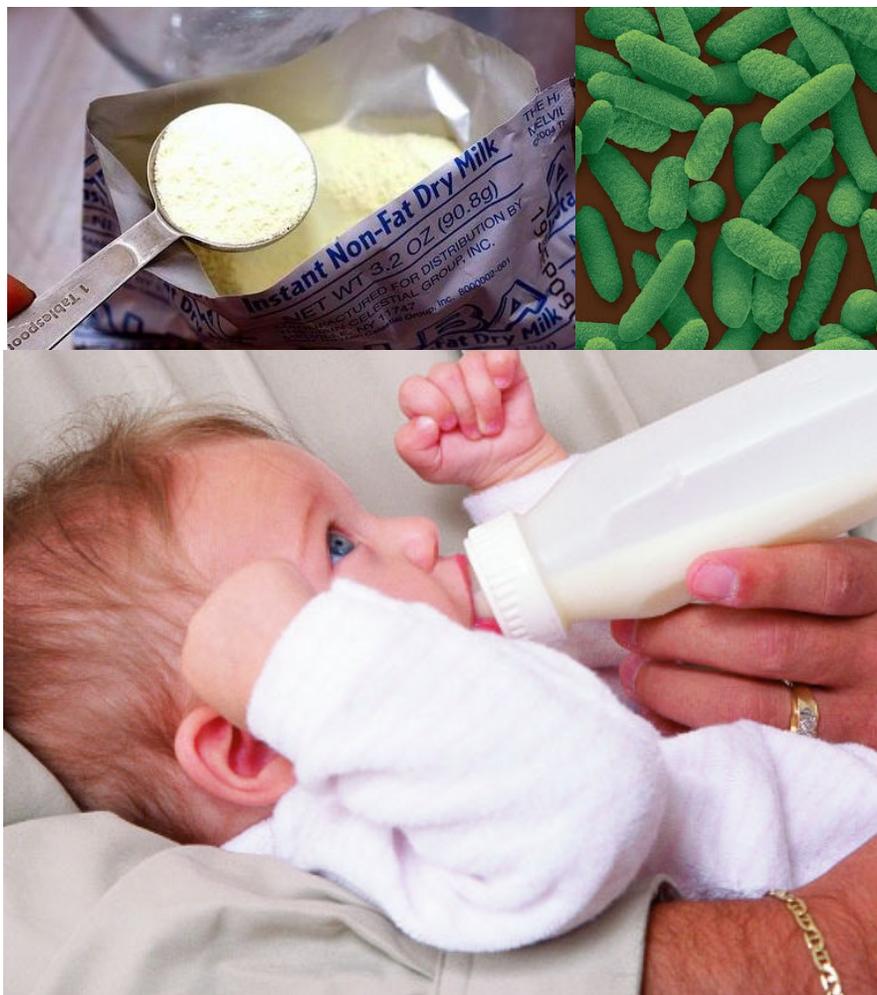


Cronobacter sakazakii

EN FORMULAS LACTEAS INFANTILES



Autores

Gerardo Leotta
Suani Pacheco Marino
Sergio Epszteyn
Juan Pedro Lirón
Julián Stambullian
Carmen Vecchiarelli
Daniel Stamboulian



Auspicia:

Gerardo Aníbal Leotta

Doctor en Ciencias Veterinarias (UNLP).

Bacteriólogo clínico e industrial (UNLP).

Magíster en Microbiología Molecular (UNSAM).

Investigador adjunto CONICET. CCT La Plata, IGEVET.

Profesor adjunto - Laboratorio de Microbiología de los Alimentos (FCV-UNLP).

Suani Pacheco Marino

Ingeniera pesquera.

Doctora en Ciencias Naturales.

Becaria posdoctoral CONICET. CCT La Plata, IGEVET.

Jefe de Trabajos Prácticos - Laboratorio de Microbiología de los Alimentos (FCV-UNLP).

Sergio Alejandro Epszteyn

Licenciado en Ciencias Biológicas (UBA).

Magíster en Microbiología (Israel).

Laboratorio de Microbiología de Alimentos, DLIM - DGHySA, G.C.B.A.

Juan Pedro Lirón

Licenciado en Genética (UNaM).

Doctor en Ciencias Naturales (UNLP).

Investigador adjunto CONICET. CCT La Plata, IGEVET.

Jefe de Trabajos Prácticos - Cátedra de Genética (FCV-UNLP).

Julián Daniel Stambullian

Técnico bacteriólogo (EPROS).

Especialización en Epidemiología de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos - Instituto Nacional de Epidemiología (INE) – Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación.

Formación como Auditor en inocuidad de Alimentos BMP-HACCP (Instituto Argentino de Normalización).

Carmen Noemí Vecchiarelli

Médica pediatra neonatóloga.

Subjefa del Servicio de Neonatología del Sanatorio Otamendi.

Coordinadora docente del área médica de la Fundación para la Salud Materno Infantil.

Miembro titular de la Sociedad Argentina de Pediatría.

Daniel Stamboulian

Médico infectólogo.

Presidente de FUNCEI (Fundación Centro de Estudios Infectológicos).

Presidente de FIDEC (*Fighting Infectious Diseases in Emerging Countries*).

Profesor Emérito de Infectología, Universidad de Ciencias Sociales y Empresariales (UCES).

Voluntary Professor of Medicine, División de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Miami.

Profesor Honorario, Instituto Universitario CEMIC.

CAPÍTULO I: Introducción

1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

1.2 Taxonomía

1.3 Reservorios y vías de transmisión

1.3.1 Distribución de *Cronobacter* spp.

1.3.1.1 Prevalencia de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en FLID

1.3.2 Características del genero *Cronobacter*

1.3.2.1 Resistencia térmica

1.3.2.2 Formación de biofilms

1.3.2.3 La tolerancia osmótica y la desecación

1.3.2.4 Ácido tolerancia

1.4 Marcadores de tolerancia y patogenicidad

1.5 Manifestaciones clínicas

1.5.1 Enterocolitis necrotizante

1.5.2 Meningitis neonatal

1.5.3 Casos en adultos

1.5.4 Diagnóstico

1.5.5 Tratamiento

1.6 Epidemiología

1.7 Situación actual en Argentina

CAPÍTULO II: Aislamiento de *Cronobacter sakazakii* a partir de productos lácteos

2.1 Definición del producto

2.2 Definición de los criterios microbiológicos

2.3 Toma de muestra y análisis microbiológico

2.3.1 Procedimiento recomendado para muestreos oficiales y auditorías externas

2.3.2 Procedimiento recomendado para control de producción

2.3.3 Procedimiento recomendado para monitoreos de vigilancia realizados por la autoridad competente

2.3.4 Procedimiento recomendado para estudio de casos clínicos o brotes

Capítulo III: Técnicas moleculares aplicadas a la detección de *Cronobacter* spp.

3.1 Técnicas moleculares aplicadas a la detección de *Cronobacter* spp.

3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.2.1 Fundamento

3.2.2 Ventajas de la PCR

3.2.3 Desventajas de la PCR

3.3 PCR convencional para la detección de *Cronobacter* spp.

3.3.1 Introducción

3.3.2 Equipos

3.3.3 Materiales

3.3.4 Reactivos

- 3.3.5 Preparación de la muestra
- 3.3.6 Preparación de la mezcla de reacción
- 3.3.7 Carga de los templados y amplificación
- 3.3.8 Detección del producto de amplificación
- 3.4 PCR para la detección de los genes *ompA* *Enterobacter sakazakii***
- 3.4.1 Protocolo PCR – *ompA*
- 3.4.2 PCR convencional - Programa de amplificación
- 3.4.3 Planilla de resultados
- 3.4.4 Límites de Detección
- 3.5 PCR en tiempo real (RT-PCR).**
- 3.5.1 Mecanismos de detección inespecíficos
 - 3.5.1.1 *Ventajas de los mecanismos de detección inespecíficos*
 - 3.5.1.2 *Desventajas de los mecanismos de detección inespecíficos*
- 3.5.2. Mecanismos de detección específicos
 - 3.5.2.1 *Sondas TaqMan®*
 - 3.5.2.2 *Sondas Molecular Beacons*
 - 3.5.2.3 *Sondas Light Cycler*
 - 3.5.2.4 *Sondas Cycleave*
- 3.6 Hibridación *in situ***
- 3.7 BAX® System Q7 (DuPont Qualicon)**
- 3.7.1 Ventajas
- 3.7.2 Desventajas
- 3.7.3 Equipamiento necesario
- 3.7.4 Fundamento
- 3.7.5 Protocolo BAX Cronobacter
- 3.7.6 Interpretación de los resultados
- 3.8 Foodproof® Cronobacter Detection Kit - 5' nuclease (Merck).**
- 3.8.1 Ventajas
- 3.8.2 Desventajas
- 3.8.3 Equipamiento necesario
- 3.8.4 Controles de reacción
- 3.8.5 Compensación del color
- 3.8.6 Fundamento
- 3.8.7 Procesamiento
- 3.8.8 Interpretación de los resultados
- 3.9 TaqMan® Cronobacter sakazakii Detection Kit (Applied Biosystems).**
- 3.9.1 Equipamiento necesario
- 3.9.2 Procedimiento
- 3.9.3 Cronofast Microbial- Systems
 - 3.9.3.1 *Fundamento*
 - 3.9.3.2 *Procedimiento*
- 3.9.4 VTT – *Enterobacter sakazakii* (Cronobacter) Vermicon.
 - 3.9.4.1 *Ventajas*
 - 3.9.4.2 *Desventajas*

3.9.4.3 Componentes

3.9.4.4 Procedimiento

3.10 Precauciones a tener en cuenta al momento de realizar un análisis

CAPITULO IV: Caracterización fenotípica

4.1 Familia enterobacteriaceae.

4.2 Tipificación bioquímica.

4.2.1 Descripción de *Cronobacter sakazakii* sp. nov.

4.2.2 Descripción de *Cronobacter malonaticus* sp. nov.

4.2.3 Descripción de *Cronobacter turicensis* sp. nov.

4.2.4 Descripción de *Cronobacter muytjensii* sp. nov.

4.2.5 Descripción de *Cronobacter sp. dublinensis*. nov.

4.2.6 Descripción de *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov.

4.2.7 Descripción de *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov.

4.2.8 Descripción de *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.

4.3 Pruebas bioquímicas.

4.3.1 Producción de indol

4.3.1.1 Introducción

4.3.1.2 Principio

4.3.1.3 Medios y reactivos

4.3.1.4 Procedimiento

4.3.1.5 Controles

4.3.2 Rojo de metilo – Voges-Proskauer (RM_VP).

4.3.2.1 Principio

4.3.2.2 Medios y reactivos

4.3.2.3 Procedimiento

4.3.2.4 Interpretación

4.3.2.5 Controles

4.3.3 Producción de sulfuro de hidrogeno.

4.3.3.1 Principio

4.3.3.2 Medios y reactivos

4.3.3.4 Procedimiento

4.3.3.5 Interpretación

4.3.3.6 Controles

4.3.4 Utilización de citrato.

4.3.4.1 Introducción

4.3.4.2 Principio

4.3.4.3 Medios y reactivos

4.3.4.4 Procedimiento

4.3.4.5 Interpretación

4.3.4.6 Controles

4.3.5 Descarboxilación de lisina y ornitina.

4.3.5.1 Principio

- 4.3.5.2 *Medios y reactivos*
- 4.3.5.3 *Caldo Lisina u Ornitina de Moeller*
- 4.3.5.4 *Procedimiento*
- 4.3.5.5 *Interpretación*
- 4.3.5.6 *Controles*
- 4.3.6 Prueba de malonato.
 - 4.3.6.1 *Principio*
 - 4.3.6.2 *Procedimiento*
 - 4.3.6.3 *Materiales*
 - 4.3.6.4 *Resultados*
 - 4.3.6.5 *Control de Calidad*
 - 4.3.6.6 *Consideraciones*
- 4.3.7 NP- α -D-glucosidasa.
- 4.3.8 Utilización de la putrescina.
- 4.3.9 Utilización del 4-aminobutirato.
- 4.3.10 Utilización de Aconitato.
- 4.4 Tipificación serológica.**
- 4.5 Sensibilidad a antimicrobianos.**
- 4.6 Métodos rápidos.**
 - 4.6.1 ¿Porqué utilizar métodos rápidos?
 - 4.6.2 ¿Cuál es el mejor método rápido?
 - 4.6.3 ¿Cómo nos aseguramos que el método es confiable?
- 4.7 Recuento e identificación de *Cronobacter* spp.**
- 4.8 Medios de cultivo.**
 - 4.8.1 Agares cromogénicos.
 - 4.8.1.1 *Agar COMPASS (Biokar diagnostics)*
 - 4.8.1.2 *chromID™ Sakazakii Agar (Biomerieux)*
 - 4.8.1.3 *R&F® Enterobacter Sakazakii Chromogenic Plating Medium*
 - 4.8.1.4 *HardyCHROM™ sakazakii*
 - 4.8.1.5 *Chromocult® Agar (Merck)*
 - 4.8.1.6 *AGAR BRILLIANCE ENTEROBACTER SAKAZAKII (DFI formulation) OXOID*
 - 4.8.1.7 *Agar cromogénico para el aislamiento de Cronobacter (CCI) (Oxoid)*
 - 4.8.1.8 *Harlequin™ Cronobacter sakazakii Agar – DFI Formulation*
 - 4.8.1.9 *Harlequin™ CSIM Cronobacter sakazakii Isolation Medium (ISO) (LAB M)*
 - 4.8.1.10 *RAPID´sakazakii (laboratorios BioRad)*
 - 4.8.2 Pruebas bioquímicas (sistemas comerciales).
 - 4.8.2.1 *Galeria API 20E (bioMérieux)*
 - 4.8.2.2 *API® / ID 32 E (BioMérieux-Francia)*
 - 4.8.2.3 *RapID ONE System-Remel*
 - 4.8.2.4 *Sistema de identificación BBL Crystal*
 - 4.8.2.5 *BBL Enterotube II BBL Enterotube II*
 - 4.8.2.6 *VITEK (BioMérieux)*
 - 4.8.2.7 *Biolog Microlog*

Capítulo V: Subtipificación

5.1 Introducción.

5.2 Técnicas de subtipificación fenotípica.

5.3 Técnicas de subtipificación genotípica.

5.3.1 Perfiles plamídicos.

5.3.2 Métodos basados en polimorfismos de fragmentos de restricción del ADN cromosómico.

5.3.2.1 Análisis convencional con enzimas de restricción (REA)

5.3.2.2 Hibridación

5.3.2.3 Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

5.3.3 Métodos basados en la amplificación de fragmentos del ADN por PCR.

5.3.3.1 Amplificación al azar del ADN polimórfico

5.3.3.2 Amplificación de fragmentos comprendidos en secuencias repetitivas

5.3.4 Métodos combinados.

5.3.4.1 PCR locus específica –RFLP

5.3.4.2 Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

5.3.4.3 Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

Anexos

1.1 Listado de gérmenes y regiones exclusivas de *Cronobacter* spp. basadas en análisis computacional comparativo.

1.2 Identificación de potenciales biomarcadores que pueden ser utilizados para distinguir a *Cronobacter* de otros patógenos transmitidos por alimentos.

1.3 Casos clínicos por Nazarowec – White & Farber 1997.

1.4 Casos registrados de infecciones por *Cronobacter* spp. en infantes y niños pequeños.

2.1 Muestreo

2.2 Especificaciones técnicas – ISO/22964

2.3 Norma BAM Aislamiento y enumeración de *Cronobacter sakazakii* a partir de formulaciones infantiles deshidratadas y pulverizadas.

CAPÍTULO I

Introducción

1.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

En la actualidad, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los principales desafíos para la salud pública. El desarrollo de estrategias de prevención y control requiere un trabajo colaborativo entre el campo de la medicina humana y veterinaria, los organismos reguladores de la producción, la industria alimentaria, la vigilancia epidemiológica y el desarrollo de redes de laboratorios y de informática, y sobre todo la educación de la comunidad sobre seguridad alimentaria. Por lo tanto, la seguridad alimentaria es un objetivo global de salud pública (Salm-Surv, 2005).

Las ETA se definen como un conjunto de síntomas y signos clásicos originados por el consumo de productos alimenticios e ingredientes, especias, bebidas y agua, que contienen agentes patógenos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afectan la salud de una persona o grupo de personas en forma aguda o crónica (SIRVETA).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Cada año, la OMS recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de casos de ETA en todo el mundo, siendo los más frecuentes los ocasionados por alimentos que sufrieron contaminación biológica. La OMS estima que se producen 1,2 billones de episodios de diarrea por año, los que ocasionan 2,2 millones de muertes en el mundo. Lo más alarmante es que 1,8 millones de estas muertes corresponden a niños menores de 5 años (WHO, 2004).

Uno de los principales problemas que presenta el control de las ETA es el sub registro. Se estima que en los países industrializados sólo se informa el 10% de los casos, mientras que en los países en vías de desarrollo la relación entre los casos ocurridos y aquellos informados es de 100 a 1. Esta falta de registros puede atribuirse a varios factores:

- Incapacidad para establecer la asociación entre un caso de diarrea y el consumo de alimentos contaminados.
- Falta de intervención, en tiempo y forma, de los servicios de salud para estudiar y notificar todos los brotes de ETA.
- Carencia de laboratorios clínicos y de análisis de alimentos y personal profesional capacitado para la investigación de las ETA.
- Desconocimiento de la naturaleza y los mecanismos de producción de las ETA.

El desarrollo de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso cada vez más difundido de sistemas centralizados de distribución rápida y el aumento del comercio internacional, representan un desafío tanto para la industria como para los organismos de control. Los cambios de hábitos y tendencias de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas inmunosuprimidas, niños, mujeres embarazadas y los cambios en las poblaciones microbianas también representan un riesgo desde el punto de vista de las ETA (Salm-Surv 2005, Álvarez Martínez 2007).

En la actualidad se reconocen más de 250 ETA cuya causa puede ser infecciosa tóxica o toxo-infecciosa. La ETA pueden clasificarse en cuanto a su origen en: infecciosas, tóxicas y toxo-infecciosas. En las primeras, los efectos deletéreos son debidos a la acción de un agente biológico sobre el huésped (parásitos, bacterias o virus). Las ETA de origen toxico se deben a la presencia de productos químicos o residuos y contaminantes radioactivos en los alimentos. Finalmente, las ETA toxo-infecciosas involucran el efecto toxico es ejercido por la toxina producida por un organismo biológico contaminante del alimento.

Entre las bacterias asociadas a ETA se incluyen *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. Sin embargo, en los últimos años se presentaron brotes ocasionados por patógenos emergentes y reemergentes que pusieron de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA. Esto aumentó los riesgos de contraer ETA para la población y afectó el comercio nacional e internacional de alimentos. Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *Salmonella Enteritidis* en huevos, *Salmonella Typhimurium* DT104 en alimentos de origen animal (Pope 1998), *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en carnes y vegetales (Masana 2010), *Listeria monocytogenes* en carne y quesos (Copes et al. 2000), *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdos y aves (de Boer & Nouws, 1991; López 2000), *Shigella dysenteriae* en agua (Faruque et al. 2003) y *Cronobacter sakazakii* en productos lácteos deshidratados (Gurtler et al. 2005). Entre los reemergentes se encuentra *Vibrio cholerae* 01, cuya principal fuente de infección es el agua y los alimentos de origen marino (Gonzales Fraga 2009).

Los síntomas de las ETA varían de acuerdo al tipo de contaminación, así como a la cantidad de alimento consumido. Los signos más comunes son diarreas y vómitos, pero

también pueden causar dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble, ojos hinchados, dificultades renales e inclusive la muerte.

Las ETA no solo afectan de manera significativa la salud y el bienestar de las poblaciones, sino que también imponen una carga sustancial en los sistemas de salud y reducen notablemente la productividad económica del país. Los costos originados por estas enfermedades humanas son elevados. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), estima que en EE.UU. 76 millones de personas por año sufren ETA, 325.000 personas son hospitalizadas y 9000 mueren. Por lo tanto, las ETA tienen un importante impacto económico. Se estima que sólo en EE.UU. el costo anual de todas las ETA es de 5 a 6 billones de dólares y que el costo de las ETA de origen bacteriano asciende hasta 6,7 mil millones de dólares al año (Todd 1989; Buzby et al. 1996; WHO 2004).

Cronobacter spp. es un patógeno emergente dentro de las bacterias que originan ETA. Es causa, rara pero potencialmente mortal, de meningitis neonatal, bacteriemia, enterocolitis necrotizante (NEC) y la meningoencefalitis necrotizante después de la ingestión (Iversen & Forsythe 2003). A par de que su prevalencia es baja, es un patógeno de importancia ya que afecta principal y más severamente a neonatos y niños de corta edad y los casos han sido vinculados al consumo de Formulados lácteos infantiles deshidratados (FLID). Dado lo relativamente reciente de su descubrimiento, muchos aspectos relacionados a la patogénesis, distribución, reservorios, epidemiología entre otros, de este microorganismo, aún están en estudio.

1.2. TAXONOMÍA

En su primer registro este microorganismo fue referido como "*Enterobacter cloacae* de pigmento amarillo" (Urmenyi & Franklin 1961). En 1974, surgen las primeras evidencias de que se trata una especie diferente, estas se basaron en el análisis de ADN mostraron que la homología genética entre las cepas pigmentadas y las no pigmentadas era menor al 50% (Brenner 1974). Pero no fue hasta 1980, cuando el denominado "*Enterobacter cloacae* de pigmento amarillo" paso a denominarse *Enterobacter sakazakii*. En ese año Farmer y colaboradores., basados en las diferencias bioquímicas, producción de pigmento, sensibilidad a antibióticos y en técnicas de hibridación ADN-ADN definió esta nueva especie. Esta especie fue incluida en el género *Enterobacter* debido a que comparte mayor homología fenotípica y genotípica con *Enterobacter* (50%) que con *Citrobacter freundii* (41%), especie tipo del género

Citrobacter. Se denominó *Enterobacter sakazakii* en honor al trabajo del microbiólogo de japoneses Riichi Sakazaki en la bacteriología entérica.

Cronobacter spp. era *Enterobacter sakazakii* fue propuesto como el nuevo nombre de esta nueva especie, ya que era fenotípicamente más similar a *E. cloacae* y sólo tenía un 41% de homología de ADN con *Citrobacter freundii*, la especie tipo de *Citrobacter* (Farmer et al. 1980)

Farmer et al. (1980), basándose en diferencias observadas en las reacciones bioquímicas, también definió que *Enterobacter sakazakii* estaba compuesto por 15 biogrupos. Posteriormente, Iversen et al. (2006) mediante el análisis de la secuencia del fragmento 16S ADNr, de 89 cepas, definió la existencia de cuatro grupos filogenéticos y describió un nuevo biogrupo de *E. sakazakii* (Fig. 1.1). El grupo 1 estuvo integrado por la mayoría de las cepas (170/189) y se incluyeron biogrupo 1-5, 7-9, 11,13 y 14. Grupo 3 se correspondía con biogrupo 15 y el grupo 4 con los biogrupo 6, 10 y 12. El grupo 2 compuesto por un nuevo biogrupo 16.

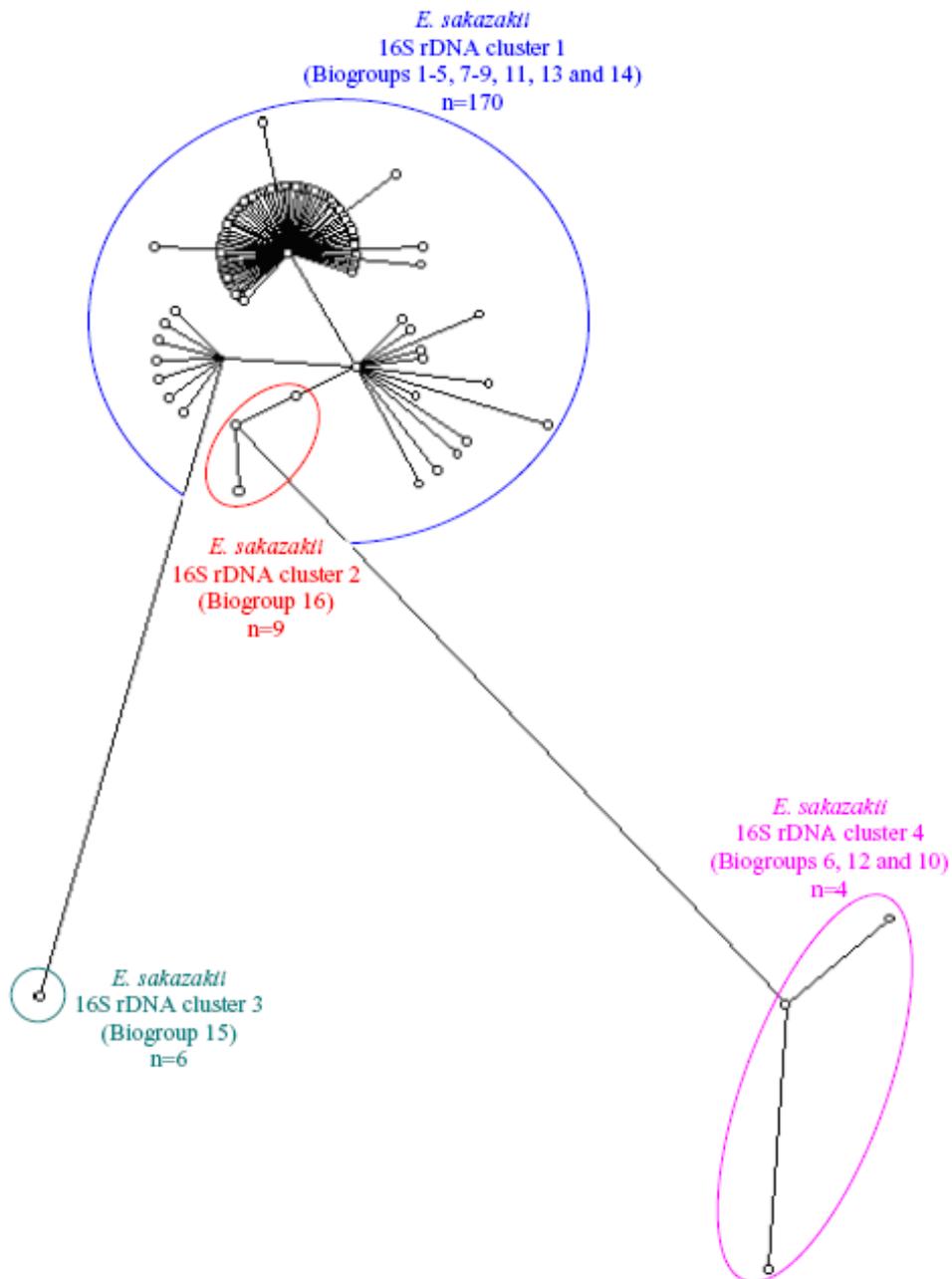


Figura 1.1.- Esquemización de los biogrupos de *Enterobacter sakazakii* *Cronobacter* spp. definidos por Iversen et al. 2006.

En 2007, nuevamente Iversen y colaboradores, intentando aclarar la relación taxonómicas entre la diferentes cepas identificadas como *Enterobacter sakazakii*. emprendieron el análisis de las mismas empleando como herramientas el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de amplificación con fluorescencia (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) f AFLP, patrones de ribotipado, análisis de las

secuencias completas del gen 16S rARN y la hibridación ADN-ADN. Las investigaciones llevadas a cabo por Iversen et al. (2007) confluyeron en la creación de un nuevo género ***Cronobacter*** **gen. nov.**, el mismo incluye 5 genoma especies: **i)** *Cronobacter sakazakii* **comb. nov.**, que a su vez incluye dos subespecies: *C. sakazakii* **subsp. sakazakii** **comb. nov.** y *C. sakazakii* **subsp. malonaticus** **subsp. nov.**; **ii)** *Cronobacter muytjensii* **sp nov.**; **iii)** *Cronobacter dublinensis* **sp nov.**; **iv)** *Cronobacter turicensis* **sp. nov** y; **v)** *Cronobacter* **genomospecies 1.**

Finalmente Iversen et al. (2008) utilizando un análisis taxonómico polifásico usando, entre otras herramientas el Biotype 100 y el Biolog Phenotype MicroArray data., modificaron la clasificación taxonómica propuesta anteriormente, para definir que el nuevo género *Cronobacter* spp. está compuesto por seis especies, cada una de las cuales podrían ser definidos en base a los métodos indicados anteriormente. Estas nuevas especies son los siguientes: *Cronobacter sakazakii*, *C. turicensis*; *C. malonaticus*; *C. muytjensii* y *C. dublinensis* y una sexto especie señalada como genomospecie.

Esta nueva división de las especies del género *Cronobacter* sigue, en gran medida, la clasificación en biogrupos propuesta originalmente por Farmer et al. (1980) y corregida por Iversen et al. (2006). Los biogrupos 1-4, 7, 8, 11 y 13 representan a *C. sakazakii*, los biogrupos de 5, 9 y 14 incluyen a *C. malonaticus*; *C. muytjensii* está representado en el biogrupo 15; *C. turicensis* se incluye en el biogrupo 16 (con la excepción de dos cepas que parecen ser un genomospecies separadas y se designan como *C. genomospecies I*) y los biogroups 6, 10 y 12 representan a *C. dublinensis*. A su vez, esta última especie se puede subdividir en tres subespecies, *C. dublinensis* **subsp. dublinensis** (biogrupo 12), *C. dublinensis* **subsp. lausannensis** (Biogrupo 10) y la *C. dublinensis* **subsp. lactardi** (biogrupo 6) (Fig. 1.2).

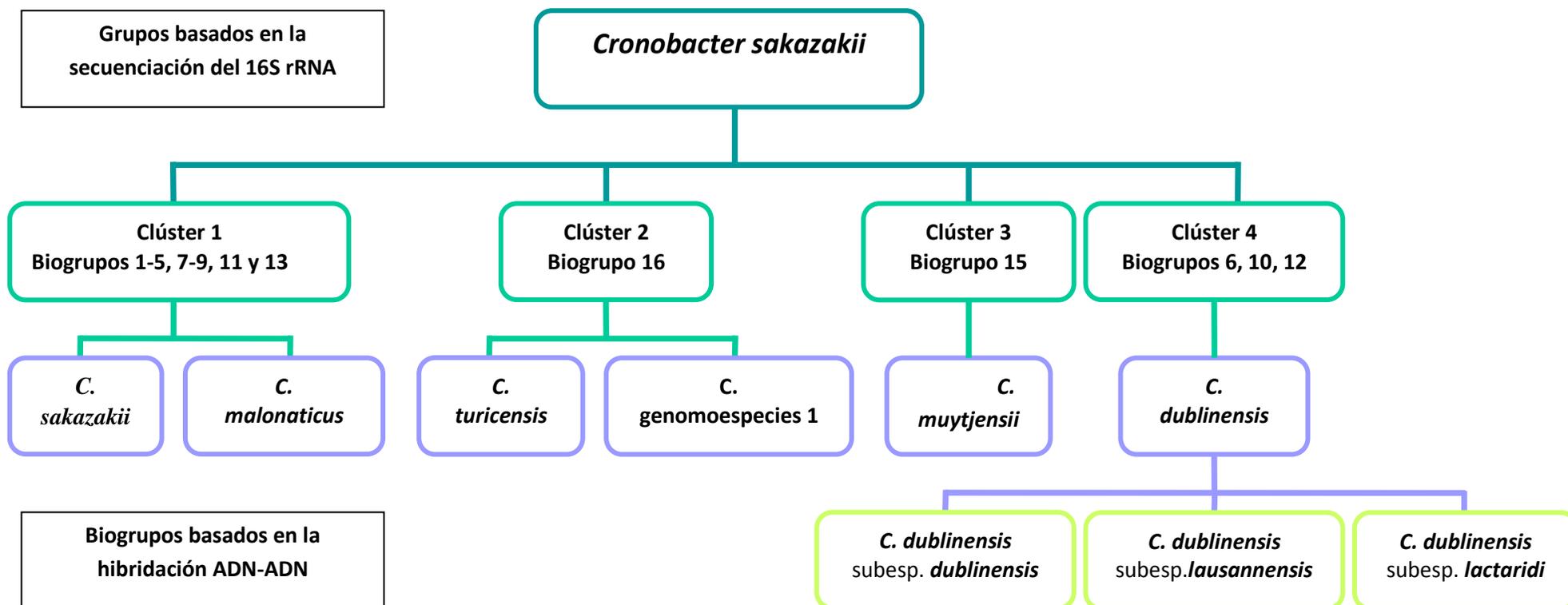


Figura 1.2.- Clasificación actual de las especies del genero *Cronobacter* según la propuesta de Iversen et al. 2008.

La reclasificación de *E. sakazakii* en el nuevo género *Cronobacter*, no requiere la modificación los protocolos de aislamiento y detección basados en las metodologías de aislamiento basadas en el cultivo ni de. Todos los métodos de laboratorios vigentes en la actualidad seguirán facilitando el reconocimiento de todos los microorganismos definidos según la nueva clasificación taxonómica. Además, la definición de cada especie se puede lograr utilizando los marcadores fenotípicos detalladamente descritos por Iversen et al. (2008).

Esta clasificación actual ha sido reconocida por OMS (FAO /OMS 2008) quienes sinonimizan a *Enterobacter sakazakii* con *Cronobacter* spp. Además, respecto a las implicaciones regulatorias de estos cambios taxonómicos mencionan que la creación de un nuevo género simplifica la inclusión de estos organismos patógenos en la legislación actual. Si bien es importante tener en cuenta que existen varias especies de *Cronobacter*, hasta el momento no se proponen cambios en el marco normativo vigente.

1.3. RESERVORIOS Y TRANSMISIÓN

1.3.1. Distribución de *Cronobacter* spp.

El hábitat natural y el modo de transmisión de *Cronobacter* son aún desconocidos (Nazarowec-White & Farber 1997b). Este microorganismos no ha sido aislado de heces de ganado, por lo que se descarta el ganado vacuno sea portador (Molloy et al. 2009). Su falta de ocurrencia natural, tanto en animales como en el hombre, sugiere que las principales fuentes de contaminación de alimentos son el suelo, agua y los vegetales (Iversen & Forsythe 2003). La producción de pigmento amarillo, de polisacáridos extracelulares y la capacidad de persistir en un estado disecado sugiere un nicho ambiental asociado a plantas. Schmid et al. (2009) evaluaron la capacidad de algunas cepas *Cronobacter* spp. de colonizar raíces de tomate, estas investigaciones mostraron que estos microorganismos exhiben características frecuentes en bacterias y microorganismos asociados plantas como la solubilización del fosfato mineral y producción de indol acético, lo que indica que el hábitat natural de *Cronobacter* spp. puede ser de origen vegetal.

Las especies de *Cronobacter* han sido definidas como bacterias ubicuas (Cawthorn et al. 2008; El Sharoud et al. 2009), ya que han sido aisladas de gran variedad de ambientes (Kandhai et al. 2004a; Neelam et al. 1987). *Cronobacter* spp. ha sido recuperado de numerosos sustratos secos incluyendo polvo, tierra, granos, té, hierbas y especias (Baumgartner et al. 2009) habiendo sido también recuperado de otros alimentos: agua, verduras, queso y carne

(Kahn et al. 1998; Iversen & Forsythe 2003; Kim & Beuchat 2005; Beuchat et al. 2009. El Sharoud et al. 2009) y de alimentos listos para el consumo (Kandhai et al. 2004a). La presencia de *Cronobacter* spp. en estos productos y la posterior contaminación de los hogares incrementa el riesgos potenciales de casos de infecciones en adultos inmunocomprometidos (Baumgartner et al. 2009).

Los FLID son la única fuente que ha sido epidemiológicamente vinculada a los brotes de enfermedades causadas por *Cronobacter* spp. (Iversen & Forsythe 2003; OMS / FAO 2004; Gurtler et al. 2005), *Cronobacter* spp. ha sido frecuentemente aislado de las instalaciones donde se fabrican FLID (Kandhai et al. 2004ab; Gurtler et al. 2005; Drudy et al. 2006; Mullane et al. 2007; Proudly et al. 2008) materias primas (El-Sharoud et al. 2009) y los productos finales (Mullane et al. 2008b). La contaminación de los FLID puede ocurrir a través de una vía intrínseca a través de la adición de materias primas contaminadas o después de la pasteurización a través del medio ambiente planta de procesamiento durante el envasado. Contaminación externa puede ocurrir durante la reconstitución mediante el uso de utensilios contaminados (Mullane et al. 2008b). Como se observa en la Tabla 1.1, que presentan un resumen de los casos de infecciones por *Cronobacter sakazakii*, los brotes ocurren principalmente en el ambiente intrahospitalario, mientras que la mayoría de los casos aislados son de origen doméstico o desconocido.

Las fuentes clínicas de *Cronobacter* spp. son diversas e incluyen: sangre, hisopados nasales, garganta, expectoración, y médula ósea. Además de ser aislado de pacientes infectados, también ha sido encontrado en el ambiente intrahospitalario, instrumental médico (Farmer et al. 1980) y utensilios usados para preparar los FLID en las guarderías de hospitales (Simmons et al. 1989; Bar-Oz et al. 2001). Es factible la posibilidad de contaminación cruzada en los hospitales; Smeets et al. (1998) encontraron utensilios de limpieza de biberones contaminados fueron los fuente contaminación en tres casos de infecciones ocurridos en dichas instalaciones.

Tabla 1.1.

País	Referencia	Enfermedad, Síntoma, procedencia del aislamiento	Consumo previo de FLI	Casos / Muertos	Fuente
Alemania	Reis et al. 1994	Meningitis	D	1/0	D
Bélgica	van Acker 2001; ver link*	Meningitis - ECN	SI (12) D (1)	13/3	12 nococ **
Brasil	Santos 2000; Barrera 2003	Bacteremia - Meningitis	NO (5) D (1)	6/1	5 nococ **
Dinamarca	Jøker et al. 1965	Meningitis	D	1/0	D
España	Aguirre Condi 2007; Reina et al. 1989	Bacteremia - Conjuntivitis	No (1) D(1)	2/0	D
Francia	Coignard et al. 2006; Caudilla- Barron 2007	Meningitis - Asintomático	SI	27/3	Nosocomial
Grecia	Arseni 1984, 1987	Bacteremia - Colonizado	D	12/5	11 nosoc. **
Hungría	Reportes realizados por la oficina de seguridad alimentaria 2003- 2006	Úlcera gástrica, secreción nasal, orina, secreción ótica	D	4/PD	Reporte a FAO
India	Rav 2007, 2008	Bacteremia	SI	2/1	1 nosoc. **
Islandia	Biering 1989; Clarke 1990	Meningitis	SI	3/1	D
Israel	Bar- Oz 2001; Block 2002	Bacteremia - Meningitis	SI (5) D (3)	8/0 - 5 (R) *	D
Japón	Japón 2008	Meningitis - Absceso cerebral	SI	1/0	Nosocomial
Nueva Zelanda	Jarvis 2004	Meningitis - Asintomático	SI *	5/1	D
Países Bajos	Muytjens 1983; Smeets 1998	Meningitis - Bacteremia- ECN	SI	8/6	Nosocomial
Portugal	Lecout 1989	Meningitis	D	1/1	Nosocomial
Reino Unido	Urmenyi & White-Frankin, 1961	Meningitis - sepsis	ND	2/2	Nosocomial
USA	Reportes previos al 2001 Varios autores**	Meningitis - Bacteremia - Absceso cerebral- Sepsis - Hidrocefalia -	SI (16) D (9)	14/0	4 nosoc., 1 hogar **

Encefalitis				
CDC 2001-2008	Meningitis - Bacteremia - ECN - Desconocida - Infección del tracto urinario - <i>Orina</i> - <i>Tracto respiratorio</i> - <i>secreción nasal</i>	SI (20) NO (6) D (10)	36 /3 16 R; 20 PD	5 Hogar **
Himelright 2002; Brown & Bowen 2006	Meningitis - Bacteremia	SI	11/1	10 nosoc. **

ND: No determinado. **D:** Desconocido. *<http://www.babymilk.nestle.com/News/All+Countries/Belgium/Infant+formula+safety.htm>. ** Se desconoce la fuente de los restantes. *** Monroe & Tiff 1965; Kleiman et al. 1979; Adamson & Rogers 1981; Naqvi et al. 1985; Will & Robinson 1998; Simmons et al. 1989; Clarke 1990; Noriega 1990; Gallagher & Ball 1991; Buredette & Santos 2000; Lai et al. 2001.

1.3.1.1. Prevalencia de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en FLID

Los preparados alimenticios pulverizados o Formulas Lácteas Infantiles Deshidratadas (FLID) se dividen en fórmulas infantiles pulverizadas (PIF), preparados de continuación (FUF) *follow-up formulae*, y alimentos dietéticos destinados a con fines médicos. El Codex Alimentarius define a los PIF como sustitutos de la leche materna especialmente fabricados para satisfacer, por sí mismos, las necesidades nutricionales de los lactantes durante los primeros meses de vida hasta la introducción de alimentación complementaria apropiada. Por su parte, los FUF se definen como alimentos destinados a ser utilizados como parte de la dieta líquida de destete de niños mayores de 6 meses y en la alimentación de niños pequeños¹. FUF se define además como un alimento preparado a partir de la leche de vaca o de otros animales y / o otros componentes de origen animal y / o vegetal, que han demostrado ser adecuados en niños de 6 meses y en niños pequeños. Así los FUF son productos consumidos por los niños entre 6 y 12 meses y los jóvenes niños de entre 12 y 36 meses. (CAC, 1987).

El informe de la reunión de la FAO/OMS sobre *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en FUF (Follow-up Formulae) (FAO/OMS 2008) hace hincapié en la diferenciación de FUF y PIF (=FLID). Ambos son productos pulverizados fabricados en forma casi idéntica. Las principales diferencias entre ellos radican en la composición y rigurosidad de las medidas de control, higiene y criterios microbiológicos aplicados durante su fabricación. La variada composición de los FUF refleja la dieta, cada vez más diversa, de sus consumidores (> 6 meses).

Si bien, la definición de los FUF es clara, la FAO/OMS (2008) señala que las autoridades regionales pueden adherirse a esta denominación o denominar de otra forma a los productos con características semejantes, hecho puede inducir a confusión. Además, debido a la semejanza del proceso de fabricación, algunos fabricantes utilizan la misma línea de producción ambos productos.

La fabricación de PIF se ha descrito y discutido en los informes de las reuniones de expertos en *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) y otros patógenos presentes en los PIF de la FAO /

¹ Según la CAC 2008, un infante se define como "una persona no mayor de 12 meses de edad "los niños pequeños son: "personas de edades entre los 12 y 36 meses (tres años)".

OMS (FAO / OMS, 2004; 2006). Además, Cordier (2007) describe detalles adicionales sobre el proceso de fabricación. FAO/OMS (2008) mencionan que existen pocos datos sobre la prevalencia de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en los productos ubicados dentro de la categoría de FLI. La ausencia de estos datos se debe probablemente a que hasta entonces pocas entidades regulatorias habían establecido los criterios para *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en dichos productos.

Solamente dos países (Japón y Estonia) respondieron a la solicitud de datos emitida por la FAO/OMS. Estonia reportó el hallazgo de *E. sakazakii* en 1 y 2 muestras (19 g N: 30) de dos lotes de FUF analizados. Por su parte, Japón informó de un caso de contaminación de FLI del orden del 3%. Dos estudios realizados por University College Dublin (UCD, Irlanda) y la Nottingham Trent University (USA), para determinar la prevalencia de *E. sakazakii* en FUF. En el estudio de la UCD no se aisló a *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). El estudio de la Nottingham Trent University, que involucró a laboratorios de Brasil, Reino Unido, Portugal, Malasia, Indonesia y Corea, arrojó una prevalencia cercana al 1%.

Más recientemente diversos autores analizaron la prevalencia de *Cronobacter* spp. en FLID, luego de un los resultados obtenidos de la búsqueda bibliográfica se muestran en la Tabla 1.2. Diversos autores (Cawthorn et al. 2008; Cordier 2008; Mullane et al. 2007) sostienen que los FLID pueden ser contaminados durante la adición de ingredientes después del proceso de pasteurización, durante el proceso de empaque o durante la reconstitución del polvo en las casas o en los hospitales.

Tabla 1.2.- Reporte de aislamientos de *Cronobacter* spp. de muestras ambientales provenientes de fabricas de FLID y FLID.

Fuente de Aislamiento	Número de muestras positivas (totales)	Método de identificación	Referencia
Planta de procesamiento de FLI (Países Bajos)	16 (56) 6 (49) 10 (47)	Test oxidasa y API 20E.	Kandhai et al. 2004
Planta de procesamiento de FLI	35 (867)	ISO 22964	Reich et al. 2010
FLI nacionales (Japón)	4 (61)	Microbiológico	Oonaka et al. 2010
FLI importadas (a Japón)	5 (88)		
FLI	1(69)	Análisis de la secuencia 16S rRNA	Jaradat et al. 2009
Hierbas y especias	26 (67)		
Ambientales	2(11)		
FLI	2(82)	Método convencional	Iversen & Forsythe 2004
Alimentos infantiles deshidratados	3(49)		

quesos	2(62)	Aislamiento en	
Hiervas y especias	11(122)	VRGA	
Ingredientes secos	1(66)		
Bolsa en la plataforma de llenado	9 *		
Fondo del secador	5 *		
Mezcladora	13 *		
Envasado al vacío	1 *	API20E	
Producción de vacío	20 *	confirmación por PCR y	Mullane et al. 2007
MUESTRAS TOMADAS EN MONITOREO DE PROCESO			
Hisopados – plataforma de secado; Kibbler, powder box	1(13), 1(2), 1(15)		
Polvo – zona de secado, (scraper) limpiabarros, pared y piso del secador.	1(9), 1(3) ,1(3), 1(6)		
FLI (diversas marcas- Malasia)	30(0)	ISO 22964	Norrakiah & Lim 2011
Ambientes de proceso	156 (200)	ISO 22964,	
Ingredientes: Lactosa	24 (200)	secuenciación de 16S rRNA y	Proudy et al. 2008
almidón de arroz o maíz		PCR BOX	
Producto Final	20(200)		
FILTROS DE AIRE			
2 Gruesos: ingreso	40 y 20% *		
2 Ingreso al secador 1º	100% *	ISO 22964 PCR	Mullane et al. 2008
Ingreso al secador 2º	60%*	RT	
Ingreso al Molino 1º y 2º	80%*		
FLID (Sudáfrica)	14%	secuenciación de 16S rRNA	Cawthorn et al. 2008
FLID(Sudáfrica)	18%	secuenciación de 16S rRNA	Witthuhn et al. 2006

En la Figura 1.3 se muestra el esquema de producción de FLID, en gris oscuros se indican los procesos en los que *Cronobacter* spp. podría contaminar los FLID mediante su ingreso, a través del entorno o línea de procesamiento y mediante la adición de ingredientes contaminados como las vitaminas y el almidón (Cordier 2008; FAO/WHO 2006).

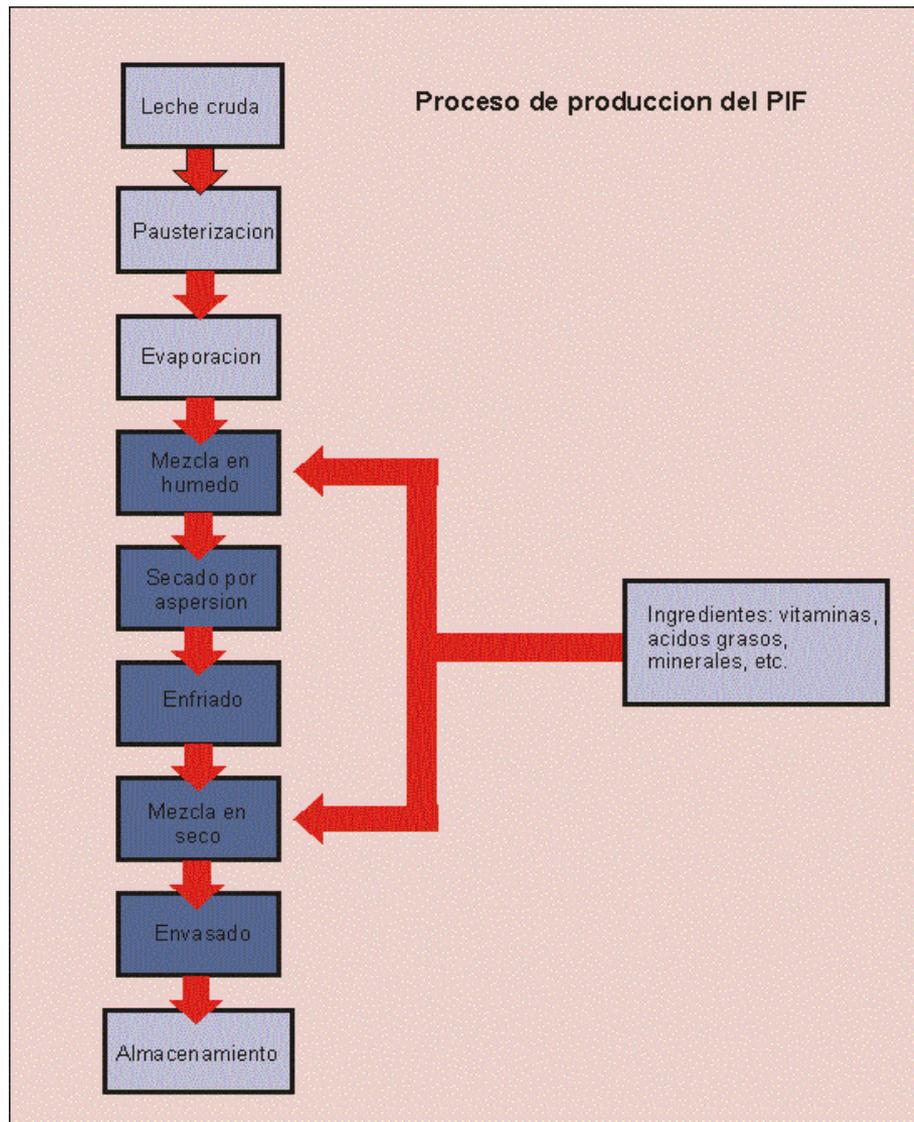


Figura 1.3.- Flujograma del proceso de Producción de FLID.

La contaminación del medio ambiente a través de aerosoles, a través del polvo o aire que contiene partículas de piel los manipuladores de alimentos (Den Aantrekker et al. 2003) puede incidir en una eventual contaminación del producto. Mullane et al. (2008b) señalan que el aire es una fuente potencial de vehiculización de microorganismos peligrosos. En áreas de alto riesgo, como zonas de empaque y almacenamiento es necesario controlar la calidad del aire y mantener estos ambientes con presiones negativas. En una planta de producción leche en polvo el aire puede verse contaminado microorganismos aerosolizados en partículas de polvo, gotas de agua (Kandhai et al. 2004b; Anonymous 2006; Mullane et al. 2007). Diversos autores (Breeuwer et al. 2003; Edelson-Mammel & Buchanan. 2004; Iversen et al. 2004; Jung & Park 2006; Nazarowec-White & Farber 1997) sostienen que la contaminación ocurre

después del tratamiento térmico. No obstante, un adecuado tratamiento térmico disminuye significativamente el número de bacterias en la leche cruda.

Debido a la naturaleza ubicua de este microorganismo, (FAO/WHO 2006) considera que la eliminación completa de *Cronobacter* spp. durante el proceso de fabricación de FLID es poco factible. (FAO/WHO 2004, 2006) sostienen que aún después de implementar y practicar buenas prácticas de manufactura e higiene (BPF y BPH) y corregir los planes HACCP esporádicamente pueden ocurrir casos de contaminación de los FLID por este microorganismo.

La detección de Enterobacteriaceae es un parámetro que indica la higiene del proceso, mientras que la detección de *Salmonella* spp. y *Cronobacter* spp. son parámetros de inocuidad del alimento (European Commission 2007). Cordier (2007) y FAO/OMS (2008) mencionan que existe una relación entre la prevalencia de Enterobacterias y la de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.), y proponen que el incremento en la rigurosidad de las medidas de control e higiene durante la producción de FLID o FUF contribuye a la disminución de la carga microbiana en estos establecimientos.

La cuantificación de las tasas de supervivencia de *Cronobacter* spp. aislados de FLID pueden proporcionar datos útiles para la evaluación de riesgos microbiológicos, ya que permite determinar los niveles de probabilidad en que el microorganismo se encuentra en los FLID, esto a su vez dependerá de los diferentes escenarios de producción en donde el tiempo y la temperatura de almacenamiento y distribución juegan un rol importante.

1.3.2. Características del género *Cronobacter*

Para poder analizar los reservorios y los mecanismos de transmisión de *C. sakazakii* es necesario conocer algunas de las características morfológicas, bioquímicas y ecológicas las que están relacionadas a su persistencia y distribución en el medio ambiente. A continuación se mencionan algunas de las características de *Cronobacter* spp que pueden contribuir a comprender algunos aspectos inherentes a su distribución.

1.3.2.1. Resistencia térmica

Iversen & Forsythe (2003) señalaron que las especies de este género pueden crecer a temperaturas entre 6 - 47 °C, con una temperatura óptima de crecimiento de 39 °C; sin embargo, el crecimiento de algunas cepas se ve inhibido a temperaturas superiores a 44 °C

(Nazarowec-White & Farber 1997a; Iversen et al. 2004a) mientras que otras son capaces de crecer a 5 °C (Nazarowec-White & Farber 1997b).

Estudios de resistencia térmica mostraron resultados contradictorios, indicando que la resistencia térmica depende de la cepa evaluada (Breeuwer et al. 2003; Edelson-Mammel & Buchanan, 2004; Arroyo et al. 2009), aunque algunos estudios no reportaron diferencias significativas entre las diferentes cepas (Nazarowec-White & Farber 1997a; Iversen et al. 2004b).

Resulta llamativo que a pesar de que las especies del género *Cronobacter* han sido consideradas termotolerantes (Chenu & Cox, 2009), diversos autores reportaron valores D^2 (a 58 °C) relativamente bajos: 0,4 minutos (Breeuwer et al. 2003), 2,6 min. (Iversen et al. 2004b) y 4,2 min. (Nazarowec-White & Farber, 1997a).

Chang et al. (2009) sometieron a una cepa de *C. sakazakii* a tratamientos de choque térmico a temperaturas y tiempos variables (42-48 °C; 5-15 min.), con la finalidad de determinar los efectos sobre la integridad celular y su posterior sobrevivencia a 51 °C. En este estudio se encontró que la temperatura máxima de crecimiento fue de 47 °C, los tratamientos de choque térmico a temperaturas inferiores a 47 °C durante 15 minutos mejoraron la tolerancia térmica, por otro lado el **electron micrograph análisis** reveló la pérdida de ácidos nucleicos y proteínas.

Arroyo et al. (2009) analizaron el efecto del choque térmico, en interacción con otros factores como el pH y el contenido de agua libre (a_w), sobre la resistencia de *E. sakazakii* encontrando que la resistencia al calor experimenta variaciones entre cepas, y a su vez está determinada por las condiciones de cultivo. Células en fase estacionaria mantenidas entre 20 y 37 °C ($D_{60}=0,9$ min) resultaron ser más resistentes que las mantenidas a 10 °C ($D_{60}=0,2$ min). Por otro lado, determinaron que la acidificación del medio disminuye la resistencia al calor, y la reducción del a_w ejerce el efecto contrario. La resistencia aumenta a pH neutro y a_w bajos, hecho que quizás se deba a la estabilización de la membrana citoplasmática.

² El valor D se define como el tiempo durante el cual un producto debe permanecer a una determinada temperatura para que su población o carga bacteriana inicial se reduzca en un logaritmo.

Otros investigadores abordaron el estudio de las características adaptativas de *C. sakazakii* desde una perspectiva tecnológica. Así por ejemplo, Iversen et al. (2004) evaluaron el crecimiento, termotolerancia y la formación del biofilms de *E. sakazakii* FLI utilizando microbiología de impedancia. En estos estudios se determinó que la temperatura óptima de crecimiento en una matriz láctea deshidratada se encuentra entre los 37-43 °C pudiendo tolerar hasta 6 °C, el valor D se ubicó entre 54 y 62 °C y el valor z^3 resultó en 5,7 °C. Dichos autores concluyeron que la termotolerancia de este microorganismo es similar a la de otras Enterobacteriáceas, siendo factible su eliminación durante un tratamiento de pasteurización estándar; conclusiones similares fueron descritas por Proudly et al. (2008). Por otro lado, se demostró que *E. sakazakii* es capaz de permanecer viable al ser sometido a temperaturas de refrigeración.

Habiendo sido demostrada la sensibilidad de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) a la pasteurización surgió la hipótesis que sostenía que en caso de ocurrir alguna contaminación durante el proceso de elaboración de FLI, esta tendría lugar en procesos posteriores al pasteurizado. Iversen & Forsythe (2003) y Proudly et al. (2008) indicaron que la contaminación en el proceso de producción de FLI posiblemente puede ocurrir antes o durante el secado por atomización. Arku et al. (2008) evaluaron si la adaptación al estrés térmico subletal puede incrementar la supervivencia *C. sakazakii*; para tales fines cinco cepas de *Cronobacter* spp. fueron mantenidas a 46 °C durante 30 minutos y posteriormente sometidas a un estrés letal (52 °C). Las cepas lograron sobrevivir a temperaturas de secado por aspersión (160 y 90 °C), el potencial de supervivencia adquirido luego de la adaptación fue trasladado a la supervivencia en un ambiente seco (FLI), lo que confirma que este puede ser el punto de contaminación en un IFM instalaciones de procesamiento.

1.3.2.2. Formación de biofilms

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. (Costerton et al. 1995). Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, la que puede

³ El valor z o constante de resistencia térmica se define como el número de °C que debe elevarse o reducirse la temperatura de un determinado valor D para disminuir o aumentar su tiempo a la décima parte.

representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Sutherland, 2001; Branda et al., 2005). La capacidad de formar biofilms le otorga a los microorganismos protección contra estresores ambientales o la acción de desinfectantes, otorgándoles una matriz de crecimiento estable de difícil erradicación, lo que contribuye a que las superficies en las que se forme el biofilm actúen como fuentes de contaminación cruzada.

La formación de biofilms en las especies del género *Cronobacter* ha sido bien documentada (Strydom 2008). Estos microorganismos son capaces de adherirse a superficies de diversos materiales como: silicio, vidrio, acero inoxidable, de látex y policarbonato, cloruro de polivinilo y poliuretano (Iversen et al. 2004b; Lehner et al. 2005; Oh et al. 2007). Lehner et al. (2005) demostraron *E. sakazakii* es capaz formar biofilms y de producir componentes característicos de la matriz extracelular como la celulosa y otros polisacáridos extracelulares (glucosa, galactosa, fucosa y ácido glucurónico); mediante el análisis cromatográfico también demostraron que es capaz de producir moléculas de señalización célula-célula importantes para la formación de biofilms.

La producción de biofilms puede estar influenciada por la disponibilidad de nutrientes, así como la temperatura del medio de cultivo. Oh et al. (2007) encontraron que las células de *C. sakazaki* suspendidas en FLI reconstituidos son capaces de formar biofilms, y además al comparar la formación de biofilms en FLI reconstituidos y otros medios de cultivo enriquecidos (infusión cerebro corazón, caldo tréptico de soya y caldo nutritivo) encontraron que los FLI son el medio más apropiado la formación de biofilms. Resultados similares fueron descritos por Kim et al. (2006), quienes concluyeron que la disponibilidad de nutrientes desempeña un papel importante en los procesos que conducen a la formación de biofilms en las superficies de materiales inertes, estos autores a su vez demostraron que el descenso de la temperatura afecta negativamente la formación del biofilms; resultando inhibida, aun en presencia de nutrientes a 12 °C y estimulada a 25 °C.

Debido a que la formación de biofilms contribuye a la contaminación cruzada su presencia revierte mayor importancia en el ámbito hospitalario, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN) donde los infantes son alimentados por vía parenteral o en las guarderías donde muchos infantes pueden ser expuestos. Se ha demostrado que *C.*

sakazakii puede persistir en los tubos de alimentación enteral formando biofilms que al cabo de 24 pueden alcanzar una elevada carga bacteriana (Kim et al. 2006; Hurelle et al. 2009) y al desprenderse colonizar el sistema digestivo de pacientes recién nacidos intrínsecamente inmunosuprimidos. Aunque el consumo de FLI por parte de niños de mayor edad representa un riesgo menor, OMS (2007) recomienda que para reducir los riesgos microbianos, los preparados en polvo deben ser reconstituidos con agua a temperaturas superiores a los 70 ° C, y que este alimento debe ser utilizado dentro de las 2 horas posteriores a su preparación.

1.3.2.3. La tolerancia osmótica y la desecación

Los miembros del género *Cronobacter* han demostrado ser más tolerantes a la desecación osmótica que otras enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp. (Breeuwer et al., 2003). Algunas cepas pueden sobrevivir en alimentos con una baja actividad de agua (a_w), como cereales de arroz para bebés (Desde 0,3 hasta 0,69 a_w) y FLI (0,25 a 0,5 a_w). La supervivencia de *Cronobacter* spp. en cereales (0,63 a 0,83 a_w) parece ser mejor a 4 ° C que a 21 o 31 ° C (Gurtler & Beuchat 2007; Lin & Beuchat, 2007).

Puesto que se ha demostrado que las células de *Cronobacter* spp. pueden sobrevivir hasta dos años en un medio ambiente seco (Riedel & Lehner 2007) y multiplicarse rápidamente después de la hidratación, es importante comprender las respuestas de *Cronobacter* al estrés osmótico, con el fin de controlar la contaminación (Osaili & Forsythe 2009). Estudios metabólicos indican que las células *Cronobacter* spp. acumulan trehalosa durante el fase estacionaria. La trehalosa es un disacárido de glucosa altamente soluble, que estabiliza las proteínas y fosfolípidos de las membranas, otorgando protección contra la deshidratación (Breeuwer et al. 2003).

Otra respuesta al estrés osmótico observada en *Cronobacter* spp. inducción de de la síntesis de proteínas Dps y Hns encargadas de proteger a los componentes de la membrana y al ADN bacteriano de la oxidación. La producción de mayores niveles de superóxido dismutasa y alquilhidroperoxido reductasa también puede participar en la protección contra la oxidación (Riedel & Lehner 2007).

1.3.2.4. Ácido tolerancia

Cronobacter ha sido descrito como moderadamente resistente a la acidez (Gorden & Small 1993). Edelson-Mammel et al. 2006 observaron una diversidad sustancial en la resistencia a la acidez de 12 cepas de *Cronobacter*, particularmente cuando fueron expuestas a

un pH muy bajo (3,0) durante 1 h. A pesar de esta diversidad, todas las cepas fueron inactivadas al ser expuestas durante 6 horas a pH 3,0; mostrando una mayor resistencia a pH 3,5.

La resistencia de *Cronobacter* spp. a la acidez de los alimentos puede variar. *Cronobacter* spp es capaz de sobrevivir en jugos ácidos como los de sandía (pH 5,0), melón (pH 6,8) y tomate (pH 4,4) (Kim & Beuchat 2005). Sin embargo, estas bacterias no sobrevivieron en jugos de manzana y fresa (pH 3,9 y 3,6 respectivamente) incubados a 25 °C e inoculados con 1000 cfu.mL⁻¹. No obstante, *Cronobacter* spp. ha sido aislado de productos fermentados de mayor acidez, como por ejemplo sobia, un alimento fermentado de trigo y malta, (pH: 3,4 a 4,0) (Gassem 2002), quesos domiati (pH: 4,9 – 6,4) y ras (pH: 5,8) (El Sharoud et al. 2009).

1.4. Marcadores de virulencia y patogenicidad

Las especies del género *Cronobacter* comparten algunos mecanismos de patogenicidad de otras bacterias Gram negativas. Pagotto et al. (2003) fueron los primeros en demostrar los efectos de alguno de los factores de la virulencia de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). Estos autores, al realizar ensayos *in vivo* e *in vitro* con 18 cepas de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) encontraron que todas las cepas fueron letales al ser inoculadas intraperitonealmente en ratones lactantes con una concentración de 10⁸ UFC/ml; mientras que por vía peroral sólo 2 cepas resultaron ser letales. En los ensayos *in vitro*, utilizando cultivos de células Vero CHO y Y-1, observaron citotoxicidad manifestada como redondeamiento celular. Posteriormente Kothary et al. (2007) lograron extraer e identificar una enzima asociada al redondeamiento celular, identificándola como una metaloproteasa de Zinc. Además de lograr clonar el gen *zpx* que codifica para esta enzima, identificaron su presencia en 135 aislamientos provenientes de muestras de diversa procedencia (clínicas, ambientales, alimenticias y de origen desconocido). Esta enterotoxina cuenta con masa molecular de 66 kDa, es más activa a pH 6 y muy estable al calor, ya que no se vio afectada después de ser incubada durante 30 minutos a 70 °C y mostró sólo una disminución de la actividad luego de ser incubada a 90 °C (Rhagav & Aggrawal, 2007).

El Lipopolisacárido (LPS) es un importante componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Este se compone de: un complejo lipídico, denominado lípido A (formado por azúcares y ácidos grasos), un núcleo y una cadena lateral o antígeno O que se extienden desde el núcleo. El antígeno O es el antígeno de superficie de las bacterias Gram-negativas, y es el responsable de la diversidad serológica. Tradicionalmente la serotipificación

inmunoquímica, basada en el polisacárido O, ha demostrado ser útil para la identificación de aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., así como también para la detección de patógenos emergentes. En la mayoría de bacterias pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae los genes implicados en la síntesis del Antígeno O se encuentran ubicados en el locus *rfb* situado entre los genes *galF* y *gnd*. Las variantes serológicas del antígeno O están relacionadas con el contenido de genes de dicho locus, que a su vez está compuesto por un grupo de genes. Este grupo de genes incluye: (i) aquellos que codifican para enzimas que participan en la síntesis de azúcares que conforman de la subunidad O, (ii) los genes que codifican glicosiltransferasas, e intervienen en el montaje de la subunidad O, y (iii) los genes que codifican para proteínas necesarias para el procesamiento y montaje del antígeno O de la subunidad S como son: el transportador (*wzx*) y la polimerasa (*wzy*). Mullane et al. (2008) caracterizaron la estructura molecular del locus *rfb* de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) identificando dos serotipos denominados: O:1 y O:2. El tamaño de estas estructuras difiere entre las diferentes cepas de *E. sakazakii*, (*Cronobacter* spp.), estas diferencias dependen de la composición del azúcar y la complejidad de la estructura. Debido a la importancia del rol del polisacárido O en la patogenia de *C. sakazakii* MacLean et al. (2009) condujeron un detallado estudio para determinar las características estructurales específicas del polisacárido O de *C. muytjensii* que puedan ser utilizadas en su identificación. El polisacárido –O producido por esta cepa es un polímero lineal no ramificado que consiste en unidades repetidas de pentasacáridos.

Otro factor de importancia en la patogenia de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) es su capacidad de persistencia en células de sistema inmune. En ensayos de laboratorio, utilizando ratas Sprague–Dawley de dos días de edad inoculadas intracranealmente con *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), Townsend et al. (2007) encontraron que las diferentes cepas exhibieron variaciones en grado de persistencia dentro de los macrófagos. Posteriormente, Townsend et al. (2008) compararon la capacidad invasiva, fijación en células intestinales de mamíferos, y la supervivencia en macrófagos de 4 cepas, con diferentes pulsotipos, aisladas de un brote ocurrido en Francia en 1994. Estos estudios revelaron que todas las cepas de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) fueron capaces de adherirse e invadir células epiteliales humanas (Caco-2), invadir las células del endotelio capilar cerebral de las ratas expuestas. Dos cepas, provenientes de casos letales de meningitis y enterocolitis necrotizante, mostraron la mayor tasa de invasión de células Caco-2. La mayoría de las cepas persistió en los macrófagos durante 48 h. Estos estudios demostraron la existencia de variaciones en el potencial invasor y en la

capacidad de persistencia y replicación de *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en los macrófagos entre y dentro de pulsotipos obtenidos de un mismo brote.

En la actualidad se conoce que estas variaciones en la patogenicidad se deben a las variaciones genotípicas de *Cronobacter* spp., ya que de acuerdo a la última clasificación taxonómica propuesta por Iversen et al. (2008) y reconocida por la OMS (FAO / OMS, 2008), este género está compuesto por seis especies.

A diferencia de *C. sakazakii*, *C. turicensis* exhibe una baja capacidad de adhesión e invasión de las células endoteliales, pero es capaz de replicar activamente dentro de los macrófagos e invadir las células del endotelio cerebral. Las cepas de *C. muytjensis* mostraron una moderada adhesión e invasión de las células endoteliales, pero una menor estabilidad en los macrófagos y una significativa disminución de la capacidad invasiva de las células cerebrales. Las cepas de *C. dublinensis* mostraron una baja adhesión pero una alta capacidad de invadir las células endoteliales pero no las del endotelio capilar cerebral. Puesto que las cepas de *C. sakazakii* y *C. turicensis* persisten en los macrófagos, son capaces de evadir la respuesta inmune. Estos hallazgos contribuyen a explicar la diversidad de los rasgos de virulencia entre las diferentes especies de *Cronobacter* spp. (FAO/WHO 2008; Himelright et al. 2002; Caubilla-Barron et al. 2007; Townsend et al. 2007; Townsend et al. 2008).

Para que un patógeno logre causar una infección en un huésped, debe ser capaz de adherirse a él y colonizarlo. La adhesión específica se considera un factor de virulencia esencial para mayoría de los patógenos bacterianos. Mange et al. (2006) lograron identificar dos patrones de adhesión en *C. sakazakii*: “agregación” y “adherencia difusa”. Dichos patrones muestran una distribución heterogénea en las diferentes cepas estudiadas, y algunas cepas presentan ambos patrones simultáneamente, a este tercer patrón se le denomina “mixto”. Los estudios de Mange et al. 2006 definieron como patrones de adhesión predominantes el de “agregación” y el “mixto”, además, no encontraron relación entre tipo patrón de adhesión y el origen de la cepa. Dichos autores señalan la importancia de considerar parámetros adicionales que influyen en la adherencia bacteriana como: la fase de crecimiento, el tiempo de incubación, etc. Aunque dichos estudios confirmaron que la adhesión a las células del huésped no se basa en las interacciones mediadas por fimbrias, la(s) adhesina(s) involucradas en este proceso aún no han sido determinadas.

Al igual que muchas otras bacterias Gram-negativas, *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) expresa la proteína de membrana externa A (ompA) que muestra un alto

grado de homología con genes de ompA de otras bacterias Gram-negativas (Mohan & Venkitanarayanan 2008b). Singamsetty et al. (2008), comprobaron que la proteína ompA de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) es crucial para la invasión de las células del microendotelio cerebral. Por su parte, Mohan & Venkitanarayanan (2007) estudiaron el rol que cumple dicha proteína en el proceso de colonización, evaluando *in vitro* su interacción con cultivos de células de epitelio intestinal humano (INT 407). Los resultados sugirieron que la invasión de las células INT 407 por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) involucra la participación tanto de la proteína de membrana externa OmpA, de esta bacteria, como la acción de los microtúbulos y microfilamentos del epitelio intestinal. Posteriormente, Kim et al. (2010) demostraron que mutantes por delección de los genes *ompX* y *ompA* exhibieron una significativa reducción de la infectividad de células epiteliales INT-407 y Caco-2.

La importancia del reconocimiento de genes específicos, particularmente de aquellos que codifican factores de virulencia o de genes responsables de fenotipos únicos, radica en el hecho de que estos pueden ser utilizados como marcadores genéticos y a su vez, como herramientas diagnósticas que permitan la identificación y diferenciación de *Cronobacter* spp.

El gen *gluA* (α -1,4-glucosidasa), fue identificado como un marcador genético de *Cronobacter* spp. puesto que no se encontró en ninguna otra especie de *Enterobacter*. (Iversen et al. 2007; Muytjens et al. 1984). Otros genes utilizados como marcadores fueron: el de la DNasa, la ornitina decarboxilasa (Farmer 1980), arginina dehidrolasa (Iversen et al. 2007), los genes de la región 16S-23S rRNA del espaciador interno transcripto (ITS) (Liu et al. 2006), el de la proteína de membrana externa (*ompA*) (Mohan & Venkitanarayanan 2006; Ye et al. 2007), también los genes *recN*, *thdF*, y *rpoA* han sido utilizados como marcadores especie específicos a través de análisis de la secuencia multilocus (Kuhnert et al. 2009).

Muchos de los biomarcadores están relacionados con genes que codifican los productos relacionados con la biogénesis/degradación de la pared o membrana celular, secreción y síntesis de estructuras extracelulares tales como fimbrias y flagelos (Healy et al. 2009). En *Cronobacter* spp., estos genes incluyen a aquellos involucrados en la formación del pigmento amarillo, un grupo de genes que codifican proteínas no estructurales *wzx* y *wzy* que intervienen en el ensamblaje del antígeno O, genes únicos, y factores de virulencia comunes a los principales patógenos transmitidos por alimentos.

Yan et al. (2011) abordaron la búsqueda de posibles biomarcadores de *Cronobacter* spp. mediante un enfoque sistemático que combina: la extracción de datos disponibles en la

literatura, el análisis comparativo del genoma, y la secuenciación directa de productos de PCR de genes de que pueden ser utilizados como biomarcadores específicos. En el **Anexo 1.1** se presenta un listado de los genes encontrados únicamente en *Cronobacter* spp. Estos están agrupados en 15 clusters, cada clúster tiene un mínimo de 3 genes; se piensa que los productos proteínicos de los mismos cumplen importantes roles en el funcionamiento, estructura o están involucrados en la patogénesis de este microorganismo. En el **Anexo 1.2** se presenta un listado de los posibles biomarcadores identificados en base a publicaciones científicas y búsquedas de similitud de secuencias de proteínas (BLASTp) contra la base de datos proteínas no redundantes del GenBank y otras bases de datos NCBI y ENA. Los estudios de Yan et al. (2011) lograron identificar 126 posibles biomarcadores *Cronobacter* spp. y también algunos factores de virulencia putativos. Futuros avances en el desarrollo de nuevas tecnologías y en el conocimiento de los mecanismos moleculares asociados a la patogénesis *Cronobacter* spp. contribuirán a la identificación de nuevos biomarcadores y su aplicación en la identificación y diferenciación de cepas de *Cronobacter* spp. de alta patogenicidad.

1.5. Manifestaciones clínicas

Desde 1958, han sido documentados numerosos casos de infecciones provocadas por *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii* en niños, con 111 casos de infección y 26 muertes asociadas (Mullane et al. 2007). Aunque la incidencia de infecciones es baja se han reportado elevadas tasas de mortalidad sobre todo en niños que padecieron meningitis (Bowen & Braden 2006; Drudy et al. 2006; Mullane et al. 2006; Hunter et al. 2008). Los neonatos prematuros o de bajo peso al nacer son los más susceptibles (Adamson & Rogers 1981; Himelright et al. 2002; Caubilla-Barron et al. 2007). El riesgo también parece estar determinado por la presencia de inmunosupresión.

En el sistema inmune innato de los recién nacidos se observa una disminución en: la motilidad del moco, la producción de ácidos digestivos, producción de inmunoglobulinas, motilidad intestinal; lo que facilita la adherencia bacteriana limitando la eliminación del patógeno. La disminución de la presentación de antígenos y producción de citocinas puede ser atribuida a una disminución en la producción de células T en el neonato. Las funciones quimiotáxicas, fagocíticas y bactericidas de los macrófagos también se ven reducidas. Además, los bebés de entre 2 y 6 meses de edad, desarrollan una deficiencia de IgG debida al catabolismo de la IgG materna. Por otro lado, hasta 2 meses de edad, la expresión de IgM se encuentra genéticamente limitada. Esta inmunodeficiencia transitoria que afecta a los neonatos aumenta el riesgo de infección (FAO /WHO 2008). Se ha demostrado, en modelos

animales recién nacidos, que la supervivencia intracelular de *Cronobacter* spp. contribuye a la patogénesis de la enfermedad (Townsend et al 2007- 2008). Cabe señalar que los recién nacidos también muestran una respuesta inmune menos activa contra los patógenos intracelulares. Todos los factores expuestos anteriormente contribuyen a que la incidencia de infecciones causadas por *Cronobacter* spp. sea mayor en neonatos y bebés prematuros.

Debido a que *Cronobacter* spp. fue diferenciado de *Enterobacter cloacae* en 1980, y hasta entonces era un microorganismo desconocido en el diagnóstico de meningitis los casos anteriores fueron atribuidos a diversas causas. Muytjens et al. (1983) analizaron nuevamente las cepas de *Enterobacter* aisladas de sangre y líquido cefalorraquídeo. Estos investigadores encontraron 8 casos de *E. sakazakii* meningitis, seis de los recién nacidos murieron y dos se recuperaron, pero con graves secuelas neurológicas. Otras condiciones médicas encontradas por Muytjens et al. (1983) fueron y enterocolitis necrotizante. Las presentaciones clínicas incluyen meningitis, enterocolitis necrotizante (ECN) y septicemia (Lai et al. 2001).

1.5.1. Enterocolitis necrotizante

La enterocolitis neonatal necrotizante (ECN) es una enfermedad grave que se caracteriza por necrosis y neumatosis intestinal. Esta es la emergencia gastrointestinal más común en el recién nacido con una tasa de mortalidad de 10 a 55% (Peter et al. 1999). Histológicamente se observa necrosis coagulativa isquémica que puede ser transmural o limitada a la mucosa y la presencia de zonas hemorrágicas, con inflamación, ulceración y edema. Los brotes han sido relacionados con patógenos que generalmente están ausentes en la flora intestinal normal del recién nacido y las fuentes de estos patógenos no siempre han logrado ser identificadas. La tasa de incidencia ECN atribuida a *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en neonatos prematuros es del 2 a 5% y aumenta al 13% en aquellos nacidos con un peso menor a 1,500 g.

van Acker et al. (2001) describieron el primer reporte que asocia a este patógeno con casos de ECN, este fue descrito en una unidad de cuidados intensivos neonatales entre Junio y Julio de 1998. El brote de ECN afecto a 12 recién nacidos los cuales mostraron: distensión abdominal, residuos gástricos, emesis y/o hematoquecia, y en estadios más avanzados de la enfermedad pneumatosis y perforación intestinal; 10 de los 12 neonatos involucrados en este brote fueron alimentados con FLI. *Cronobacter* spp. fue aislado de dicho alimento y a partir de muestras de sangre, hisopado anal o aspirado gástrico en 6 de los 12 individuos afectados.

Los principales síntomas gastrointestinales son: distensión abdominal, vómitos biliosos, diarrea, sangre en heces (macro o microscópica) y colecta de líquidos en exceso en cavidad abdominal. Otros síntomas generales observados son: intolerancia al alimento, decaimiento, inestabilidad de la temperatura, alteraciones en recuento de glóbulos blancos y shock. Las complicaciones incluyen: sepsis, perforación intestinal, estenosis intestinal, peritonitis. La presencia de dichas complicaciones deriva en una cirugía, la cual consiste en la extracción del tejido intestinal necrótico y realización de una colostomía o una ileostomía. El intestino se reconecta varias semanas o meses después, cuando la infección y la inflamación se hayan curado.

En caso de sospecha de enterocolitis necrotizante, se debe suspender la alimentación y descomprimir el intestino de gases, insertando un tubo pequeño en el estómago. Los alimentos de fórmula o la leche materna se deben ser reemplazados por líquidos intravenosos y se debe dar inicio a la terapia antibiótica.

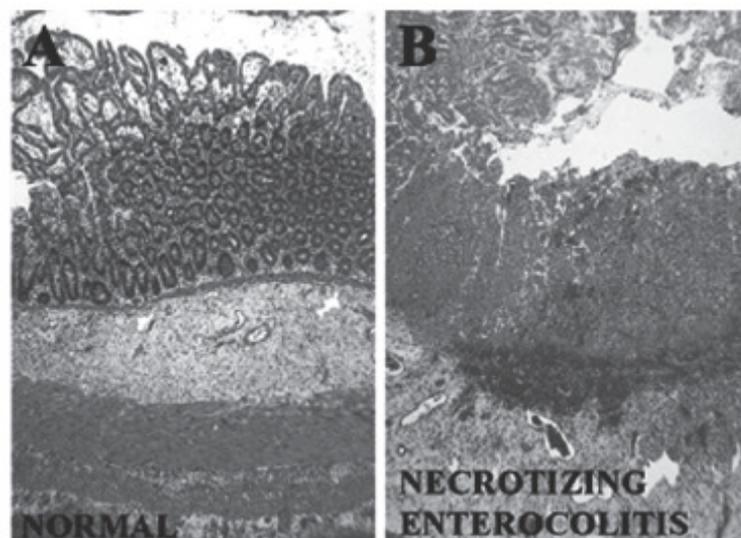


Figura 1.4.- Cortes histológicos de Intestino de un recién nacido teñidos con Hematoxilina y eosina (A) segmentos sin alteraciones. (B) segmento ileal afectado con enterocolitis necrotizante neonatal. Infiltrado de células inflamatorias, trastornos de las microvellosidades y hemorragia.

1.5.2. Meningitis neonatal

La meningitis es la infección aguda de las membranas que cubren el cerebro y la médula espinal (meninges). Las infecciones de las meninges se asocian generalmente con el inicio progresión agudo los que sin tratamiento conllevan a un desenlace fatal. Más de la mitad de los sobrevivientes desarrollan secuelas neurológicas irreversibles, resultando en cuadriplejia, desarrollo de impedancia, y problemas de audición (Bowen & Braden 2006).

La meningitis causada por esta bacteria, tiende a desarrollarse durante el periodo neonatal de los infantes; esto puede deberse a que los procesos inmunológicos y neurovasculares aún no se han desarrollado completamente en este grupo etario (FAO/WHO 2006). En los lactantes, la meningitis por *Cronobacter* spp. se establece entre el cuarto y quinto día después del parto y puede ser fatal en cuestión de horas o hasta varios días después de la aparición de los primeros síntomas clínicos (Muytjens et al. 1983).

La meningitis neonatal produce ventriculitis, abscesos cerebrales o formación de quistes, y el desarrollo de hidrocefalia. La tasa de mortalidad en neonatos es de hasta un 80% (Nazarowec-White & Farber 1997a; Lai 2001) y los sobrevivientes a menudo sufren de graves trastornos neurológicos irreversibles. La mayoría de los casos de meningitis por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) disponibles en la literatura describen la infección en recién nacidos. Nazarowec-White & Farber (1997) realizaron una extensa revisión de los casos registrados en niños esta se detalla en el **Anexo 1.3**. *C. sakazakii*, *C. turicensis* y *C. malonaticus* son las únicas especies que han sido aislados de casos de recién nacidos meningitis (Kučerová et al. 2010). Sin embargo, una cepa perteneciente al *C. muytjensii* ha sido aislada de la médula ósea humana que normalmente estériles (Farmer et al. 1980).

Debido a que la meningitis bacteriana es una enfermedad mortal y que la presencia de células del sistema inmune en el líquido cerebroespinal de los recién nacidos es limitada, se deben utilizar antibióticos con la finalidad de erradicar el agente causal. La terapia antibiótica es generalmente suministrada por vía intravenosa y debe iniciarse de inmediato. En la mayoría de los casos reportados, se utiliza una combinación de ampicilina y gentamicina en el tratamiento de meningitis causada por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp).

Los principales síntomas asociados a esta presentación son: fiebre, intenso dolor de cabeza, decaimiento, inapetencia, náuseas y vómitos, espasmos rígidos (cabeza, cuello y columna arqueadas hacia atrás), rigidez cervical, convulsiones, fotofobia, alteraciones el

estado mental, síntomas que sugieren infección de la vejiga o los riñones, los intestinos o el pulmón que podría ser la fuente de la infección del líquido cefalorraquídeo (ANMAT; Pérez 2007).

1.5.3. Casos en adultos

Los informes de infecciones invasivas por *Cronobacter* spp. en individuos adultos son raros, aunque se han algunos reportes en pacientes inmunodeprimidos (Lai 2001). En los adultos, la infección generalmente afecta a los pacientes de edad avanzada (mayores de 55 años) que presentan enfermedades subyacentes como cáncer, y muestran una elevada tasa de mortalidad tasa por sepsis y neumonía (50-67%) (Lai 2001; Gurtler et al. 2005). Pribyl et al. (1985) describió un caso en el que *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) fue uno de los tres microorganismos aislados de una úlcera en el pie de un paciente adulto diabético. Jiménez & Giménez (1982) reportó un solo caso de urosepsis causada por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en un paciente de sexo masculino de 76 años de edad. Más recientemente, Hawkins et al. (1991) informaron tres casos de bacteriemia en adultos causadas por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). En todos los casos mencionados anteriormente el tratamiento antibiótico resultó adecuado para lograr la recuperación de los pacientes. Corti et al. (2007) informó el hallazgo de un caso de infección por *Cronobacter* spp. en un paciente masculino de 22 años de edad con osteomielitis postoperatoria del fémur.

1.5.4. Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo se basa en el rango etario, las manifestaciones clínicas y el tratamiento debe ser iniciado de inmediato. La confirmación se realiza por el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo, abscesos cerebrales. Adicionalmente, dependiendo de la presentación clínica, se puede indicar la realización de una tomografía computada o resonancia magnética.

1.5.5. Tratamiento

El tratamiento antibiótico óptimo para el tratamiento de las infecciones provocadas por *Cronobacter* spp. aún no ha sido determinado. En la mayoría de los casos de meningitis se utiliza una combinación de ampicilina y gentamicina. Willis & Robinson (1988) denominaron a esta combinación, el “gold standart” para el tratamiento de meningitis causadas por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.).

Sin embargo, parece existir divergencias en la susceptibilidad entre los diferentes miembros del género *Cronobacter*. Todas las cepas analizadas por Farmer et al. (1980) exhibieron resistencia a la penicilina, algunas fueron sensibles al cloranfenicol y ampicilina, y sólo el 13% de las cepas fueron sensibles a cefalotina. Nazarowec-White & Farber (1999) encontraron cepas resistentes a cefalotina y cloranfenicol, así como a ampicilina y tetraciclina. Recientemente Kuzina et al. (2001) y Lai (2001) informaron el hallazgo de cepas resistentes a la ampicilina, cefalotina y penicilinas de amplio espectro. Por su parte, Dennison & Morris (2002) describieron el aislamiento de una cepa multirresistente de *Cronobacter* spp. El aumento de la resistencia a los antibióticos de *Cronobacter* spp. ha incitado a los médicos a considerar la prescripción de carbapenémicos (imipenem-cilastatina, meropenem, ertapenem) o cefalosporinas en conjunto con un aminoglucósido (Lai 2001; Lehner & Stephan, 2004). Sin embargo, según las recomendaciones estándar, se debe minimizar el uso de antibióticos de amplio espectro y realizar una selección de los antimicrobianos basada a la evaluación de la sensibilidad específica mediante antibiogramas.

1.6.- Epidemiología

Para comprender la epidemiología de las enfermedades provocadas por *Cronobacter* spp. es necesario conocer como se obtiene la información que será sujeta al análisis epidemiológico. Como sabemos, los sistemas de vigilancia epidemiológica (SVE) de enfermedades transmisibles pueden clasificarse según los mecanismos de información en Activos y Pasivos. En los sistemas de vigilancia activos las autoridades de salud pública participan activamente recaudando, a intervalos regulares, información proveniente de las entidades involucradas en salud (laboratorios, hospitales, personal médico y la comunidad). Por su parte, los sistemas de vigilancia pasiva las entidades involucradas recolectan los datos que registran periódicamente volcando la información en formularios los que serán derivados a las autoridades de salud pública, este tipo de vigilancia epidemiológica puede clasificarse en obligatoria y no obligatoria. En los sistemas de vigilancia pasiva obligatoria las entidades involucradas en salud están obligadas a reportar la presencia de un caso o infección a la autoridad sanitaria correspondiente; en la vigilancia pasiva no obligatoria la notificación se basa, únicamente, en la iniciativa del médico tratante.

En la actualidad, no existe un sistema de vigilancia activo para las enfermedades provocadas por *Cronobacter* spp. Aunque la mayoría de países declaran contar con un sistema de vigilancia o un sistema de reporte de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos,

la mayoría de los brotes registrados son aportados por notificación pasiva voluntaria. La ocurrencia de infecciones por *Cronobacter* spp. es de declaración obligatoria sólo en Brasil y Hungría. En Nueva Zelanda y en el estado de Minnesota (USA) es obligatorio declarar de la ocurrencia de infecciones invasivas. Exceptuando a los países antes mencionados, la denuncia de eventos en los que se involucra a *Cronobacter* spp. ocurre de manera aislada y con escasa frecuencia, sobre todo en países en vías de desarrollo (Estuningsih & Abdullah Sani, 2008).

Si analizamos la pirámide epidemiológica esquematizada en la Figura 1.5 podemos decir que los casos reportados representan sólo una fracción de los casos de reales y en este contexto, es posible que se desconozca la real magnitud del efecto de un patógeno sobre la población general. Más aún sí, como en el caso de *Cronobacter* spp., se trata de un patógeno emergente, cuya vigilancia epidemiológica se basa en un sistema de declaración pasiva no obligatoria.

Por otro lado en Reino Unido y Filipinas, se han establecido un sistema de vigilancia de laboratorios, según el cual se reportan los eventos en los que *Cronobacter* spp. fue aislado en laboratorio pero no se obtiene información referida a la historia clínica y otros aspectos de importancia epidemiológica asociados a cada uno de estos hallazgos.

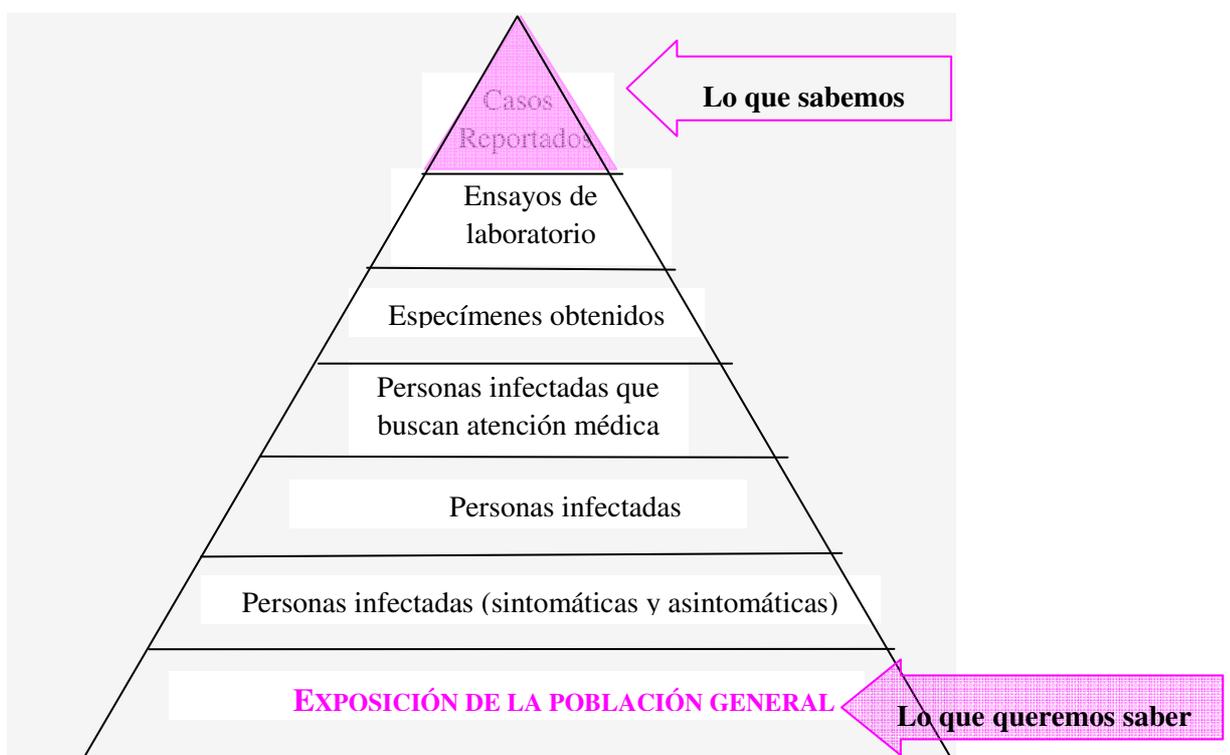


Figura 1.5. Pirámide epidemiológica.

Desde 1961 diversas entidades (Consejo Internacional de Fórmula (IFC), e Industrias Internacionales de Alimentos Dietéticos (ISDI), Nestlé, UCD, EE.UU. (CDC)), se han encargado de recopilar información referida a la incidencia y cáustica de infecciones por (*Cronobacter* spp.) a nivel mundial (Iversen & Forsyth, 2003). En el informe publicado por la Organización de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS): “*Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae” se encuentra compilada toda esta información. A continuación la Tabla 1.3 resume los casos registrados, por año y país, desde 1961 a 2008. En el Anexo 1.4. se presenta información más detallada sobre cada uno de estos reportes.

Tabla 1.3.- Número de casos de infección invasiva por *Cronobacter* spp. en infantes y niños reportados hasta Julio de 2008.

Año de publicación	País	Número de casos	Muertos
1961	Reino Unido	2	2
1965	Dinamarca	1	
1979	USA	1	
198	USA	2	
1983	Países Bajos	8	6
1984	Grecia	1	
1985	USA	1	
1987	Grecia	11	4
1988	USA	2	
1989	Portugal	1	1
1989	Iceland	3	1
1989	USA	4	
1990	USA	1	
1991	USA	1	
1994	Alemania	1	
1997	Escocia	1	
2000	USA	1	
2000	Brazil	5	
2001	USA	3	
2001	Bélgica	12	2

2001	Israel	2	
2002	Israel	3	
2002	USA	20	2
2002	Bélgica	1	1
2003	Brazil	1	
2003	Hungría	1	
2003	USA	5	1
2004	USA	2	
2004	Hungría	1	
2004	Nueva Zelanda	5	
2005	USA	2	
2005	Hungría	1	
2006	USA	5	
2006	Hungría	1	
2006	Francia	9	2
2007	USA	9	1
2007	Canadá	1	
2007	India	2	1
2007	España	1	
2007	Francia	18	4
2008	USA	3	
2008	Japón	1	
Total		156	29

Según estos datos, entre 1961 y Julio de 2008, se han reportado 156 casos documentados de infecciones causadas por *Cronobacter* spp. a nivel mundial. De estos 156 casos, por lo menos 29 casos (19%) resultaron en la muerte (FAO/WHO. 2008). Las evidencias parecen indicar que los niños de corta edad son más propensos a desarrollar una enfermedad grave que conlleve a la muerte. También se considera posible que los niños mayores experimentan una enfermedad leve, el hecho de la enfermedad sea leve o autolimitada, reduce aún más el potencial de captura de los casos a través de los SVE existentes. Según el Codex Alimentarius, un prematuro es un bebé que nació antes de las 37 semanas de gestación, un recién nacido es un bebé recién nacido, de menos de cuatro semanas de edad, y un bebé es

una persona de no más de 12 meses de edad. Mientras que los niños son personas de 12 a 36 meses de edad (3 años) (CAC 2008).

De los 156 casos documentados presentados en la Tabla 1.3, 120 afectaron a bebés y niños menores de tres años, solo 8 de estos a bebés entre 6 y 35 meses de edad, de los cuales la mayoría (7 casos) padecieron la enfermedad de manera invasiva (con compromiso sistémico: hallazgo de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) a partir de muestras de LCR, tejido cerebral, sangre u orina), en estos casos se registraron factores predisponentes como: la presencia de otros problemas médicos activos, antecedentes nacimiento prematuro; y en la mayoría de los casos de enfermedad invasiva esta estuvo asociada a la ingesta de formulados lácteos infantiles contaminados, aunque no en todos los casos se logró aislar al microorganismo del formulado.

Adicionalmente, SVE de laboratorio fueron implementados en Reino Unido, Túnez; Hungría y Filipinas. En Reino Unido, entre 1997 y 2007 se registraron 507 hallazgos, de los cuales 15 provenían de infantes de menores de un año y 16 de niños entre 1 y 4 años. En Túnez entre 2006 y 2007 se realizaron 26 aislamientos. En Hungría, entre 2002 y 2006 se obtuvieron 25 – 29 aislamientos de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). En Filipinas, el Programa de vigilancia del Instituto de Investigación en Medicina Tropical Resistencia a los Antimicrobianos del Departamento de Salud recopiló información sobre la frecuencia de aislamientos de laboratorio entre 1998-2007, encontrando un total de 237 aislamientos de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) de los cuales 18 provenían de bebés menores de un mes, 5 entre 1 y 2 meses, 9 de niños entre 9 y 35 meses. Como en el caso de los reportes obtenidos del Reino Unido, ya que estos provienen de un sistema de vigilancia de laboratorio no se dispone de información sobre los síntomas, pronósticos, o si los bebés y niños pequeños afectados consumieron Formulados Lácteos Infantiles.

En los últimos años el número de casos bien documentados de infecciones por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en lactantes de todo el mundo ha aumentado, pero continua siendo muy bajo en comparación con muchas otras enfermedades infecciosas. En general, hay muy pocos datos disponibles para dar una idea definitiva sobre el número probable de infecciones atribuibles a este organismo o la variación en la incidencia de país a país o entre regiones de un mismo país. La dificultad de realizar conclusiones radica principalmente en tres aspectos: a) dificultades para realizar un diagnóstico certero adecuado,

b) disparidad en los alcances de los SVE en un país, c) diferencias en la metodologías aplicadas en la vigilancia epidemiológica entre países.

Al tratarse de un patógeno emergente el desconocimiento de este microorganismo puede representar una de los principales puntos débiles en el reporte de casos, esto sumado al hecho de que en algunos países no todos los laboratorios de análisis microbiológicos: clínicos, ambientales o de alimentos cuentan con las herramientas necesarias para la detección inequívoca de estos microorganismos. A pesar de que se han logrado importantes avances en la estandarización de una metodología de aislamiento y detección tanto de muestras alimentaria y ambientales como de muestras clínicas aún es necesario ahondar en la educación, difusión y concientización de la importancia de éste y otros patógenos emergentes.

En cuanto a la disparidad de los alcances de los SVE dentro de un país podemos decir que esta se debe principalmente a que la información es proporcionada por hospitales centinela o centros de referencia nacional. El hecho de que no todas las regiones cuenten con hospitales centinela proporciona un panorama muy desigual en cuanto a la extensión de la vigilancia epidemiológica. Por otro lado, debido a que las metodologías planteadas para llevar a cabo los SVE varían significativamente entre los diferentes países, resulta difícil realizar comparaciones o uniformizar los resultados obtenidos.

El reporte de la FAO /WHO 2008 menciona que los únicos datos disponibles para hacer cualquier estimación de la incidencia de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) son los aportados por Inglaterra y Gales y las Filipinas. Si bien estos datos fueron utilizados para proporcionar algunas cifras sobre la incidencia es necesario advertir que estos datos están basados en aislamientos de laboratorio y no proveen información necesaria para realizar un análisis epidemiológico a fondo estableciendo la fuente de infección, vías de diseminación, reservorios, condiciones predisponentes, etc. Estas y otras dificultades hacen que la epidemiológica de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) sea compleja y no haya podido ser del todo comprendida hasta el momento.

En la primera reunión de expertos de la FAO/OMS sobre *Cronobacter* spp. en FLID, realizada en 2004, se definió que tasa de incidencia anual para infecciones invasivas por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en los Estados Unidos es de 1 por cada 100.000 niños menores de <12 meses de edad (FAO/WHO 2004). Por otro lado, se encontró que la tasa de incidencia anual entre los bebés poco peso al nacer (<2.500 g) era superior: 8,7 por cada 100.000 niños (FAO/WHO. 2006). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos por Stoll

et al. (2004), quienes realizaron una extensiva revisión de los archivos del Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano de la Red de Investigación Neonatal con el fin de determinar la tasa de infección por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en lactantes con bajo peso al nacer (<1,500 g), estos estudios los llevaron a concluir que es esta enfermedad es muy rara ocurrencia en niños con peso muy bajo al nacer puesto que solo lograron identificar un solo caso de sepsis entre 10,660 recién nacidos, lo que representa una incidencia de 9,4 por cada 100,000 niños.

Según Bowen & Bramen (2006), los casos meningitis por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) se presentan exclusivamente en lactantes, mientras que eventos de bacteriemia han sido registrados en todos los grupos etarios. Por otro lado Reij & Zwietering (2008) mencionan que los recién nacidos son el grupo etario de riesgo para la enterocolitis necrotizante. Por su parte, Friedemann (2009) señaló que las infecciones neonatales por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) exhiben una tasa de mortalidad del 27%. La letalidad se calculó también para meningitis (42%), septicemia (<10%), enterocolitis necrotizante (19%) causadas por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.).

En cuanto a los factores predisponentes, la inmunosupresión es considerada uno de los más importantes. La inmunosupresión se define como la inhibición de uno o más componentes del sistema inmunitario, que puede producirse como resultado de una enfermedad subyacente o de forma intencional mediante el uso de medicamentos u otros tratamientos, como radiación o cirugía, con el propósito de prevenir o tratar el rechazo de un trasplante o una enfermedad autoinmune. Debido a que la incidencia de inmunosupresión varía significativamente entre países, es de esperar también que esto condicione la incidencia de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). El estado inmunitario de la población no es fácil de evaluar, y la aparente falta de un sistema universalmente acordado sobre el término “inmunosuprimido” complica aún más la situación.

La prevalencia de condiciones inmunosupresoras puede ser relativamente baja en países desarrollados países (4% en los EE.UU.). Sin embargo, en países en desarrollo esta puede ser de hasta un 40%. La desnutrición es la principal causa de inmunodeficiencia. El peso es un indicador de desnutrición y los datos aportados por UNICEF (2008) muestran que, a nivel mundial, aproximadamente el 25% de los niños menores de cinco años tiene un peso inferior al normal. Estos factores tienen un impacto importante no sólo en los niños sino también los adultos, especialmente los ancianos que pueden ser tan susceptibles como los

niños a la deficiencia de micronutrientes y la desnutrición que conduce a una inmunodepresión. Existe poca información disponible sobre el consumo de preparados en polvo entre las poblaciones con desnutrición. Los datos de algunos países indica que estas poblaciones el consumo de preparados en polvo no es una opción económicamente viable. La edad, en relación con el estado inmunológico de los bebés, es otro factor importante. Recién nacidos y niños pequeños tienen una inmunodeficiencia transitoria que afecta a un amplio número de funciones inmunes y que aumenta el riesgo de infección. Los efectos de la inmunosupresión neonatal en el desarrollo de la enfermedad fueron analizados en la sección 1.5.

1.7.- Situación actual en Argentina

En el 2005, en Argentina se reportó un caso asociado al consumo de leche de una fórmula láctea antireflujo, a partir de dicho producto se aisló *C. sakazakii* lo que motivó la prohibición de su comercialización durante 5 años.

Asato et al. (2010) documentaron, por primera vez la ocurrencia en Argentina de dos casos letales no relacionados entre sí, en los que *Cronobacter* spp. fue aislado de neonatos con diferentes síndromes clínicos asociados. Un primer caso de meningitis y sepsis en un neonato gemelar pre término, asociado a infección por *C. sakazakii* y el segundo, que afectó también a un neonato pre término, estuvo asociado a sepsis, necrosis y perforación intestinal y presentó infección por *C.malonaticus.*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus* coagulasa negativa y *Enterococcus faecalis* (aislados del líquido abdominal). En ambos casos hubo consumo previo a FLID pero *Cronobacter* spp. no fue aislado de FLID ni muestras ambientales.

A raíz de estos hallazgos, en 2007 la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) procedió a la modificación del Código Alimentario Argentino, el que hasta entonces solamente establecía un límite de tolerancia para algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, pero no especificaba nada acerca de *C. sakazakii*. Dicha modificación se detalla en el punto E-A1 del Artículo 1340 del Capítulo XVII: Alimentos de Régimen o Dietéticos del CAA; donde se definen las normas microbiológicas a las que deberán ajustarse aquellos productos para lactantes que han de consumirse después de añadir un líquido para la población de 0 a 6 meses. El criterio de aceptación del producto incluye ausencia de *C. sakazakii* en 10 g de muestra.

Debido a la ocurrencia del primer aislamiento clínico de *C. sakazakii* en 2005, un grupo de investigadores abordó un exhaustivo análisis de la presencia de *C. sakazakii* en FLID importados y comercializados en el mercado argentino durante el periodo 2005- 2008. Producto de esta iniciativa, se lograron aislar e identificar fenotípicamente 22 cepas de *C. sakazakii* y una de *C. malonaticus*; las que posteriormente fueron subtipificadas utilizando el método de electroforesis en campo pulsado PFGE (Terragno *et al.* 2009). Todos los aislamientos fueron susceptibles a: ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, cloramfenicol, cefuroxima,, amoxicilina - ácido clavulánico, cefotaxima y cefoxitina (Binsztein 2009).

La subtipificación reveló la diversidad genética de los aislamientos, 8 diferentes patrones que agrupan aislamientos de diferentes procedencias y la presencia de cepas que muestran diferentes subtipos genéticos en un mismo lote de producto. El hecho de haber encontrado diferentes patrones en un mismo lote indica la existencia de fuentes de contaminación diversas. Por otro lado, la existencia de un patrón común en diferentes lotes de una marca y diferentes marcas indica, en ambos casos la presencia de una fuente de infección común.

Hasta 2010 / En actualidad la Base de Datos Nacional (BDN) de *Cronobacter* spp., contiene hasta ahora 16 subtipos correspondientes a 43 aislamientos de *Cronobacter* spp. de origen alimentario, esta Base de Datos, única en Sudamérica, será de suma importancia para la vigilancia y la investigación de la especie *Cronobacter* en el futuro. Más recientemente, Asato *et al* 2010, empleando el protocolo estandarizado de la Red PulseNet Internacional para *Shigella sonnei* con las enzimas *XbaI* y *SpeI*, no encontraron relación genética, entre los dos cepas provenientes de aislamientos clínicos y las cepas de origen alimentario de la BDN.

CAPÍTULO II

**Aislamiento de *Cronobacter sakazakii* a partir de
productos lácteos**

2.1. DEFINICIÓN DEL PRODUCTO

El código alimentario argentino en el Capítulo XVII (**Alimentos de Régimen o Dietéticos**, Artículo 1339), incluye a los formulados lácteos infantiles (FLI) dentro de 'Alimentos para regímenes especiales' y los define como "Alimentos envasados preparados especialmente que se diferencian de los alimentos ya definidos por el presente Código por su composición y/o por sus modificaciones físicas, químicas, biológicas o de otra índole resultantes de su proceso de fabricación o de la adición, sustracción o sustitución de determinadas sustancias componentes. Este tipo de alimentos están destinados a satisfacer necesidades particulares de nutrición y alimentación de determinados grupos poblacionales"

A su vez los clasifica en "Alimentos para satisfacer necesidades alimentarias específicas de determinados grupos de personas sanas" y más específicamente dentro de "Alimentos para lactantes y niños de corta edad"

2.2. DEFINICIÓN DE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

Los criterios microbiológicos a tener en cuenta son contemplados en el Artículo 1314. Para la definición de dichos criterios en el CAA se clasifica a los alimentos *de régimen o dietéticos* en cinco subgrupos (A-E), donde los FLI pertenecen al grupo E "**PRODUCTOS PARA LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD: E-A1 Productos para lactantes que han de consumirse después de añadir un líquido para la población de 0 a 6 meses**".

Tabla 2.1.- Criterios microbiológicos establecidos por el CAA para los productos definidos en el Artículo 1339 e incluidos dentro de la categoría E-A1.

Parámetro	Caso según ICMSF	Criterio de aceptación				Método de Referencia
		N	C	m	M	
Recuento de aerobios mesófilos UFC/g (*)	3	5	2	10 ³	10 ⁴	ICMSF
Recuento de <i>Cronobacteriaceae</i> NMP/g	6	10	2	< 3	10	ISO 21528
Detección de <i>Salmonella</i> spp.	12	30	0	Ausencia en 25 g		ISO 6579
Detección de <i>Cronobacter sakazakii</i>	15	30	0	Ausencia en 10 g		ISO 22964

(*) - No aplicable a los productos alimenticios en cuya elaboración intervienen procesos de fermentación por bacterias lácticas

Donde:

n: Número de muestras del lote a muestrear.

m: Valor mínimo.

M: Valor máximo.

c: Número máximo de muestras analizadas cuyo resultado puede estar dentro del intervalo de tolerancia establecido entre los valores m y M.

2.3. TOMA DE MUESTRA Y ANALISIS MICROBIOLÓGICO

2.3.1. Procedimiento recomendado para muestreos oficiales y auditorías externas

Para realizar muestreos oficiales y auditorías externas se recomienda proceder según el Artículo 1339 del Código Alimentario Argentino. La metodología microbiológica recomendada es la Norma ISO/TS 22964:2006 (Ver Anexo 03). No existe lugar a duda sobre el carácter OBLIGATORIO del análisis de 30 muestras de 10 g cada una según la Norma ISO/TS 22964:2006 antes de liberar un lote de producción de FLI.

Es interesante mencionar que en los Artículos 1413 y 1414 del CAA se enumera una lista de métodos analíticos, quizás un tanto desactualizada para el avasallador avance del desarrollo de los cuantiosos métodos rápidos que constantemente se ofrecen en el mercado. Asimismo, en la Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos (ANMAT) se reconoce que en los últimos años se produjeron avances significativos en el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección y la separación de microorganismos de los alimentos. En la mencionada Guía, redactada en el año 2005, se deja constancia que el desarrollo de técnicas moleculares (PCR) e inmunológicas (ELISA) brinda ventajas sobre los métodos tradicionales, específicamente en lo que refiere a velocidad. Por lo tanto, se considera oportuno recomendar la utilización de métodos rápidos para la detección, aislamiento y caracterización de *Cronobacter sakazakii* en FLI.

2.3.2. Procedimiento recomendado para control de producción

La utilización de métodos rápidos agiliza la toma de decisiones durante la producción y permite ampliar la frecuencia de muestreo, ya que proporciona resultados rápidos y precisos, siempre y cuando la técnica elegida haya sido previamente validada por un organismo de validación internacional. Por lo tanto, se recomienda la utilización de métodos rápidos para la detección de *C. sakazakii* a partir de FLI. El procedimiento recomendado para control de producción es complementario al procedimiento estipulado en el CAA para la liberación del lote. Por lo tanto la recomendación se basa en realizar los dos procedimientos en cada lote de producción.

El esquema recomendado para control de producción es el siguiente:

1. Analizar como mínimo un envase del producto elaborado por cada hora de producción. Para establecer el N adecuado según las características de producción de la empresa interesada se deberá considerar el Anexo 4.3.
2. En los casos que se detecte *C. sakazakii* se procederá a retener el producto.
3. Se confirmará la presencia de *C. sakazakii* por cultivo.
4. Se analizarán 30 muestras del producto elaborado durante la misma franja horaria según la Norma ISO/TS 22964:2006.
5. En caso de confirmar el resultado positivo se implementarán medidas de intervención acordes con el sistema de HACCP implementado en la empresa.

Tabla 2.2: Métodos rápidos disponibles en Argentina para la detección y el aislamiento de *Cronobacter sakazakii* a partir de alimentos y cultivos puros.

Distribuidor en Argentina	Producto (kit)	Matriz	Tipo de Método o Análisis
Medica-Tec	Compass <i>Cronobacter sakazakii</i> Agar	Caldo de enriquecimiento	Agar cromogénico
Merck	Cronobacteriaceae plus <i>C. sakazakii</i> . Detection Kit, Hybridization Probes (LC 2.0, 480)_Foodproof®	Cultivo puro	PCR
	Agar <i>Cronobacter sakazakii</i> para microbiología Chromocult®	Caldo de enriquecimiento	Agar cromogénico
	Foodproof® Cronobacteriaceae plus <i>C. sakazakii</i> Detection System (LC 2.0, 480) For Food Testing Purposes	Alimentos	PCR TR
	Foodproof® kit de detección de Cronobacteriáceas y <i>C. sakazakii</i> , 5'Nucleasa For Food Testing Purposes	Alimentos	PCR TR
Biomerieux	Chrom ID sakazakii (Es)	Caldo de enriquecimiento	Agar cromogénico

Bioartis	Sistema automático BAX [®] Dupont qualicon para detección de patógenos por PCR	Alimentos	PCR TR
Applied Biosystems	TaqMan [®] <i>Cronobacter sakazakii</i> Detection Kit	Alimentos	PCR TR

2.3.3. Procedimiento recomendado para monitoreos de vigilancia realizados por la autoridad competente

En el marco de monitoreos realizados por autoridades competentes se recomienda el análisis de un envase original, un duplicado y un triplicado. la utilización de la Norma BAM (Ver Anexo 4.2). En aquellos casos en que las muestras analizadas sean positivas se sugiere:

1. Se realizará el retiro del mercado del “producto problema” (mismo lote y misma franja horaria de producción) de común acuerdo y con la colaboración de la empresa productora-importadora.
2. Se analizarán 30 muestras (envases) del mismo lote y elaboradas en la misma franja horaria que la muestra positiva.
3. Las muestras serán analizadas según la Norma ISO/TS 22964:2006.

2.3.4. Procedimiento recomendado para estudio de casos clínicos o brotes

Para estudios de FLI asociadas a casos clínicos o brotes se recomienda el procedimiento descrito en el punto 4.3.3. Se recomienda decomisar el lote en su totalidad y notificar a la autoridad sanitaria correspondiente cuando las muestras analizadas se confirmen positivas y cuando los aislamientos de *C. sakazakii* provenientes de FLI y pacientes presenten el mismo perfil feno-genotípico.

CAPÍTULO III

**Técnicas moleculares aplicadas a la detección de
Cronobacter spp.**

3.1. TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A LA DETECCIÓN DE *Cronobacter* spp.

Desde el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al 1986; Mullis y Faloona 1987), el uso de esta técnica ha experimentado un aumento progresivo en su aplicación para la detección de patógenos bacterianos específicos dentro de poblaciones microbianas mixtas (Nogva et al. 2000). Los métodos moleculares, como la PCR, son potentes herramientas para una rápida, específica y sensible detección de patógenos transmitidos por alimentos y son considerados como alternativas confiables a los métodos bacteriológicos tradicionales (Malorny & Wagner 2005, Seo & Brackett 2005). Una de las recomendaciones de la reunión FAO / OMS sobre *E. sakazakii* y otros microorganismos en fórmulas en polvo para lactantes, llevada a cabo en el año 2004 fue promover el uso de métodos de detección y caracterización molecular para la identificación de *E. sakazakii* internacionalmente validados (FAO/WHO 2004).

En los últimos años, se han desarrollado diferentes métodos de PCR destinados a permitir la detección de *Cronobacter* spp. (Malorny & Wagner, 2005; Seo y Brackett, 2005; Lehner et al, 2006; Liu et al. 2006; Mohan Nair & Venkitanarayanan 2006; Mullane et al. 2006). Los sistemas de detección más evaluados han sido: PCR convencional basada en la detección del gen que codifica para la 1,6- α -glucosidasa y una PCR-RT que permite la detección del *dnaG* (Iversen et al. 2007b).

Malorny & Wagner (2005) desarrollaron y validaron una PCR en tiempo real para la detección específica de *Cronobacter* con el objetivo de detectar el gen 16S ARNr, esta técnica demostró ser útil para la detección rápida directa de *Cronobacter* en muestras de origen alimentario después de su enriquecimiento, y requiere una población de sólo 10^3 UFC por ml para obtener el 100% de probabilidad de detección. Seo & Brackett (2005) ideó un ensayo de PCR en tiempo real dirigido a la detección del gen *dnaG* del operón de síntesis de macromoléculas, este método permite la discriminación de *Cronobacter* entre otros coliformes, y logra un nivel de detección de 10^3 UFC por gramo de la fórmula infantil con un solo paso de enriquecimiento.

Nair & Venkitanarayanan (2006) desarrollaron dos cebadores dirigidos a la detección de una región específica del gen (*ompA*) que codifica para la proteína de la membrana externa homónima, específica de *Cronobacter*. Este fragmento también se utilizó como un objetivo en

una PCR dúplex, especie específica, que también identifica la región del espaciador transcrito interno 16S-23S del ADNr. La PCR, junto con un paso de inmovilización con hidróxido de circonio, permite detectar bajos niveles (10^3 UFC por gramo) de *Cronobacter* en PIF (Zhou et al. 2008)

Por otra parte, puesto que las distintas especies muestran diferencias en sensibilidad a los agentes químicos y antibióticos, la aplicabilidad en estudios epidemiológicos de una PCR que permita la diferenciación de especies es indiscutible. Es importante señalar que de los métodos antes mencionados, ninguno permite diferenciar las seis especies propuestas por Iversen et al. (2007) como integrantes de este género.

El gen *rpoB* ha sido descrito como un objetivo útil para la identificación bacteriana y la realización de estudios filogenéticos (Mollet et al., 1997). La comparación de secuencias de genes conservados, y más comúnmente aquellas que codifican para el fragmento 16S del ADNr, han sido frecuentemente utilizadas para la identificación genotípica bacteriana. En algunas taxas, como es el caso de las Enterobacteriaceae, las variaciones en estos genes no permiten una identificación certera. Por tal razón, Mollet et al. (1997) propusieron que la amplificación de un gen que codifica para la subunidad β de la polimerasa (*rpoB*) como una herramienta alternativa para la identificación genotípica bacteriana.

Stoop et al. (2009) desarrollaron un sistema de PCR convencional, basado en la detección del gen *rpoB*, que permite la identificación especie específica de cepas del género *Cronobacter*. En esos estudios encontraron que *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* y *C. genomospecies 1* pueden ser identificados de manera confiable mediante el uso de un único par de cebadores con una especificidad del 100%. Sin embargo, las estrechas relaciones encontradas en la secuencia de gen *rpoB* de *C. sakazakii* y *C. malonaticus* requieren un procedimiento adicional en el que dos pares de cebadores Cmalf/Cmalr son utilizados a luego de confirmar mediante una PCR que las cepas analizadas son positivas para la amplificación de otro par de cebadores específicos denominados Csakf/Csagr.

A pesar de estas ventajas, el gran inconveniente de la PCR convencional es que no proporciona la información relacionada con la viabilidad de las bacterias detectadas. De hecho, el ADN derivado de las células lisadas por calor, desinfectantes y antibióticos pueden servir como un molde para la amplificación por PCR muchos días después de la pérdida de

viabilidad (Chaiyanan et al 2001. Nogva et al. 2003, Rudi et al. 2005). La posibilidad de que la PCR proporcione resultados falsos positivos limita su aplicación al control microbiológico de los alimentos (Wang y Levin 2006). Para evitar este problema, recientemente se ha desarrollado una nueva alternativa que permite la detección selectiva de bacterias viables en la muestra. Lo novedoso de este método radica en el uso de tinciones ADN intercalantes específicas, que modifican selectivamente el ADN presente en células muertas, como los colorantes no son capaces de penetrar en la membrana intacta de las células viables, no pueden intercalar con el ADN de estas células. Así, sólo el ADN de las células viables es detectado y amplificado por PCR (Nogva et al. 2003). Cawthorn & Witthuhn (2008) aplicaron y optimizaron esta técnica y compararon los métodos PMA-PCR y EMA-PCR para la detección selectiva de células viables de *E. sakazakii* en presencia de células muertas.

Por lo expuesto anteriormente llegamos a la conclusión de que este la PCR, combinada con el cultivo de enriquecimiento, tiene el potencial para ser utilizado como una herramienta rápida para detectar la presencia de *E. sakazakii* en fórmulas infantiles.

3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

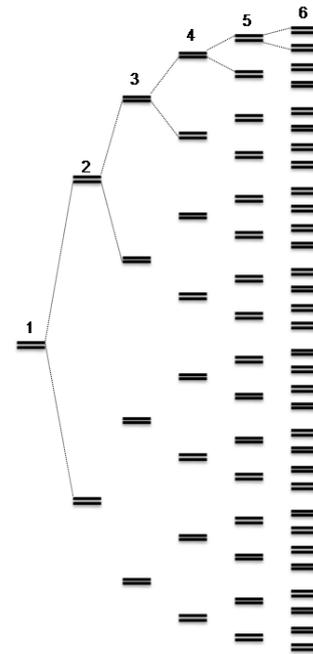
La PCR consiste en la generación de un gran número de copias de un fragmento específico de ADN. La cantidad de moléculas originales o ADN templado, al inicio es muy escasa pero se incrementa dramáticamente durante la reacción, utilizándose en cada ciclo de amplificación los productos generados como nuevos templados.

En un tiempo relativamente corto desde su invención por Kary Mullis, la PCR revolucionó la forma de enfocar el estudio de la biología molecular. Utilizando la PCR se pueden aislar esencialmente cualquier gen del genoma de cualquier organismo. En la actualidad, la PCR es una técnica rutinaria de laboratorio. Su simplicidad permite utilizarla en laboratorios no especializados en biología molecular. Este hecho se incrementó en los últimos años por la creciente disponibilidad de productos comerciales

3.2.1 Fundamento

El principio fundamental de la PCR consiste en la amplificación de un fragmento específico de ADN a través de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial hasta que se produce la acumulación de producto en cantidades detectables. De esta manera, una simple molécula puede generar cerca de mil millones de copias de sí misma después de 30 ciclos de replicación ($2^{30} = 1.073.741.824$).

Cada ciclo de amplificación consiste típicamente en tres pasos, en los cuales los fragmentos de ADN experimentan diferentes procesos fisicoquímicos (desnaturalización, hibridación y extensión) con el fin de replicarse.



Para que se produzca el proceso de amplificación es necesario proveer las condiciones adecuadas e incluir los reactantes sustratos enzimas y cofactores que participaran en la síntesis de ADN:

1. **Polimerasa:** como su nombre lo indica, esta metodología se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra preexistente. Esta enzima requiere de una pequeña cadena de ADN con un extremo 3'OH libre para iniciar la síntesis, esta secuencia recibe el nombre de cebador. La polimerasa más utilizada es *Taq*, aunque existen otras variantes más específicas.
2. **Cebadores (primers):** son oligonucleótidos, de 20-30 bases, que presentan una secuencia complementaria a los extremos de la región de ADN que se desea amplificar.
3. **Nucleótidos (dNTP):** en forma de nucleótidos trifosfato (ATP, CTP, TTP y GTP), deben ser incorporados a la mezcla de reacción en cantidades iguales.
4. **Cloruro de magnesio (Cl₂Mg):** En concentraciones adecuadas el Mg²⁺ actúa como cofactor enzimático y contribuye a la estabilización de los fragmentos de ADN.
5. **Buffer de PCR:** es provisto con la polimerasa en una concentración 10X.
6. **Agua de calidad molecular**

7. **ADN templado:** en el caso de las bacterias, el material de inicio es ADN bicatenario.

Desde hace algunos años la tendencia es incorporar controles internos de amplificación (IAC) a la mezcla de reacción, en especial para aquellas PCR utilizadas como tamizaje a partir del caldo de enriquecimiento. Estos reactivos se pueden adquirir por separado y preparar las soluciones con las concentraciones necesarias. En la actualidad, todo este trabajo se puede evitar adquiriendo kits comerciales en los que se incluyen todos los reactivos liofilizados y listos para su uso luego de ser rehidratados con el extracto de ADN templado.

En el primer paso se incuba la muestra a aproximadamente 94°C para permitir la desnaturalización de las dos cadenas complementarias del ADN molde. Esto es seguido por la hibridación de un par de cebadores o *primers* complementarios a los extremos del ADN templado que se va a amplificar. La temperatura de incubación en este paso depende de la secuencia de ADN de los cebadores y de la concentración de sales en la mezcla de reacción. Finalmente, cada ciclo se completa mediante una etapa de extensión a 72°C, donde la polimerasa sintetiza a partir de los cebadores la nueva cadena complementaria de ADN en la dirección 5' a 3'. Una amplificación consta de entre 30 y 40 ciclos. La Figura XX ilustra los pasos de cada ciclo de amplificación.

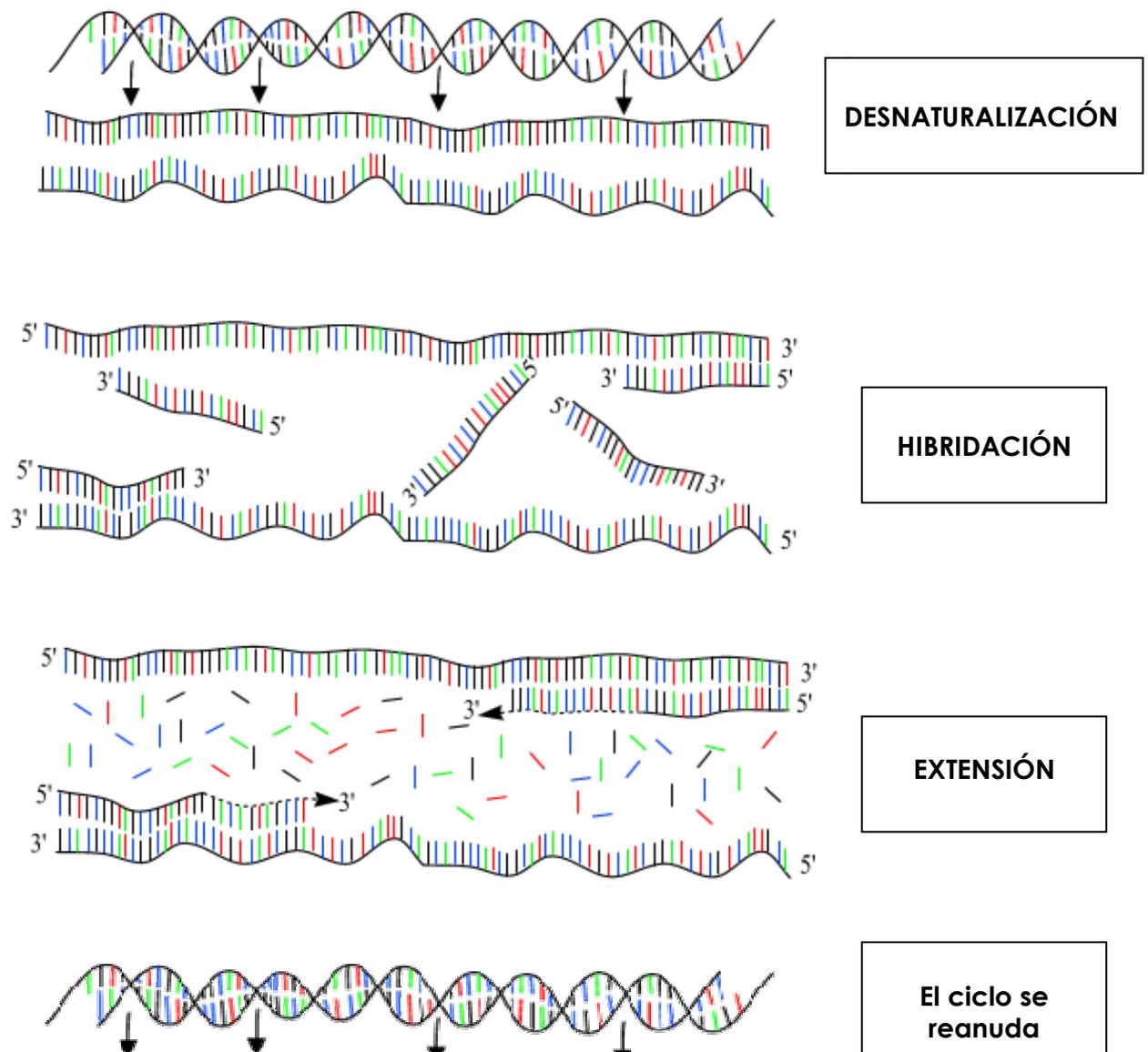


Figura 3.1.- Esquemización de los pasos que ocurren en un ciclo de amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.2.2. Ventajas de la PCR

- **Rapidez.** Puede ser realizada en unas horas. La ganancia de tiempo es considerable cuando se la compara con las técnicas de detección tradicionales, como el cultivo que puede tomar entre 6 y 8 días, o el aislamiento de algunos virus en cultivos celulares (6-14 días).

- **Sensibilidad.** La PCR es una herramienta de diagnóstico extremadamente sensible. Muestras con unas pocas secuencias de templado pueden amplificarse a niveles detectables mediante PCR.
- **Especificidad.** La PCR se basa en el material genético de los individuos, que es la característica más distintiva e informativa posible que poseen los organismos.
- **Versatilidad.** La PCR es extremadamente versátil ya que utiliza esencialmente el mismo procedimiento experimental, equipamiento y reactivos químicos, con el fin de amplificar un determinado fragmento específico de ADN. Un laboratorio equipado para realizar la identificación de un patógeno, puede utilizarlo para la identificación de cualquier otro organismo. Los protocolos experimentales pueden ser fácilmente adaptados a cada patógeno simplemente por el diseño de nuevos cebadores y pequeños cambios en las condiciones de la reacción. La amplificación de ADN por PCR se aplica a la detección de factores de virulencia como adhesinas, endotoxinas, exotoxinas, a la detección de especies de genes de resistencia a antimicrobianos, subtipificación bacteriana, como así también a la identificación bacteriana. Asimismo, la técnica de PCR se utiliza en el diagnóstico de enfermedades virales y parasitarias, en ingeniería genética y como base para la secuenciación de ADN.
- **Bajo costo.** Actualmente la PCR es una técnica simple que puede ser implementada a un bajo costo utilizando metodologías “caseras” como alternativa a los productos de identificación comerciales.
- **Información genética.** Uno de los aspectos más útiles de la PCR radica en su capacidad de proveer un elevado grado de información acerca de los organismos estudiados. La PCR permite identificar y caracterizar a los organismos como pertenecientes a distintos niveles taxonómicos (familia, género, especie, etc.).
- **Estandarización de resultados.** El resultado de la PCR es fácil de interpretar y comparar entre los distintos laboratorios y no requiere personal altamente entrenado y con elevada experiencia como ocurre con otras metodologías basadas en la caracterización morfológica y bioquímica de determinados organismos.
- **Seguridad.** El primer paso en la detección mediante PCR consiste en la muerte y extracción de ADN de los individuos luego de un paso de enriquecimiento (1 día). Esto contrasta con muchos métodos clásicos de aislamiento que necesitan varios días en los que se realizan cultivos y subcultivos para establecer su identidad. Este contraste se traduce en un menor riesgo para la salud de los laboratoristas.

3.2.3. Desventajas de la PCR

- **Riesgo de contaminación cruzada o “carryover”.** La extrema sensibilidad que posee la PCR, una de sus principales ventajas, contribuye a su mayor desventaja; el riesgo de resultados falsos positivos. Unas pocas moléculas de una amplificación previa pueden contaminar muestras negativas. Se desarrollaron varios protocolos con distinto grado de sofisticación para minimizar este riesgo, los cuales fueron incluidos en algunos kits comerciales de PCR en tiempo real.
- **Accesibilidad de equipos y reactivos.** Aunque el equipo necesario para realizar una PCR es mínimo comparado con otras técnicas, se necesita equipamiento específico. Muchas variantes de la técnica de PCR dependen de la utilización de ciertos reactivos comerciales difíciles de conseguir en algunos países. Algunos reactivos como la enzima *Taq* polimerasa es inestable a temperatura ambiente y necesita ser transportada y conservada en frío de manera eficiente. Cabe destacar que muchos kits comerciales de PCR contienen la enzima polimerasa liofilizada con la mezcla de reacción y no es necesario conservarla a temperaturas bajo cero.
- **Entrenamiento.** Como con cualquier técnica, los usuarios deben poseer buen entrenamiento no solo en los aspectos prácticos sino también en los principios teóricos que subyacen a la PCR. Si bien se puede adquirir en un tiempo breve un cierto grado de conocimiento básico para la realización de PCR, una mayor experiencia técnica o teórica es necesaria para solucionar ciertos problemas que pueden presentarse habitualmente.
- **Reproducibilidad.** Existen varios factores que afectan el rendimiento de la amplificación por PCR y por ende su reproducibilidad, entre los se incluyen: insuficiente calidad de la muestra, presencia de inhibidores o nucleasas, variabilidad entre los lotes de reactivos, calidad insuficiente del agua, pérdida de actividad de la polimerasa, problemas técnicos con el termociclador. Deben tenerse en cuenta estos factores y realizarse controles adecuados a fin de mantener un rendimiento óptimo. En la actualidad muchos de estos inconvenientes fueron solucionados con la oferta comercial de kits validados por Organizaciones Internacionales que aseguran el resultado mediante controles externos e internos para la detección de inhibidores. Asimismo, los kits comerciales presentan una absoluta trazabilidad de los insumos.

- **Detección de organismos viables y no viables.** Una ventaja de la PCR es la detección de organismos no viables. Sin embargo, en situaciones donde se quieren detectar solo organismos vivos, las técnicas de cultivo que detectan viabilidad son preferibles a la de PCR. En este punto, también podemos mencionar que algunos kits comerciales contemplan la posibilidad de realizar un tratamiento previo a la PCR que permite eliminar el ADN de células muertas.
- **Utilización de reactivos carcinogénicos.** En la PCR convencional para evidenciar el producto amplificado se tienen que correr el resultado del proceso de amplificación en geles de agarosa. Estos geles deben ser teñidos con sustancias carcinogénicas como el bromuro de etidio, una sustancia que se intercala en los puentes de hidrógeno de la doble hebra de ADN del amplificado. Actualmente existen sustancias que reemplazan al bromuro, como por ejemplo Sybr Safe, aunque este colorante no es tan noble como el bromuro a la hora de interpretar los resultados, los geles deben correrse al abrigo de la luz y la cantidad de colorante que se agrega a los geles es 20 o 30 veces superior al bromuro. Una de las grandes ventajas de la PCR en tiempo real es que no se necesita utilizar ninguno de estos productos.
- Las características genéticas de una célula, a diferencia de las características fenotípicas, son muy estables. Por esto, en los últimos años se estimuló la utilización de técnicas moleculares en las etapas de confirmación e identificación del diagnóstico bacteriológico. El debate continúa, y todavía no se tiene una postura por parte de las entidades regulatorias y gubernamentales.

3.3 PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE *Cronobacter* spp.

3.3.1 Introducción

La proteína membrana *ompA* es una proteína de membrana, altamente conservadas entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae codificada por el gen del mismo nombre y vinculada con la capacidad invasiva de estos microorganismos. El análisis de las secuencias genómicas de miembros de la familia Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Salmonella* spp., *S. flexneri*, y *Erwinia carotovora*), reveló que el gen *ompA* está altamente conservada dentro del genoma. Este gen se encuentra ubicado entre los genes *suIA*, que codifica un inhibidor de la división celular, y *ycbG*, que codifica una proteína hipotética. Basándose en los resultados de la secuencia de múltiples alineaciones, Nair & Venkitanarayanan (2006) identificaron las regiones

de los genes *sulA* y *ycbG* que son altamente conservadas y diseñaron los cebadores para amplificar una región de aproximadamente 2047 pb que abarca al gen *ompA* de *E. sakazakii* cuyo genoma es de 51329 pb.

El gen *ompA* de *E. sakazakii* se encuentra muy relacionado (85 a 90% de conservación de la secuencia a nivel de ácidos nucleicos y aminoácidos) a otros *ompA* ortólogos de otras enterobacteriáceas. Las secuencias o genes ortólogos son aquellas secuencias homólogas que se han separado por un evento de especiación. Es decir, cuando una especie diverge en dos especies separadas, las copias divergentes de un mismo gen en las especies resultantes se dice que son ortólogas. En otras palabras, las secuencias ortólogas son las secuencias que se encuentran en diferentes especies y que son altamente similares debido a que se han originado en un ancestro común. Sin embargo, utilizando un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST-Basic Local Alignment Search Tool), para comparar a la secuencia del gen *ompA* de *E. sakazakii* contra secuencias ortólogas disponibles en GenBank se identificaron regiones específicas de *E. sakazakii*. Estos hallazgos permitieron a Nair & Venkitanarayanan (2006) clonar y secuenciar el gen *ompA* de *E. sakazakii* con el fin de desarrollar un ensayo de PCR convencional para la detección rápida y específica de *E. sakazakii* en FLID.

El uso de esta metodología permite disminuir el tiempo de análisis, ya que la PCR desarrollada en ese estudio puede detectar *E. sakazakii* en 12 h. La especificidad de la PCR se aseguró mediante la selección de cebadores complementarios a las secuencias en las regiones reguladoras y de codificación del gen *ompA* específicas para *E. sakazakii*. Además la inclusión de un control interno de amplificación (IAC) permite distinguir las respuestas negativas debido a la ausencia de la secuencia *target* en la mezcla de reacción de resultados negativos debidos a la inhibición de la PCR resultantes de una multitud de razones, incluyendo mal funcionamiento del termociclador, ineficiente actividad de la ADN polimerasa, incorrecta preparación mezcla de reacción, o la presencia de inhibidores de la PCR en la mezcla reacción.

3.3.2. Equipos

- Termociclador.
- Baño termostático.
- Bloque térmico.

- Balanza electrónica.
- Microondas.
- Microcentrífuga para tubos Eppendorf.
- Cuba y fuente de poder para electroforesis.
- Equipo para la adquisición de imágenes.
- Transiluminador de UV.
- Freezer -20 °C.
- Heladera 4 °C.

3.3.3. Materiales

- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 0,5 - 10 µl.
- Micropipeta para el templado de ADN rango: 0,5 - 10 µl
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 5 - 50 µl
- Micropipeta para amplicones: 5 - 50 µl
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 10 - 100 µl
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 20 - 200 µl
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 100 - 1000 µl
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Microtubos pared delgada para PCR de 0,2 ml
- Tips con filtro para aerosoles 10 µl
- Tips con filtro para aerosoles 100 µl
- Tips con filtro para aerosoles 200 µl
- Tips con filtro para aerosoles 1000 µl
- Tips sin filtro 200 µl
- Recipiente con hielo o gradilla refrigerada.
- Gradillas plásticas.

3.3.4. Reactivos

- Buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X o agua tridestilada para extracción de ADN.
- Agua calidad molecular.
- Buffer PCR 10X
- Mezcla de dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, y dTTP: 2,5 mM

- Cl_2Mg 50 mM o en 25 mM.
- Par de cebadores específicos: 0,1 nmol/ μl
- *Taq* polimerasa: 5 U/ μl
- Control interno de amplificación (IAC)
- Agarosa
- Bromuro de Etidio (BrEt): 10 mg/ml o Sybr safe.
- Buffer TAE 1X
- Buffer de siembra 1: xilene cianol 0,25%, glicerol en agua 30%
- Buffer de siembra 2: azul de bromofenol
- Marcador de tamaño molecular: 100 pb
- Marcador de tamaño molecular: 1 kb

3.3.5. Preparación de la muestra

Procedimiento	Comentarios
<p>A partir del caldo de pre-enriquecimiento.</p> <p>a) Tomar 1 ml de la muestra suspendida en agua peptonada buferada.</p> <p>b) Centrifugar la muestra durante 5 min a 10.000 rpm.</p> <p>c) Retirar el sobrenadante en cabina con mechero.</p> <p>d) Resuspender la muestra en 150 μl de agua destilada estéril o en 150 μl de buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El medio de cultivo selectivo, dependerá de la metodología de aislamiento empleada, ya que algunos de los componentes selectivos pueden inhibir la PCR. • La técnica de PCR es de muy alta sensibilidad. Se recomienda establecer diferentes áreas de trabajo para evitar la obtención de falsos resultados positivos por contaminaciones cruzadas: <ul style="list-style-type: none"> a) área de procesamiento de la muestra y obtención del ADN. b) área de preparación de la mezcla de reacción. c) área para el agregado del templado y amplificación. d) área de detección de los productos de amplificación.

<p>A partir de un medio sólido</p> <p>a) Tomar un inóculo de la zona de crecimiento bacteriano confluyente o bien una colonia aislada con ansa en punta</p> <p>b) Descargar el ansa en 150 µl de agua destilada estéril o en 150 µl de buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fraccionar el agua destilada estéril o el buffer Tritón en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, en el área de preparación de la mezcla de reacción. Utilizar micropipeta para uso exclusivo de reactivos y tips con filtro para evitar contaminación con aerosoles. Luego trasladar los tubos al área de procesamiento de la muestra para preparar el extracto de ADN.
<p>Extracción de ADN por calor. Colocar las muestras en el bloque térmico a 100°C durante 10 min.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El efecto conjunto del detergente Tritón y el calentamiento produce la lisis bacteriana y la liberación del ADN. En caso de utilizar agua destilada la lisis bacteriana se realizará solamente por calor. • Tomar la precaución de cerrar bien los tubos Eppendorf.
<p>Separación del ADN del pellet. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Luego de la centrifugación, se obtiene un pellet correspondiente al debris bacteriano y en el sobrenadante se encuentra el ADN.
<p>Conservación del extracto de ADN</p> <p>Los extractos de ADN se pueden conservar a -20°C para re-utilizarlos en posteriores PCR.</p> <p>Este método de extracción de ADN no incluye un paso de purificación. Si bien el ADN es estable a temperatura ambiente se pueden encontrar DNAsas con la capacidad de degradar el ADN blanco.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El extracto de ADN puede conservarse en freezer a -20°C para ser utilizado en otra PCR. Conservarlos en un área libre de reactivos. • Si el extracto es descongelado, es necesario realizar una centrifugación a 10.000 rpm por 5 min antes de utilizarlo. • No se recomienda congelar y descongelar el ADN templado con frecuencia ya que se puede degradar el ADN blanco.

<p>Preparar el extracto de ADN de las cepas de referencia que serán utilizadas como control positivo en la reacción. Si las cepas fueron sembradas en medios sólidos se debe seguir el paso 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Verificar las cepas de referencia que se utilizan en cada protocolo de PCR.
--	---

3.3.6. Preparación de la mezcla de reacción

Procedimiento	Comentarios
<p>Retirar los reactivos para la PCR del freezer de -20°C. Esperar que los mismos se descongelen y colocarlos en un recipiente con hielo o en una gradilla refrigerada.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Los reactivos para PCR deben conservarse en freezer a -20°C en un área específica para tal fin.
<p>Establecer el número de determinaciones y completar el protocolo de la PCR a realizar (Ver Protocolo específico).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar el siguiente cálculo para determinar el número de reacciones: $A = B + C + D + E$ <p>A: Número de determinaciones</p> <p>B: Número de muestras presuntivas</p> <p>C: control positivo</p> <p>D: control de reactivos o sin templado</p> <p>E: se suma 1 para calcular, en exceso, el volumen total de la mezcla de reacción. Se contempla de esta manera los probables errores de pipeteo que pueda cometer el operador.</p>
<p>Para cada reactivo, calcular los volúmenes necesarios en la mezcla de reacción de acuerdo al número de determinaciones</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Las concentraciones de los reactivos de trabajo, de los reactivos en la mezcla y los volúmenes de los reactivos para una determinación, se indican en el protocolo específico de cada PCR. • Realizar el siguiente cálculo para determinar el volumen

	<p>de cada reactivo en la mezcla de reacción: $A = B \times C$</p> <p>A: volumen del reactivo en la mezcla</p> <p>B: volumen del reactivo en la mezcla para una determinación</p> <p>C: número de determinaciones</p>
Enumerar los microtubos de 0,2 µl de acuerdo al N° de muestras.	<ul style="list-style-type: none"> • Marcar la pared del tubo utilizando un marcador indeleble.
<p>Preparar la mezcla en un tubo Eppendorf de 1,5 ml agregando los reactivos en el siguiente orden:</p> <p>a. Agua tridestilada</p> <p>b. Buffer PCR</p> <p>c. dNTPs</p> <p>d. Cl₂Mg</p> <p>e. Cebadores</p> <p>f. <i>Taq</i> polimerasa</p> <p>g. Control interno de amplificación (IAC) dependiendo de la PCR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar la mezcla en un área o superficie libre de bacterias, muestras de ADN o productos amplificados. • Utilizar micropipetas exclusivas para reactivos de PCR y tips con filtro para aerosoles. • Homogenizar los reactivos antes de usarlos. • La enzima debe permanecer siempre a -20°C para evitar que baje su actividad. • En el momento de usar, retirarla del freezer y colocarla rápidamente en un bloque frío. • En caso de utilizar control interno de amplificación (IAC) cargar un tubo con la mezcla de reacción antes de agregar el IAC a la misma. • En caso de utilizar IAC, este debe ser agregado a la mezcla de reacción en el área de carga de templados.
Resuspender la mezcla con micropipeta y fraccionar 20 µl en cada microtubo de PCR.	<ul style="list-style-type: none"> • Descartar el remanente del tubo de 1,5 ml. Este sobrante, corresponde al volumen de muestra para una determinación calculado previamente en exceso.
Cerrar y trasladar los microtubos de PCR al área de carga de ADN templado.	

3.3.7. Carga de los templados y amplificación

Procedimiento	Comentarios
A cada microtubo conteniendo 20 µl de mezcla de reacción se le agregará 5 µl del ADN templado correspondiente a cada muestra.	<ul style="list-style-type: none"> • Para cargar los templados se debe utilizar una micropipeta exclusiva para ADN y tips con filtro para evitar aerosoles. • El volumen del templado se toma del sobrenadante del tubo donde se prepara el extracto de ADN.
Colocar los microtubos en el termociclador y activar el programa de amplificación específico para cada PCR (Ver Protocolo PCR)	<ul style="list-style-type: none"> • Cerrar correctamente los microtubos.

3.3.8. Detección del producto de amplificación

Procedimientos	Comentarios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar un gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1X. 2. Armar el molde para el gel de agarosa. 3. Colocar el peine o molde para hoyos. 4. Disolver la agarosa en buffer TAE 1X en microondas o en baño de agua caliente. 5. Dispensar bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,03 µg/ml de gel de agarosa. Agregar el intercalante antes que gelifique la agarosa y mezclar para 	<ul style="list-style-type: none"> • Se deberá preparar un gel de una consistencia tal, que permita separar y visualizar correctamente las bandas después de realizar la corrida electroforética. La concentración de agarosa a utilizar depende del tamaño de la banda del producto amplificado. Para productos de bajo peso molecular se utilizan concentraciones mayores de agarosa y viceversa. • El bromuro de etidio es agregado al gel para poder visualizar el ADN. Se recomienda utilizar guantes para su manipulación. • La molécula de ADN tiene carga negativa y en la corrida electroforética migra hacia el polo positivo de la cuba. Por lo tanto colocar el gel de manera que la zona de siembra quede orientada al borne negativo.

<p>homogenizar.</p> <p>6. Dejar gelificar y retirar el peine.</p> <p>7. Colocar el molde con el gel en la cuba electroforética.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cubrir con buffer TAE 1X. El buffer debe penetrar en los hoyos y sobrepasar la superficie del gel en 0,5 cm.
<p>8. Retirar los microtubos del termociclador y llevar al área de detección del producto de amplificación.</p>	
<p>9. Resuspender el producto de amplificación en buffer de siembra.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El buffer de siembra 1 está compuesto por xilene cianol (0,25%) y glicerol en agua (30%). • El glicerol arrastra al ADN hacia el fondo del hoyo y el colorante xilene cianol marca el fondo de corrida. • Se debe diluir una parte del buffer de siembra 1 (6X) en 5 partes del amplificado.
<p>10. Sembrar los amplicones en el gel.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizar una micropipeta de uso exclusivo para la siembra de geles.
<p>11. Sembrar paralelamente un marcador de peso molecular diluido en buffer de siembra 1 (Ver el marcador de tamaño molecular que es sugerido en cada protocolo de PCR).</p>	<p>La elección del marcador de peso molecular dependerá del tamaño del fragmento a amplificar. El marcador adecuado es aquel que permite establecer si la banda obtenida para cada producto amplificado, es del tamaño esperado.</p>
<p>12. Conectar la cuba a la fuente de poder.</p>	
<p>13. Realizar la corrida electroforética a 90 Volts por 40 min dependiendo de la PCR.</p>	

<p>14. Colocar el gel en el UV-transiluminador e interpretar los resultados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Una exposición inadecuada a luz ultravioleta puede dañar la piel y los ojos. Se recomienda usar anteojos protectores. • Observar en la calle del control positivo, la presencia de bandas específicas cuyo tamaño corresponde al fragmento amplificado. • No se deben visualizar bandas en las calles del control negativo ni del control de reactivos. • Registrar en el protocolo la presencia de bandas específicas en las calles correspondientes a las muestras presuntivas. • Descartar el gel de agarosa con bromuro de etidio siguiendo las normas para la eliminación de residuos tóxicos.
---	---

3.4. PCR PARA LA DETECCIÓN DE LOS GENES *ompA* *Enterobacter sakazakii*.

Se utilizan los cebadores diseñados por Nair & Venkitanarayanan (2006) que amplifican un fragmento de 469 pb que codifica la expresión de la proteína de membrana *ompA* de *Enterobater sakazakii*.

Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
ESSF	GGATTTAACCGTGAACCTTTCC	469
ESSR	CGCCAGCGATGTTAGAAGA	

3.4.1 Protocolo PCR - *ompA*

Fecha:

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo En la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (μl)	Volumen del reactivo en la mezcla para N° determinaciones (μl)
----------	---------------------------------------	---	---	--

Buffer	10X	1X	2,5
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,2 mM	200 nM
Cl₂Mg	25 mM	2 mM	2,5 mM
Primer ESSF	0,1 nmol/μl	2 pmol/μl	0,5
Primer ESSR	0,1 nmol/μl	2 pmol/μl	0,5
Taq polimerasa	5 U/μl	0,04 U/μl	2 U
Templado			50nM
H₂O ddd estéril			Hasta completar
			50 μl
IAC			0,2 fg
Vol. Final			50

3.4.2. PCR convencional - Programa de amplificación

Paso Nº	Etapas	Temperatura °C	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Precalentamiento	94	2 min.		
2	Desnaturalización	94	15 seg.		50
3	Pegado de cebadores	60	15 seg.		
4	Extensión	75	30 seg		
5	Terminación	72	5 min		

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X	100 pb

3.4.3. Planilla de resultados

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	#7		
8	Control positivo		
9	Control negativo sin templado		

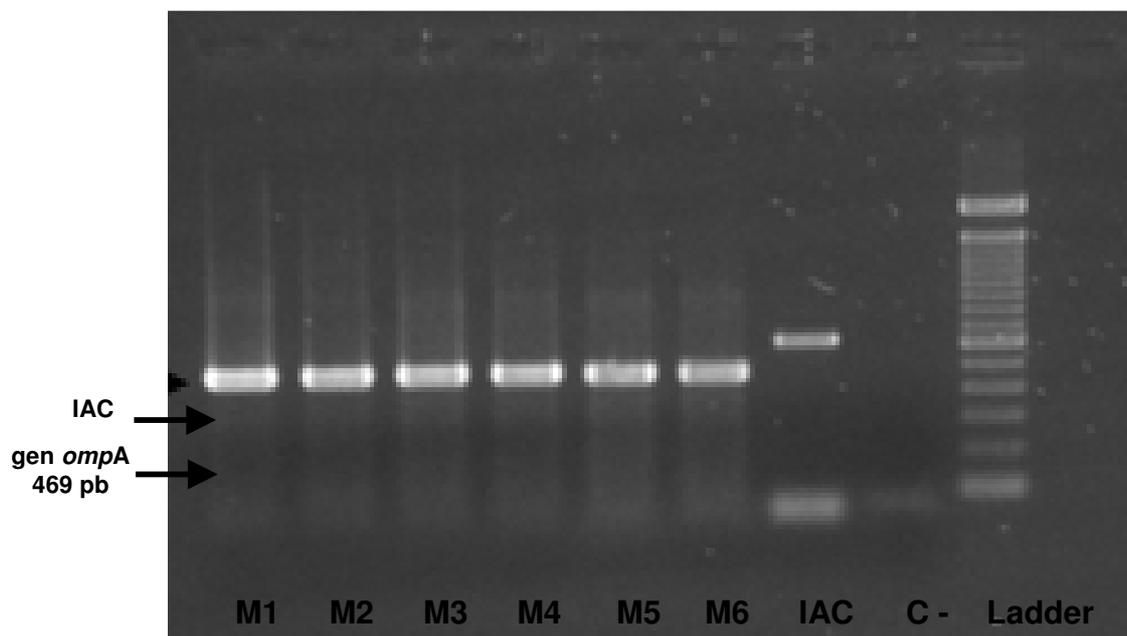


Figura 3.2.- Muestras provenientes de FLID analizadas por PCR para la detección del gen *ompA* M 1-6: muestras positivas, IAC: mezcla de reacción con IAC, C- mezcla de reacción sin IAC, Ladder: marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen).

3.4.4. Límites de Detección

Epszteyn et al. (PONER FECHA o datos sin publicar) realizaron ensayos para determinar el límite de detección, el que resulto en 10^2 UFC en presencia de 50 copias IAC.

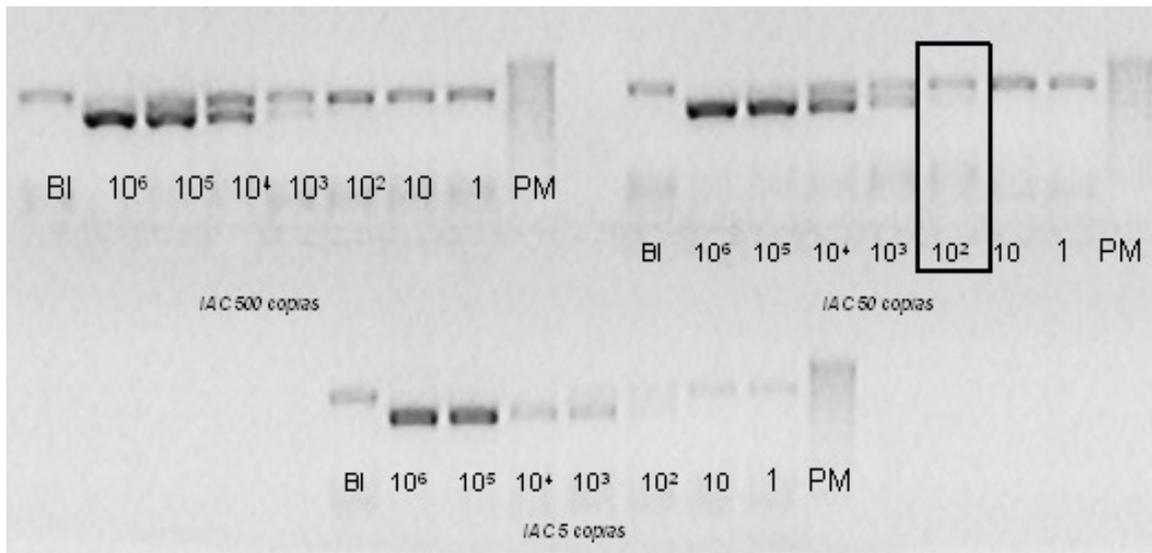


Figura 3.3.

También se calcularon de los límites de detección de *E. sakazaki* en formulas lácteas inoculando las mismas con concentraciones crecientes del microorganismo, y realizando un pre-enriquecimiento durante 8 – 12 horas a 37 °C y la posterior la extracción del ADN por hervido.

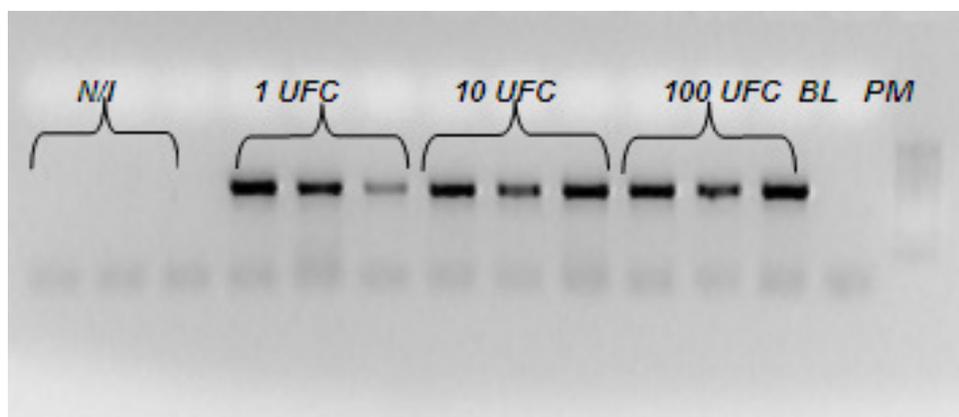


Figura 3.4.

3.5. PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

Las diferencias entre PCR convencional y RT-PCR son más fáciles de comprender si se analiza la cinética de reacción de la PCR. Una PCR posee usualmente 3 fases: exponencial, no exponencial y *plateau*. Al inicio de la reacción todos los componentes están presentes en suficiente cantidad y la amplificación ocurre de una manera exponencial, duplicándose en cada ciclo la cantidad de ADN. Con el progreso de los ciclos comienzan a escasear los reactivos de la PCR, la velocidad de incremento en el número de amplicones disminuye y la reacción continúa de forma no exponencial. Luego de unas rondas más de amplificación la PCR no genera más templados debido a la pérdida de algunos componentes críticos de la reacción, entrando en la fase final conocida como *plateau*.

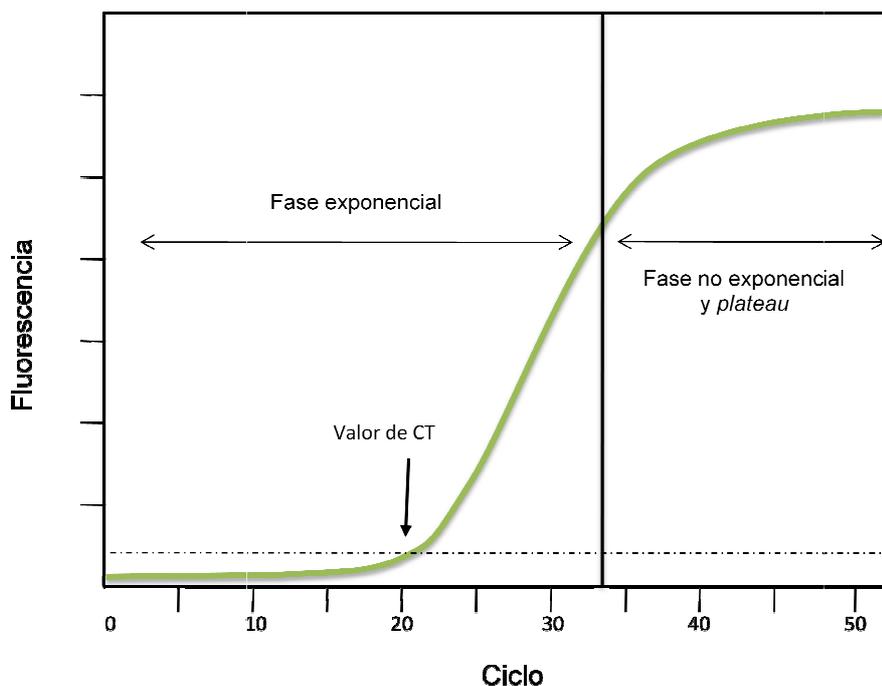


Figura 3.5. Diagrama de la cinética de amplificación de la PCR.

La PCR en tiempo real es una técnica desarrollada a mediados de los años 90 con el objetivo principal de cuantificar el ADN templado presente en una muestra de ADN. La RT-PCR se basa en la detección de una señal fluorescente proporcional al producto de amplificación en cada ciclo de PCR. La PCR cuantitativa se realiza en termocicladores con sistemas de detección de fluorescencia y recolección de los datos en tiempo real.

En la PCR convencional los productos de amplificación son analizados por electroforesis en geles y visualizados mediante la utilización de colorantes como el bromuro de etidio. Este proceso se realiza con el producto final de la PCR, que se obtiene en la fase de *plateau* de la reacción. En este punto, es extremadamente dificultoso realizar una adecuada cuantificación porque la PCR genera la misma cantidad de producto independientemente de la cantidad inicial de templados presentes. A su vez, la detección por punto final es muy costosa en tiempo, dado que hay que esperar a que termine la reacción para cargar la muestra en el gel y realizar la electroforesis.

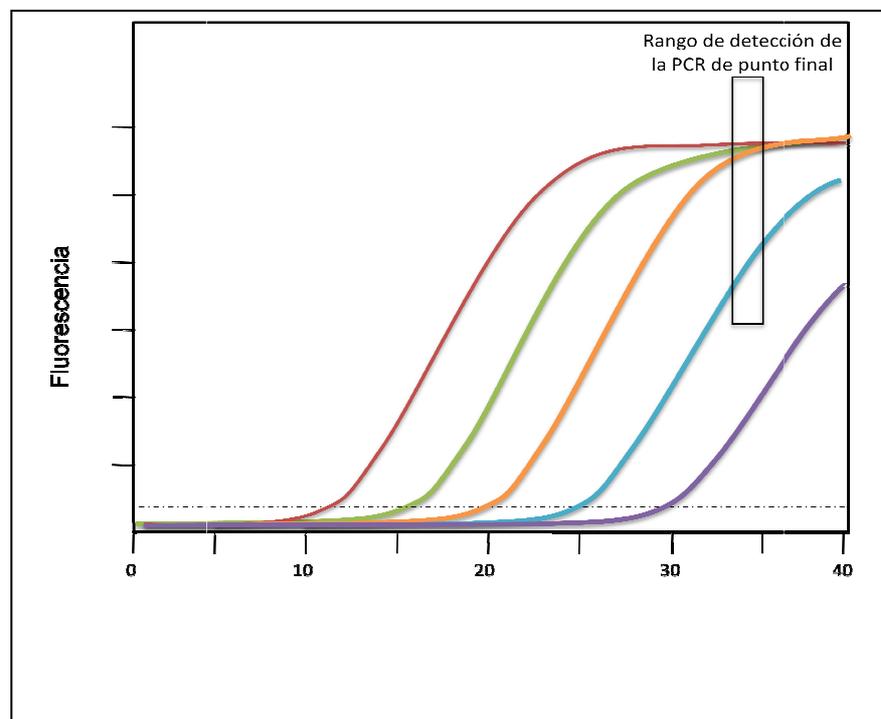


Figura 3.6.

En la figura se puede observar un diagrama representativo de PCR en tiempo real con diluciones seriadas de templado. Se representa el rango de detección de una PCR de punto final. Algunas diluciones con cantidades iniciales diferentes de templado poseen la misma concentración en la fase de *plateau* (colores rosa, verde y naranja). La dilución representada con color violeta que es detectada por PCR en tiempo real no llega a ser visualizada con las técnicas de PCR de punto final.

Existen dos alternativas en cuanto a la química de fluorescencia de la PCR en tiempo real: i) la utilización de moléculas que se unen al ADN de cadena doble como el SYBR Green, y ii) el uso de oligonucleótidos fluorogénicos de secuencia específica.

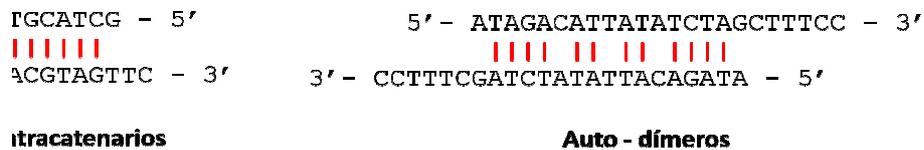
3.5.1. Mecanismos de detección inespecíficos

Los colorantes de unión al ADN son la base de los métodos inespecíficos de detección de PCR en tiempo real. La mayoría de las moléculas fluorogénicas utilizadas interactúan con la hendidura menor de la doble hélice de ADN. Estos colorantes emiten una mínima fluorescencia cuando se encuentran libres en la solución pero generan una fuerte señal cuando se unen al ADN de cadena doble y son expuestos a una longitud de onda capaz de excitarlos. Uno de los colorantes más utilizados en RT-PCR es el SYBR Green.

Los métodos inespecíficos de marcaje fluorescente son relativamente menos costosos, ya que no requieren del diseño de oligonucleótidos o conjugados químicos y se encuentran mínimamente afectados por pequeños cambios en la secuencia blanco que pueden impedir la hibridación del oligo fluorescente. Sin embargo, los dímeros de cebadores formados y otros productos de amplificación inespecíficos compiten por la unión a los fluoróforos e interfieren en la interpretación de los resultados. Desafortunadamente, la formación de dímeros es más frecuente cuando existe un reducido número de copias iniciales de templado, hecho bastante frecuente en los estudios de búsqueda de microorganismos.

La formación de dímeros de cebadores puede ser revelada observando la curva de temperaturas de disociación o Melting del ADN (T_m). Dado su menor tamaño, los dímeros poseen una T_m inferior que la secuencia amplificada. Sin embargo esta metodología de ajuste no es aplicable cuando la T_m de ambas secuencias son similares o no son discernibles con el equipo de RT-PCR utilizado.

En la figura se representan las interacciones moleculares producidas por complementariedad en la secuencias de los *cebadores* (formación de dímeros). Este tipo de apareamientos debe evitarse en el diseño de la PCR.

Estructuras secundarias de primers**Figura 3.7.****3.5.1.1. Ventajas de los mecanismos de detección inespecíficos**

- ✓ La cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de productos de PCR.
- ✓ Se puede aplicar al estudio de cualquier secuencia de ADN de cadena doble.
- ✓ Al no requerir sondas específicas, se reduce el costo y el tiempo de puesta a punto.

3.5.1.2. Desventajas de los mecanismos de detección inespecíficos

- ✓ Pueden generarse falsos positivos dado que los colorantes no específicos se unen a cualquier ADN de cadena doble incluyendo los productos inespecíficos como los dímeros de cebadores.
- ✓ Se requiere el análisis de la curva de disociación de ADN al final de la PCR para verificar la formación de productos inespecíficos.

3.5.2. Mecanismos de detección específicos

La adopción de sondas de oligonucleótidos fluorescentes agregó un nuevo nivel de especificidad a la RT-PCR mediante la confirmación de un fragmento del amplificado en adición a la especificidad aportada por el par de cebadores externos.

Las metodologías de PCR cuantitativas de detección específica utilizan el efecto de transferencia energética de resonancia fluorescente (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). La FRET se basa en la proximidad e interacción de un fluoróforo dador o “reporter” y

un fluoróforo aceptor o "*quencher*". Los fluoróforos dadores son moléculas que al absorber energía, pasan a un estado excitado, retornando al estado inicial mediante la liberación de energía en forma de fluorescencia. Los "*quenchers*" son moléculas que aceptan la energía emitida durante la des-excitación de un fluoróforo y la disipan en forma de calor más que en fluorescencia.

Aunque las técnicas de RT-PCR basadas en sondas FRET son mucho más específicas que los métodos de detección que utilizan SYBR Green, son más costosas y requieren una mayor validación y optimización.

Los colorantes fluorescentes unidos a las sondas deben poseer ciertas características para ser de utilidad en la RT-PCR:

- Diferentes longitudes de onda de absorción y emisión de fluorescencia.
- Fácil y fuerte unión al ADN de la sonda.
- Señal detectable a bajas concentraciones.
- Producción de una señal fluorescente diferencial cuando la sonda se encuentre hibridada al producto de amplificación.
- Resistencia a elevadas temperaturas.
- Falta de inhibición de la actividad de la polimerasa.

Existen algunas consideraciones generales para el diseño de una sonda fluorogénica:

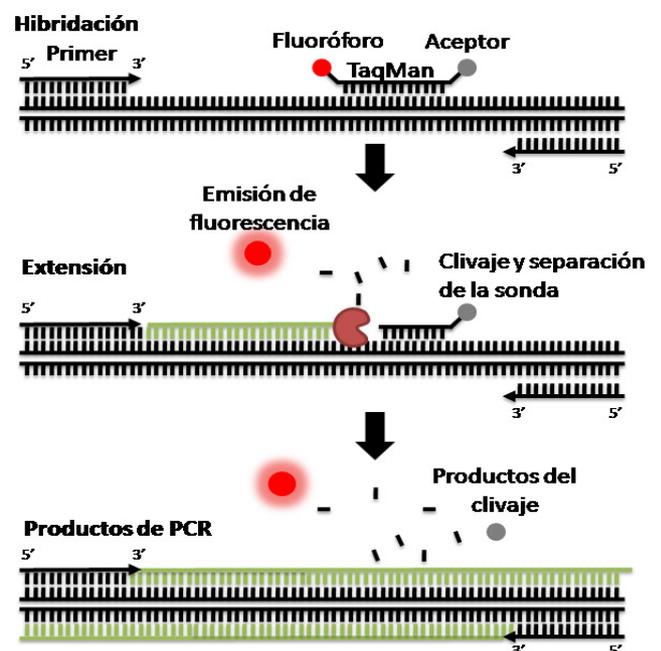
- Tamaño entre 15 a 35 nucleótidos.
- Contenido en C+G de 40 a 60%.
- No deben contener bases repetidas contiguas y en particular G.
- No deben hibridar con los cebadores externos.
- Poseer un T_m 5°C mayor que los cebadores para permitir su unión al templado antes del comienzo de la fase de extensión.

A continuación se describen los distintos formatos de sondas de ADN específicas utilizadas en la RT-PCR.

3.5.2.1. Sondas TaqMan®

Actualmente, las sondas TaqMan son las más utilizadas en la PCR en tiempo real. En adición a los cebadores externos, esta metodología utiliza un tercer oligonucleótido interno conocido como sonda. El colorante fluorescente dador, típicamente FAM™, se encuentra unido al extremo 5' de la sonda y el aceptor, generalmente TAMRA™ está unido al extremo 3'. Actualmente, TAMRA™ está siendo reemplazado por los dadores de tipo BHQ (*Black Hole Quenchers*) porque proveen una menor fluorescencia de fondo. En tanto que las moléculas dadoras y aceptoras se encuentren estrechamente cercanas (alrededor de 100 Å), la fluorescencia del dador es secuestrada por el colorante receptor y no es detectada. En las sucesivas etapas de extensión de la cadena de ADN la polimerasa encuentra y degrada el extremo 5' de la sonda hibridada a la cadena molde mediante su actividad 5'-3' exonucleasa. Como consecuencia de ello, los colorantes emisor y aceptor son liberados por separado a la solución y la fluorescencia comienza a ser detectada.

En la siguiente figura se representa el método de PCR en tiempo real TaqMan. En el diseño de la PCR se incluye una sonda doblemente marcada con un colorante emisor y otro aceptor que hibrida en el interior del ADN amplificado. La actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq ADN polimerasa permite el clivaje de la sonda, la separación espacial de los colorantes y la consiguiente emisión de fluorescencia.



Ventajas del sistema de RT-PCR TaqMan

- Para generar la señal fluorescente se requiere una hibridación específica entre la sonda y el ADN templado.
- Las sondas pueden ser marcadas con diferentes fluorocromos, permitiendo la detección de múltiples secuencias en un solo tubo de reacción.

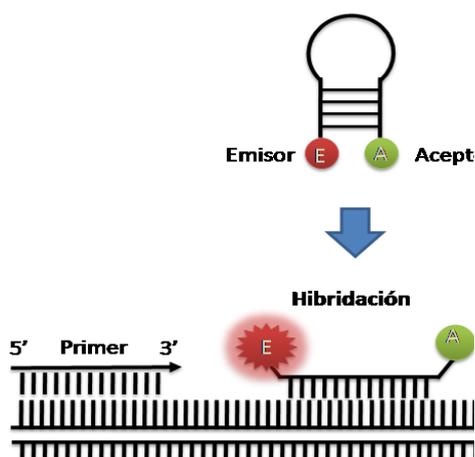
Desventajas del sistema de RT-PCR TaqMan

- La química TaqMan requiere la síntesis de diferentes sondas para cada secuencia a amplificar, haciendo el ensayo específico pero al mismo tiempo más costoso.
- Se requiere el análisis de la curva de disociación de ADN al final de la PCR para verificar la formación de productos inespecíficos.
- El diseño de los métodos basados en sondas es un tanto más complejo de optimizar que los ensayos basados en SYBR Green.

3.5.2.2. Sondas *Molecular Beacons*

Las sondas *Molecular Beacons* son oligonucleótidos de cadena simple que forman estructuras intracatenarias compuestas por un tallo y un bucle. El bucle posee una secuencia que es complementaria a la secuencia de ADN que se quiere amplificar. El tallo se encuentra formado por 5-6 bases adicionales auto-complementarias ubicadas en los extremos de la sonda. Además, un fluoróforo dador está unido covalentemente a un extremo del oligonucleótido y otro aceptor se une al otro extremo, con el fin de absorber la energía de transferencia. Cuando la sonda encuentra una secuencia homóloga en el ADN templado, hibrida y forma una estructura más larga y termodinámicamente más estable.

Esto último causa la separación espacial del fluoróforo y el aceptor, restableciendo la emisión de fluorescencia. Esta metodología no depende de la función 5'-3' exonucleasa de la *Taq* polimerasa, la cual durante la extensión de la cadena de ADN desplaza la sonda a la solución y conlleva al restablecimiento de su estructura autocomplementaria. Existen varios programas de simulación de estructuras termodinámicas realizados con el fin de garantizar un adecuado diseño de las sondas *Molecular Beacons*.



Ventaja del sistema de RT-PCR *Molecular Beacons*

- ✓ Bajo nivel de ruido de fondo en la señal fluorescente y gran especificidad.

Desventaja del sistema de RT-PCR *Molecular Beacons*

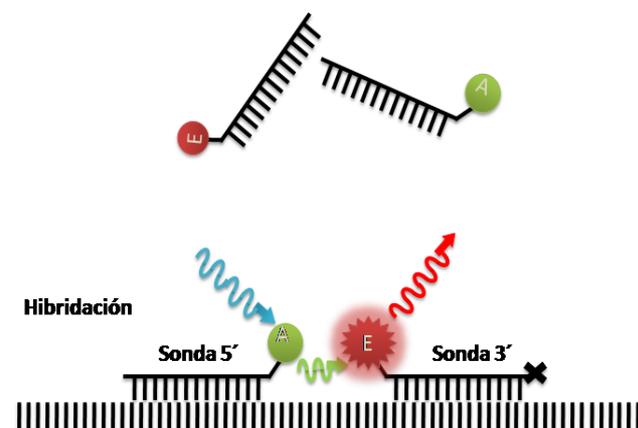
- Mayor dificultad de diseño y optimización

En la figura se representan las sondas *Molecular Beacons*, las que poseen una estructura compuesta por un tallo y un bucle. Cuando la sonda hibrida al ADN templado, el fluorocromo emisor se separa del aceptor y emite fluorescencia.

3.5.2.3. Sondas *Light Cycler*

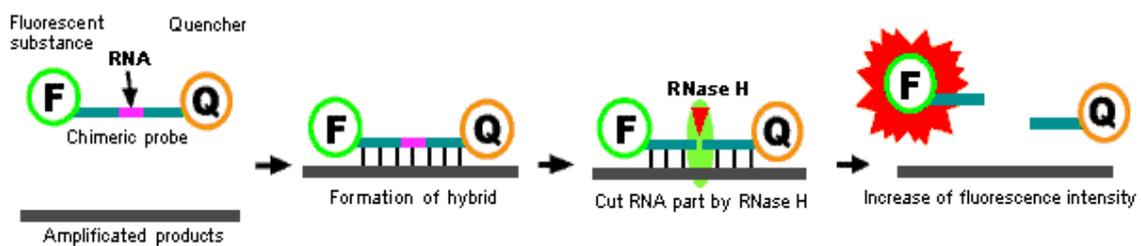
Son dos sondas específicas que hibridan en regiones adyacentes espaciadas entre uno y cinco nucleótidos sobre el ADN blanco. Una sonda está marcada con un fluorocromo emisor en posición 3' y la otra con un fluorocromo aceptor en su extremo 5'. Esta última tiene además bloqueado su extremo 3' con un grupo fosfato para evitar su extensión. Cuando las dos sondas hibridan y están próximas, una sonda emite fluorescencia que excita al colorante de la segunda sonda, produciendo una señal detectable. La intensidad de la fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de secuencia diana formada en la reacción de PCR. Existen otras sondas como las "*Scorpions*" y las "*Cycleave*".

En la figura se representa en forma esquemática la metodología de doble sonda "*Lightcycler*". En este caso se emplean dos sondas marcadas con moléculas fluorescentes en posición 5' (sonda A) y 3' (sonda E) que hibridan en regiones adyacentes del ADN blanco. Cuando se produce la hibridación, la primera sonda emite fluorescencia que excita al colorante de la segunda sonda, produciendo una señal detectable.



3.5.2.4. Sondas *Cycleave*

Las sondas *Cycleave* son quimeras compuestas de ARN y ADN. Uno de los extremos está marcado con un fluoróforo y el otro con una molécula que absorbe fluorescencia o *quencher*, y al estar próximas no se detecta señal. Cuando la sonda forma un híbrido con la región complementaria de la molécula blanco, la RNasa H destruye específicamente el ARN de la sonda, separando los fluoróforos y emitiendo fluorescencia.



3.6. HIBRIDACIÓN *IN SITU*.

La técnica de **hibridación *in situ*** está basada en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse o unirse, a una secuencia complementaria de ADN o ARN. Entonces, La hibridación *in situ* se fundamenta en la complementariedad de los ácidos nucleicos, que pueden ser DNA y/o RNA, esta unión es a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases: adenina–timina (DNA) o uracilo (RNA) y citosina-guanina (DNA y RNA). Este apareamiento da lugar a una doble cadena en la cual una cadena, tiene la orientación opuesta a la otra con respecto al esqueleto azúcar-fosfato. La secuencia es leída de 5' a 3'. Esta técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados. La detección *in situ* provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas

La Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es un método comúnmente utilizados para la identificación y localización de bacterias en una muestra. Este método se basa en la unión específica de sondas de ácidos nucleicos a una región particular del ADN o ARN (Amann & Fuchs 2008; Amann et al, 1997). Se considera que el ARNr es el *target* más adecuado para la identificación bacteriana mediante FISH, ya que permite la diferenciación de las células potencialmente viables. Tradicionalmente, los métodos de FISH se basan en el uso de sondas convencionales de oligonucleótidos de ADN.

Sin embargo, tras el desarrollo de análogos sintéticos de ADN denominados ácidos nucleicos peptídicos (ANP), se ha demostrado que éstos ofrecen un mejor rendimiento de hibridación FISH que las tradicionales sondas de ADN (Stender et al. 2002). Este método modificado ha sido implementado par la detección de diversos microorganismos de importancia clínica (Brehm-Stecher et al. 2005; Guimaraes et al 2007; Hartmann et al. 2005; Lehtola et al. 2005; Oliveira et al. 2002; Perry-O'Keefe et al. 2001; Prescott & Fricker 1999). Almeida et al. (2009) aplicaron esta nueva metodología para la detección rápida de cepas *Cronobacter* a partir de FLID y encontraron que los porcentajes de especificidad y sensibilidad de este método fueron del 100%, logrando detectar, en un entorno bacteriano mixto, hasta 1 UFC de *Cronobacter* spp. por cada 10 g de FLID, después de una etapa de enriquecimiento de 8 horas.

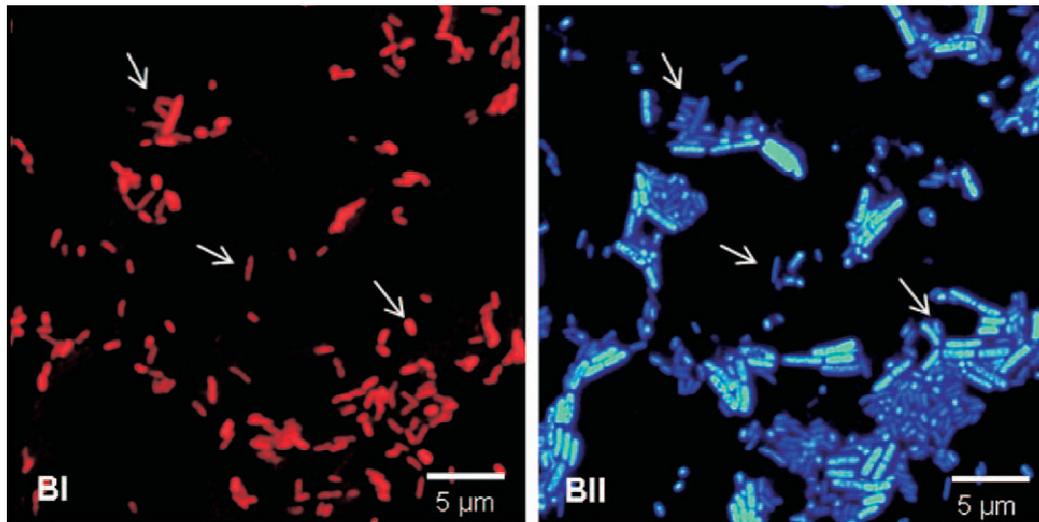


Figura 3.8. FLID reconstituido e inoculado con *C. sakazakii*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* ATCC 10145, and *S. enterica* serotype Enteritidis ATCC 13076. BI. Detección de *C. sakazakii* utilizando el tests de emisión de fluorescencia roja SakPNA971. BII. Muestra anterior sometida a una contra tinción con DAPI que permite la visualización de la población bacteriana total.

En la actualidad se encuentran disponible bajo el nombre comercial de VIT-E sakazakii (Vermicon AG, Munich, Alemania), una técnica de detección rápida basada esta tecnología (Lehner et al. 2006).

3.7. BAX® SYSTEM Q7 (DUPONT QUALICON)

BAX® System Q7 (DuPont Qualicon) es un sistema cerrado y automatizado de PCR. Este sistema combina la amplificación de ADN y la lectura automática para determinar la presencia o ausencia de patógenos a partir de alimentos previamente enriquecidos.



Mediante la utilización de equipos automatizados se elimina la detección de amplicones en geles de agarosa y se generan datos que pueden ser almacenados en una base electrónica. Este sistema reduce la mano de obra, el tiempo y la subjetividad de los resultados obtenidos. A continuación se enumeran las consideraciones técnicas de este sistema, en base a la información provista por el proveedor del sistema en la Argentina:

- El sistema se basa en agentes fluorogénicos que se intercalan en cualquier doble hebra de ADN presente.
- El Kit para la detección de *Cronobacter* spp. se encuentra validado por Health Canada y AQSIQ de la República popular China.
- El límite de detección es 10^5 UFC/ml de muestra pre-enriquecida.
- Especificidad del 98%.
- El equipamiento incluye una PC, software, micropipetas y equipos para la extracción de ADN.
- El tiempo de análisis es aproximadamente de 3,5 h.
- Permite analizar simultáneamente 90 muestras además de los controles externos.
- El kit comercial incluye reactivos para la extracción de ADN, la mezcla de reacción, controles internos y material descartable como tubos de PCR.

- No se necesita modificar el laboratorio, ya que no genera contaminaciones debido a que no se abre el tubo de PCR una vez realizada la prueba.

3.7.1. Ventajas

- La lectura es sumamente sencilla (+ en color rojo, - en color verde).
- No se requiere equipamiento adicional.
- Menor tiempo de análisis que una PCR convencional.

3.7.2. Desventajas

- El sistema de detección por fluorógenos intercalantes es menos específico que el sistema que utiliza sondas marcadas con fluorógenos, pudiendo generar falsos resultados positivos con mayor frecuencia.
- Mayor tiempo de análisis que una PCR en tiempo real.

3.7.3. Equipamiento necesario

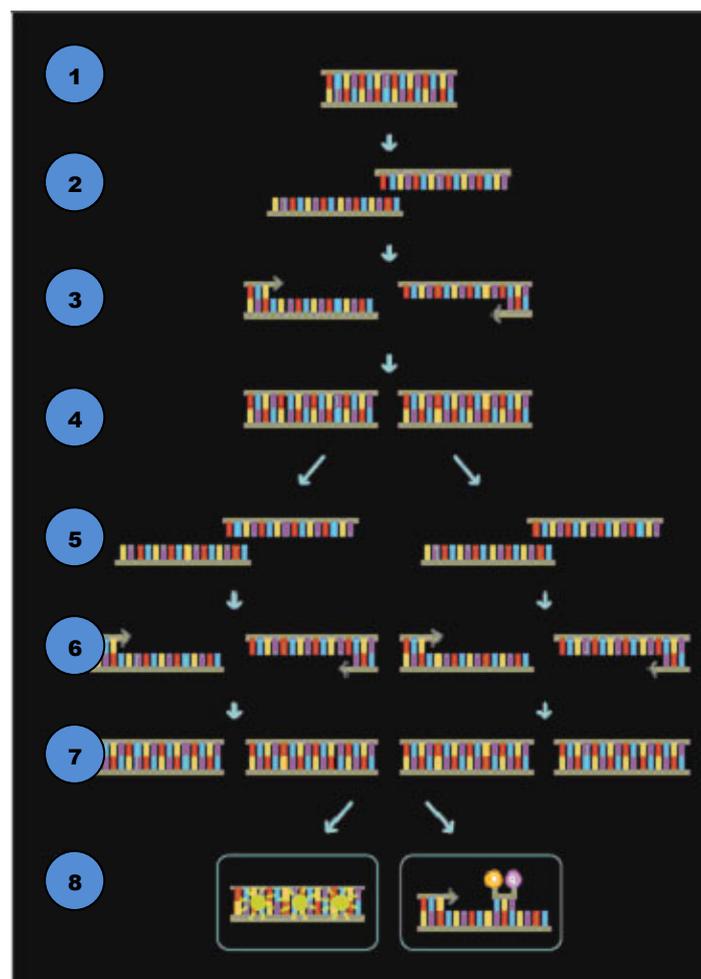
- Equipos, medios y reactivos descritos en MLG 4.
- Tubos de PCR (Qualicon).
- Micropipetas estériles $200 \pm 20 \mu\text{l}$ y tips estériles.
- Micropipetas estériles $5 \pm 1 \mu\text{l}$ y tips estériles.
- Micropipetas estériles $150 \pm 15 \mu\text{l}$ y tips estériles.
- Bloque refrigerante para lisis celular $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (Qualicon).
- Bloque térmico de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ Techne DB-2A o equivalente.
- Bloque térmico de $95 \pm 3^\circ\text{C}$ Techne DB-2A o equivalente.
- Micropipeta multicanal con ocho canales para dispensar $50 \pm 5 \mu\text{l}$ y tips estériles.
- Tubos de 12 x 75 mm tipo Falcon 352063 o equivalentes.
- Tubos para extracción de ADN con sus respectivas tapas y gradillas (Genemate 8, ISC Bioexpress, T-3120-5).
- Kit para detección de *Cronobacter* spp. por PCR sistema BAX[®].



3.7.4. Fundamento

La mezcla de reacción contenida en los tubos es reconstituida durante la preparación de las muestras. Los tubos contienen tinciones intercalantes, cebadores, enzimas y demás reactivos necesarios para la reacción de PCR.

El proceso de PCR inicia con el calentamiento de la muestra y la subsecuente separación de la doble hélice del ADN (2). Un posterior ciclo de enfriamiento activa a los cebadores, los que identifican una región específica del ADN ubicado en una de las hebras (3). La enzima de replicación inicia el proceso de copia (4). La repetición de los ciclos genera la amplificación de la reacción (5-7) asegurando la obtención de una cantidad de producto detectable (8).



Algunos sistemas de PCR BAX[®] utilizan colorantes químicos intercalantes para detectar fragmentos específicos del ADN (Figura XX A). El sistema Q7 de BAX[®] incluye ensayos de PCR en

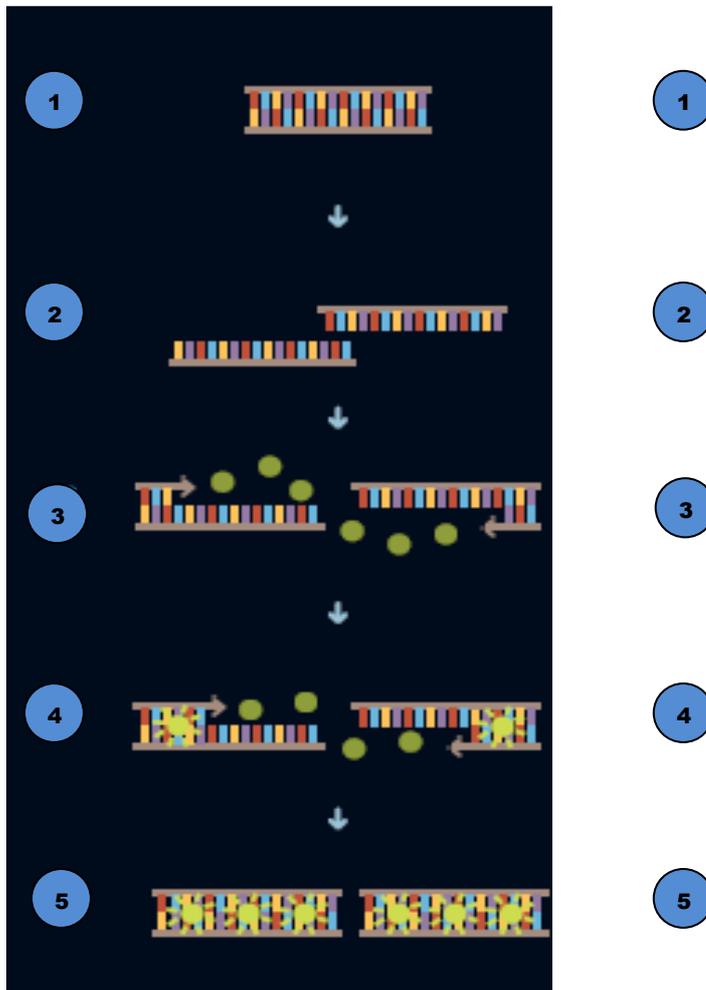
tiempo real con un sistema de detección basado en el empleo de sondas (Figura XX B). Estas sondas permiten al sistema identificar diferentes especies en una muestra única.

**BAX[®] basada en colorantes
químicos intercalantes**

A

BAX[®] Q7 basado en sondas

B



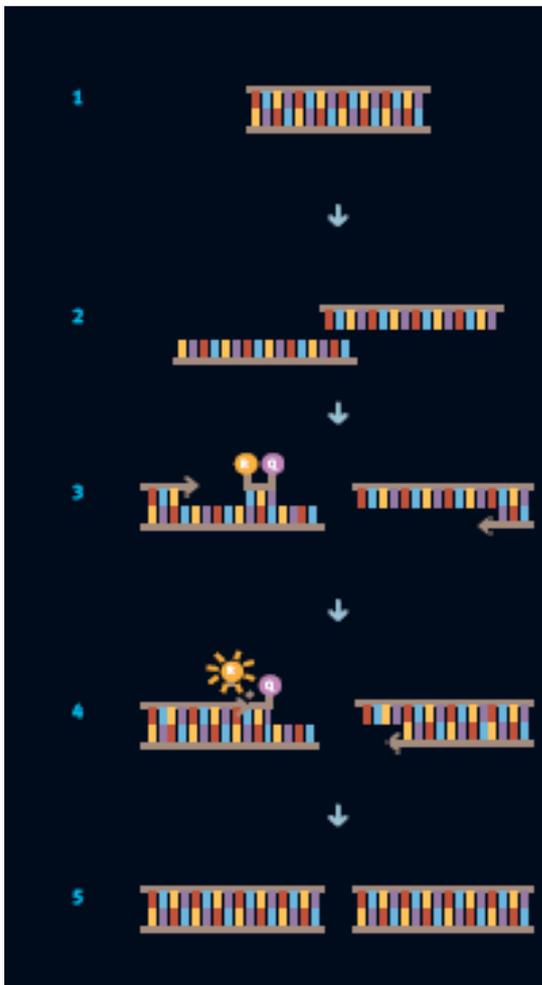


Figura 3.9. Esquemización de los procesos que ocurren durante los dos métodos de PCR BAX

Ambos métodos proveen un análisis exhaustivo, confiable y preciso de las muestras y comparten los pasos iniciales de ciclo, a continuación detallaremos las diferencias entre ambos métodos:

- En los sistemas BAX[®] basados en el uso de colorantes químicos intercalantes el proceso de amplificación culmina al cabo de 3 horas. La fase de detección inicia cuando las muestras son expuestas a un haz de luz que excita las moléculas del colorante intercalado en el ADN produciendo la emisión de una señal que es captada y cuantificada. Posteriormente un leve aumento de la temperatura genera la desnaturalización del ADN y por ende un descenso en la emisión de señal la que se mide y analiza como una curva de *melting*.

- En los sistemas BAX[®] Q7, durante la hibridación y al mismo tiempo que los *primers* se unen al ADN, un tercer primer o sonda también se adhiere. Esta sonda contiene un marcador fluorescente cuya señal es absorbida por el *quencher* ubicado en el otro extremo. Cuando, en caso de existir complementariedad entre el primer y un fragmento de la secuencia de organismo sujeto a análisis se procede a la hibridación, entonces la enzima inicia la síntesis de la cadena complementaria o extensión, la sonda se fractura separando al marcador fluorescente del *quencher*, lo que genera un incremento en la emisión de señal por parte del marcador. En este tipo de ensayos no es necesaria una fase de detección separada porque la señal es medida y analizada al final de cada ciclo de amplificación. La amplificación culmina al cabo de 90 minutos y permite la detección de hasta cinco microorganismos diferentes a partir de una misma muestra (Fig. XX A), esto se realiza utilizando fluoróforos distintos y observan diferentes curvas de *melting*. (Fig. XXB)

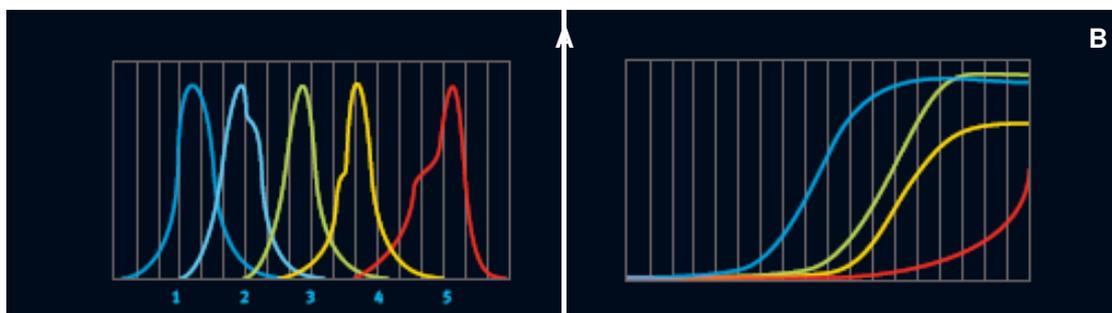


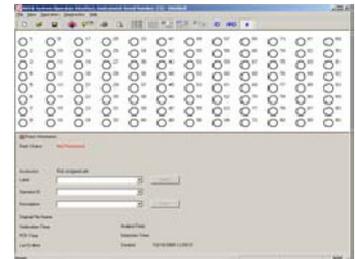
Figura 3.10. Esquematización de los resultados obtenidos tras la amplificación según el método PCR BAX Q7

3.7.5. Protocolo BAX *Cronobacter*

1. El enriquecimiento primario se realiza diluyendo la muestras (1:10) en caldo mLST con vancomicina e incubar a 45 °C durante 20 – 22 horas. También puede realizarse en Agua peptonada buferada añadir 10 µl de muestra enriquecida en 500 ml de caldo infusión cerebro corazón e incubar a 37 °C durante 3 horas.



2. Crear un archivo y encender los bloques térmicos (37°C y 95°C). Chequear la temperatura antes de utilizarlos.



3. Fraccionar el buffer de lisis en tubos de lisis. Colocar 60 tubos de lisis en una gradilla verde con tapa. Colocar 200 µl del buffer en cada tubo de lisis. Tapar los tubos con tapas cóncavas utilizando las tiras de 8 tapas y el dispositivo de tapado azul. El buffer de lisis fraccionado tiene un período de vencimiento de 15 días. Identificar la gradilla con la fecha de vencimiento y conservarla en la heladera (4°C).



4. Separar los tubos de lisis necesarios para las muestras a analizar. Un tubo por cada muestra.

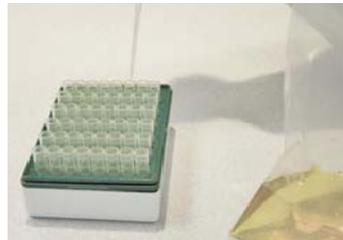


5. Retirar los caldos de enriquecimiento de la estufa. Abrir cada bolsa junto al mechero encendido. Pipetear 5 µl y descargarlos en el buffer de lisis. Tapar los tubos de lisis. Identificar las muestras y establecer claramente el orden

de los tubos correspondientes a cada muestra para que estos a su

vez correspondan con los datos que cargados en la PC.

6. Colocar los tubos con buffer de lisis + caldo de enriquecimiento en el bloque térmico a 37°C durante 20 min o a 95°C durante 10 min. Los tubos se colocan en el bloque con la gradilla verde.



7. Encender el UPS, luego el termociclador y finalmente la PC. Abrir el programa “Launch BAX System” y cargar los datos según los requerimientos del programa
 - a) Level: nombre del archivo con la fecha
 - b) Identificación del operador
 - c) descripción no se completa
 - d) guardar el archivo en la carpeta correspondiente.

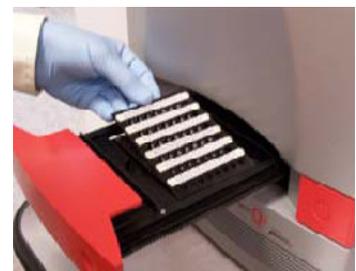
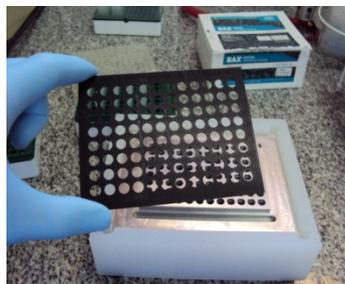
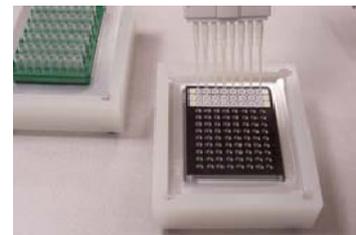
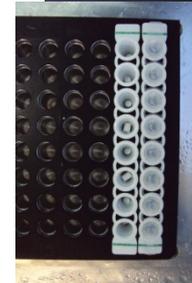
Tocar con el *mouse* uno de los casilleros y cargar los siguientes datos:

- a) Identificación de la muestra
- b) análisis (*Cronobacter*)
- c) Número de lote del kit.

En cada muestra colocar “apply” para guardar los datos. Darle la orden al equipo para que caliente la lámpara (tocar *run full process*, se llega desde la herramienta operaciones o desde el acceso directo)

8. Colocar los tubos con el lisado bacteriano en el bloque de enfriamiento durante 5 min. Los tubos se colocan en el bloque con la gradilla verde.
9. Retirar de la heladera el bloque de enfriamiento para tubos los de PCR y colocar la plancha negra sobre el bloque.

10. Sobre la plancha negra y en el bloque de enfriamiento, colocar la cantidad de tubos de PCR necesarios para las muestras a analizar
11. Destapar cuidadosamente los tubos de PCR utilizando el destapador plateado. Tener cuidado porque saltan las pastillas. Tirar las tapas.
12. Con la micropipeta multicanal cargar 50 μ l de cada tubo de lisis y colocarlo en los tubos de PCR en la posición homóloga.
13. Tapar los tubos de PCR con las tapas ópticas disponibles en cada kit. No tocar las tapas ópticas con los dedos. Utilizar tapador plateado.
14. Llevar la plancha negra con los tubos de PCR al termociclador. Colocarla en el mismo orden que se identificó en la PC.
15. Colocar los tubos sellados en el ciclador e iniciar el programa. Seleccionar en el software la opción de comienzo, esperar 3 h 30 min y leer los resultados.



3.7.6. Interpretación de los resultados

Los resultados se observarán en la pantalla como positivos (rojo), negativos (verde), indeterminado y error (amarillo). El software tiene la opción de analizar las curvas de *melting*.

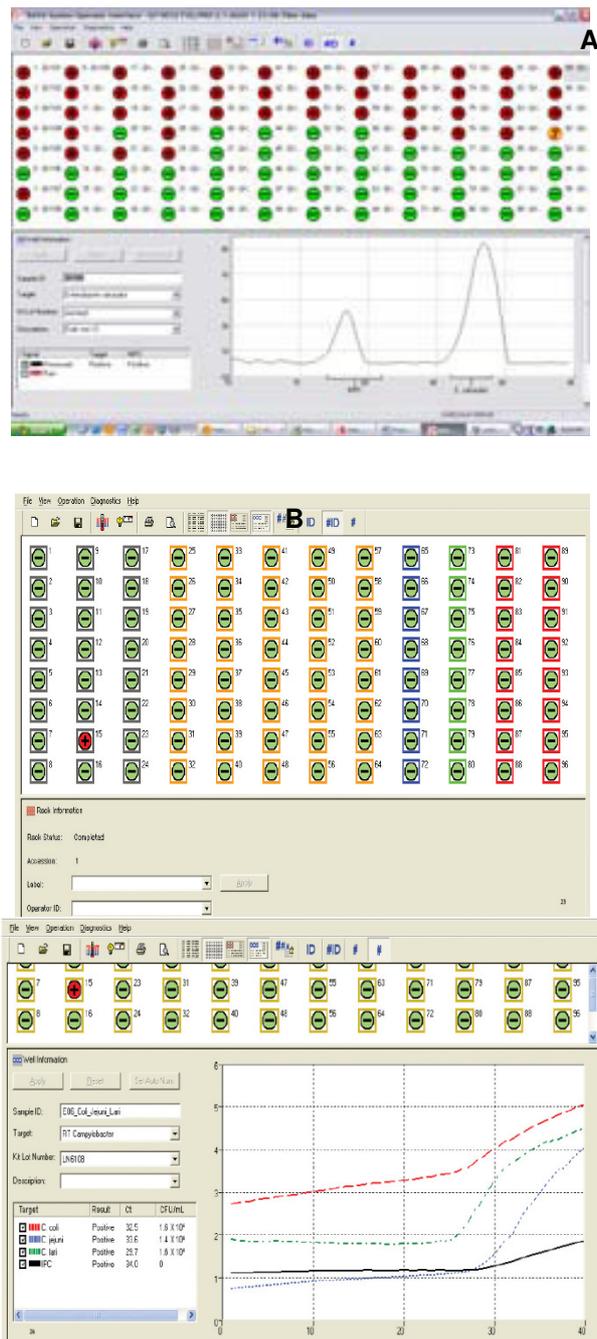


Figura 3.11.- Visualización de los resultados A. de una sistema BAX® convencional. B. de un sistema BAX® en tiempo real.

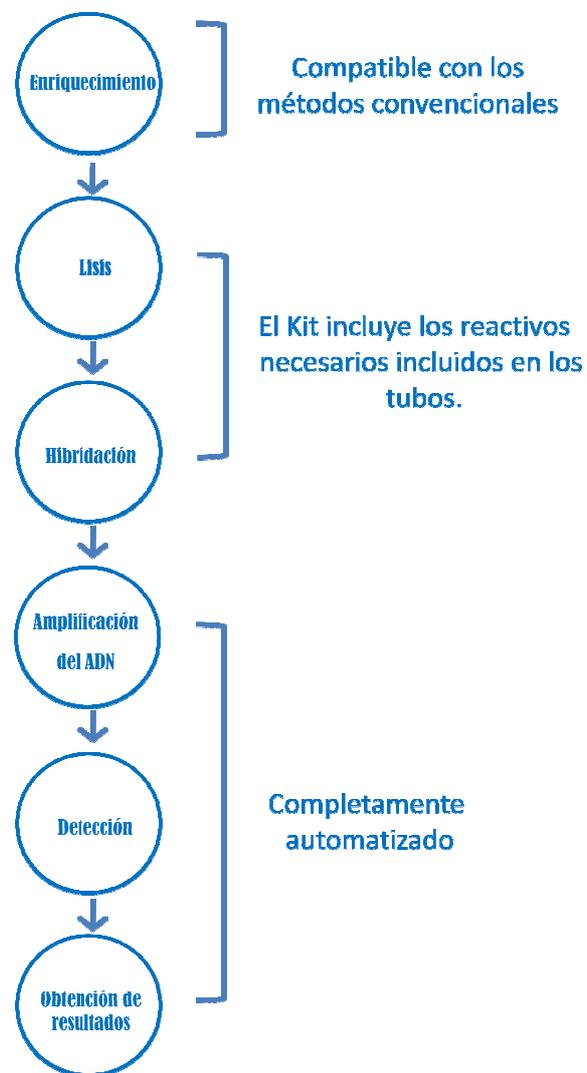


Figura 3.12.- Esquematización de los pasos a seguir para el análisis con el sistema BAX®.

3.8. FOODPROOF® *Cronobacter* DETECTION KIT - 5' NUCLEASE (MERCK)



El sistema Foodproof® *Cronobacter* Detection Kit - 5' nuclease (Merck), se basa en la utilización de sondas TaqMan marcadas con un colorante dador FAM unido al extremo 5' terminal y un *quencher* unido al extremo 3' terminal de la sonda.

El sistema incluye un control interno de amplificación competitivo y su sonda específica marcada en su extremo 5' terminal con HEX. Como se mencionó anteriormente, estas sondas se unen al ADN producto del proceso de amplificación y genera una alta especificidad. En estos kits también se incluye la enzima Uracil-DNA-Glycosylase (UNG) para eliminar cualquier ADN generado en el laboratorio.

Los kits comerciales se pueden utilizar con los siguientes equipos de RT-PCR: LightCycler® 480 (Roche Diagnostic), ABI 7500 y StepOne Plus (Applied Biosystem), Mx3005P® QPCR System (Stratagene), iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) and Mastercycler ep *realplex*⁴ (Eppendorf).



La detección de *E. sakazakii* utilizando el kit de Foodproof *Enterobacter sakazakii* requiere amplificación del ADN por PCR. El sistema de detección proporciona todos los reactivos necesarios para la PCR incluyendo la Taq polimerasa. Sin embargo, en a fin de lograr resultados confiables, el procedimiento debe realizarse bajo condiciones libres de nucleasas.

En Argentina, Merck recomienda la utilización del equipo **Agilent Mx3005P (Stratagene) comercializado por General Electric.**

A continuación se enumeran las consideraciones técnicas de este sistema, en base a la información provista por el proveedor del sistema en la Argentina:

- El sistema se basa en la utilización de sondas TaqMan altamente específicas.
- Este sistema presenta un 100% de exclusividad y un 100% de inclusividad.
- Límite de detección: 1-10 células por cada 25-100 g de muestra.
- Una sensibilidad de 10^3 - 10^4 UFC/ml a partir de muestras pre-enriquecidas
- El kit puede utilizarse con cualquier equipo de PCR en tiempo real. En Argentina Merck, recomienda el equipo Agilent Mx3005P. La compra del termociclador incluye el software pero no incluye la PC.
- El tiempo de análisis es de 1 h 42 min.
- Permite analizar 94 muestras además de los controles externos.
- El kit comercial no incluye los reactivos para la extracción de ADN.
- El kit comercial incluye la mezcla de reacción, *Taq* DNA polimerasa, Uracil-DNA-Glycosylase, controles externos y control interno en tubos separados. El kit debe conservarse a -15 a -25°C.
- El equipo de PCR no incluye PC, micropipetas, microcentrífuga, software, ni la unidad de disrupción mecánica.
- No se necesita modificar el laboratorio, ya que no genera contaminaciones debido a que no se abren los tubos una vez realizada la prueba.

3.8.1. Ventajas

- La lectura es sencilla (análisis de curvas o exportando los datos a Excel como positivo y negativo).
- El sistema de detección por sondas marcadas con fluorógenos es más específico que el sistema de fluorógenos intercalantes, evitando la generación de resultados falsos positivos.
- El tiempo de análisis es corto y en tiempo real (1 h 42 min)
- Permite analizar simultáneamente muestras para la detección de *E. sakazakii*, y otros microorganismos.

3.8.2. Desventajas

- Se requiere equipamiento adicional (micropipetas, microcentrífuga, unidad de disrupción mecánica, bloque térmico, material descartable).

3.8.3. Equipamiento necesario

- Sistema LightCycler® 2.0 Carousel-Based
- Capilares LightCycler® de 20 µl
- Set de compensación color para *E. sakazakii*
- Microcentrífuga que contenga un rotor para tubos de de reacción de 2ml.

El sistema LightCycler® Carousel-Based proporciona adaptadores que permiten que los capilares LightCycler® puedan ser centrifugados en una microcentrífuga con rotor estándar, o en su defecto,



- Centrífuga Carousel LC 2.02 compatible con el LightCycler® 2.0 Sample Carousel.

- Tubos de PCR y tapas ópticas.
- Tips libres de nucleasas con filtro.
- Reactivo D1 (recomendado)
- Disruptor.
- Unidad de disrupción mecánica.
- Bloque térmico.



- Micropipeta para dispensar 5 a 50 µl y tips estériles con filtro.
- Foodproof® Short Prep I, para la extracción de ADN.
- Foodproof® *Cronobacter* Detection Kit - 5' nuclease (Merck)

3.8.4. Controles de reacción

Analice siempre junto con las muestras un control positivo y uno negativo.

Para preparar el control positivo, reemplace el ADN templado por el control de ADN [Foodproof *E. sakazakii* control (vial 3, tapa púrpura)] o utilice una muestra positiva como control. Mantenga cerrados los capilares con el ADN templado y los controles negativos antes de añadir el ADN del control positivo.

Para preparar un control negativo, reemplace el ADN templado por H₂O, de calidad molecular (vial 4, tapa sin color). La inclusión de un control negativo en la preparación de muestras permite controlar la pureza de reacción y determinar la existencia de contaminación cruzada. El control de la extracción puede ser utilizado como un control negativo adicional.

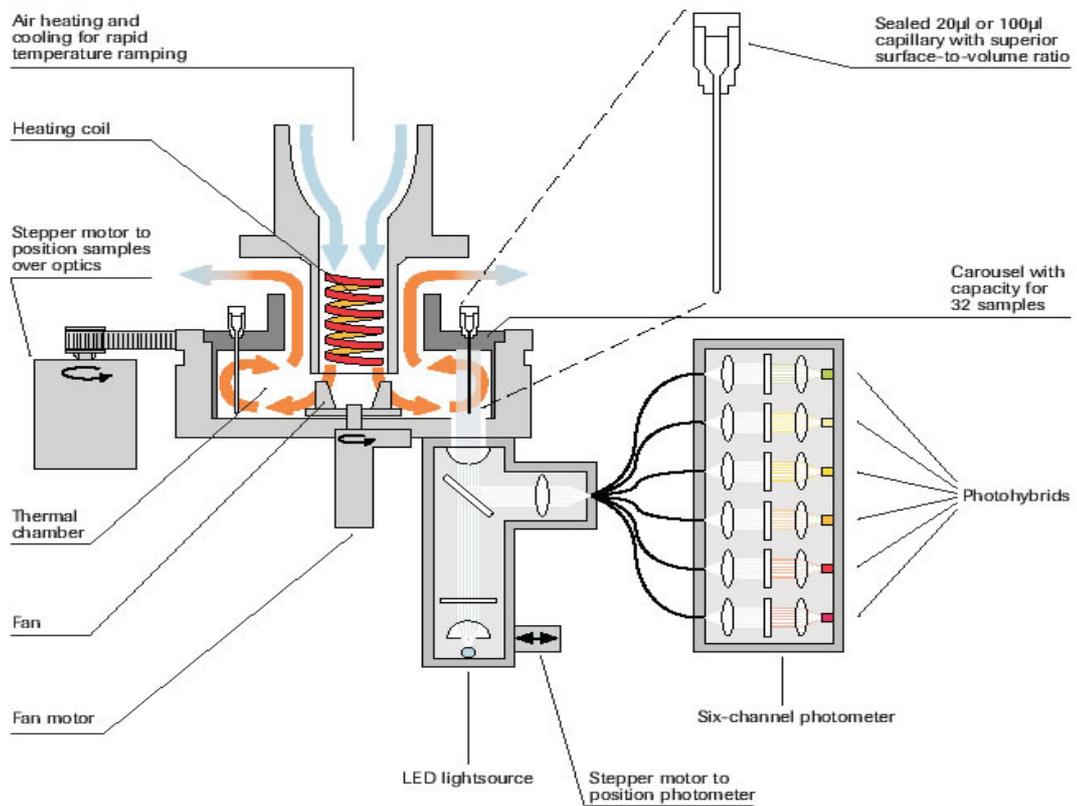
3.8.5. Compensación del color

En experimentos con múltiples colores, el uso de un objeto de compensación de color generado previamente es un requisito previo indispensable para la discriminación inequívoca del ADN de *E. sakazakii* y del ADN del control interno de amplificación (CI), El ADN en este experimento multi-color. Para información adicional sobre la generación y el uso de un objeto de compensación de color para el kit de detección de *Enterobacter sakazakii* foodproof por favor consulte el Manual LightCycler[®] 2.0 Carrusel o contacte con Bioteccon.

3.8.6. Fundamento

El LightCycler[®] consiste en una cámara cilíndrica donde se calienta el aire, que prácticamente no tiene masa, por un serpentín de calentamiento. La PCR se produce dentro de los capilares de vidrio que puede contener un volumen de hasta 20 µl. Esta gran superficie en relación al volumen permite ciclos muy rápidos.

La unidad de detección consiste en una fuente de luz LED azul y tres canales de detección que miden la luz emitida en tres diferentes longitudes de onda: 530 nm, 640 nm y 710 (Fig. XX).



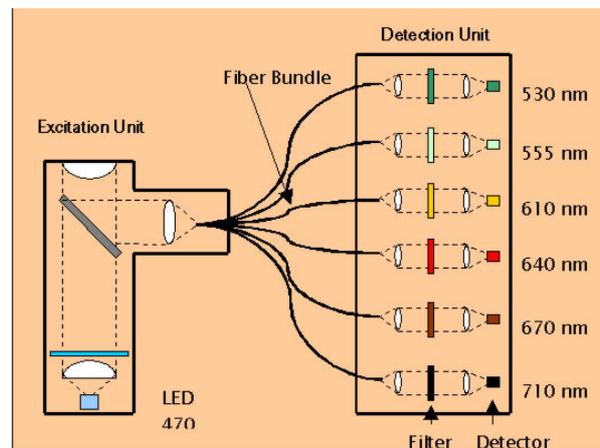


Figura 3.13. Esquematización del sistema de detección de LightCycler®

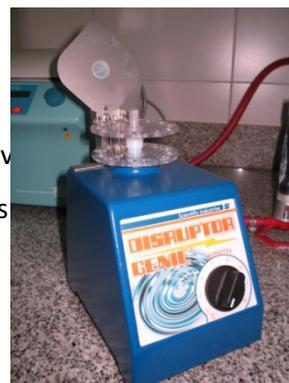
3.8.7. Procesamiento

Enriquecimiento

Utilice un caldo de pre-enriquecimiento y la temperatura de incubación sugerida en la norma DIN EN ISO 22964:2006 e incube durante 22-26 h. También pueden ser utilizados otros procedimientos de enriquecimiento adecuados y validados.

Extracción de ADN

- Agitar el caldo de pre-enriquecimiento y dejar reposar por 5 a 10 min.
- Transferir 50 µl del sobrenadante al tubo con solución lista para usar de reactivo de lisis Foodproof Short Prep I.
- Asegurarse que el tubo esté bien cerrado, vortexear por 5 seg, incubar a 95-100°C por 10 min en un bloque térmico.
- Sacar cuidadosamente los tubos del bloque térmico y dejar enfriar 1 min a temperatura ambiente.
- Pasar por vórtex 5 seg
- Centrifugar 1 min a 8000 x g
- El sobrenadante contiene el ADN. Evitar el pellet porque este último contiene inhibidores



Preparación del termociclador

a) Abrir el programa Mx3005P *Instrument Qualification Test 3*.

b) Seleccionar “*Quantitative PCR*”

c) Seleccionar los casilleros donde se van a analizar muestras e identificarlos según número de muestra y los fluorógenos a detectar.

Ali	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HEX FAM											
B	HEX FAM											
C	HEX FAM											
D	HEX FAM											
E												
F												
G												
H												

d) en la solapa superior izquierda ingresar el programa de PCR:

- **Pre-incubación: un ciclo**

Segmento 1: 37°C por 4 min

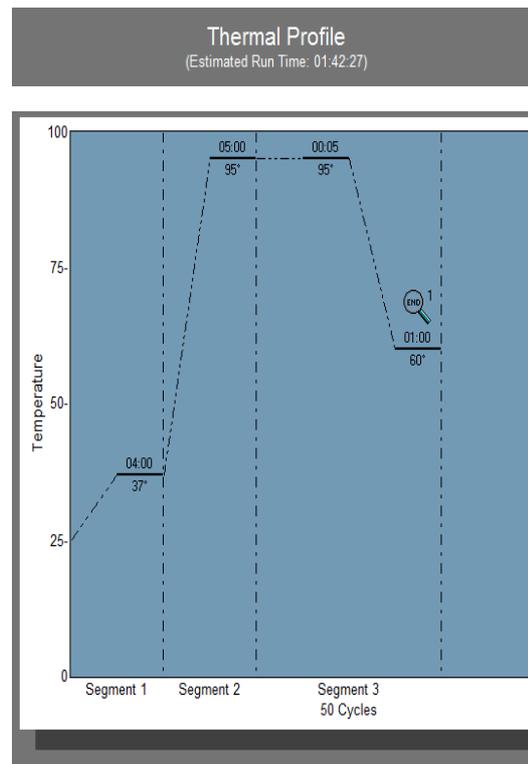
Segmento 2: 95°C por 5 min

- **Segmento 3: 50 ciclos**

Primer paso: 95°C por 5 seg

Segundo paso: 60°C por 60 seg

(detección de fluorescencia)



e) Salvar los cambios y guardar el archivo en la PC.

Preparación de la mezcla de reacción

Reactivos

Volumen para 1

Volumen para 5

	reacción	reacciones
Foodproof mezcla de reacción (tapa amarilla)	13	65
Foodproof polimerasa (tapa roja)	1	5
Foodproof control interno (IAC) (tapa blanca)	1	5
Muestra: ADN templado ó	5	-
Control positivo (tapa púrpura) ó	5	-
Control negativo (tapa sin color)	5	-
Volumen total por pocillo	20	-

Mezcla

Agregar 20 µl de la mezcla de reacción por pocillo.

Agregar: 5 µl *Cronobacter*-ADN templado

5 µl *Cronobacter* control positivo (tapa púrpura),

5 µl *Cronobacter* control negativo (tapa transparente)

Cerrar completamente la placa o los tubos usando una lámina de cierre o tira de tubos

Comenzar la corrida en el equipo (Mx3005)

3.8.8 Interpretación de los resultados

Los resultados pueden ser analizados ciclo por ciclo. Sin embargo, al finalizar el proceso se podrá tener mayor información. Analizar resultados de la PCR en tiempo real en canales 670/530 Back y 610/530 Back utilizando el módulo de detección cualitativa del Software de análisis de la LightCycler[®]. Compruebe si hay un resultado positivo del control interno (señal visible en el canal 610) por cada muestra que es negativo para *E. sakazakii* ADN (no hay señal en el canal 670). Comparar los resultados de los canales 670 y canal 610 (Control Interno) para cada muestra, e interpretar los resultados como se describe en la siguiente tabla:

<i>E. sakazakii</i>	Control interno	Interpretación
---------------------	-----------------	----------------

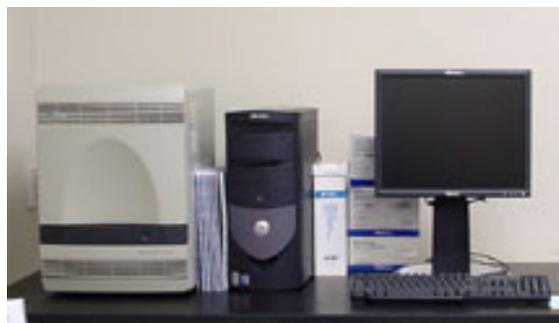
Canal de lectura 670/Back 530	Canal de lectura 610/Back 530	
Positivo	Positivo CR Negativo	Positivo para <i>E. sakazakii</i>
Negativo	Positivo	Negativo para <i>E. sakazakii</i>
Negativo	Negativo	Inválido

Siempre verifique los resultados del software (señales rojas para las muestras positivas / señales verdes de las muestras negativas) para la credibilidad de inspección de las curvas de amplificación.

En las muestras con resultados inválidos ambas curvas no superan la línea de corte y deben ser analizadas nuevamente.

3.9. TAQMAN® CRONOBACTER SAKAZAKII DETECTION KIT (APPLIED BIOSYSTEMS)

El kit de detección TaqMan® *Cronobacter sakazakii* ofrece un procedimiento sencillo, confiable y rápido para detectar la presencia de *Cronobacter sakazakii*. Este método utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sondas TaqMan® que identificar y amplificar una secuencia característica de este microorganismo.



La identificación de *C. sakazakii* a partir de una amplia variedad de muestras es altamente selectiva de alto rendimiento y con mínimos riesgos de contaminación y se realiza en 3 sencillos pasos: Enriquecimiento, Preparación y Análisis de las muestras.

3.9.1. Equipamiento necesario

- Kit de detección TaqMan® *Enterobacter sakazakii*
- Target Assay Mix: Contiene cebadores y sondas para la amplificación y detección del target (FAM™-sonda marcada) e IPC (VIC®-sonda marcada) 300 µL.
- Control negativo, 1 tubo 1000 µL tapa blanca



- Mezcla de reacción 2 tubes 750 µL 2X
- Equipo de PCR Real-Time 7300 o 7500 Applied Biosystems.
- ABI PRISM® 96-Well placa óptica de reacción
- ABI PRISM® cubiertas ópticas adhesivas
- Tubos ópticos ABI PRISM® Applied Biosystems
- Tapas ópticas (8 tapas/tira), 300 tiras ABI PRISM® Applied Biosystems
- Optical Adhesive Cover Starter Kit ABI PRISM® Applied Biosystems
- Optical Adhesive Covers, 25 covers Applied Biosystems
- MicroAmp™ Splash free support base Applied Biosystems
- Enrichment reagent and protocol appropriate for the pathogen you are testing for
Major Laboratory Suppliers (MLS)

3.9.2. Procedimiento

Enriquecimiento

Applied Biosystems no ha validado ningún procedimiento para el pre-enriquecimiento para su uso con el Kit de detección TaqMan *Enterobacter sakazakii*. Sin embargo, pueden ser utilizados muchos procedimientos de enriquecimiento estandarizados (USDA, FSIS o FDA BAM methods).

Extracción del ADN

1. Transferir 1 ml de la muestra enriquecida de la bolsa Stomacher a un tubo estéril de microcentrífuga, y luego tapar el tubo.
2. Centrifugar el tubo a la máxima velocidad en una microcentrífuga durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante del tubo, dejando el pellet en el fondo. Tratar de no perturbar la integridad del pellet durante la extracción del sobrenadante.
4. Resuspender el precipitado en 100 µL del reactivo de preparación de muestras PrepMan® Ultra, a continuación, agitar brevemente el tubo para mezclar el contenido.
5. Colocar el tubo en un bloque térmico a 95-100 °C durante 10 minutos, luego, agitar brevemente el tubo para mezclar el contenido.
6. Centrifugar el tubo en una microcentrífuga a máxima velocidad durante 3 minutos.

7. Transferir 50 µL del sobrenadante en un nuevo tubo de microcentrífuga. La muestra puede ser almacenada a 4 ° C hasta un mes.
8. Transferir 10 µl de la muestra de ADN a un nuevo tubo que contiene 90 µl de ARNasa libre de agua.
9. Agitar brevemente el tubo para mezclar el contenido. La muestra de ADN ya está listo

Preparación de la PCR

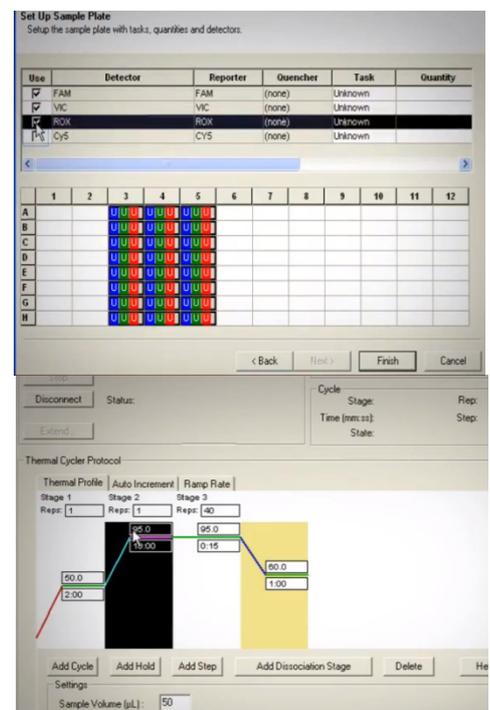
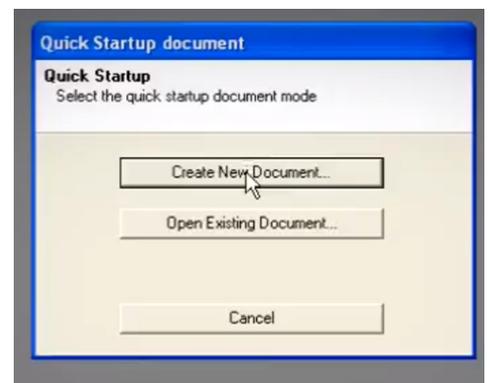
Preparación de la PCR es el tercer paso en el uso del Kit de detección TaqMan® *Enterobacter sakazakii*.

Esta consiste en la creación de un nuevo documento y preparación de la mezcla de reacción.

Nota: Todos los kits de detección de patógenos TaqMan® poseen condiciones de ciclado universales, lo que le permite ejecutar diferentes kits en una misma PCR.

1. En el software, crear un documento en blanco y especificar el tipo de ensayo es de cuantificación relativa o cuantificación absoluta sin curva estándar.
2. Especificar el tipo de detector, FAM o VIC que se utilizará para cada reacción.
3. Establecer las condiciones de ciclos térmicos especificadas a continuación.

	Activación de la enzima	PCR	
	Espera	Ciclado (45 Ciclos)	
		Desnaturalización	Hibridación /Extensión
Tiempo	10 min	15 seg	1 min
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C



Para preparar la mezcla de reacción:

La mezcla de reacción puede causar irritación en ojos y piel. La exposición puede causar molestias si se ingiere o se inhala. Lea el MSDS proporcionado en el kit y siga las instrucciones de manejo. Use lentes de protección, ropa, y guantes adecuados.

1. Descongele completamente todos los reactivos.
2. Etiquete los tubos con el nombre correspondiente.
3. Calcular el volumen de los componentes de la solución premezcla necesarios para el número de muestras, repeticiones, y los controles para su funcionamiento.

Applied Biosystems recomienda analizar cada muestra por triplicado, en cada análisis incluir por lo menos un control negativo por cada organismo analizado. Añadir 30 μ l de mezcla de reacción para el control positivo, control negativo, o réplicas.

Componente	Vol (μ L) for One 30- μ L Reaction	Vol (μ L) for Four 30- μ L Reactions*
2X Environmental Master Mix (EMM)	15.0	66.0
10X Target Assay Mix (TAM)	03.0	13.2
Volumen Total	18.0	79.2

4. Pipetear los componentes de la solución de premezcla en un tubo etiquetado. Cambie los tip al pipetear EMM y TAM.
5. Mezclar la solución pipeteando suavemente arriba y abajo, luego tapar el tubo.
6. Repita los pasos 2 a 5 para cada muestra.
7. Coloque las muestras desconocidas al comienzo de una fila o columna y los controles al final de la fila o columna.

Coloque las réplicas de una muestra por el mismo objetivo una al lado de la otra.

Si hay suficiente espacio disponible:

- a) Separe los objetivos diferentes dejando una fila vacía.
- b) Así también puede separar las diferentes muestras desconocidas y controles o,
- c) Separar los controles negativos y positivos. Ubique los controles positivos en una fila o columna exterior.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TARG1 UNKN 1	TARG1 UNKN 1	TARG1 UNKN 1	TARG1 UNKN 2	TARG1 UNKN 2	TARG1 UNKN 2		NEG CTRL	NEG CTRL			POS ⁺ CTRL
B												
C	TARG2 UNKN 1	TARG2 UNKN 1	TARG2 UNKN 1	TARG2 UNKN 2	TARG2 UNKN 2	TARG2 UNKN 2		NEG CTRL	NEG CTRL			POS CTRL
D etc...												

No se recomienda el uso de controles positivos, pero en caso de usarlos ubíquelos dejando un espacio que los separe de las muestras y en el final de una fila.

8. Transferir 12 μ l de la muestra problema en los tubos correspondientes, pipetear suavemente arriba y abajo para mezclar la solución. Mezclar suavemente con el tip en la parte inferior del tubo para minimizar la formación de aerosoles y evitar la contaminación cruzada. Cambie de tip en cada muestra.
9. Transferir de 12 μ l de control negativo en donde corresponda, luego mezclar la solución como se indica en el párrafo anterior.
10. Si está utilizando un control positivo, este debe diluirse de la siguiente forma:
 - a) Añadir agua libre de ARNasa a 1 pg por microlitro.
 - b) Cierre los tubos que contengan muestras desconocidas y el control negativo.
 - c) Transferir 12 μ l de control positivo en cada uno controles positivos y, luego suavemente mezclar la solución.

El resultado de la dilución es de aproximadamente 2000 copias por reacción.

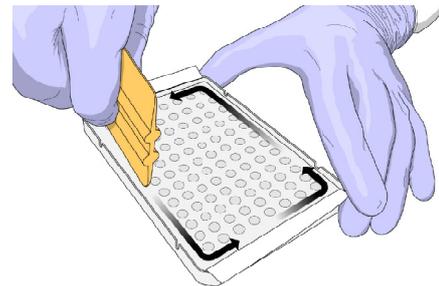
11. Cerrar los tubos o aplicar una cubierta óptica a la placa

a. Coloque una cubierta adhesiva óptica en la placa, luego frote el piso borde de la parte posterior del aplicador y sucesivamente a lo largo de la placa.



b. Presione ida y vuelta el borde plano de la aplicador de a lo largo del borde corto (ancho) de la placa.

c. Frote el extremo del aplicador horizontal y vertical entre todos los pozos.

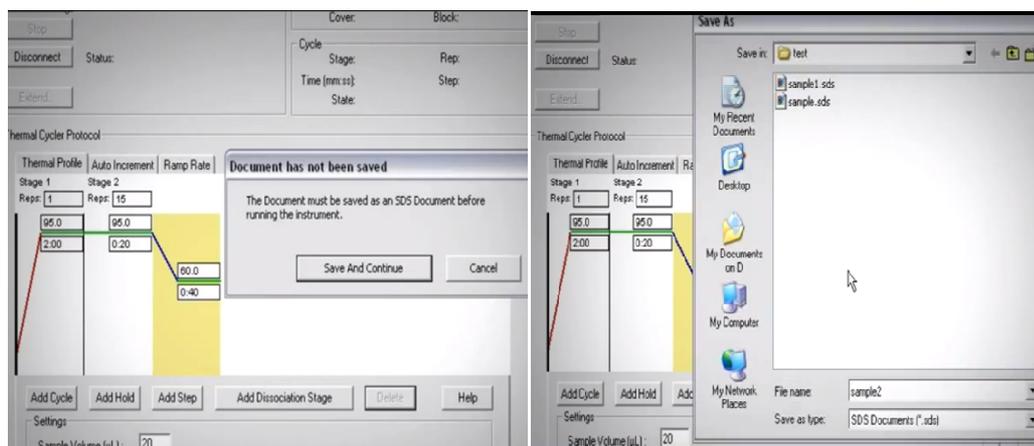


d. Frote el extremo del aplicador alrededor de los bordes exteriores de la placa utilizando pequeñas de ida y vuelta movimientos para formar un sello completo alrededor de los pozos fuera.

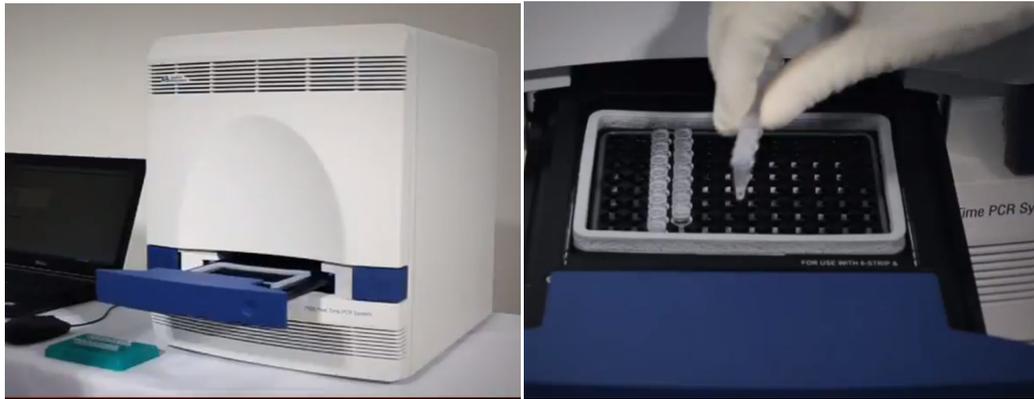
12. Asegúrese de que los reactivos están en el fondo de los pozos. Si disponibles, el uso de una centrifugadora con un adaptador de la placa de una breve centrifugación de la placa

Inicio de la PCR

1. Abra el documento creado anteriormente en el que cargo los datos del ensayo.



2. Coloque la placa de reacción en el sistema de PCR en tiempo real.

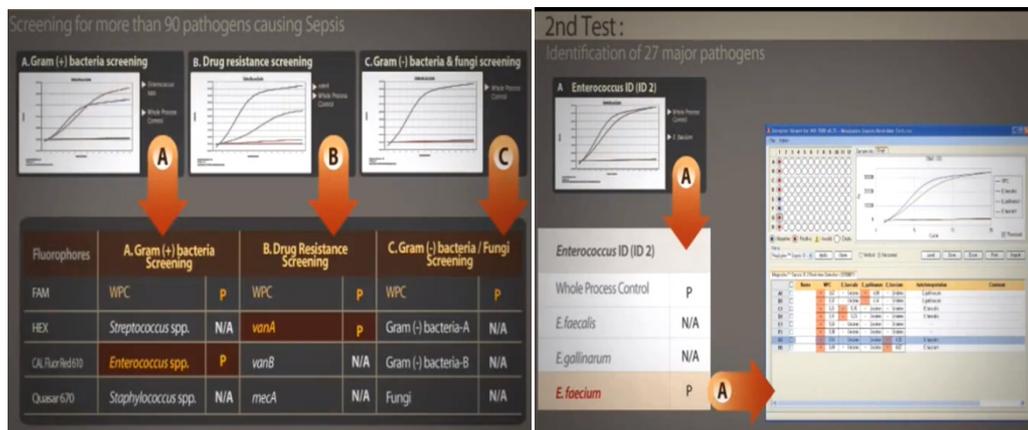


3. Inicie el análisis

Asegúrese de que el equipo este correctamente instalado y los instrumentos calibrado

Observación de los resultados

1. Observe los gráficos de amplificación de la totalidad de la placa.



2. Establezca los valores de base y limite.

3. Marque cada una de las muestras para la señal de FAM™ (señal del objetivo específico) y VIC® (IPC). Finalmente, interprete los resultados:

Señal FAM	Señal VIC	Resultado

Presente	Presente o ausente	Positivo
Ausente	Presente	Negativo
Ausente	Ausente	-

3.9.3. Cronofast microbial-systems

Cronofast se basa en la detección de una diana genética específica para esta bacteria, cuya elevada conservación a nivel de secuencia la diferencia de otros marcadores comúnmente usados. Esta característica, junto con la inclusión de un control interno de amplificación (IAC), prácticamente elimina la posibilidad de obtener falsos negativos.

3.9.3.1 Fundamento

Cronofast se basa en la amplificación por PCR a tiempo real de un gen diana con secuencia específica para detectar todas las especies de *Cronobacter*. Una amplificación positiva indica la presencia de esta bacteria en la muestra. *Cronofast* también puede utilizarse para confirmar colonias aisladas en placa.

A continuación se enumeran las consideraciones técnicas de este sistema, en base a la información provista por el proveedor

- La mezcla de reacción contiene tampón, dNTPs, DNA polimerasa Hot-Start, agua estéril bidestilada libre de ácidos nucleicos y MgCl₂ en proporciones y cantidad suficiente para el número de reacciones indicado en la caja. pos, medios y reactivos descritos en la Norma utilizada.
- Un control interno de amplificación (IAC) cuya detección indicará la ausencia de inhibidores.
- Los *primers* y sondas necesarios para la amplificación tanto del IAC como del gen diana de *Cronobacter* spp. están también incorporados en la mezcla de reactivos.
- La sonda de detección de *Cronobacter* spp. está marcada con el fluorocromo FAM, mientras que la sonda de detección del IAC está marcada con el fluorocromo JOE.

- La mezcla de reacción NO contiene ROX. Omitir el uso de este fluoróforo en las opciones del software de equipos que habitualmente funcionen con ROX como sistema de referencia pasiva, o bien añadir ROX a la concentración especificada por el equipo.
- La mezcla de reacción debe ser conservada a -20°C, evitando su exposición a la luz directa. Para uso frecuente se puede alicuotar y conservar a 4°C durante 4 semanas. Evitar los procesos repetidos de congelación/descongelación.

Materiales necesarios no incluidos en el kit

- Tubos de PCR y tapas ópticas.
- Solución de lisis DNAREady
- Vórtex.
- Microcentrífuga.
- Termociclador a tiempo real.
- Bloque térmico.
- Guantes de un solo uso libres de polvo.
- Micropipeta para dispensar 5 a 50 µl y tips estériles con filtro.

3.9.3.2. Procedimiento

1. Después del enriquecimiento de las muestras en un medio adecuado, como Agua de Peptona Tamponada, se debe extraer el ADN de las muestras (es aconsejable realizar una prueba de amplificación sobre este ADN para comprobar la calidad del mismo). Se recomienda el uso de un método de extracción que se adecue a la muestra analizada, que incluyan un paso de purificación para muestras que puedan presentar problemas de inhibición. Para el resto de muestras, se recomienda el uso de DNAREady, una solución de lisis para la extracción fácil y rápida del ADN.

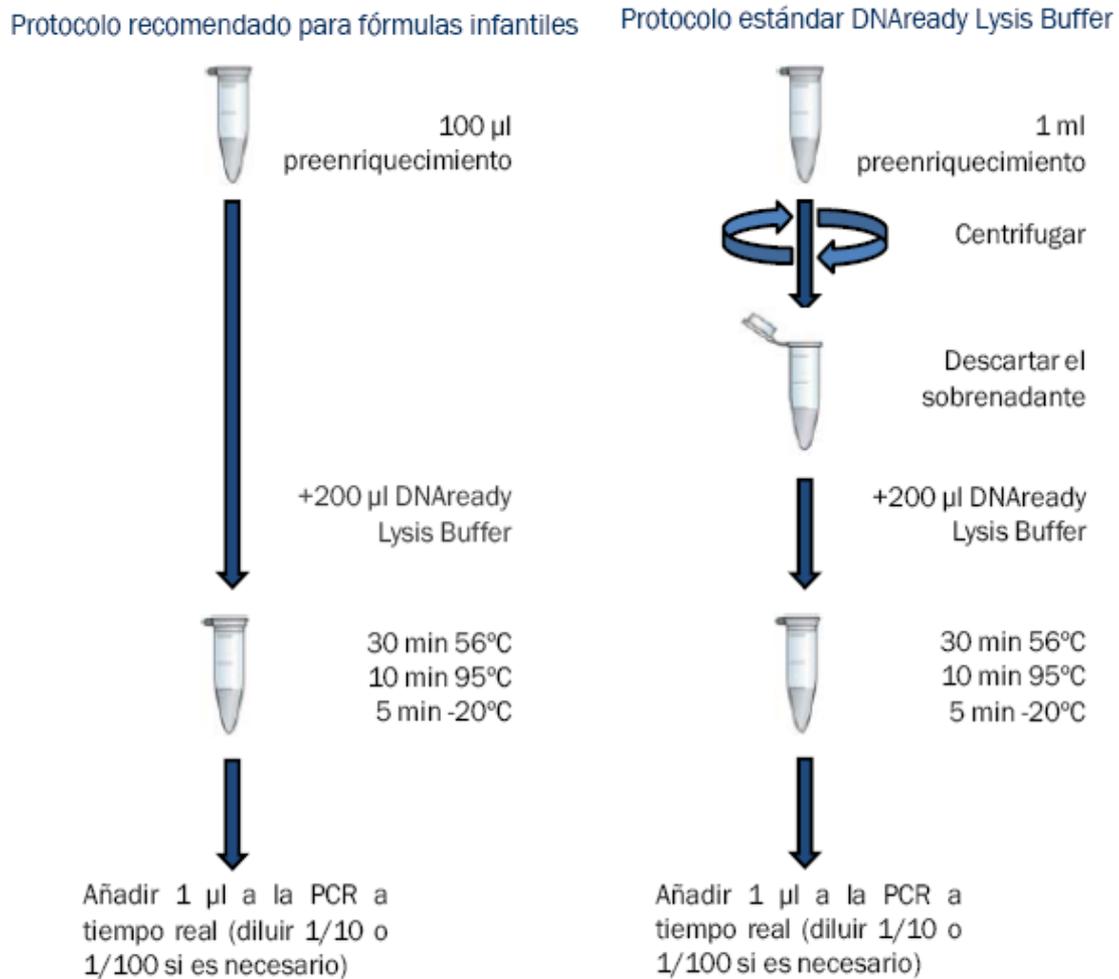


Figura 3.14. Flujograma de los métodos de extracción sugeridos por el fabricante

2. Mezclar 100 µl del enriquecimiento con 200 µl de la solución de lisis DNAREADY, pipetear o vortear para homogenizar la muestra y seguir los protocolos de incubación recomendados. Alternativamente, centrifugar 1 ml del enriquecimiento durante 5 minutos a 8.000 g, eliminar el sobrenadante y extraer el ADN del pellet celular con el DNAREADY u otro método de extracción de ADN.
3. Pipetear 19 µl de la mezcla de reacción a cada uno de los tubos o pocillos de la placa de PCR. Realizar esta operación preferentemente en un entorno protegido o dentro de una cabina y sin excesiva luz ambiental.
4. Añadir a cada tubo o pocillo de la placa 1 µl del extracto de ADN o los controles blanco (también llamado *non template control*, NTC) o positivo según corresponda.

5. Introducir los tubos o la placa en el bloque del termociclador a tiempo real. Seleccionar la lectura de fluorescencia para los fluorocromos JOE y FAM. Realizar la amplificación según el siguiente programa:

Paso	Evento	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la ADN polimerasa y desnaturalización del ADN	95 °C	10 minutos
2	Desnaturalización	95 °C	15 segundos
(40 ciclos)	Annealing/Extensión	60 °C	1 minuto *

*Realizar la lectura de fluorescencia en el Paso 2 al final de cada ciclo de Annealing/Extensión a 60°C.

6. Se recomienda realizar al menos un control blanco (añadiendo 1 µl de agua estéril libre de ácidos nucleicos en lugar de ADN) y un positivo (usando el PCR Positive Control SLCC de Microbial o ADN genómico de *Cronobacter* spp.) cada vez que se realice una determinación.
7. Interpretación de los resultados.

Un resultado se considerará positivo cuando la fluorescencia correspondiente a *Cronobacter* (FAM) supere el valor umbral.

Un resultado sólo se considerará negativo cuando la fluorescencia de *Cronobacter* no supere el valor umbral pero sí lo haga la fluorescencia del IAC (JOE).

La fluorescencia obtenida depende de cada fluorocromo, siendo generalmente mayor la fluorescencia del FAM y menor la del JOE. Generalmente, la fluorescencia del IAC supera el valor umbral entre los ciclos 28 y 31, en función de las características del software del equipo.

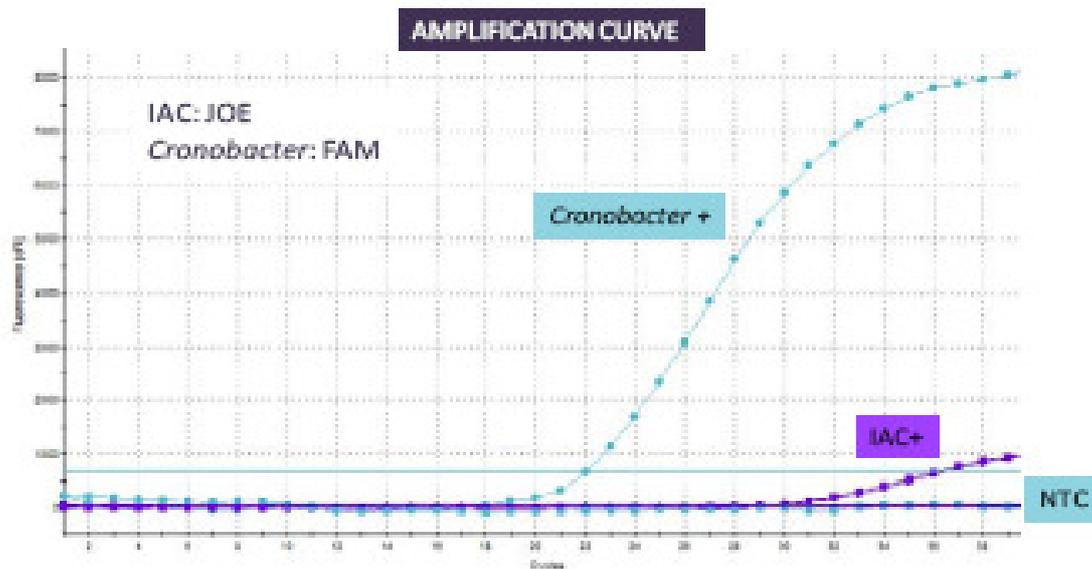


Figura 3.15. Curva de amplificación para *Cronobacter* spp.

El reciente desarrollo de Bactoplex PIF permite la detección rápida e inequívoca de *Cronobacter* spp. y *Salmonella* spp. por PCR a tiempo real. Bactoplex PIF se basa en la detección de dos dianas genéticas específicas para estas bacterias, cuya elevada conservación a nivel de secuencia las diferencia de otros marcadores comúnmente usados. Este nuevo producto comparte la metodología descrita anteriormente y los resultados se visualizan como se muestra en la Figura XX.

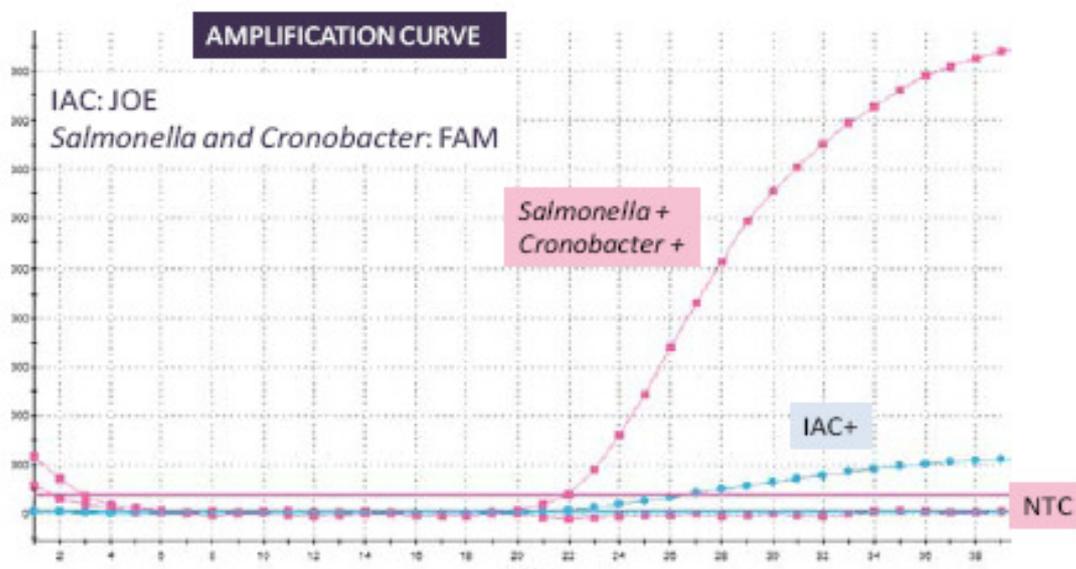


Figura 3.16. Curva de amplificación para *Cronobacter* spp y *Salmonella* sp.

3.9.4. VIT-*Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) VERMICON

Este es un kit diagnóstico que se fundamenta en la hibridación de dos secuencias complementarias de AND o ARN. VIT-*Enterobacter sakazakii* permite la detección inequívoca de todas las especies del genero *Cronobacter*.



Permite el análisis directo de aislamientos puros, o a partir del caldo de enriquecimiento sin un paso de purificación previa. El análisis de muestras de agua, alimentos, leche en polvo y muestras ambientales requiere un proceso de enriquecimiento. El análisis es rápido obteniéndose resultados de manera casi inmediata.

3.9.4.1. Ventajas

- Permite la detección de células viables
- 100% de inclusividad
- No arroja resultados falsos positivos
- Sin embargo, algunos microorganismo pueden producir autofluorescencia, que se observa de color semejante pero con menos brillo, este problema se resuelve comparando coloración con el control positivo.
- Obtención de resultado en 3 horas.
- Puede detectar cedula individuales inclusive en presenta de otro microorganismos.
- Limite de detección 10^3 UFC/ml (Lehner et al. 2006).

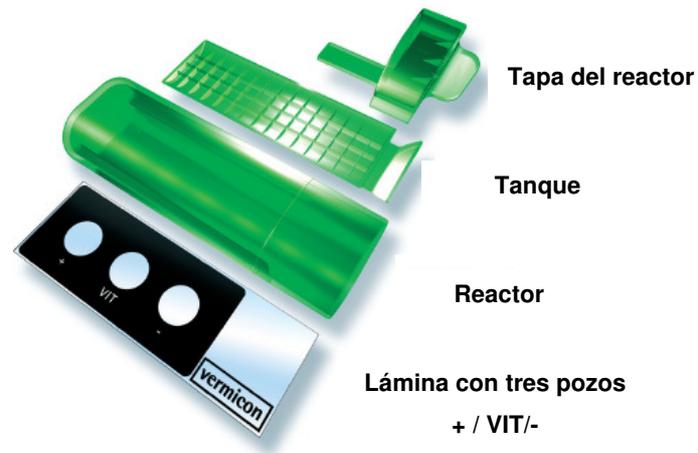
3.9.4.2. Desventajas

- Requiere un microscopio de fluorescencia

3.9.4.3. Componentes

- Reactor

- Tanques
- Láminas y vidrios
- Breaker 2
- Solución C4
- Solución D4 (tóxica contiene formamida)
- Control negativo
- VIT
- Finisher
- Solución E, contiene etanol (levemente inflamable)
- Probeta de 10ml/100ml
- Contendor hermético de vidrio con tapa
- Agua destilada
- Microcentrifuga para viales de 2ml. min, 2700 x g
- Viales de reacción estériles de 2ml
- Micropipetas y Tips 2 – 20, 100 - 1000 μ l
- Microscopio de fluorescencia con lente de inmersión 100x y contraste de fase
- Incubador 46°C \pm 2°C
- Filtro fluorescente: verde Zeiss filtro 15, excitación BP 564/12, haz de luz FT580, emisión LP 590.



3.9.4.4. Procedimiento

1. Luego de realizar un proceso de pre-enriquecimiento como indica el protocolo, colocar 1,5 del caldo de enriquecimiento en tubo de reacción estéril. Centrifugar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos 2000- 4000 x g. Descartar el sobrenadante eliminando el líquido remanente.

Preparación de la muestra

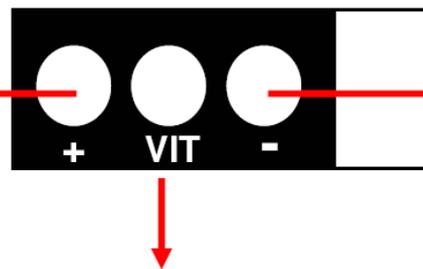
2. Añadir una gota de Breaker 2 al tubo de reacción que contiene el pellet con la muestra mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 7 minutos.
3. Agregar 2 gotas de la solución E, mezclar e incubar durante 30 segundos.

- Insertar la lamina en la tapa del reactor. Colocar 5 µl de la muestra preparada en cada uno de los pozos de la lámina. Seque la lámina horizontalmente: a 46 °C durante 15-30 minutos (máximo 2 horas).

Contacto

- Colocar 25 gotas de la solución 4 en el tanque y asegurarse que se deslicen completamente en el reactor.
- Añadir una gota del Control positivo (rojo) sobre el pozo designado con el signo +.
- Añadir una gota de VIT (verde) sobre el pozo designado como VIT.
- Añadir una gota del Control negativo (marrón) sobre el pozo designado con el signo -.

Todas las bacterias viables, especialmente las Gram positivas no destruyen el breaker y emiten fluorescencia roja en luz verde



No se observan células con fluorescencia

VIT con un resultado positivo se observa como en la Figura XX

- Inserte cuidadosamente la lamina en el reactor e incubar horizontalmente a 46°C durante 90 minutos (máximo 2 horas). Las gotas no se deben dispersar entre pozos.
- Prepare la solución de lavado (3ml de Solución D4 + 27 ml de agua destilada) precalentar a 46°C durante 30 minutos.

Lavado

- Abrir cuidadosamente el reactor y retire la lamina. Evitar la dispersión de las gotas entre pozos. Retirar cuidadosamente el tanque del reactor.

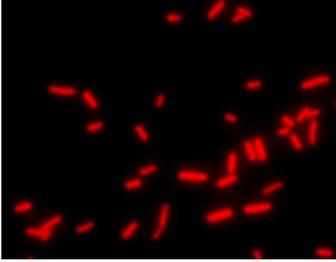
12. Mantenga el reactor en posición vertical y llénelo con la solución de lavado hasta la línea marcada.
13. Inserte la lámina rápida y cuidadosamente en el reactor (evitando que las gotas se dispersen entre pozos). Cierre firmemente el reactor y colóquelo hacia abajo. Incubar en esta posición a 46 °C durante 15 minutos (máximo 30 minutos)
14. abra el reactor y retire la lámina. Descarte la solución de lavado.
15. Llenar el reactor, hasta la línea marcada, con agua destilada. Cuidadosamente sumerja la lámina en el agua y retírela inmediatamente. Sacuda la lámina hasta remover el agua remanente. Descarte el agua.
16. Mantenga la lámina de costado y déjela secar a 46 °C durante 15-30 minutos (máximo 2 horas). La lámina puede conservarse a 4 °C en oscuridad hasta un mes.



Figura 3.17. Esquematización del procedimiento de análisis con el método VIT-*Enterobacter sakazakii*

Observación al microscopio

17. Previamente coloque una gota de Finisher entre cada uno de los pozos de la lámina y coloque el cubreobjetos encima.
18. Analice la lámina, compare sus resultados con los de la siguiente tabla.

	+	VIT	-
Contraste de Fase	Células en contraste de fase		Células en contraste de fase
 Luz verde	Todas las células viables de <i>E. sakazakii</i> se observan de color rojo		No hay cedulas rojas

3.10. PRECAUCIONES A TENER EN CUENTA AL MOMENTO DE REALIZAR UN ANÁLISIS

1. Las zonas del laboratorio de extracción y de amplificación del ADN, así como los materiales, instrumentación y reactivos, no se deben usar para otras actividades y no se deben transferir de una zona a otra. Los guantes usados en una zona no se deben usar en otra zona.
2. Se deben seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio con el fin de obtener resultados fiables con esta técnica. La elevada sensibilidad de este test requiere un cuidado extremo para mantener la pureza de todos los reactivos. Descartar todos los reactivos sospechosos.
3. Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la degradación por nucleasas, que están presentes tanto en la piel humana como en las superficies que han estado en contacto con ella. Limpiar las superficies con los reactivos adecuados, usar guantes de un solo uso sin polvo y una bata de laboratorio mientras se realiza el test. Lavarse las manos después de realizar el test.
4. Cada método ha sido validado usando los reactivos proporcionados en el *kit* correspondiente. El uso de otros métodos de amplificación o cualquier cambio en los

protocolos podrían dar lugar a resultados erróneos. Por lo que se recomienda no intercambiar los componentes de diferentes lotes.

5. No usar el producto después de su fecha de caducidad. Conservar los componentes en las condiciones indicadas por el fabricante.
6. El uso de este producto está limitado a personal calificado con experiencia en técnicas de extracción y amplificación de ADN.
7. Estos test solamente pueden ser utilizado para investigar la presencia de *Cronobacter* spp. en muestras de agua, alimentarias o para otros propósitos relacionados con la I+D. No se recomienda su utilización para diagnóstico en muestras clínicas.
8. A nivel teórico, los *primers* y sondas que incluidas en los *kits* diagnósticos no detectan otras bacterias. Además, se han realizado ensayos con un amplio rango de bacterias y no se han observado reacciones cruzadas. Sin embargo, no se han realizado análisis con todas las bacterias que se pueden encontrar en muestras ambientales.
9. Para evitar la contaminación, es prudente preparar alícuotas de las soluciones y mantenerlas separados de otros reactivos evitando, en cada ensayo, manipular directamente las soluciones madre.
10. No toque las tapas ópticas o la superficie de los capilares, según sea el caso. Siempre use guantes al manipular los tubos de reacción.
11. Con el fin de evitar la contaminación cruzada, manipular cuidadosamente los controles positivos evitando contaminar las muestras, los controles negativos, y los reactivos.
12. La luz directa puede dañar algunos reactivos, manténgalos protegidos de la luz y a temperaturas de almacenamiento indicadas por el fabricante.

CAPITULO IV

Caracterización fenotípica

4.1. FAMILIA *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo heterogéneo de bacterias gram-negativas ampliamente distribuidas en plantas, tierra, agua e intestino de hombres y animales. Algunos géneros son enteropatógenos humanos importantes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), mientras otros son colonizantes habituales del tracto gastrointestinal (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, etc. *Cronobacter* spp. es un patógeno emergente perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que durante mucho tiempo fue denominado *Enterobacter cloacae* de pigmento amarillo. Según la más reciente clasificación, propuesta por Iversen et al. (2008), el género *Cronobacter* comprende bacilos Gram-negativos de aproximadamente 1- 3 μ m, peritricos, generalmente móviles, anaerobios facultativos (Fig. 2.1).

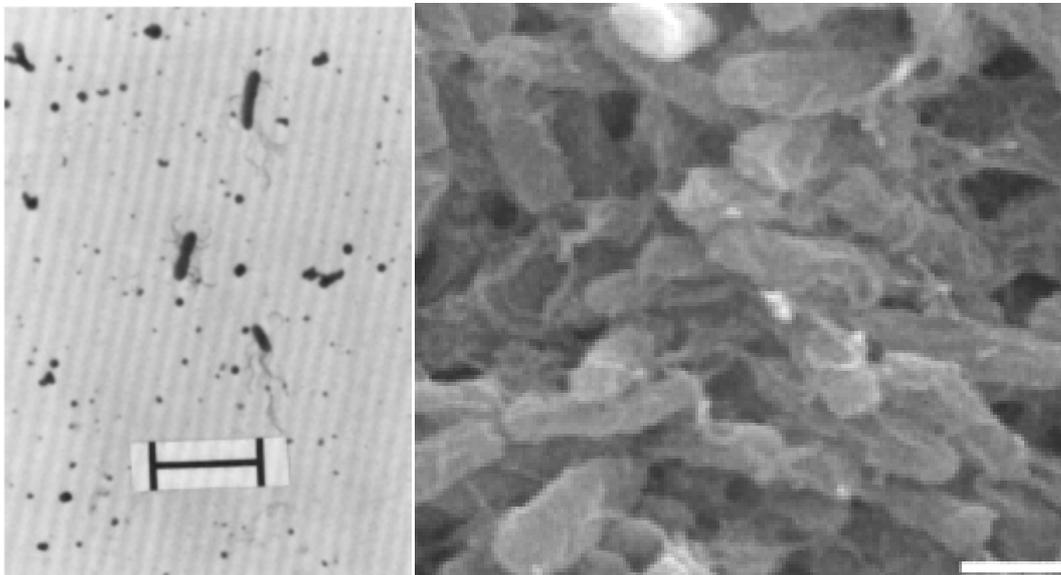


Figura 4.1. A) Microfotografía de la cepa tipo de *E. sakazakii* que muestra el tamaño, la morfología, y la disposición de los flagelos (Barra de escala: 10 μ m) (Tomada de Farmer et al. 1980), B) *Cronobacter sakazakii* observado al microscopio electrónico (Tomada de Zogaj et al. 2003).

Las primeras evidencias de la existencia de *Cronobacter* spp. como taxa no relacionada con el género *Enterobacter*, fueron características fenotípicas como la producción de pigmento amarillo en agar tripticasa de soja luego de 48 h de incubación a 25°C y las diferencias en el crecimiento en el caldo tripticasa de soja Fig. 2.2. Posteriormente otras características fueron empleadas para diferenciar a *E. sakazakii* de *E. cloacae*, tales como: la observación de actividad DNA extracelular tras la incubación del microorganismo durante 7 días en agar azul de toluidina y la incapacidad de fermentar sorbitol o mucato a 36°C.

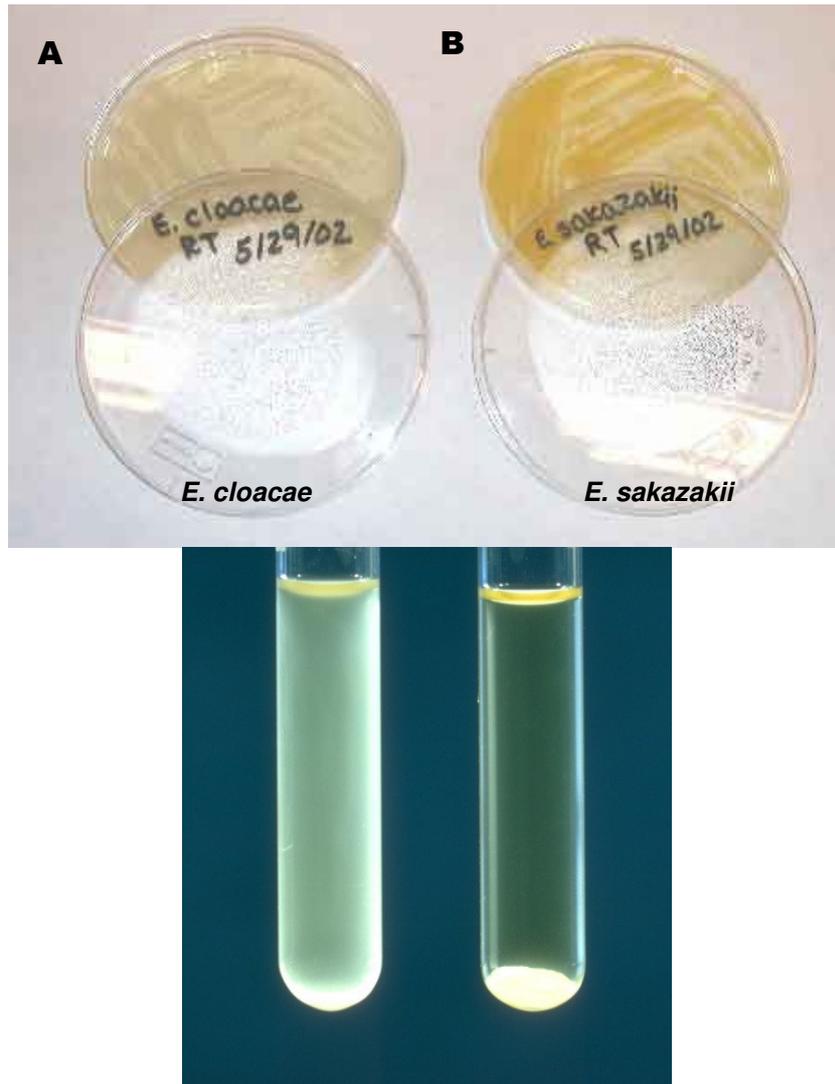


Figura 4.2. Diferencias en el crecimiento de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter sakazakii* en A) Agar tripticasa de soja B) caldo tripticasa de soja.

Farmer et al. (1980) describieron las colonias de *Enterobacter sakazakii* y encontraron que todas las cepas utilizadas en su estudio crecieron rápidamente en agar tripticasa de soja formando, al cabo de 24 h incubación a 36 ° C, colonias de 2 a 3 mm de diámetro. A 25 ° C las colonias generalmente son de 1 a 1,5 mm a las 24 horas y de 2 a 3 mm luego de 48 h. Las colonias son de color amarillo brillante después de 48 horas a 25 °C, pero a 36 ° C, la producción de pigmento fue disminuido en gran medida. Muchos de las cepas recién aisladas presentan dos o más tipos de colonias diferentes cuando fueron sembradas en cultivos puros: 1) colonias tipo A (Fig. 2.3) secas o mucosa, de bordes dentados con muescas o festoneados, y de consistencia gomosa o elástica al ser tocadas con el ansa. 2) colonias de tipo B (Fig. 2.3) típicamente lisas, que se pueden retirar fácilmente con el ansa. Las cepas obtenidas a partir de clones de la colonia de tipo A pronto disociaron formando colonias tipo B. Algunas cepas tipo también produjeron colonias lisas levemente amarillas y difíciles

de calificar como positivo o negativo para la producción de pigmento amarillo. Resultado de esta experiencia se definió que una colonia típica puede ser identificada tentativamente como *E. sakazakii* por su aspecto en tripticasa de soja agar después de la incubación a 25 ° C durante 48 h, pero esta identificación debe ser confirmada por reacciones bioquímicas.

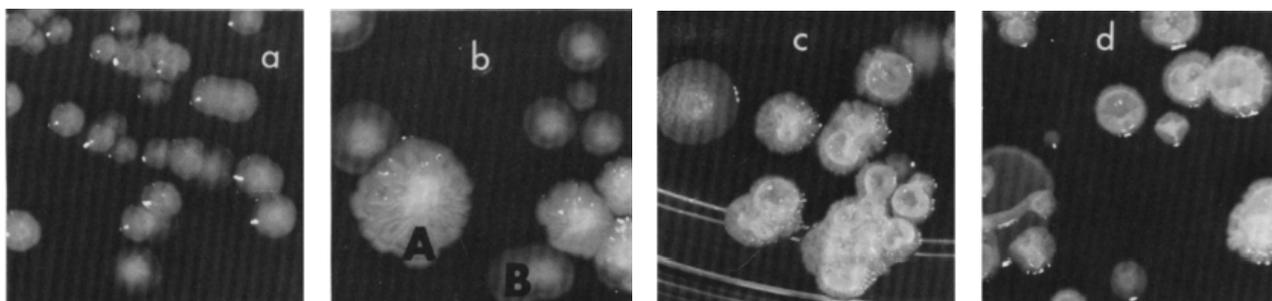


Figura 4.3. Diferencias en la morfología de las colonias (Agar tripticasa de soja incubado durante 48 h a 25 °C).

4.2. TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Las características bioquímicas más representativas del género *Cronobacter* reacciones negativas para oxidasa y positivas para catalasa. Estos microorganismos además, son capaces de: reducir el nitrato, utilizar citrato, hidrolizar la esculina y arginina, y descarboxilar oxidativamente la L-ornitina. En 1984, Muytjens y colaboradores analizaron los perfiles enzimáticos de *E. sakazakii* con la finalidad de encontrar un método más rápido de diferenciación producto de sus investigaciones lograron determinar que la actividad α -glucosidasa de este microorganismo lo diferenciaba del resto de Enterobacterias.

Según la más reciente clasificación propuesta por Iversen et al. (2008) los microorganismos del género *Cronobacter* son capaces de metabolizar una gran variedad de azúcares (D-glucosa, sacarosa, rafinosa, melibiosa, celobiosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, trehalosa, galacturonato y maltosa) con producción de ácido. Generalmente positivas para la producción de acetoina (prueba de Voges-Proskauer) y negativas para la prueba de rojo de metilo, lo que indica que ocurre producción de 2,3-butanodiol en lugar de la fermentación del ácido mixto. Son capaces de crecer, en caldo infusión cerebro corazón (CM1032, Oxoid), a temperaturas entre 6 y 45 °C y a valores de pH entre 5 y 10, inclusive, según lo medido por el Biolog fenotipo Microarray, sin crecimiento de a pH inferior a 4,5. También son capaces de crecer a una concentración constantemente de Cloruro de Sodio de hasta el 7% y pero no en 10% (w / v); hasta 100 mM de sulfato amonio, nitrato de sodio y el nitrito de sodio; y en 200 mM fosfato de Sodio, en un 5% de Sulfato de Sodio y un 20% etilenglicol. El crecimiento es inhibido a concentraciones superiores a 20 mM

de Benzoato de Sodio. Los siguientes compuestos pueden ser utilizados como únicas fuentes de carbono: D-glucosa, β -D-fructosa, D-galactosa, la trehalosa, D-manosa, α -melibiosa, sacarosa, rafinosa, maltotriosa, maltosa, α -lactose, 1-0-metil- α/β -galactopiranosido, celobiosa, β -gentiobiose, 1-0-metil- β -D-glucopiranosido, aesculina, L-arabinosa, D-xilosa, glicerina, D-manitol, L-malato, D-glucuronato, D-galacturonato, 2-ceto-D-gluconato, N-acetil-D-glucosamina, arbutina, DL- α -glicerol-fosfato, dihidroxiacetona, D-ribosa, L-lixosa, ácido pirúvico, D-gluconato, DL-lactato, succinato, fumarato, DL-glicerato, D-glucosamina, L-aspartato, L-glutamato, L-prolina, D-alanina, L-alanina y L-serina. Metabolizar los sustratos 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido; 4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido; 4-nitrofenil- α/β -D-glucopiranosido y 4-nitrofenil- α/β -D-galactopiranosido.

No son capaces de hidrolizar los siguientes compuestos: 4-nitrofenil- β -D-glucurónido, Ácido L-aspártico 4-nitroanilida. Las reacciones negativas incluyen la producción de sulfuro de hidrógeno, hidrólisis de la urea, descarboxilación de lisina y la actividad β -D-glucuronidasa. Los siguientes compuestos no se utilizan como única fuente de de carbono: L-sorbosa, α -L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, xilitol, D-tagatosa, D-sorbitol, adonitol, hidroxiquinolina- β - glucuronide, *i*-eritritol, 3-0-metil-D-glucopiranososa, D-sacarato, mucato, L-tartrato, D-tartrato, *meso*-tartrato, tricarbilato, 5-ceto-D-gluconato, L-triptófano, fenilacetato, protocatecuato, 4-hidroxibenzoato, quinato, gentisato, 3-hidroxibenzoato, benzoato, 3-fenilpropionato, *m*-coumarato, trigonelina, betaína, histamina, caprato, caprilato, L-histidina, glutarato, 5-aminovalerato, etanolamina, triptamina, itaconato, 3-hidroxibutirato, propionato, L-tirosina, α -cetoglutarato, piruvato de sodio, amigdalina, D-serina, D-treonina, inulina, L-alaninamida, laminarina, L-glucosa, L-homoserine, L-iso-leucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-valina, manano, tiramina, glucosa 1 - fosfato y glucosa 6-fosfato (Farmer et al. 1980.; Farmer 1999; Iversen et al, 2006, 2007, 2008). La utilización de melezitosa, malonato, dulcitol, *myo*-inositol, turanosa, *trans*-aconitato, *cis*-aconitato, maltitol, putrescina, lactulosa, 1-0-metil- α -D-glucopiranosido, palatinosa, adenosina, D-arabinosa, D-psicosa, formato, inosina, L-asparagina, L-glutamina, L-ramnosa, salicina, estaquiosa, timidina, uridina y 4-aminobutirato, y la producción de indol son variables. La Tabla 2.1 resume las principales características metabólicas que diferencian a *Cronobacter* spp. de otras enterobacterias.

El género *Cronobacter* esta compuestos por 5 especies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii* y *C. dublinensis*. La especie tipo es *Cronobacter sakazakii* y como mencionamos en el capítulo anterior ha sido implicada en casos de sepsis, meningitis y enterocolitis necrotizante en neonatos, dichos eventos se han asociado al consumo de FLID.

Tabla 4.1. Diferenciación bioquímica de *Cronobacter* y otras Enterobacteriaceae

	4-NP- α -Glc	VP	ADH	ODC	SAC	RAF	CEL	ARA	CIT	MR	ADO	SOR	LDC	H2S
<i>Cronobacter</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Buttiauxella agrestis</i>	v	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	-	-	v	+	v	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	v	-	v	v	v	+	v	+	-	+	-	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	-	-	v	+	+	v	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	v	+	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	+	v	+	+	-	+	+	+	v	-	-	-	-
<i>Enterobacter pyrinus</i>	v	v	-	+	+	-	+	+	-	v	-	-	+	-

<i>Enterobacter helveticus*</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter turicensis*</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	v	v	v	v	-	+	-	+	-	+	(+)	-
<i>Hafnia alvei</i>	(-)	(+)					(-)							
			-	+	-	-		+	-	v	-	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>Kluyvera spp.</i>									(+)					
	v	-	-	+	+	+	+	+		+	-	v	v	-
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	-	-	-	-	v	v	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>														(-)
	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
<i>Pantoea spp.</i>	-	v	-	-	v	v	v	+	v	v	-	v	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>														
	+	-	-	v		-	-	-	v	v	-	-	-	+
<i>Providencia spp.</i>	-	-	-	-	v	-	-	-	v	+	v	-	-	v
<i>Rahnella aquatilis</i>														
	-	-	v	-	+	+	+	+		-	-	+	-	-
<i>Raoultella terrigena</i>														
	-	+	-		(-)									
	-	+	-		+	+	+	+	v	v	+	+	+	-

Salmonella sv.				(+)				(+)					(+)	
	-	-	v		-	-	v		v	+	-	v		v
<i>Serratia</i>													(-)	
<i>marcescens</i>	v	+	-	+	+	-	-	-	+		v	+	+	-
<i>Yersinia</i>														
<i>enterocolitica</i>	-	-	-	+	+	-	v	+	-	+	-	+	-	-

4-NP- α -Glc: metabolismo del 4-NP- α -glucosido; **VP:** Voges-Proskauer; **ADH:** arginina dehidrolasa; **ODC:** ornitina decarboxilasa; **Formación de ácido a partir de SAC:** sacarosa, **RAF:** rafinosa; **CEL:** celobiosa; **ARA:** arabinosa **ADO:** adonitol; **SOR:** sorbitol; **CIT:** uso de citrato como única fuente de carbono (Simmon's); **LDC:** decarboxilación de lisina; **MR:** prueba del rojo de metilo; **H2S:** producción de sulfuro de hidrogeno. +, 90–100% positivo; (+), 80–90% positivo; v, 20–80% positive; (-), 10–20% positivo; -, menos del 10% positivo. Datos provenientes del estudio realizado por Iversen et al. (2007) y del Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition [25].

4.2.1. Descripción de *Cronobacter sakazakii* sp. nov.

Cronobacter sakazakii (sa.ka.za'ki.i. NL gen. N. sakazakii de Sakazaki, en honor del microbiólogo japonés Riichi Sakazaki).

Basonym: *Enterobacter sakazakii* Farmer et al. 1980.

Esta especie comprende los biogrupos 1-4, 7, 8, 11 y 13 descritos por Farmer et al., 1980 y dan un resultado positivo en pruebas para la utilización de putrescina, turanosa, maltitol, lactulosa, 1-0-metil- α -D-glucopiranosido, palatinosa, *cis*-aconitato y 4-aminobutirato. La utilización de *mio*-inositol es variable y un pequeño número de cepas (menos del 5%) pueden utilizar malonato. La cepa tipo es positiva para utilización de *mio*-inositol y negativa para la utilización de malonato.

La cepa tipo: ATCC 29544^T (=NCTC 11467^T), aislada originalmente de la garganta de un niño (Farmer et al., 1980). La relación G + C de las cepas de [*Enterobacter*] *sakazakii* 57 y 56.7 mol% (Farmer et al. 1980; http://genome.wustl.edu/pub/organism/Microbes/Enteric_Bacteria/Enterobacter_sakazakii/assembly/draft/Enterobacter_sakazakii-4.0/ASSEMBLY)

4.2.2. Descripción de *Cronobacter malonaticus* sp. nov.

Cronobacter malonaticus (mal.on.at.í'cus NL n. *malonas. atis* - malonato; L. suf. *-icus* sufijo utilizado en el sentido de relativo a; N.L. masc. adj. *malonaticus* relativo a la utilización de malonato).

Esta especie comprende a los biogrupos 5, 9 y 14 propuestos por Farmer et al. (1980). Se caracteriza por ser positiva para la utilización de malonato, lactulosa, 4-aminobutirato, maltitol, 1-O-metil α -D-glucopiranosido, turanosa, *trans*-aconitato, *cis*-aconitato y palatinosa. La utilización de putrescina y *mio*-inositol es variable. La cepa tipo es positiva para la utilización de putrescina y negativos para *mio*-inositol.

La cepa tipo: CDC 1058-77^T (=LMG 23826^T =DSM 18702^T), fue aislada originalmente a partir de un absceso mamario.

4.2.3. Descripción de *Cronobacter turicensis* sp. nov.

Cronobacter turicensis (tu.ri.cen'sis. L. masc. adj. *turicensis* relativo a Turicum, el nombre latino de Zúrich, debido a que la cepa tipo fue aislada en Zúrich, Suiza).

Esta especie deriva del biogrupo 16 de Farmer, tal como lo describe Iversen et al. (2006), y es positiva para la utilización de melezitosa, dulcitol, *mio*-inositol, turanosa, *cis*-aconitato, putrescina, maltitol, lactulosa, 1-O-metil- α -D-glucopiranosido, palatinosa, malonato y 4-aminobutirato.

La cepa tipo: z3032^T (=LMG 23827^T =DSM 18703^T), fue aislada de un hemocultivo durante un caso de meningitis neonatal ocurrida en Zúrich en 2005 (Essers et al. 2006).

4.2.4. Descripción de *Cronobacter muytjensii* sp. nov.

Cronobacter muytjensii (muy.tjen.si.i. NL gen. N. *muytjensii* de Muytjens, nombrado en honor de los holandeses microbiólogo Harry Muytjens, quien realizó gran parte de los primeros trabajos sobre [*Enterobacter*] *sakazakii*).

Comprende el biogrupo 15 como se describió previamente (Farmer et al., 1980). Esta especie produce de indol y utiliza de malonato, dulcitol, *mio*-inositol, putrescina, lactulosa y 4-aminobutirato. La utilización de turanosa, *trans*-aconitato, *cis*-aconitato y palatinosa es variable. La cepa tipo es positiva para la utilización de turanosa y palatinosa pero negativa para la utilización de *trans* y *cis*-aconitato.

La cepa tipo: ATCC 51329^T (=CIP 103581^T), fue originalmente depositada ambas colecciones por bioMérieux, La Balme-les-Grottes, Francia.

4.2.5. Descripción de *Cronobacter* sp. *dublinensis*. nov.

Cronobacter dublinensis (dub.lin.en'sis. NL masc. adj. *dublinensis* relativo a Dublín, Irlanda, el origen de la cepa tipo). Comprende los biogrupos 6, 10 y 12 descritos previamente por Farmer et al. (1980). Por lo general son positivas para la utilización de *trans*-aconitato, *cis*-aconitato, 1-0-metil- α -D-glucopiranosido, palatinosa y 4 aminobutirato. La utilización de melezitosa, malonato, *mio*-inositol, turanosa, maltitol, putrescina, lactulosa y la producción de indol son variables. La cepa tipo es resultado positivo en todas estas pruebas.

La cepa tipo: DES187^T (=LMG 23823^T =DSM 18705^T), fue aislada de una muestra ambiental proveniente de las instalaciones de una fábrica de leche en polvo en 2004. Esta cepa también ha sido referida como CFS237.

Tabla 4.2. Diferenciación bioquímica de la diferentes especies del género *Cronobacter*

	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Cronobacter malonaticus</i>	<i>Cronobacter turicensis</i>	<i>Cronobacter muytjensii</i>	<i>Cronobacter dublinensis</i>
Putrescina,	+	v (+)	+	+	v (+)
Turanosa	+	+	+	v (+)	v (+)
Maltitol	+	+	+	-	v (+)
Lactulosa	+	+	+	+	v (+)
Palatinosa	+	+	+	v (+)	+
<i>cis</i> -aconitato	+	+	+	v (-)	+
<i>trans</i> -aconitato	-	+	-	v (-)	+
<i>mio</i> -inositol	v (+)	v (-)	+	+	v (+)
4-aminobutirato	+	+	+	+	+
Melezitosa	-	-	+	-	v (+)
Indol	-	-	-	+	-
Malonato	i (-)	+	+	+	v (+)
Dicitol	-	-	+	+	-
1-0-metil α -D-glucopiranosido	+	+	+	-	+

4.2.6. Descripción de *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov.

Cronobacter dublinensis subsp. *dublinensis* (dub.lin.en'sis. N.L. masc. adj. *dublinensis* relativo a Dublín, Irlanda, origen de la cepa tipo). Esta subespecie corresponde al biogrupo 12 de Farmer (Farmer et al. 1980) y es positiva para la producción de indol y utilización de melezitosa, malonato, mioinositol, turanosa, *trans*-aconitato, *cis*-aconitato, maltitol, putrescina, lactulosa, 1-0-metil- α -D-glucopiranosido, palatinosa y 4 aminobutirato.

La cepa tipo es DES187^T (=DSM 23823^T =LMG 18705^T).

4.2.7. Descripción de *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov.

Cronobacter dublinensis subsp. *lausannensis* (lau.sann.en'sis. L. masc. adj. *lausannensis* relativo a Lausana, Suiza, origen de la cepa tipo para esta subespecie).

Esta subespecie se corresponde con el biogrupo 10 de Farmer (Farmer et al., 1980). Es positiva para la utilización de *trans*-aconitato, *cis*-aconitato, 1-0-metil- α -D-glucopiranosido, alatinosa y 4-aminobutirato. La producción de indol y la utilización de putrescina son variables, sin embargo el la cepa tipo es positiva para estas pruebas.

La cepa tipo: E515^T (=LMG 23824^T =DSM 18706^T), fue aislada originalmente a partir de la cuenca de una fuente de agua en 2004.

4.2.8. Descripción de *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov.

Cronobacter dublinensis subsp. *lactaridi* (lact.ar'id.i. L. n. lac *lactis* leche; L. adj. seca aridus; N.L. gen. n. lactaridi de leche en polvo). Esta subespecie corresponde al biogrupo 6 de Farmer (Farmer et al., 1980). Esta subespecie es positiva para la producción de indol y la utilización de *mio*-inositol, maltitol, *trans*-aconitato, *cis*-aconitato 1-0-metil- α -D-glucopiranosido, putrescina, lactulosa, 4-aminobutirato y palatinosa. La utilización de turanosa es variable, pero la cepa tipo es positiva para esta prueba.

La cepa tipo de esta subespecie, E464^T (=LMG 23825^T =DSM 18707^T), fue aislada originalmente a partir de una planta de producción de leche en polvo en 2003.

Tabla 4.3. Diferenciación bioquímica de la diferentes subespecies de *Cronobacter dublinensis*.

	<i>C. dublinensis</i> <i>subsp. dublinensis</i>	<i>C. dublinensis</i> <i>subsp.</i> <i>lausannensis</i>	<i>C. dublinensis</i> <i>subs. lactaridi</i>
Putrescina	+	v (+)	-
Turanosa	+	-	v (+)
Maltitol	+	-	+
Lactulosa	+	-	+
<i>mio</i> -inositol	+	-	+
melezitosa	+	-	-
indol	+	v (+)	+
malonato	+	-	-
1-0-metil α -D-glucopiranosido	+	+	+

4.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

4.3.1. Producción de indol

4.3.1.1. Introducción

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptofano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de Indol, Ácido Pirúvico y Amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies bacterianas.

4.3.1.2. Principio

La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs descrito más adelante. El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptofano.

4.3.1.3. Medios y reactivos

Caldo triptofano

Peptona o digerido pancreático de caseína. 2 g

Cloruro de sodio..... 0,5 g

Agua destilada100 ml

Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico o isoamílico150 ml

p-dimetilaminobenzaldehído10 g

HCl conc.50 ml

4.3.1.4. Procedimiento

Inocular el caldo triptofano con el microorganismo en estudio e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de reactivo por la pared interior del tubo.



Interpretación

El desarrollo de un color rojo intenso en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol y un resultado de la prueba positiva.

4.3.1.5. Controles

Positivo: *Escherichia coli*:

Negativo: *Klebsiella pneumoniae* (mayoría de las cepas)

4.3.2. Rojo de metilo - Voges-Proskauer (RM_VP)

4.3.2.1. Principio

Una de las características taxonómicas que se utilizan para identificar los diferentes géneros de enterobacterias lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa. Se conocen dos tipos generales: la fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente ácido láctico, acético y succínico, además de etanol, H₂ y CO₂. En la vía del butanodiol se forman cantidades menores de ácido (acetato y succinato) y los principales productos son el butanodiol, etanol, H₂ y CO₂.

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo de viraje entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido mixta.

El acetil-metil-carbinol (o acetoína) es un producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo. Este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo-fucsia

4.3.2.2. Medios y reactivos

Caldo RM/VP

Peptona..... 7 g

Glucosa..... 5 g

Fosfato dipotásico..... 5 g

Agua destilada..... 1 L

pH = 6,9 ± 0,1

Indicador de pH rojo de metilo

Rojo de metilo 0,1 g en 300 mL de etanol 95°

Agua destilada 200 ml

Revelador VP

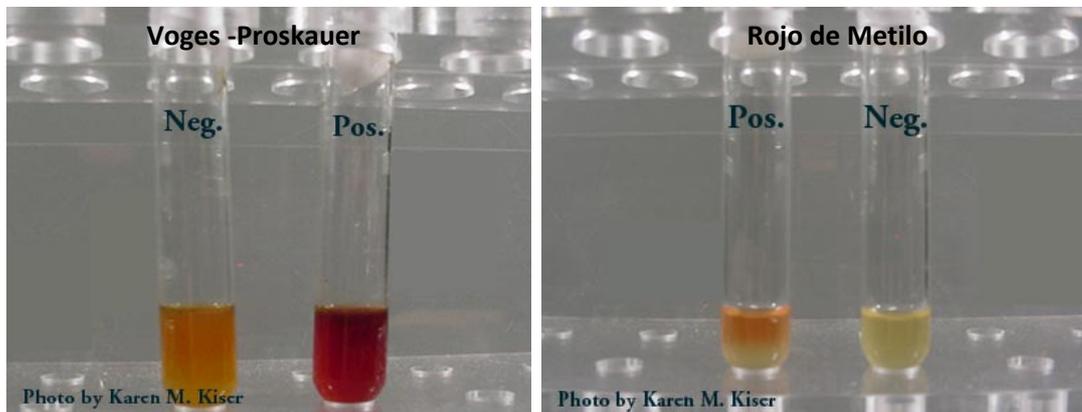
alfa-naftol (solución al 5% en etanol 95°)

Solución de KOH al 40% en agua destilada

4.3.2.3. Procedimiento

Inocular el caldo RM-VP con un cultivo puro de no más de 24 horas. Incubar a 35°C durante 48 horas. Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1 mL del caldo a un tubo limpio para VP. En el caldo restante revelar RM agregando unas 4 - 8 gotas del indicador rojo de metilo. Para revelar VP agregar 0,6 ml (10

gotas) de alfa-naftol al 5% y 1 gota de KOH al 40%. Agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 minutos.



4.3.2.4. Interpretación

La prueba RM es positiva si se desarrolla un color rojo estable. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador y que el microorganismo fermentó la glucosa por la vía de ácido mixta. Un color anaranjado, intermedio entre el rojo y el amarillo no es considerado como positivo.

La prueba VP es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia luego de 15 minutos, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína.

4.3.2.5. Controles

RM positivo, VP negativo: *Escherichia coli*

RM negativo, VP positivo: *Enterobacter aerogenes*

4.3.3. Producción de sulfuro de hidrogeno

4.3.3.1. Principio

El sulfuro de hidrogeno (SH_2) fue uno de los primeros productos metabólicos bacterianos en ser reconocido. La proteólisis de las proteínas produce aminoácidos libres, ciertas bacterias heterotróficas pueden liberar enzimáticamente azufre de los diversos aminoácido azufrados ($-\text{SH}$), produciendo H_2S gaseoso. Peptona cisterna, cistina, metionina y tiosulfato son fuentes de azufre, pero las diferentes especies bacterianas utilizan diferentes compuestos o aminoácidos azufrados para producir H_2S . Las enzimas responsables de esta

actividad son la cisteína desulfhidrasa y la tiosulfato reductasa. Los diferentes métodos utilizados para evidenciar la producción de SH₂ difieren en la fuente de sulfuro y las sales de metal (plomo, hierro, bismuto, etc.).

4.3.3.2. Medios y reactivos

Diferentes pruebas bioquímicas permiten evidenciar la formación Sulfuro de Hidrogeno, en el caso de las enterobacterias, en donde la producción de H₂S es abundante, los más utilizados son Triple azúcar hierro (TSI) lisina y hierro (LIA) Agar hierro de Kliger (KIA) y el medio denominado SIM por Sulfuro indol movilidad. Algunos medio de cultivo también permiten visualizar estas reacciones (agar Salmonella Shigella (SS), Hektoen, Agar Xilona Lisina Desoxicolato (XLD), Agar Desoxicolato Citrato (DCA).

Por su elevada sensibilidad, el uso de tiras de acetato de plomo asegura la detección de bajos niveles de H₂S. A continuación se describirán tres de los métodos utilizados para Enterbacterias LIA, TSI y SIM.

LIA		Cloruro de sodio 5 g
Peptona de gelatina 5g		Tiosulfato de Sodio 0,3 g
Extracto de levadura 3g		Rojo fenol.....0,024 g
Glucosa (dextrosa) 1g	KIA	Agar 12 g
L –lisina . HCl10g	extracto de carne 3 g	pH 7,4 ± 0,2
Citrato de amonio férrico 0g	extracto de levadura..... 3 g	
Tiosulfato de sodio 5H ₂ O 0,04g	peptona 15 g	SIM
Purpura de bromocresol0,02 g	peptona proteosa 5 g	peptona de caseína 20g
Agar15g	lactosa 10 g	peptona de carne6,1g
pH 6,7 ± 0,2	glucosa 1 g	sulfato de amonio ferroso . 12 H ₂ O0,2 g
	sulfato ferroso 7 H ₂ O 0,2 g	

Tiosulfato de sodio $\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g

Agar3,5 g

pH 7,3 \pm 0,2

4.3.3.4. Procedimiento

Para los se utilizan tubos con 4ml para el SIM y el PIA 8ml. La inoculación debe realizarse de una colonia aislada proveniente de un cultivo puro con la ayuda de una aguja de inoculación. En los medios en pico de flauta (LIA TSI KIA - 4 ml de medio/tubo) la inoculación será por estriado en la superficie y una punción de hasta 0,5 de profundidad. En los medios sin pico de flauta se realizara por una única punción. Incubación a 35 °C durante 18 – 24 horas.



4.3.3.5. Interpretación

Esta prueba permite determinar la producción de ácido sulfhídrico gaseoso a partir de aminoácidos azufrados, generando, en presencia de un sistema indicador, una reacción visible de color negro.

Positivo: cualquier ennegrecimiento del medio i) en el fondo ii) a lo largo de la línea de siembra se observa primero donde la fermentación ácida es máxima.

4.3.3.6. Controles

Positivo: *Salmonella choleraesuis* subesp. *arizonae*

Negativo: *Shigella flexneri* - *Echerichia coli*

Salmonella typhimurium

SH₂ (+) indol (-) movilidad (+)

Controles SIM *Shigella flexneri*

SH₂ (-) indol (-) movilidad (-)

Echerichia coli

SH₂ (-) indol (+) movilidad (+)

4.3.4. Utilización de citrato

4.3.4.1. Introducción

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de Enterobacterias.

4.3.4.2. Principio

La utilización de citrato como única fuente de carbono se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7,6.

4.3.4.3. Medios y reactivos

Azul de bromotimol0,08 g

Medio de Simmons

Agua destilada c.s.p.1 L

Fosfato diácido de amonio..... 1 g

pH = 6,9

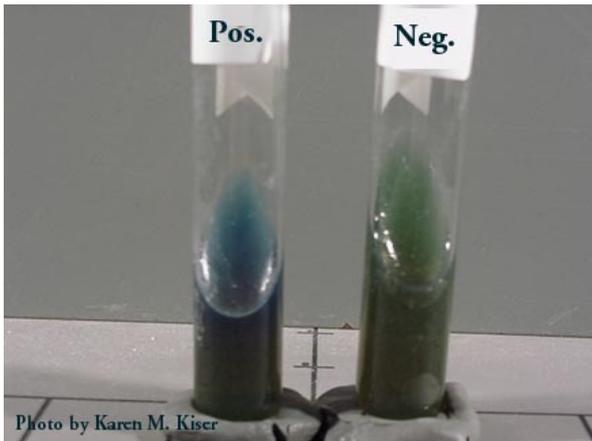
Fosfato dipotásico..... 1 g

Cloruro de sodio..... 5 g

Citrato de sodio2 g

Sulfato de magnesio..... 0,2 g

Agar15 g



4.3.4.4. Procedimiento

Se inocula la superficie del agar inclinado con una sola estría en el pico. Utilizar un cultivo de 24 horas en un medio sólido y cuidando no arrastrar medio de cultivo, ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo. Incubar a 35°C durante 4 días.

4.3.4.5. Interpretación

El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador al azul.

4.3.4.6. Controles

Positivo: *Klebsiella* spp.

Negativo: *E.coli*

4.3.5. Descarboxilación de lisina y ornitina

4.3.5.1. Principio

La descarboxilación de los aminoácidos es llevada a cabo por descarboxilasas y en estas reacciones se forman aminas y CO₂. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible. Los aminoácidos ensayados habitualmente para la identificación son lisina, ornitina y arginina.

El caldo descarboxilasa de Moeller es el medio base más comúnmente usado para la determinación de las descarboxilasas en enterobacterias. Se prepara un tubo con el medio conteniendo el aminoácido a ensayar y un tubo control con medio base sin aminoácido. Se cubren con una capa de aceite mineral (vaselina líquida) para hacer el medio anaerobio de manera que ocurra la fermentación de la glucosa que contiene. Durante las

primeras etapas de la incubación en ambos tubos se observará viraje del indicador de pH del medio al ácido, por la fermentación de la glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas que provocan un retorno al color original del medio o un viraje al alcalino.

4.3.5.2. Medios y reactivos

Base de Moeller

Peptona5 g

Extracto de carne5 g

Glucosa0,5 g

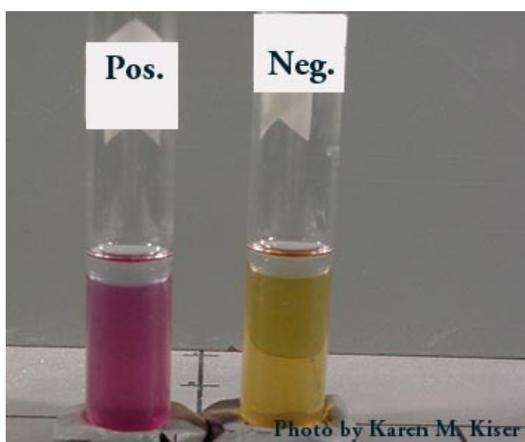
Piridoxal0,005 g

Púrpura de Bromocresol0,01 g

Rojo de cresol0,005 g

Agua destilada c.s.p.1 L

pH final = 6,0



4.3.5.3. Caldo Lisina u Ornitina de Moeller

Preparar igual al medio base y agregar 10 g del aminoácido (1% de concentración final de la forma *levo*, utilizar el doble si se usa la forma *dl* del aminoácido ya que solo la *levo* es activa). Agregar aceite mineral para formar una capa de 1 cm de espesor.

4.3.5.4. Procedimiento

Inocular con un cultivo puro de 24 horas un tubo de base de Moeller con el aminoácido a estudiar (lisina u ornitina) y un tubo de la base (control sin aminoácido). Incubar a 35°C durante 18 a 24 horas.

4.3.5.5. Interpretación

El ensayo puede ser leído si en el tubo control se observa crecimiento y viraje del indicador al amarillo indicando que se dio la fermentación de la glucosa y un descenso de pH que permite la activación de las descarboxilasas. El retorno al color azul-violeta en el tubo que contiene el aminoácido indica una reacción positiva debida a la liberación de aminas por descarboxilación.

4.3.5.6. Controles

Descarboxilación de lisina positiva: *Enterobacter aerogenes*

Descarboxilación de lisina negativa: *Enterobacter cloacae*

Descarboxilación de ornitina positiva: *Serratia spp*

Descarboxilación de ornitina negativa: *Klebsiella spp.*

4.3.6. Prueba del malonato

4.3.6.1. Principio

El ensayo pone en evidencia la capacidad de las bacterias de utilizar malonato como fuente de carbono. Las cantidades mínimas de glucosa del medio, permiten el desarrollo de organismos que no pueden usar malonato o sales de amonio, sin embargo esos organismos no pueden mantener un pH alcalino. La producción de ácido por la fermentación de la glucosa impide una posible alcalinización. Solamente los microorganismos que pueden usar simultáneamente malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno son capaces de ejercer una acción buffer produciendo hidróxido de sodio. El aumento de la alcalinidad resultante hace que el azul de bromotimol

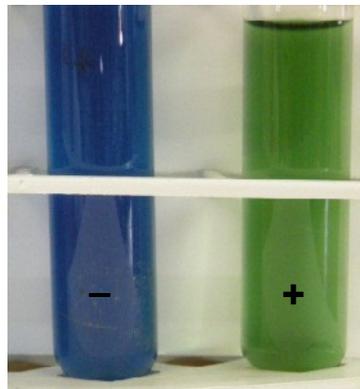
cambie de verde a azul. Los microorganismos malonato negativos que fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo. La mayoría de las especies de *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. utilizan malonato de sodio. El ensayo también sirve para separar *Salmonella enterica* subesp. *Arizonae* (+) de otras subespecies de *Salmonella* (-).

4.3.6.2. Procedimiento

Con un ansa estéril tomar material e inocular el medio. Incubar a 37°C por 24 a 48 horas. Reincubar los tubos negativos hasta 4 días, registrando los resultados día por día.

4.3.6.3. Materiales

Extracto de levadura1.0 gr
Sulfato de amonio2.0 gr
Fosfato dipotásico..... 0.6 gr
Fosfato monopotásico0.4 gr
Cloruro de sodio2.0 gr
Malonato de sodio3.0 gr
Glucosa0.25 gr
Azul de bromotimol (1/500)12.5 ml
Agua destilada c.s.p.1000 ml



Disolver en agua destilada, dispensar 3 ml en tubos con tapa a rosca y autoclavar a 121°C por 10 minutos. Enfriar antes de usar; el sustrato es estable por 2 a 3 meses. Rotular los tubos y guardar en heladera. Si hay cambio de color en el medio no usar.

4.3.6.4. Resultados

Ensayo positivo: reacción alcalina (azul).

Ensayo negativo: no hay cambio de color (verde).

Ensayo negativo: reacción ácida, sólo fermentación de glucosa (amarillo).

4.3.6.5. Control de Calidad

Positivo: *Enterobacter aerogenes*

Negativo: *Escherichia coli*

4.3.6.6. Consideraciones

1. Algunos organismos malonato (+) producen una ligera alcalinidad, que hace la interpretación difícil. Cuando hay duda comparar con un tubo sin inocular. Cualquier vestigio de color azul denota una prueba positiva luego de una incubación de 48 horas. No se debe hacer una interpretación final negativa hasta no haber incubado los tubos durante 48 horas.
2. A veces es necesario agregar extracto de levadura y glucosa para estimular el crecimiento de algunos organismos.
3. Algunas cepas malonato (-) dan color amarillo por la fermentación de la glucosa solamente. Esto produce una disminución del pH y el viraje del indicador al amarillo.

4.3.7. 4 NP- α -D-glucosidasa

Para demostrar la actividad α -D-glucosidasa Muytjens et al. (1984) agregaron 0,25 ml de una suspensión de *E. sakazakii* en solución salina (ajustada a una turbidez entre 5 – 6 grados McFarland) en dos tubos. Uno de ellos contenía una tableta de 300 μ g de p-nitrofenil- α -D-glucósido en 0,05 M de buffer fosfato (pH 8,0) (Rosco Diagnostica, Taastrup, Dinamarca). El otro fue utilizado como un control de color. Después de ser incubados a 36 ° C durante 4 horas observaron un color amarillo en el sobrenadante, originado por la liberación de nitrofenol, indicaron la presencia de la enzima α -glucosidasa.

En la actualidad existen kits comerciales que permiten la detección de esta enzima y también medios de cultivos agarizados cromogénicos, en los cuales, como veremos más adelante la capacidad diferencial se fundamenta en la detección de esta enzima.

4.3.8. Utilización de la Putrescina

La capacidad de catabolizar la putrescina en una reacción de transaminación catalizada por la putrescina aminotransferasa, con la conversión de putrescina y 2-oxoglutarato, en glutamato y 4-aminobutanal, los que espontáneamente ciclizan para formar 1-pirrolina. Esta enzima es capaz también de transaminar la cadaverina, y en menor grado, espermidina, pero no la ornitina.

4.3.9. Utilización del 4-aminobutirato

El 4-aminobutirato es un aminoácido no proteico de 4 carbonos altamente conservado en bacterias plantas y vertebrados. El catabolismo del 4-aminobutirato es una reacción de transaminación en la que el 4-aminobutirato y el 2-oxoglutarato se convierten en succinato-semialdehído y L-glutamato. Los genes que codifican para esta enzima putativa, conformada por 401 aminoácidos, se encuentran ubicados en locus ESA 04278. http://string-db.org/version_9_0/newstring.cgi/show_network_section.pl?identifier=290339.ESA_04278&all_channels_on=1

4.3.10. Utilización de Aconitato

Esta se realiza a merced de la enzima aconitato hidratasa, también conocida como aconitasa o citrato de hidrolasa. Incluye las aconitasas bacterianas y Arqueales, y la forma citosólica de la aconitasa eucariota. La presencia de esta enzima en *Cronobacter* spp. fue demostrada por Kucerova et al. 2010.

4.4. TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA

A diferencia de otras Enterobacterias, hasta la fecha el estudio de la variabilidad antigénica de estos microorganismos ha sido abordado desde una perspectiva puramente experimental, y en la actualidad no se disponen de metodologías que permitan la serotipificación

4.5. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Uno de los primeros reportes de la sensibilidad a antibióticos de *Cronobacter* spp. fue el realizado por Monroe & Tift (1979) quienes encontraron que estas especies, entonces

denominadas *Enterobacter cloacae* de pigmento amarillo, eran moderadamente susceptibles a: Amikacina, Ampicilina, Cefalotina, Gentamicina, Tetraciclina, Carbenicilina, Cloranfenicol, Kanamicina y Tobramicina. En 1980 Farmer y colaboradores, realizaron uno de los estudios pioneros cuyos resultados se presentan en la Tabla 2.3. Además encontraron que *E. sakazakii* exhibía una moderada susceptibilidad al cloramfenicol (MIC: 4 to 8 µg/ml) y ampicilina (MIC: 2 to 4 µg/ml), y que esta característica lo diferenciaba de *E. cloacae*.

Tabla 4.4. Patrones de sensibilidad a antibióticos de 24 cepas de *E. sakazakii* (tomado de Farmer et al. 1980).

Antibiótico	Medidas de la zona			% de aislamientos susceptibles
	Media	Desviación Estándar	Rango	
Colistin (10)*	11,6	1,4	8- 14	71
Ac. Nalidixico (30)	21,8	2,1	18-28	96
Sulfadiazina (250)	18,7	3,6	12-24	67
Gentamicina (10)	20,8	2,3	16-26	100
Streptomicina (10)	18,0	2,4	14-22	92

Kanamicina (30)	21,0	1,4	20-24	100
Tetraciclina (30)	20,3	1,2	18-22	87
Cloramfenicol (30)	23,4	2,1	22-30	100
Penicilina (10 U)	6,9	1,3	6-12	0
Ampicilina (10)	19,9	1,8	16-24	100
Carbenicilina (100)	25,4	2,3	22-30	87
Cefalotina (30)	12,9	2,2	8-18	13

Posteriormente Muytjens et al. (1984) compararon la susceptibilidad a antibióticos de *E. sakazakii* con las de otras Enterobacterias (VER ANEXO X.1) y encontraron que esta especie resultó ser la más sensible de todas las evaluadas. Nazarowec-White & Farber (1999) encontraron 4

patrones distintos de resistencia a antibióticos en 18 cepas de *E. sakazakii* evaluadas, y debido a la variabilidad en la resistencia a los antibióticos encontrada entre las diferentes colonias (clones de un aislamiento), concluyeron al igual que Clark et al.(1990) que la utilización de estudios de sensibilidad a antibiogramas resultan limitados en cuanto a su capacidad para la tipificación epidemiológica porque no permiten discriminar entre las cepas de *E. sakazakii*.

A pesar de que la resistencia a antibióticos, parece no ser una herramienta adecuada para la caracterización fenotípica de *Cronobacter* spp. Últimamente ha surgido interés al respecto debido a que es una preocupación creciente la aparición de cepas resistentes en la práctica clínica. La resistencia a antimicrobianos puede ser una característica *intrínseca* propiedad específica y su aparición precede al uso de los antibióticos, todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas. *Adquirida* que surge como resultado de la adaptación bacteriana tras uso de antibióticos y se detectan pruebas de sensibilidad. La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones y por la transmisión de material genético extra cromosómico procedente de otras bacterias. Existen tres mecanismos de resistencia, el primero de ellos es mediante un sistema de expulsión activa del antimicrobiano; el segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas) y el tercero es la producción de enzimas inactivantes de los antibióticos, de esta forma son inhibidos los aminoglucósidos,⁷ el cloranfenicol por la acetil transferasa,⁷ y el caso más típico, el de las beta lactamasas, para el grupo de los beta lactámico

Las Betalactamasas son enzimas que hidrolizan irreversiblemente el enlace amida del núcleo betalactámico de los antibióticos del mismo nombre, transformándolos en compuestos inactivos, incapaces de ejercer su acción antibiótica. La presencia de estas enzimas, además de tener gran importancia clínica, es utilizada como característica para la clasificación, detección y caracterización bacteriana. Por su espectro de acción pueden clasificarse en Penicilinasas (P), Cefalosporinasas (C) y de Amplio espectro (AE). Los genes que codifican para estas enzimas pueden ser de ubicación **cromosómica**, frecuentes y características de un género, especie o subespecie; o **extracromosómica**, de amplia distribución, surgen como resultado de una posible difusión intragénica o intergénica. Su síntesis puede ser **inducible**, si están codificadas por un gen no funcional por represión activa que se desreprime en presencia de inductor; o **constitutiva** si no requiere presencia de inductor, formándose enzima en cantidades constantes cuantitativa y cualitativamente. En general, las bacterias gram-negativas estas enzimas se encuentran retenidas en el espacio periplásmico. Su eficacia está en función de la capacidad de penetrar los sustratos. Basado en las características bioquímicas, físicas, espectro de hidrólisis y espectro de inhibición

Bush (1989) estableció 4 grupos: Grupo 1. Enzimas “serina”. Actividad preferente C. No inhibidas por clavulánico y sí por aztreonam. Grupo 2. Enzimas “serina”. Inhibidas por clavulánico, incluye 6 subgrupos; Grupo 3. Metaloenzimas. No inhibidas por clavulánico y Grupo 4 . Penicilinasas no inhibidas por clavulánico.

Pitout et al. (1997) encontraron que cepas salvajes de *E. sakazakii* eran capaces de producir β -lactamas del Tipo 1 de Bush en niveles bajos e inducibles; mientras que cepas mutantes no sólo incrementaron sus niveles de producción de estas β -lactamasas sino que además eran producidas de manera constitutiva, lo que se reflejó en la resistencia a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, excepto cefepime e imipenem.

En se dispone de sistemas automatizados de estudio de susceptibilidad, basados principalmente en técnicas de colorimetría, turbidimetría, fluorimetría y son capaces de detectar desarrollo bacteriano mucho antes que el laboratorista pueda detectar turbidez (Ferraro & Jorgensen 1999). Los microorganismos desarrollan en micropaneles que contienen diluciones seriadas del antimicrobiano, estableciendo la mínima concentración del antimicrobiano que es capaz de inhibir el desarrollo bacteriano

Tabla 4.5.- Sistemas automatizados para la identificación y estudio de susceptibilidad bacteriana clasificados según el método de detección, marca registrada y fabricante (tomado de García 2002).

Método de detección	Equipo	Fabricante
Colorimetría	Vitek®	bioMerieux
Turbidimetría	MicroScan® Unisept® Pasco® Sceptor® Phoenix®	Dade API DIFCO Becton Dickinson Becton Dickinson
Fluorimetría	Vitek 2® Sensititre® MicroScan Walk/Away®	bioMerieux Radiometer Dade

4.6. MÉTODOS RÁPIDOS

Se define como “método rápido” a cualquier método destinado a la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales. El desarrollo de métodos rápidos y automatizados constituye un área de la microbiología aplicada muy dinámica y en continua evolución. En las últimas cuatro décadas hubo

numerosos avances en el desarrollo de métodos rápidos. Desde hace 15 años este campo cobró gran importancia en investigación y particularmente en la industria de los alimentos.

Los métodos rápidos se basan en técnicas físico-químicas (películas de medios de cultivos deshidratados generales o selectivos, sistemas para determinar el número más probable, medios cromogénicos y fluorogénicos), bioquímicas (galerías miniaturizadas y automatizadas), inmunológicas (precipitación, aglutinación, inmunofluorescencia, citometría, radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo, inmunocromatografía, nefelometría, inmunomicroscopía) y moleculares (hibridación, PCR de punto final, PCR en tiempo real, ribotipificación, *microarrays*, *biochips*).

Desde la década del 70, el desarrollo y la implementación de los métodos rápidos para la identificación de microorganismos evolucionaron en paralelo con los adelantos en otras áreas de la investigación científica, en particular con la generalización del uso de galerías de pruebas bioquímicas miniaturizadas. A partir de la década del 80, el avance en la producción de anticuerpos monoclonales hizo posible el desarrollo de pruebas inmunológicas de identificación, como el ELISA o la inmunocromatografía. En 1990, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular comenzaron a utilizarse técnicas como la PCR, tanto para tamizaje como para la identificación de microorganismos y sus factores de virulencia. A partir del año 2000, comenzó el desarrollo de biosensores y en menor medida de *biochips* y *microarrays*. Cabe mencionar que estos últimos aún no se encuentran disponibles en el mercado. El crecimiento exponencial de los métodos rápidos aplicados a la microbiología de los alimentos puede evidenciarse en la gran cantidad de equipos comerciales que se ofrecen en la actualidad con el objetivo de tener resultados rápidos, en tiempo real, exactos y de bajo costo. Por ejemplo, como consecuencia de la automatización, el estudio de genotipos bacterianos pasó de ser un proceso tedioso y lento a un método práctico que se puede aplicar en los ensayos microbiológicos cotidianos (II Curso sobre métodos rápidos en microbiología de aguas y alimentos, 2008).

Los factores que justifican la utilización de métodos rápidos e impulsan su desarrollo son numerosos, entre ellos se pueden mencionar las presiones regulatorias, las modernas prácticas de producción y la complejidad analítica. Para hacer frente a las presiones regulatorias, la industria alimentaria debe utilizar métodos oficiales de referencia, como los recomendados por la ISO (*International Standards Organization*) y AOAC International (*Association of Official Analytical Chemists*), entre otras. Actualmente, algunos métodos rápidos son recomendados como técnicas de tamizaje por agencias regulatorias internacionales (USDA/FSIS MLG 5.04, 2008). En consecuencia, la oferta de métodos rápidos es cuantiosa. Sin embargo, se debe considerar que antes de la adopción de nuevos métodos por parte de la industria, estos deben tener constancia del proceso de

estandarización y validación ante entidades internacionales, o bien en instancias inter e intralaboratorio (Feldsine et al., 2002; OAA, 2003; NordVal, 2004; Trullols et al., 2004).

Algunos métodos para la detección de patógenos evolucionaron desde los análisis estándares realizados en el laboratorio, hacia análisis efectuados en tiempo real en la línea de producción. Esta tendencia hacia las pruebas en tiempo real, que surgió debido a la necesidad de ofrecer información de utilidad durante la operación de producción de alimentos se trata de un esfuerzo para superar en parte las deficiencias de los métodos convencionales, cuyos resultados no se pueden utilizar para controlar el proceso *in situ*. En el presente, la industria de alimentos basa la seguridad y calidad de sus productos en pruebas o medidas fuera de la línea de producción. Sin embargo, las nuevas tendencias hacen cada vez más necesaria la implementación de un sistema de medición continua y en tiempo real, que haga posible la intervención *in-line* u *on-line*. Las medidas de intervención *in-line* son aquellas que se efectúan directamente en la línea del proceso y las medidas de intervención *on-line* son aquellas que pueden efectuarse en un asa *by-pass* de la línea principal del proceso y que luego de la medida se retorna a la línea principal.

Desde una perspectiva futurista, el Dr. Daniel Fung, profesor de la Universidad de Kansas y uno de los mayores expertos sobre métodos rápidos aplicados a la microbiología de alimentos, propuso el siguiente escenario para los próximos años: 1) no se podrá reemplazar el recuento de microorganismos viables, 2) la supervisión de la higiene con métodos rápidos se efectuará en tiempo real, 3) las técnicas genotípicas serán habituales en los laboratorios de alimentos, 4) las pruebas inmunológicas serán automatizadas, 5) los resultados más rápidos se obtendrán con inmunocromatografía, 6) en los programas de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control o HACCP (su sigla en inglés) se utilizarán biosensores, 7) los patógenos se detectarán inmediatamente de forma computarizada, 8) se realizará la separación y la concentración eficaz de las bacterias buscadas, 9) se utilizará un sistema de alerta microbiológico en los envases de alimentos, 10) los consumidores tendrán dispositivos de alerta rápido para detectar patógenos en sus hogares (II Curso sobre métodos rápidos en microbiología de aguas y alimentos, 2008).

Como se puede deducir, el desarrollo de métodos rápidos está dirigido hacia las empresas productoras de alimentos en primera instancia y luego a los consumidores. Sin embargo, se debe considerar que para los organismos municipales, provinciales o nacionales responsables del control de los alimentos no es habitual el uso de métodos rápidos, sobre todo de métodos moleculares. Esto se debe a que actualmente la tendencia internacional de los organismos de control está orientada al aseguramiento de los programas de HACCP utilizados por las empresas productoras de alimentos y no al análisis microbiológico del producto final. Aunque en países como el nuestro,

donde la aplicación de este tipo de programas de control aún no es de cumplimiento obligatorio, no es posible asegurar que la oferta de alimentos en la boca de expendio provenga de empresas que utilizan programas HACCP. Es entonces cuando la utilización de los métodos rápidos puede agilizar y mejorar los resultados generados por los organismos de control. Sin embargo, también se debe considerar que para la utilización de los métodos rápidos, además de inversiones y operadores capacitados, se requieren políticas estatales de control tendientes a asegurar la calidad de los alimentos que consumimos.

Si pensamos en la Argentina, podemos hacernos la siguiente pregunta ¿el CAA contempla la utilización de métodos rápidos?

En los Artículos 1413 y 1414 se enumera una lista de métodos analíticos, quizás un tanto desactualizada para el avasallador avance del desarrollo de los cuantiosos métodos rápidos que constantemente se ofrecen en el mercado. Sin embargo, en la Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos (ANMAT) se considera que los métodos de laboratorio utilizados para la detección o recuento de microorganismos forman parte del criterio microbiológico. La elección del método a utilizar debe privilegiar a aquellos métodos estandarizados y de alta sensibilidad que hayan sido validados por organismos internacionales/nacionales de referencia. Asimismo, se reconoce que en los últimos años se produjeron avances significativos en el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección y la separación de microorganismos de los alimentos. En la mencionada Guía redactada en el año 2005 se deja constancia que el desarrollo de técnicas moleculares (PCR) e inmunológicas (ELISA) brinda ventajas sobre los métodos tradicionales, específicamente en lo que refiere a velocidad, pero su uso todavía no se ha generalizado.

4.6.1. ¿Porqué utilizar métodos rápidos?

Existen dos grandes razones que justifican la importancia de utilizar métodos rápidos en microbiología: a) rapidez y confiabilidad en la detección de una contaminación, y b) obtener alimentos seguros e inocuos. Además, y como se mencionó antes, son numerosos los factores que justifican la utilización de métodos rápidos e impulsan su desarrollo, entre ellos:

- **Presiones regulatorias.** Principalmente para la exportación de productos alimenticios, ya que se requiere seguridad y calidad de los productos terminados. Para la exportación de alimentos se requieren análisis oficiales, aunque muchas veces estas pruebas no son suficientes en cantidad y las empresas realizan un mayor número de análisis para comprobar la inocuidad y la calidad microbiológica de sus productos. En general, los análisis oficiales se realizan por métodos clásicos de referencia y los métodos rápidos se utilizan

para analizar una mayor cantidad de muestras en menor tiempo y por lo menos con la misma confiabilidad que los métodos de referencia.

- **Presiones de las modernas prácticas de producción.** La competencia en los mercados fuerza a las industrias a reducir costos, utilizar personal menos especializado y aplicar las prácticas logísticas del *just-in-time* y del *cero-stock*.

4.6.2. ¿Cuál es el mejor método rápido?

No existe el “mejor método rápido” ni va a existir en muchos años. Esto no quiere decir que los métodos rápidos actuales no sirvan, quiere decir que debemos considerar numerosas variables para escoger el método rápido conveniente. Entre estas variables podemos citar: a) el tipo de alimento que produce la empresa que lo va a implementar, b) la capacitación de los analistas, c) la decisión de la empresa para adoptar el método rápido (costos), d) la cantidad de análisis diarios, e) la utilización de equipamiento adicional, f) el tiempo que demora el método rápido hasta obtener el resultado, y g) la complejidad del análisis, entre otras variables.

Por lo tanto, es aconsejable efectuar análisis comparativos entre varios métodos rápidos para asegurar la selección del “mejor”. En la industria de los alimentos no es aceptable un método rápido que contemple la posibilidad de generar 1 falso resultado negativo, ya que el impacto de liberar un lote de alimento contaminado con un patógeno, y que este ocasione un brote de ETA, puede generar un gran costo para la salud pública con terribles consecuencias sobre la aceptación de la empresa elaboradora-comercializadora o marca comercial por parte de los consumidores. Por supuesto que estas consecuencias acarrearán grandes pérdidas económicas. En este contexto, debemos considerar el costo personal del responsable de la elección e implementación del método. Un falso resultado positivo, no tiene las consecuencias mencionadas, aunque sí tiene costos económicos para la empresa. Un falso resultado positivo debe ser confirmado y la confirmación puede demorar varios días. Durante este tiempo se producen costos de estacionamiento. Si el alimento debe conservarse congelado o refrigerado, este costo puede ser muy elevado.

4.6.3. ¿Cómo nos aseguramos que el método es confiable?

Una condición obligada a tener en cuenta cuando se selecciona un método rápido es que este tenga un certificado o comprobante de validación. En este comprobante, se deben detallar todos los parámetros evaluados. Asimismo, es de suma importancia realizar una validación en el laboratorio donde se va a implementar el método rápido antes de comenzar a utilizarlo.

La validación de un método consiste en comprobar su capacidad para proveer resultados aceptables respecto a un patrón de oro. Para cualquier laboratorio es importante saber que los métodos que usa generan resultados confiables. Confiables quiere decir en este caso equivalentes a los resultados que hubiéramos obtenido con un método de referencia (ISO, BAM, ICMSF, APHA, entre otros).

Existen dos tipos de procesos de validación:

- 1) Validación externa.** La validación externa debe hacerla una tercera parte independiente del laboratorio y del fabricante, como por ejemplo Organismos de Referencia (AOAC International, AFNOR-Francia, NordVal-Países Nórdicos, MicroVal-Unión Europea, Health Protection Branco-Canadá). De todas las organizaciones anteriores la AOAC es la que hasta el momento validó el mayor número de métodos. La validación de métodos de la AOAC es reconocida tanto en EE.UU. como en el resto del mundo incluyendo la mayor parte de los países de Europa. Es importante mencionar que cada organismo tiene su propio protocolo de validación, y que en el año 2003, como una iniciativa de la Unión Europea, se publicó un protocolo internacional de validación con el objeto de que todas las organizaciones y países aplicaran el mismo tipo de validación. Este protocolo es la Norma ISO 16140:2003 llamada "Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal: Protocolo para la validación de métodos alternativos"

- 2) Validación interna.** La validación interna la lleva cabo el propio laboratorio que quiere utilizar el método o bien aquel laboratorio que desarrolló un método alternativo para la detección, aislamiento o caracterización de patógenos para los cuales no existe un método rápido. También se puede realizar una validación interna cuando por necesidad de la empresa productora de alimentos se quiere utilizar una metodología internacional (por ejemplo USDA/FSIS MLG 5.04) y un método rápido que tiene una validación externa contrastada con la Norma ISO 16654 y no con USDA/FSIS MLG 5.04. Las Normas ISO y USDA/FSIS para *Salmonella* no tienen inconvenientes porque recomiendan el mismo enriquecimiento, pero en el ejemplo de *E. coli* O157:H7 el caldo de enriquecimiento y las condiciones de incubación son diferentes. El problema es que se necesita utilizar el enriquecimiento de USDA/FSIS MLG 5.04 y el tamizaje validado según ISO 16654. Es entonces cuando podemos recurrir a una validación interna utilizando un protocolo de validación internacional (AOAC, ISO, etc.) para asegurarnos que el tamizaje rápido es confiable al utilizarlo con otras condiciones de enriquecimiento. Esta validación interna

debe realizarla un laboratorio externo a la empresa productora de alimentos y a la empresa productora del tamizaje.

4.7. RECUENTO E IDENTIFICACION DE *Cronobacter* spp.

En el análisis de alimentos, el procedimiento tradicional de recuento de microorganismos se realiza según los siguientes pasos:

1. Homogeneización.
2. Realización de diluciones.
3. Siembra en un medio de cultivo sólido.
4. Incubación en condiciones de temperatura y atmósfera adecuadas.
5. Cuantificación manual de las colonias específicas.
6. Confirmación de las colonias mediante pruebas sencillas, en algunos casos.

Actualmente, se dispone de sistemas que permiten la automatización de algunas de dichas etapas, como por ejemplo:

- Diluidores gravimétricos que reducen los errores y el tiempo de la pesada.
- Aparatos para la preparación y el llenado automático de placas.
- Contadores automáticos de colonias.
- Medios de cultivo preparados.

Tal como recomienda la Norma BAM el análisis cuantitativo de una muestra sospechosa se realiza mediante la técnica del Número más Probable MPN (ver Manual BAM Manual, Apéndice 2; Most Probable Number Determination from Serial Dilutions). Esto se realiza calculando el NMP de células de *E. sakazakii* por gramo de muestras basados en el número de tubos de una dilución en los que la presencia de *E. sakazakii* fue confirmada.

4.8. MEDIOS DE CULTIVO

4.8.1. Agares cromogénicos

Los medios de cultivo se usan para el crecimiento, aislamiento y detección de los microorganismos. Normalmente contienen nutrientes como peptonas, aminoácidos, extracto de carne y extracto de levadura, también contienen minerales y vitaminas, inhibidores, agentes solidificantes los que son sólidos (fundamentalmente agar-agar), y sistemas de detección. Los sistemas de detección de los medios de cultivo convencionales pueden ser uno o varios

carbohidratos, aminoácidos o glicósidos, y en todos ellos un indicador que revela si se utilizó o no el sustrato. La incorporación en los medios de cultivo de sustratos fluorogénicos o cromogénicos, para la detección de actividades enzimáticas específicas de origen microbiano, permite una rápida detección e identificación de los microorganismos. Los sustratos cromogénicos son compuestos que actúan como sustratos de enzimas específicas y cambian de color debido a la acción de la enzima. Los que se utilizan actualmente son indolil derivados:

- 5-bromo-4-cloro-3-indolil. Color de azul turquesa a verde.
- 5-bromo-6-cloro-indolil. Color de púrpura a magenta.
- 6-cloro-3-indolil. Color de rosa a salmón.
- N-metilindoxil. Color verde.
- 5-bromo-3-indoxil. Color azul.
- 4-nitrofenil. Color amarillo.

Los derivados del indolil son hidrosolubles y resistentes al calor. La mayoría de ellos no difunden en las placas de agar.

Hasta el momento se han desarrollado medios de cultivo fluorogénicos o cromogénicos para: *E. coli* y coliformes, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *C. perfringens*, *Bifidobacterium* spp., *L. monocytogenes* y *B. cereus*.

A diferencia de la mayoría de los otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Cronobacter* spp. poseen la enzima α -glucosidasa, y esto es explotado como función de diagnóstico en los medios cromogénicos



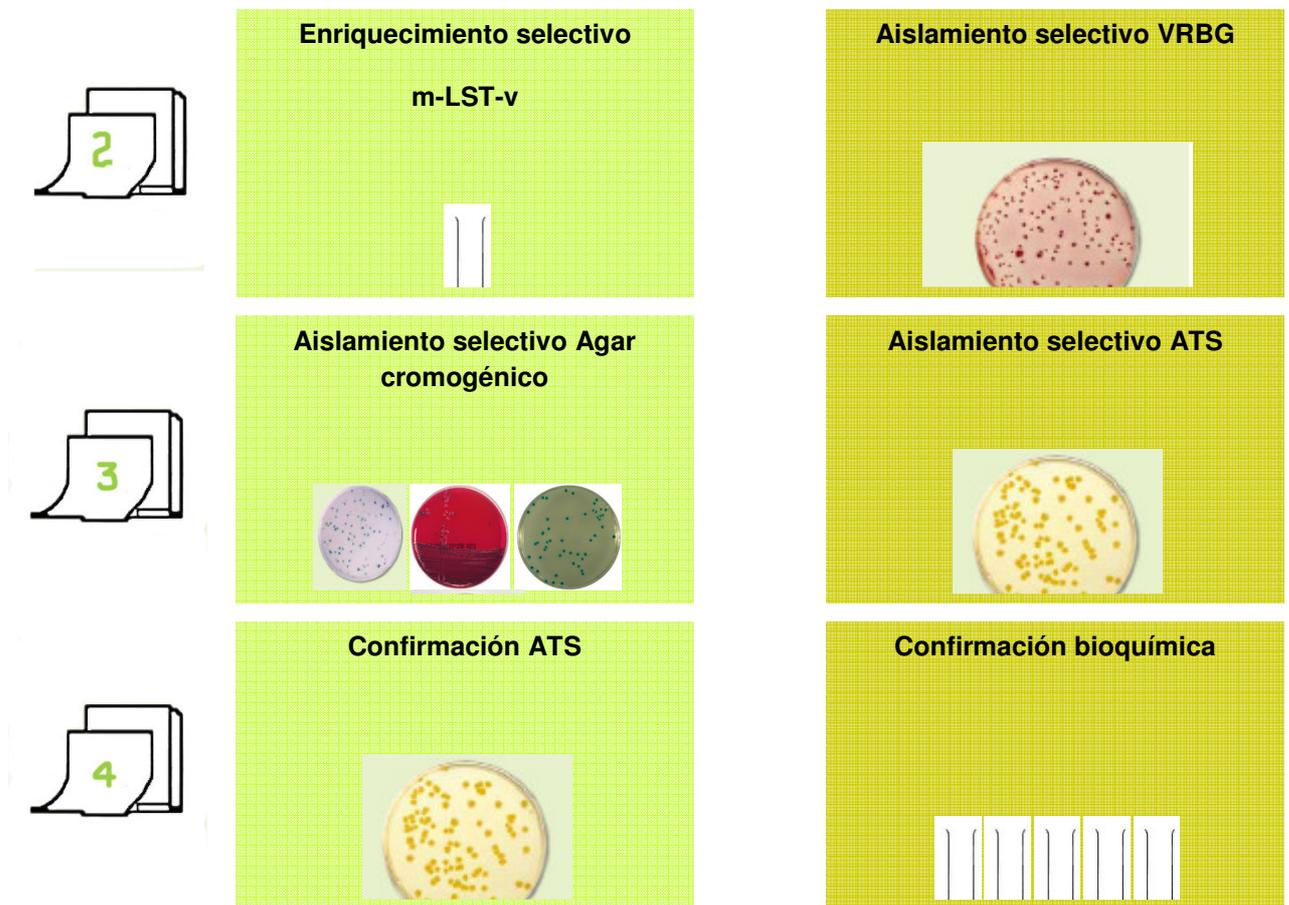


Figura 4.4. Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de *Cronobacter* spp.

Los estudios han demostrado que el 100% de *E. sakazakii* son positivos para la α -glucosidasa, (Muytjens et al. 1984). Sobre la base de estas observaciones, se ha propuesto el uso del 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido (X- α -glucósido) como sustrato cromogénico para diferenciar *Enterobacter sakazakii* de otros miembros de la Familia Enterobacteriaceae ya que es más fácil de utilizar que la 4-methylumbelliferone (MU α Glc) (Iversen et al. 2004; Guillaume-Gentil et al. 2005). La enzima α - glucosidasa hidroliza el X- α -glucósido y libera la aglicona 5-bromo-4-cloro-indolol, en presencia de oxígeno la aglicona es dimerizada formando el pigmento bromo-cloro-índigo.

El primer agar cromogénico comercialmente disponible para el aislamiento *Cronobacter* spp. fue el Agar Enterobacter Sakazakii (ESIA[®]) de AES Chemunex. La formulación ha sido publicada en la norma técnica ISO / TS 22964. Este medio tiene una concentración relativamente baja de peptona en comparación con el TSA. Contiene X α Glc, desoxicolato de sodio y cristal violeta como

agentes selectivos para inhibir el crecimiento de organismos Gram-positivos. También puede ser incubado a 45 °C para inhibir el crecimiento de Gram-negativos termotolerantes. Posteriormente se encontró que a pesar de ESIA[®] tiene una excelente especificidad, exhibe una cierta reducción en la sensibilidad para *Cronobacter* spp. ya que algunas cepas son inhibidas por cristal violeta y por la temperatura de incubación (45 °C). ESIA[®] es distribuido comercialmente por una variedad de fabricantes, en virtud a lo cual posee diversos nombres comerciales.

El Agar Druggan-Forsythe-Iversen (DFI), fue desarrollado por Oxoid en Julio de 2002 y se empezó a comercializarse en 2004, poco después del ESIA[®] en. La formulación ha sido publicada (Iversen et al., 2004b). Este medio no está sujeto a restricciones de marca o patente y se ha sido colocado en el mercado por numerosos fabricantes. El Agar DFI está basado en el Agar triptona bilis (Anderson y Baird-Parker 1975) utilizando ATS, como la base de nutrientes con el agregado de X α Glc y un sistema de detección de sulfuro de hidrógeno incluido para diferenciar a *Proteus* spp. que muestra una actividad α -glucosidasa débilmente positiva. Este medio se incuba a 37 °C para asegurar el crecimiento de cepas termosensibles de *Cronobacter* spp. Se ha observado que la elevada concentración de desoxicolato de sodio, en relación con otros medios, y el relativamente bajo nivel de cromógeno, junto con los azúcares endógenos en el medio de base, se combinan para reducir la sensibilidad de detección de algunas cepas raras de *Cronobacter* que son particularmente susceptibles a las sales biliares o que poseen una débil actividad α -glucosidasa. Se determinó que en varias cepas, el aumento de la temperatura de incubación por encima de los 37 °C es contraproducente, ejerciendo un efecto perjudicial sobre la producción de pigmento azul-verdoso.

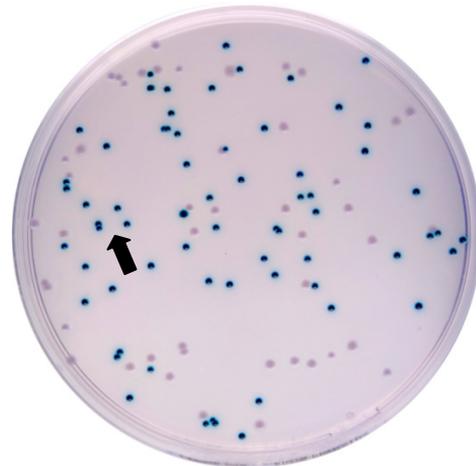
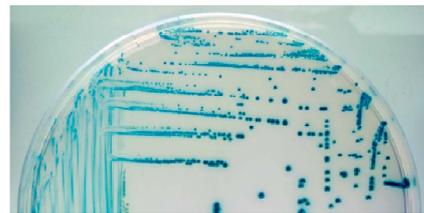
Las limitaciones de ambos agares ESIA y DFI[®] y condujeron al desarrollo del Agar modificado Druggan-Forsythe-Iversen (mDFI). Una de las debilidades del DFI se debe a que muchas cepas de *Cronobacter* spp. producen un pigmento amarillo en ATS, lo hacen también en DFI, entonces las colonias pueden observarse de color verde en lugar de azul-verdosas. La composición de la peptona del mDFI fue modificada para prevenir la formación de pigmento amarillo, la concentración de X α Glc fue aumentada en un 50% para detectar cepas de *Cronobacter* spp. débilmente α -glucosidasa positivas, y la concentración de desoxicolato de sodio se redujo para aumentar la sensibilidad del medio a las cepas de *Cronobacter* spp. sensibles a esta sustancia. La temperatura de incubación se incrementó a 42 °C y para este medio este aumento de la temperatura resultó ser beneficioso en términos de la mejora del crecimiento de las cepas de *Cronobacter* spp. y la inhibición de otras enterobacterias termosensibles.

4.8.1.1. Agar COMPASS (Biokar diagnostics)

Es un medio agarizado selectivo para la detección de *Enterobacter sakazakii* en leche en polvo, productos deshidratados y de materias primas de uso frecuente en las fórmulas infantiles.

Triptona
..... 7,0
g
Extracto de
Levadura..... 3,0 g
Cloruro de Sodio
..... 5,0 g
Desoxicolato de
Sodio..... 0,6 g
Cristal violeta
.....2,0 mg
5-bromo-4-cloro-3-indolil,α-D-
glucopyranosido....150,0 mg
Agar
.....
14,4 g

pH a 25°C : 7.0 ± 0.2.



La triptona de soja estimula el crecimiento de los microorganismos del género *Enterobacter*, el extracto de levadura es utilizado como fuente de vitaminas del complejo B. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. El desoxicolato de sodio, el cristal violeta y la temperatura de incubación (44 °C), contribuyen a la inhibición de la flora de fondo. X-α-glucósido asegura la revelación cromogénica de la actividad α-glucosidasa de *Enterobacter sakazakii*. En medios sólidos, estas bacterias colonias de color verde a verde azulado después de hidrólisis el sustrato.

Figura 4.5.- Aspecto de las colonias de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) en COMPASS Agar.

Microorganismos	Características de las colonias	Color
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Colonias de color azul verdoso	
<i>Escherichia coli</i>	Colonias de color gris a violeta	

Enterobacter spp., Klebsiella spp. Colonias de color Gris a violeta



Bacterias Gram (+)

Inhibidas

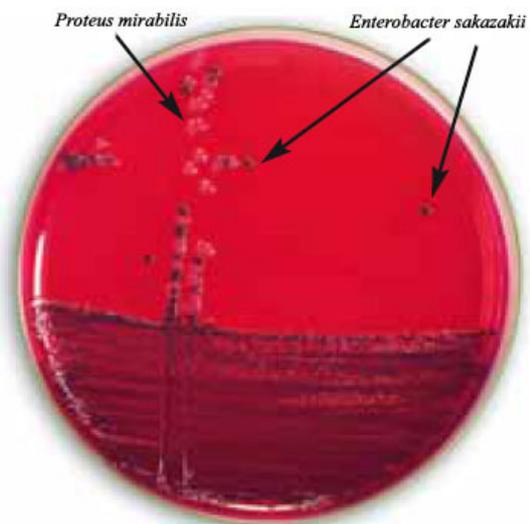
4.8.1.2. chromID™ Sakazakii Agar (Biomérieux)

chromID™ Agar *Sakazakii* se basa en la fórmula del medio de R & F *Enterobacter sakazakii* placas cromogénico (ESPM) descrito por Restaino et al. (laboratorios de I + F).

Elementos nutritivos (bovinos o porcinos)
 16,0 g
 Extracto de
 levadura..... 6,0 g
 Adonitol
 8,0 g
 Arabitol
 5,0 g
 Sorbitol
 10,0 g
 Cloruro de
 Sodio..... 5,0 g
 Agar.....
 14,0 g
 Indicador de color
 0,1 g
 Mezcla antibiótica
 2,0 ml
 Sustratos
 0,25 g

Proteus mirabilis

Enterobacter sakazakii



chromID™ Agar *Sakazakii* debe ser utilizado luego de un enriquecimiento en mLST + novobiocina (ISO/TS 22964:2006) o caldo EE (FDA / CFSAN: 2002). Este medio contiene dos sustratos

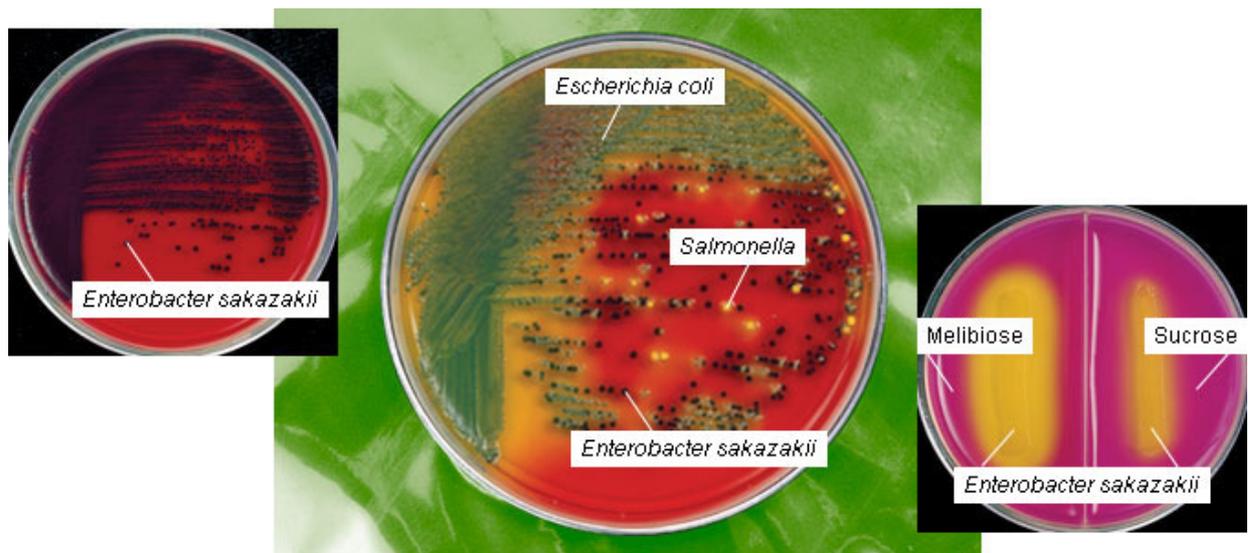
cromogénicos que revelan la actividad de dos enzimas la α - D - glucopiranosidasa y la β - D - cellobiosidasa. Los elementos nutritivos y fuentes carbono favorecen el crecimiento de las cepas de *E. sakazakii*, cuyas colonias desarrollan pigmentos vinculados con la hidrólisis de los sustratos observándose de color azul-grisáceo a azul-negrusco. Las sales biliares contribuyen a su selectividad y propiedades diferenciales. Los antibióticos (vancomicina, y cefsulodina) inhiben el crecimiento de la mayoría de bacterias Gram-positivas, levaduras algunas especies Gram-negativas. Las colonias típicas (azul-gris a azul-negro) son obtenidas luego de 24 horas de incubación. El aspecto característico de las colonias se mantiene durante un máximo de 48 horas luego de incubación. Por tanto, es posible realizar una sola lectura a las 48 horas. Este producto ha sido evaluado para su incubación a 35-37 ° C, así como a 41,5 ° C.

Las reacciones de color obtenido con el chromID™ Agar sakazakii se describen en la siguiente Tabla.

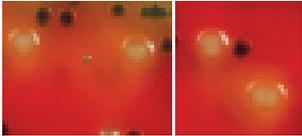
Azúcar o alcohol : Adonitol– arabitol y/o sorbitol	Sustratos: Glucósido y/o Celobiosido	Color obtenido en presencia de rojo de fenol	Orientación: género o especie
+	-	Amarillo	Enterobacteria sin actividad enzimática
+	+	Amarillo a Verde	Enterobacteria con al menos una enzima activa
-	+	Azul- grisáceo a azul negruzco, menos frecuentemente verde – negruzco*	<i>E. sakazakii</i>
-	-	Incoloro o con color proporcionado por la pigmentación de la cepa	Bacterias no fermentadoras

4.8.1.3. R&F® *Enterobacter Sakazakii* Chromogenic Plating Medium

Este es un medio selectivo y diferencial desarrollado por R&F laboratorios para la identificación de *Enterobacter sakazakii*, los fundamentos y características de selectividad han sido mencionados en el punto anterior.

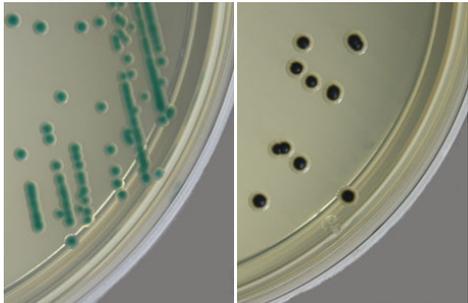


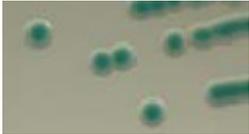
Las características más representativas de las colonias típicas de *C. sakazakii* y de otros microorganismos tras el cultivo en este agar cromogénico se describen en la siguiente tabla y se detallan en el ANEXO 2.

Organismo	Descripción	Foto	Color
<i>C. sakazakii</i>	Colonias de color negro azulado de 1-2 mm de diámetro		
<i>Escherichia coli</i> ,	Colonias de color verde con o sin precipitado verduzco		
<i>Salmonella spp.</i>	Colonias de color blanco amarillento 1-2 mm de diámetro. Con halos claros		

4.8.1.4. HardyCHROM™ sakazakii

Es un medio cromogénico recomendado para el aislamiento selectivo y diferenciación de *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. Está compuesto por peptonas extracto de levadura, una mezcla cromogénica, citrato férrico y agar.

	<i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Samonella sp.</i>
Peptona10,0 g	Agar 15,0g
Extracto de levadura 5,0 g	
Mixtura cromogénica 2,0 g	
Citrato Férrico 0,5g	

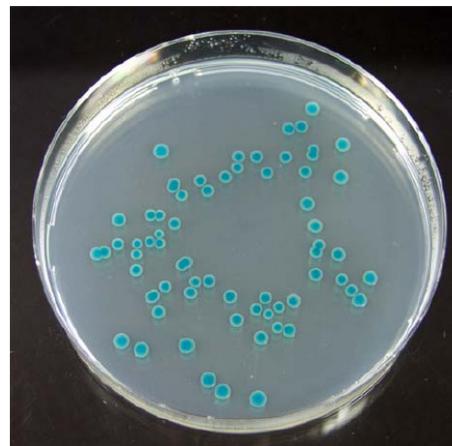
Organismo	Descripción	Foto	Color
<i>C. sakazakii</i>	Colonias de color turquesa		
<i>Salmonella spp.</i>	Colonias incoloras con o sin centro negro		
<i>Citrobacter spp.</i>	Colonias incoloras con o sin centro negro		
<i>Proteuss spp.</i>	Colonias doradas		

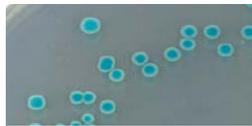
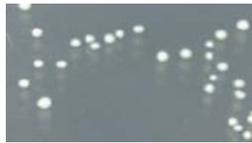
4.8.1.5. Chromocult® Agar (Merck)

Medio selectivo, desarrollado por Merck y recomendado por la norma ISO 22964, para la detección de *Enterobacter sakazakii* en la leche en polvo y leche maternizada en polvo. La base de

agar Chromocult® *Enterobacter sakazakii* permite un buen crecimiento y la formación de colonias fuertemente coloreadas. Las sales biliares y la temperatura de incubación de 44 ° C actúan como inhibidores de la flora gram-positiva y gram-negativa acompañante. Temperaturas superiores a 45 ° C se inhibe el crecimiento de *E. sakazakii*. Temperaturas inferiores a 43 ° C se reduce la inhibición de las bacterias acompañantes.

Peptona
..... 6,0 g
Cloruro de Sodio..... 5,0 g
Mezcla de sales biliares
..... 1,5 g
5- Bromo- 4 Cloro- 3 indolil α - D-
glucopiranosido.... 0,2 g
Agar.....
12,0 g



Organismo	Descripción	Foto	Color
<i>C. sakazakii</i>	Colonias de color azul turquesa		
<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteuss</i> <i>mirabilis</i>	Colonias blancas		
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i>	Sin crecimiento	-	-

4.8.1.6. AGAR *BRILLIANCE* ENTEROBACTER SAKAZAKII (DFI formulation) OXOID

El agar Brilliance™ Enterobacter sakazakii (DFI), desarrollado por Druggan, Forsythe & Iversen, fue el primer medio para incorporar un sustrato para esta la enzima 5 - bromo-4-cloro-3-indolil α -D-glucopiranosido (X- α -gluc). *Cronobacter* spp. hidroliza este cromógeno incoloro para producir colonias características de color azul / verde para la identificación presuntiva de la placa. El tiosulfato de Sodio y el citrato férrico de amonio (III) son incluidos para evidenciar la producción de sulfuro de hidrógeno característica de Enterobacterias, como Salmonella, que aparecen en gris / marrón. Mientras que el desoxicolato de sodio y el cristal violeta actúan inhibiendo el crecimiento de organismos Gram positivos.

Este agar es recomendado por la norma ISO / TS 22964:2006 para el aislamiento y detección de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) de leche y productos lácteos. También utiliza X- α -gluc como un medio para diferenciar a *Cronobacter* de enterobacterias,

Triptona	g
15,0 g	Agar15,0 g
Peptona de Soya	pH Final 7.3 \pm 0.2 a 25°C
5,0 g	
Cloruro de Sodio..... ..	
5,0 g	
Citrato Férrico de Amonio.....	
1,0 g	
Desoxicolato de Sodio	
1,0 g	
Tiosulfato de Sodio	
1,0 g	
Cromógeno	0,1



4.8.1.7. Agar cromogénico para el aislamiento de *Cronobacter* (CCI) (Oxoid)

Recientemente se ha desarrollado un agar Cromogénico para aislamiento y la detección de *Cronobacter* spp (CCI) en alimentos, piensos y muestras ambientales basado en la formulación del Agar brillante *Enterobacter sakazakii* (DFI). Optimización de peptonas reduce la producción de pigmento amarillo de *Cronobacter*, que puede alterar coloración de la colonia, y una mayor concentración de cromógeno mejora la detección de cepas de *Cronobacter* con débil actividad α -glucosidasa. *Proteus vulgaris* es también débilmente α -glucosidasa positivo y podría llegar a dar a las colonias de un color similares a las de *E. sakazakii*. Sin embargo, en este medio, *Proteus* spp. crecen formando colonias de color gris, producen sulfuro de hidrógeno en presencia de cloruro férrico formando sulfuro de hierro. El desoxicolato nuevamente actúa como inhibidor de Gram-positivos.

Triptona
7,0 g
Cloruro de Sodio.....
5,0 g
Citrato Férrico de Amonio.....
1,0 g
Desoxicolato de Sodio
0,25g
Tiosulfato de Sodio
1,0 g
Cromógeno
0,15 g
Agar13,2 g
pH Final 7.3 \pm 0.2 a 25°C

Controles Positivos

Resultados Esperados

<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 12868	colonias 1-2mm azul-verde
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC® 290041	colonias 1-2mm azul-verde

Cronobacter muytjensii ATCC® 51329* colonias 1-2mm azul-verde

Controles Negativos

Escherichia coli ATCC® 25922* colonias 0.25-1.5mm **straw**

Staphylococcus aureus ATCC® 25923* Inhibidas

4.8.1.8. Harlequin™ *Cronobacter sakazakii* Agar – DFI Formulation

(Druggan, Forsythe & Iversen)

El agar DFI para *Cronobacter sakazakii* fundamentos está basado en el desarrollo de Druggan, Forsythe & Iversen cuyo fundamento fue presentado en presentados en el punto anterior.

1.0 g
X- α -D-glucopiranosido
0.1 g
Agar 15.0 g

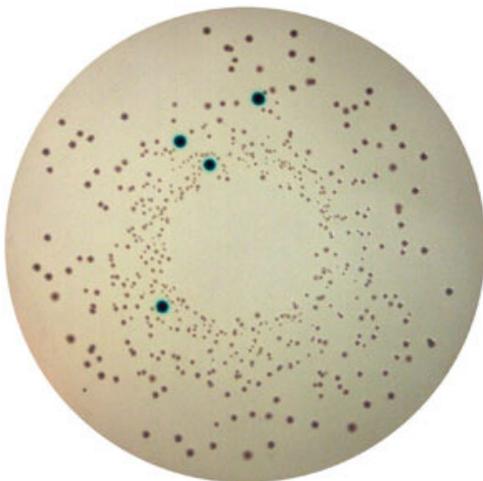
Triptona
.....15.0 g
Peptona de soja
5.0 g
Cloruro de Sodio
5.0 g
Citrato de Amonio Férrico
.....1.0 g
Desoxicolato de
Sodio.....1.0 g
Tiosulfato de Sodio



4.8.1.9. Harlequin™ CSIM *Cronobacter sakazakii* Isolation Medium (ISO) (LAB M)

El agar para aislamiento de *Cronobacter sakazakii*, comercializado por Harlequin™, también comparte fundamento de acción con el Agar cromogénico para el aislamiento de *Cronobacter* (CCI) (Oxoid).

Peptona pancreática de caseína	
7.0 g	
Extracto de levadura	3.0
g	
Cloruro de Sodio	5.0 g
Desoxicolato de Sodio	0.6
g	
5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-Glucosido	
....	0.15 g
Cristal violeta	0.002
g	
Agar	14.0 g



4.8.1.10. RAPID[®] sakazakii (laboratorios BioRad)

El principio de este medio se basa en la detección de una actividad enzimática específica común para todas las especies de *Cronobacter*. La hidrólisis del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indol-D-glucopiranosido conduce a la formación de colonias típicas de color turquesa. Otras bacterias pueden formar colonias de la luz violeta o gris. Quiring et al. (AÑO) calcularon la precisión relativa (96,8%), especificidad relativa (96,9%) y sensibilidad (96,7%) relativa de este método comparándolo con la metodología de propuesta por ISO/TS 22964.



4.8.2. Pruebas bioquímicas (sistemas comerciales)

Entre 1960 y 1970 predominó el desarrollo de galerías de pruebas miniaturizadas, particularmente para reducir el tiempo de preparación de las pruebas bioquímicas artesanales y estandarizar la lectura de los resultados. Estos métodos rápidos se basan en los mismos fundamentos de las pruebas bioquímicas artesanales pero se realizan en un formato de galerías plásticas constituidas por varios pocillos que contienen el sustrato de cada prueba bioquímica liofilizado. Este sustrato se rehidrata con una suspensión bacteriana y se incuba durante 24-48 h, dependiendo del equipo y del microorganismo. Luego de la incubación se leen los resultados, si es necesario se agregan reactivos específicos y se interpretan con una tabla o un programa informático. A continuación se describen las galerías rápidas y otros métodos automatizados que pueden ser utilizadas para la identificación de *Cronobacter* spp.

4.8.2.1. Galería API 20E (bioMeriéux)

La galería API20E es un sistema de identificación rápida basado en pruebas bioquímicas y diseñado para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias gram negativas. Consta de 21 pruebas

bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas, y de una base de datos. Este sistema es rápido, eficaz y permite realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo corresponde a una prueba bioquímica diferente. Las pruebas incluidas en API 20E son: β -galactosidasa (ONPG), arginina dehidrolasa (ADH), lisina decarboxilasa (LDC), ornitina decarboxilasa (ODC), citrato (CIT), SH₂ (H₂S), ureasa (URE), triptófano desaminasa (TDA), indol (IND), Voges-Proskauer (VP), gelatinasa (GEL), fermentación/oxidación de los siguientes hidratos de carbono: glucosa (GLU), manitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), ramnosa (RHA), sacarosa (SAC), melobiosa (MEL), amigdalina (AMY) y arabinosa (ARA). La prueba número 21 (citocromo oxidasa - OX) debe realizarse de forma independiente.

Materiales necesarios

- Mechero, ansas en punta y en anillo
- Estufa de cultivo a $35 \pm 2^\circ\text{C}$
- Cepas control
- Placas con el cultivo puro
- Escala de McFarland
- Pipetas Pasteur o micropipeta de 200 μl o 1000 μl
- Tips estériles de 200 μl o 1000 μl
- Aceite mineral estéril
- API 20E (incluye la solución salina de NaCl al 0,85%)
- Reactivos para revelar las pruebas IND, VP, TDA y OX (no provistos).

Procedimiento

Preparar una suspensión bacteriana en solución salina 0,85% a partir de una colonia de 2 a 3 mm de diámetro y bien aislada del microorganismo en estudio (escala #3 McFarland).

consta de un tubo y una cúpula. No se debe llenar la cúpula ya que es el receptáculo para el oxígeno requerido en las reacciones aerobias.

Llenar todos los microtubos o pocillos con 200 μl de la suspensión bacteriana. Cada pocillo

Llenar la cúpula de los pocillos CIT, VP y GEL

con la suspensión de bacterias. Cubrir con parafina

las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE, H2S para obtener anaerobiosis.

Colocar la galería en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente agregar agua destilada estéril en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.

Incubar a 37 °C durante 18-24 h.



Luego de la incubación se leen los resultados que no necesitan ser revelados. Las pruebas IND, VP y TDA deben ser reveladas teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- a. Si la glucosa es negativa y las pruebas positivas son dos o menos de dos, se descarta la posibilidad de que sea *Salmonella* spp., no añadir reactivos.
- b. Si la glucosa es positiva y tres o más pruebas son positivas revelar IND, VP y TDA de la siguiente manera:

TDA: añadir una gota de FeCl₃ 10 %.

VP: añadir una gota del reactivo 1 y una gota del reactivo 2.

IND: añadir una gota del reactivo de Kovacs (Dimetilamino-cinamaldehido)

Oxidasa: añadir una gota de reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

Interpretación

En la figura XX se observa la esquematización de los resultados positivos y negativos para esta prueba. La lectura de los resultados se lleva a cabo por cambios de color en cada pocillo según las tablas de lectura Ver tabla XX.



Figura 4.6.- Esquematización de los resultados posibles del sistema API 20 E.

Tabla 4.7.- Tabla de lectura para la interpretación del Sistema API 20E.

Prueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	β-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	Arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	Utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H2S	Producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	Ureasa	amarillo	rojo o naranja

TDA	Triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	Producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	Producción de acetoína (VP)	sin color	rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	F/O de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	F/O de manitol	azul o verde	amarillo
INO	F/O de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	F/O de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	F/O de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	F/O de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	F/O de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	F/O de amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	F/O de arabinosa	azul o verde	amarillo
OX	Citocromo oxidasa		

Los resultados se identifican como positivo o negativo. Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes (el pocillo 21 corresponde a la prueba de oxidasa).

Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le asigna un número de acuerdo a los siguientes criterios:

Reacción negativa: 0.

Reacción positiva: 1 si se trata del primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo pocillo y 4 si es el tercero.

Se suman los valores de cada triplete y con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras.

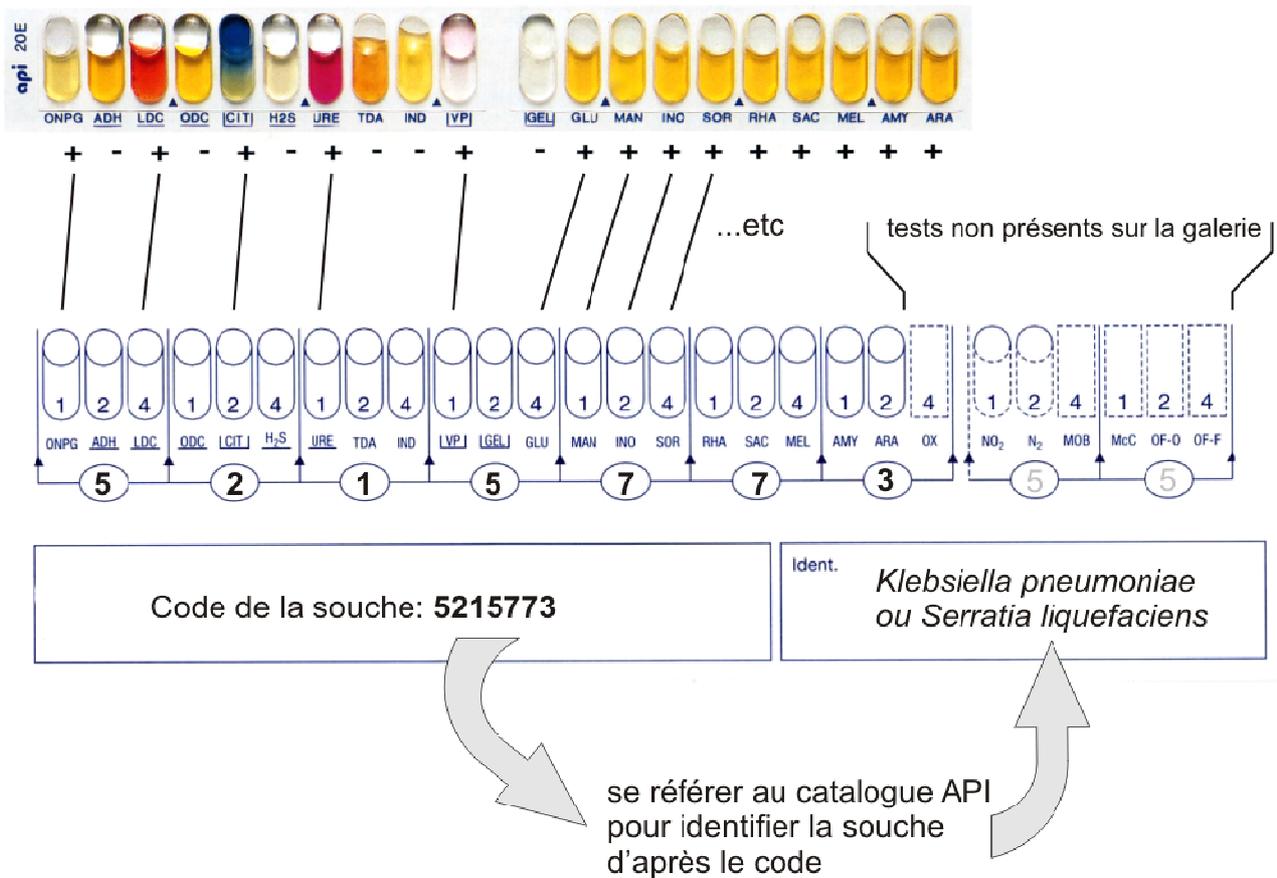


Figura 4.7.- Esquematzación de la lectura del sistema API 20 E.

Con este código se puede identificar la especie bacteriana en la tabla de identificación o bien en un programa informático.



Tabla 4.8.- Tabla de identificación para el Sistema API 20E.

Código	Microorganismo	Código	Microorganismo	Código	Microorganismo
0104140	<i>Shigella flexneri</i>	2206004	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5207323	<i>Serratia rubidae</i>
0104452	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	2504752	<i>Salmonella</i> spp.	5255573	<i>Klebsiella oxytoca</i>
0104504	<i>Pasteurella multocida</i>	3005573	<i>Enterobacter cloacae</i>	5346761	<i>Serratia marcescens</i>
0104521	<i>Yersinia enterocolitica</i>	3246527	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	5314173	<i>Enterobacter gergoviae</i>
0140004	<i>Pasteurella multocida</i>	4004550	<i>Salmonella cholerasuis</i>	5317761	<i>Serratia marcescens</i>
0144042	<i>Shigella boydii</i>	4004550	<i>Salmonella Typhi</i>	5704412	<i>Salmonella arizonae</i>
0206042	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	4104100	<i>Salmonella Gallinarum</i>	5704552	<i>Salmonella arizonae</i>
0210004	<i>Achromobacter sp.</i>	4357106	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	6004540	<i>Salmonella Typhi</i>
0210004	<i>Alcaligenes faecalis</i>	4404112	<i>Salmonella Gallinarum</i>	6144204	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
0210004	<i>Alcaligenes sp.</i>	4404510	<i>Salmonella Cholerasuis</i>	6404112	<i>Salmonella</i> spp.
0314000	<i>Proteus mirabilis</i>	4404540	<i>Salmonella Typhi</i>	6504750	<i>Salmonella</i> spp.
0504512	<i>Salmonella Paratyphi A</i>	4504010	<i>Salmonella Pullorum</i>	6604512	<i>Salmonella</i> spp.
0676001	<i>Proteus vulgaris</i>	4604552	<i>Salmonella</i> spp.	6704342	<i>Salmonella</i> spp.
0776000	<i>Proteus mirabilis</i>	4704500	<i>Salmonella Cholerasuis</i>	6704532	<i>Salmonella</i> spp
1000004	<i>Pasteurella sp.</i>	5004024	<i>Pseudomonas cepacea</i>	6704752	<i>Salmonella Gallinarum</i>
1014743	<i>Klebsiella ozaenae</i>	5044124	<i>Vibrio cholerae</i>	7244126	<i>Aeromonas hydrophila</i>

1104112	<i>Shigella sonnei</i>	5046753	<i>Serratia odorifera</i>	7305773	<i>Enterobacter cloacae</i>
1214012	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	5100100	<i>Yersinia ruckeri</i>	7704752	<i>Salmonella arizonae</i>
1214773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5104111	<i>Hafnia alvei</i>	7704752	<i>Salmonella</i> spp.
5104542	<i>Salmonella arizonae</i>	5144572	<i>Escherichia coli</i>		

4.8.2.2. API® / ID 32 E (BioMerieux-Francia)

API 20E fue el primer sistema de identificación en ser desarrollado por BioMerieux, posteriormente, en colaboración con los principales centros de referencia internacional en los Estados Unidos, Japón, Australia y Europa se creó el sistema **API® / ID 32**. Estas galerías permiten realizar las pruebas de identificación en 18 a 24 horas con la gama ID 32, o en 4 horas con las galerías rapid ID 32. Estas versiones automáticas de las galerías API comprenden 32 pruebas bioquímicas optimizadas y altamente discriminantes. Ambas galerías están asociadas con una amplia base de datos, regularmente actualizada en función de la evolución de los conocimientos en el campo de la identificación bacteriana a nivel internacional.



El ID 32 E es la versión automatizada y optimizada del API20E que permite la identificación de 103 taxa (*Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, no-enterobacteria) provee resultados en tan solo 18-24 h. Mientras que el

4.8.2.3. RapID ONE System-Remel

El sistema RapID™ ONE de REMEL es un micrométodo cualitativo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros microorganismos gram negativos y oxidasa negativos. Este sistema está formado por paneles RapID ONE y reactivos RapID ONE. Cada panel consta de varios pocillos de reacción moldeados en la periferia de una bandeja de plástico desechable. Los pocillos de reacción contienen reactivos deshidratados y la bandeja permite la inoculación simultánea de cada uno de ellos con una cantidad predeterminada de inóculo. Después de incubar el panel, se examina cada pocillo y se observa cambios de color. Con el conjunto de resultados se genera un patrón numérico que se utiliza para identificar el aislamiento en estudio. Cada patrón es comparado con datos pre-existentes en una base de datos o mediante la utilización de un programa informático. Las pruebas realizadas en el sistema RapID ONE se basan en la utilización de sustratos específicos por parte del cultivo en estudio, los que son detectados por diferentes sistemas indicadores. Los reactivos utilizados son una combinación de pruebas convencionales y pruebas cromogénicas de monosustrato. Cada equipo comercial incluye 20 paneles RapID ONE, 20 formularios de resultados, 1 frasco por 15 ml de reactivo RapID ONE (p-dimetilaminocinamaldehído 0,06 g/L) y 2 bandejas de incubación de cartón.

Material es necesarios

- RapID ONE System.
- Mechero, ansas en punta y en anillo.
- Placas con el cultivo puro.
- Estufa de cultivo a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Escala de McFarland
- Cepas control
- Pipetas Pasteur o micropipeta de 200 μl o 1000 μl .
- Tips estériles de 200 μl o 1000 μl .
- Líquido de inoculación RapID (2ml/tubo): KCl 6 g/L, CaCl₂ 0,5 g/L, agua desmineralizada 1L.
- Reactivo RapID Spot Indole (15ml/frasco): p-dimetilaminocinamaldehído 10 g/L, HCl 100 g/L, agua desmineralizada 900 ml.
- Reactivos para realizar la prueba de oxidasa



- Compendio de códigos RapID™ ONE (Nº de cat. REMEL 8326006) o ERIC® (Compendio electrónico RapID™, Nº de cat. REMEL 8323600).

A continuación se presenta la Tabla 1 del manual de instrucciones del equipo RapID ONE System-Remel

Tabla 4.10.- Principios y componentes del sistema RapID™ ONE

Nº de pocillo	Código de la prueba	Ingredientes de los reactivos	Cantidad	Principio
1	URE	Urea	0,25%	La hidrólisis de la urea da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH y cambian el indicador.
2	ADH	Argirina	1,0%	La hidrólisis del sustrato aminoácido da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH y cambian el indicador.
3	ODC	Ornitina	1,0%	
4	LDC	Lisina	1,0%	
5	TE ⁺	Tiol alifático	0,2%	La utilización del compuesto de tiol da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.
6	LIP	Éster de ácido graso	1,0%	La hidrólisis del ácido graso da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.
7	KSF	Aldehído de azúcar	1,0%	La utilización del hidrato de carbono como sustrato da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.
8	SBL	Sorbitol	1,0%	
9	GUR	o-nitrofenil-β-D-glucuronida	0,1%	La hidrólisis enzimática de glucósido incoloro aril-sustituido o fosfoéster libera o- o p-nitrofenil amarillo.
10	ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactósido	0,1%	
11	βGLU	o-nitrofenil-β-D-glucósido	0,1%	
12	βXYL	o-nitrofenil-β-D-xilósido	0,1%	
13	NAG	o-nitrofenil n acetil β-D glucosamida	0,1%	
14	MAL	Malonato	0,5%	La utilización del malonato da lugar a productos alcalinos que aumentan el pH e inducen el cambio del indicador.
15	PRO	Prolina-β-naftilamida	0,1%	La hidrólisis enzimática de sustrato de arilamida libera β-naftilamina que se detecta con el reactivo RapID™ ONE.
16	GGT	γ-glutamil-β-naftilamida	0,1%	
17	PYR	Pirrolidoni-β-naftilamida	0,1%	
18	ADON	Adonitol	1,0%	La utilización del hidrato de carbono como sustrato da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.
18	IND	Triptófano	0,4%	La utilización de triptófano da lugar a la formación de indol, que se detecta con el reactivo RapID™ Spot Indole.

Procedimiento Preparación del inóculo.

Se debe partir de un cultivo puro chequeado previamente por coloración de Gram y oxidasa. El sistema RapID ONE está diseñado solo para microorganismos Gram negativos y oxidasa negativos. Se recomienda utilizar los siguientes medios de cultivo para sembrar el aislamiento: ATS, agar sangre, HE, agar MacConkey, EMB, agar eosina azul de metileno (EMB), agar desoxicolato, agar Salmonella-Shigella (SS). Las placas para la preparación del inóculo deben tener 18 a 24 h.

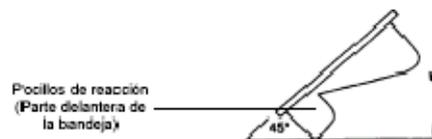
1. Colectar y resuspender el cultivo en estudio con un hisopo de algodón o un ansa en el líquido de inoculación RapID (2ml) para conseguir una turbidez visual igual a la del estándar de turbidez Nº2 de Mc Farland o equivalente.

Las suspensiones con una turbidez menor que el estándar N°2 de McFarland provocarán reacciones anómalas, las suspensiones ligeramente más turbias no afectarán al desempeño de la prueba. Sin embargo, las suspensiones muy turbias comprometerán el desempeño de la prueba.

2. Mezclar con vórtex y dejar reposar durante 15 min.
3. Incubar la placa durante un período de al menos 18 a 24 h a una temperatura de 35 a 37°C.

Inoculación de los paneles Rapid ONE

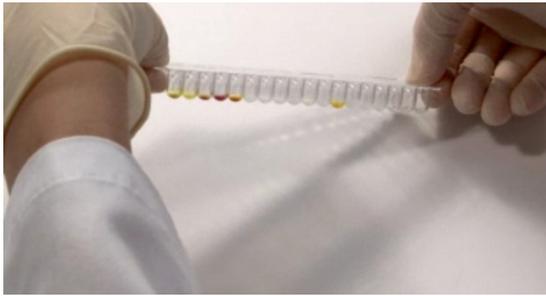
1. Abrir la tapa del panel desde la pestaña marcada "Peel to Inoculate" hacia arriba y hacia la izquierda. Si es necesario, golpear con suavidad el panel sobre la mesa para eliminar el aire atrapado en los pocillos.
2. Transferir suavemente el contenido de todo el tubo de líquido de inoculación a la esquina superior derecha del panel. Volver a sellar el acceso de inoculación del panel, presionando la pestaña de apertura para que vuelva a su posición original.
3. Inclinar el panel hacia el lado contrario a los pocillos de reacción, en un ángulo de 45°



4. Mecer suavemente el panel de lado a lado para distribuir el inóculo a lo largo de las depresiones posteriores.



5. Inclinar lentamente el panel hacia delante, hacia los pocillos de reacción, hasta que el inóculo fluya a lo largo de las depresiones de los pocillos de reacción. De esta manera, todo el inóculo de la parte posterior del panel será evacuado.



Incubación de los paneles Rapid ONE

Incubar los paneles a una temperatura de 35-37°C durante 4 h. Para facilitar la manipulación, los paneles se pueden incubar en las bandejas de incubación de cartón que se incluyen en el estuche.

Puntuación de los paneles Rapid ONE

Los paneles contienen 18 pocillos de reacción que proporcionan 19 puntuaciones de prueba. El pocillo de prueba 18 contiene 2 pruebas independientes. Para interpretar los resultados de este pocillo, primero se lee el resultado, se asigna una puntuación, luego se agrega el reactivo Rapid Spot Indole que origina otro resultado y por ende una nueva puntuación. Los pocillos 15 al 17 requieren el reactivo Rapid ONE y aparecen designados mediante un recuadro que los rodea.

1. Retirar la tapa que cubre los pocillos de reacción.
2. Añadir 2 gotas del reactivo Rapid ONE a los pocillos del 15 (PRO) al 17 (PYR)
3. Leer y asignar puntuación a los pocillos 1 (URE) al 18(ADON) de izquierda a derecha, usando la guía de interpretación que se incluye en la Tabla 2 del manual de instrucciones. Registrar las puntuaciones de las pruebas en los recuadros adecuados del formulario de resultados, usando el código de prueba.

4. Añadir 2 gotas del reactivo RapID Spot Indole al pocillo 18 (ADON/IND). No utilizar reactivos de Kovac o Ehrlich porque no proveen resultados satisfactorios.



5. Dejar 10 seg. a 2 min. como máximo para que desarrolle el color.



6. Leer y puntuar el pocillo de prueba 18 (IND). Registrar la puntuación en el recuadro adecuado del formulario de resultados.

7. Consultar el microcódigo obtenido en el formulario de resultados del Compendio de códigos RapID ONE o ERIC (Compendio electrónico RapID) para la identificación.

RapID™ STAPH PLUS Color Guide

Test	Código	Reacción Positiva	Reacción Negativa
Test	Código	Reacción Positiva	Reacción Negativa
Test	Código	Reacción Positiva	Reacción Negativa
Test	Código	Reacción Positiva	Reacción Negativa
ADH	1	●●●●●	○
ODC	2	●●●●●	○
IP	3	●●●●●	○
DUC	4	●●●●●	○
MAHO	5	●●●●●	○
PO ₂	6	●●●●●	○
UGU	7	●●●●●	○
USU	8	●●●●●	○
CMPO	9	●●●●●	○
CLB	10	●●●●●	○
NAGA	11	●●●●●	○
URE	12	●●●●●	○
PVR	13	●●●●●	○
ARG	14	●●●●●	○
ALJ	15	●●●●●	○
LEU	16	●●●●●	○
LSI	17	●●●●●	○
NIT	18	●●●●●	○

remel
Rapid STAPH PLUS
www.remel.com



Tabla 4.11. Interpretación de las pruebas del sistema RapID™ ONE

Nº de pocillo	Código de la prueba	Reactivo	Reacción		Comentario
			Positivo	Negativo	
1	URE	Ninguno	Rojo o violeta	Amarillo o naranja	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color rojo o violeta bien definido.
2	ADH	Ninguno	Morado intenso o azul	Amarillo, gris, pajizo o amarillo-verde	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color morado intenso o azul bien definido. Los matices de amarillo, gris, pajizo, marrón o verde se deben puntuar como negativos.
3	ODC				
4	LDC				
5	TET	Ninguno	Amarillo	Rojo o naranja	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo bien definido en todo el pocillo. No se debe interpretar como positivo la existencia de capas de color amarillo. Se puede mezclar el contenido del pocillo con una varilla aplicadora para mejorar la lectura.
6	LIP				
7	KSF				
8	SBL				
9	GUR	Ninguno	Amarillo	Transparente o tostado	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color amarillo bien definido. Los tonos muy tenues de amarillo o los colores dudosos se puntuarán como negativos.
10	ONPG				
11	βGLU				
12	βXYL				
13	NAG				
14	MAL	Ninguno	Rojo	Amarillo o naranja	Sólo se debe puntuar como positivo el desarrollo de un color rojo bien definido. Los tonos de naranja se puntuarán como negativos.
15	PRO	Reactivo RapID™ ONE	Violeta, morado, rojo o rosa oscuro	Transparente, amarillo, naranja o rosa muy pálido	Sólo se puntuará como positivo cualquier desarrollo de un color violeta, morado, rojo bien definido o rosa oscuro. El naranja pálido o los tonos tenues de rosa se puntuarán como negativos.
16	GGT				
17	PYR				
18	ADON	Ninguno	Amarillo o naranja muy claro	Rojo o rojo-naranja oscuro	El desarrollo de cualquier tono de amarillo o amarillo-naranja en la totalidad del pocillo se debe puntuar como positivo.
18	IND	Reactivo RapID™ Spot Indole	Marrón, negro o morado	Naranja o rojo	El desarrollo de cualquier color marrón, negro o morado se debe puntuar como positivo.

*NOTA: Los paneles se deben leer mirando a través de los pocillos de reacción sobre un fondo blanco.

Resultados e intervalo de valores esperados

Los resultados del diagrama diferencial provisto con el equipo se expresan como una serie de porcentajes que indican positivos para cada prueba del sistema. Esta información apoya estadísticamente el uso de cada prueba y proporciona la base del enfoque probabilístico para identificar el aislamiento en estudio mediante un código numérico de los resultados de la prueba digital. Las identificaciones se hacen con las puntuaciones individuales de la prueba en los paneles RapID ONE junto con otra información de laboratorio (por ej. coloración de Gram y oxidasa) para producir un patrón que imite estadísticamente la reactividad conocida de los géneros registrados en la base de datos RapID. Estos patrones se comparan mediante el uso del diagrama diferencial RapID ONE o a partir de un microcódigo y el uso del Compendio de códigos RapID ONE o ERIC.

Tabla 4.12. Diagrama Diferencial del sistema Rapid™ ONE

Microorganismo	URE	ADH	ODC	LDC	TET	LIP	KSF	SBL	GUR	ONPG	βGLU	βXYL	NAG	MAL	PRO	GGT	PYR	ADON	IND	OXI
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	5	29	11	7	2	94	0	1	0	0	0	0	2	21	3	5	2	0	0	0
<i>Burkholderia cepacia</i> ¹	14	12	31	84	3	95	2	0	0	14	9	0	19	16	71	95	0	0	0	62
<i>Cedecea devisa</i> (EG-15)	2	27	51	0	0	71	88	0	0	51	98	96	99	92	1	82	0	0	0	0
<i>C. lapagei</i>	0	38	0	7	0	90	95	0	0	90	92	0	99	98	1	98	0	0	0	0
<i>C. neteri</i>	2	46	2	5	0	93	98	95	0	98	98	0	99	98	0	99	0	0	0	0
<i>Cedecea</i> sp. 3	0	90	0	0	0	95	90	0	0	91	97	0	98	0	0	97	0	0	0	0
<i>Cedecea</i> sp. 5	0	91	35	2	0	81	90	98	0	90	98	0	98	0	0	95	0	0	0	0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	11	11	96	3	98	0	95	96	0	95	83	1	9	2	2	92	98	2	98	0
<i>C. freundii</i>	11	18	24	0	88	0	94	92	0	92	5	1	0	5	3	88	96	1	1	0
<i>C. koseri</i> ²	5	20	95	2	0	0	95	95	0	95	92	0	1	90	4	95	96	80	96	0
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	0	0	79	98	11	0	8	0	0	0	0	2	90	69	99	5	0	0	78	0
<i>E. tarda</i>	0	0	83	89	90	0	2	0	0	3	0	2	96	0	98	4	0	0	92	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	7	97	97	1	1	96	97	0	98	98	98	97	92	1	93	98	88	0	0
<i>E. amnigenus</i>	0	2	78	0	9	0	90	21	0	98	97	98	96	93	0	28	96	0	0	0
<i>E. asburiae</i> (EG-17)	7	6	89	0	0	0	98	94	0	98	94	30	97	2	0	82	9	0	0	0
<i>E. cancerogenus</i> ³	0	91	95	1	0	0	98	0	0	98	84	2	98	98	0	98	96	0	0	0
<i>E. cloacae</i>	9	92	92	1	0	2	95	96	0	98	82	92	94	76	1	94	21	17	0	0
<i>E. gergoviae</i>	74	9	96	84	0	0	95	0	0	88	91	0	11	92	0	98	9	0	0	0
<i>E. intermedium</i>	0	0	86	0	0	0	98	98	0	97	98	98	0	98	0	92	98	0	0	0
<i>E. sakazakii</i>	0	89	92	3	0	0	98	1	0	96	84	96	98	19	0	95	38	0	20	0
<i>Escherichia coli</i>	1	15	75	84	2	0	1	90	92	95	1	0	0	1	3	44	1	2	98	0
<i>E. fergusonii</i>	0	5	88	96	0	0	96	0	0	86	2	0	0	14	2	90	98	82	94	0
<i>E. hemannii</i> (EG-11)	0	2	87	2	98	0	98	3	0	85	67	0	1	0	4	96	92	0	96	0
<i>E. vulneris</i> (Alma I)	0	9	0	91	0	0	95	0	0	96	90	94	0	93	0	57	93	4	0	0
<i>Ewingella americana</i> ⁴	0	0	0	0	0	0	56	0	0	92	44	0	94	0	0	21	99	0	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	13	92	96	5	1	87	0	0	31	7	0	77	20	97	96	11	0	2	0
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	98	8	99	98	0	0	98	98	1	98	98	98	98	98	0	98	98	93	98	0
<i>K. oxyfoca</i>	93	12	9	97	9	2	98	96	0	95	98	84	0	95	0	96	82	76	99	0
<i>K. ozaenae</i>	6	12	2	32	0	0	84	48	0	97	94	17	0	1	1	88	98	89	0	0
<i>K. planticola</i> (EG-47)	98	11	2	98	0	0	98	90	0	99	98	15	90	98	0	98	98	90	11	0
<i>K. pneumoniae</i>	96	13	9	97	4	1	96	96	0	97	98	94	0	91	0	98	92	88	0	0
<i>K. rhinoscleromatis</i>	0	0	0	0	0	0	5	27	0	0	14	0	0	29	0	2	99	4	0	0
<i>Kluyvera ascorbata</i>	0	0	98	90	0	0	90	40	0	98	96	96	0	93	0	91	8	0	89	0
<i>K. cryocrescens</i>	0	0	98	11	0	0	91	38	0	98	93	96	0	79	0	7	2	0	90	0
<i>Leclercia adcarboxylata</i> (EG-40)	20	0	0	0	0	0	42	0	0	95	92	94	96	86	0	5	93	91	94	0
<i>Leminorella grimonii</i> (EG-57)	0	0	7	6	88	0	5	0	0	0	0	0	99	0	0	98	0	0	0	0
<i>L. richardii</i>	0	0	5	2	91	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0

¹Denominado anteriormente *Pseudomonas cepacia*

²Denominado anteriormente *Citrobacter diversus*

³Denominado anteriormente *Enterobacter taylorae*

⁴Denominado anteriormente *Ewingella* sp. (EG-40)

Microorganismo	URE	ADH	ODC	LDC	TET	LIP	KSF	SBL	GUR	ONPG	βGLU	βXYL	NAG	MAL	PRO	GGT	PYR	ADON	IND	OXI
<i>Moellerella wisconsensis</i> (EG-46)	0	0	0	0	89	0	2	0	0	93	8	0	0	0	0	5	0	97	0	0
<i>Morganella morganii</i>	98	18	91	4	98	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	96	0	0	98	0
<i>Pantoea agglomerans</i> ⁵	2	2	0	0	2	0	91	32	0	93	71	51	21	61	0	94	77	7	11	0
<i>Proteus mirabilis</i>	98	13	91	1	98	5	1	0	0	0	0	0	0	4	7	96	0	0	1	0
<i>P. penneri</i>	99	0	0	0	79	0	0	0	0	0	0	0	0	8	9	49	0	0	0	0
<i>P. vulgaris</i> grupo 2	98	18	6	0	95	5	0	0	0	0	98	0	0	2	2	94	0	0	96	0
<i>P. vulgaris</i> grupo 3	98	12	0	0	97	4	3	0	0	0	0	0	0	2	1	98	0	0	96	0
<i>Providencia alcalifaciens</i>	4	4	1	0	94	0	1	0	0	0	0	0	1	2	4	98	0	86	98	0
<i>P. rettgeri</i>	98	11	2	0	92	0	73	2	0	0	30	0	3	4	0	96	0	90	96	0
<i>P. rustigianii</i>	0	2	0	0	99	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	95	0	0	98	0
<i>P. stuartii</i>	22	3	2	1	96	0	2	0	0	0	1	0	97	0	1	98	2	2	95	0
<i>Pseudomonas luteola</i> ⁶	8	77	3	4	2	2	0	0	0	92	95	0	0	32	99	78	98	0	0	8
<i>P. oryzae</i> ⁷	5	2	8	4	0	90	5	4	0	2	3	0	0	88	99	21	98	0	0	0
<i>Rahnella aquatilis</i> ⁸	0	0	0	0	0	0	88	94	0	96	97	98	0	98	92	4	98	0	0	0
<i>Salmonella</i> I - incluye los serotipos: siguientes de <i>S. choleraesuis</i> :	1	54	92	94	91	0	2	91	20	1	1	0	0	1	8	97	0	0	1	0
Choleraesuis	0	60	98	94	56	0	0	90	11	0	0	0	0	0	7	95	0	0	0	0
Gallinarum	0	11	5	90	79	0	1	1	5	0	0	0	0	0	2	98	0	0	0	0
Paratyphi A	0	17	96	0	9	0	12	93	5	0	0	0	0	0	8	96	0	0	0	0
Pullorum	0	13	90	95	87	0	0	1	11	0	0	0	0	0	8	97	0	0	0	0
Typhi	0	2	0	98	89	0	0	97	8	0	0	0	0	0	5	97	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> II	0	82	97	95	97	0	0	98	59	6	4	0	0	98	0	98	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> III (<i>S. arizonae</i>)	0	70	98	98	95	0	2	96	48	90	0	0	2	94	0	30	0	0	0	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	3	9	98	31	28	70	28	84	0	92	96	0	98	4	98	98	96	0	0	0
<i>S. marcescens</i>	12	74	92	96	62	80	86	88	0	88	95	0	98	3	98	98	92	16	0	0
<i>S. odorifera</i> 1 y 2	2	6	32	92	0	31	90	92	0	81	79	95	98	2	97	98	93	9	60	0
<i>S. plymuthica</i>	0	0	0	0	0	20	90	87	0	87	95	0	98	0	94	48	28	0	0	0
<i>S. rubidaea</i>	2	5	2	77	0	11	98	2	0	98	96	93	90	83	90	93	90	52	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	8	86	3	3	1	1	2	78	86	1	0	0	3	19	7	2	0	0	0
<i>Shigella</i> spp.	0	2	1	1	2	0	1	21	28	1	2	0	0	1	46	66	1	0	31	0
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ⁹	2	2	0	0	0	86	2	2	0	62	95	28	76	2	4	92	91	0	0	68
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ¹⁰	4	80	29	90	80	83	0	0	0	2	91	0	20	5	98	98	0	0	0	11
<i>Tatumella ptyseos</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	86	0	93	0	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	91	11	70	0	17	9	2	92	3	82	11	0	72	9	4	5	98	3	32	0
<i>Y. frederiksenii</i>	86	1	77	0	8	4	0	96	0	87	86	24	42	0	38	27	99	0	97	0
<i>Y. intermedia</i>	79	1	98	0	9	4	0	92	0	96	98	0	97	10	79	16	96	0	97	0
<i>Y. kristensenii</i>	77	2	68	0	4	0	0	93	12	9	2	0	80	3	92	6	99	0	11	0
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	89	1	0	0	13	0	1	1	0	21	96	8	4	2	95	0	95	0	0	0
<i>Yokenella regensburgei</i> ¹¹	2	8	98	98	91	0	4	0	0	88	49	0	99	0	2	98	0	0	0	0

⁵Denominado anteriormente *Enterobacter agglomerans*

⁶Denominado anteriormente *Chryseomonas luteola*

⁷Denominado anteriormente *Flavimonas oryzae*

⁸Denominado anteriormente *Rahnella* spp.

⁹Denominado anteriormente *Pseudomonas paucimobilis*

¹⁰Denominado anteriormente *Xanthomonas maltophilia*

¹¹Denominado anteriormente *Kosserella trabulsi* (EG-45)

4.8.2.4. Sistema de identificación BBL Crystal

El sistema BBL Crystal es un método miniaturizado de identificación. Muchos de los análisis utilizados son modificaciones de los métodos clásicos. Estos incluyen pruebas para la fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos. Además, contienen sustratos unidos a un cromógeno para

detectar las enzimas que utilizan los microorganismos para metabolizar distintos sustratos. El equipo BBLCrystal está compuesto de tapas, bases y tubo de fluido.

Tapas: cada tapa contiene 30 sustratos deshidratados Tubo de fluido (IF)

Bases BBL

Cristal: cada base tiene 30

en las puntas de los dientes

para preparación

pocillos de reacción.

del inóculo.



Para realizar el ensayo se debe alinear la tapa con la base y cerrar. El inóculo rehidrata los sustratos secos y comienza el ensayo. Se producen cambios de color como resultado de las actividades metabólicas de los microorganismos. Los pocillos se examinan luego del período de incubación. El patrón resultante de las 30 reacciones se convierte en un número de 10 dígitos que se utiliza como base para la identificación. Esta identificación deriva de un análisis comparativo del patrón de reacción del aislamiento problema con aquellos existentes en la base de datos BBL Crystal. El panel **BBL Crystal E/NF ID** contiene 30 sustratos bioquímicos y enzimáticos según se describe a continuación. La ubicación del panel indica la fila y la columna donde se encuentra el pocillo (por ejemplo: 1J se refiere a la fila 1 en la columna J).

Ubicación del Panel	Ingrediente activo	Código	Cantidad aprox. (g/10mL)	Positivo	Negativo	Principio (Referencia)
4A	Arabinosa	ARA	3,5	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	La utilización de carbohidratos produce un descenso de pH y
4B	Manosa	MNS	3,0	Dorado /	Naranja /	

				amarillo	rojo	un cambio en el
4C	Sacarosa	SUC	2,9	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	Indicador (rojo fenol)
4D	Melibiosa	MEL	1,0	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	
4E	Ramnosa	RHA	3,0	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	
4F	Sorbitol	SOR	3,5	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	
4G	Manitol	MNT	1,8	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	
4H	Adonitol	ADO	2,5	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	
4I	Galactosa	GAL	1,5	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	
4J	Inositol	INO	1,3	Dorado / amarillo	Naranja / rojo	
2A	p-n-p-fosfato	PHO	0,025	Amarillo	Entre incolore	La hidrólisis enzimática del glucósido incolore del glucósido incolore
2B	p-n-p a-b- glucósido	BGL	0,025	Amarillo	Entre incolore	aril sustituido o éster de fosfato libera p- nitrofenol amarillo
2C	p-n-p-b- glucósido	NPG	0,06	Amarillo	Entre incolore	nitrofenol amarillo
2D	Prolina nitroanilida	PRO	0,07	Amarillo	Entre incolore	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incolore libera p- nitroanilina de color amarillo
2E	p-n-p bis- fosfato	BPH	0.02	Amarillo	Entre incolore	La hidrólisis enzimática del glucósido incolore aril sustituido o éster de fosfato libera p- nitrofenol amarillo

2F	p-n-p-xilósido	BXY	0,03	Amarillo	Entre incoloro	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p-
2G	p-n-p-a-arabinósido	AAR	0,03	Amarillo	Entre incoloro	nitroanilina de color amarillo
2H	p-n-p-fosforilcolina	PHC	0,03	Amarillo	Entre incoloro	
2I	p-n-p-b-glucurónido	GLR	0,02	Amarillo	Entre Incoloro	
2J	p-n-p-N-acetil glucosamidina	NAG	0,04	Amarillo	Entre incoloro	
1A	g-L-glutamil p-nitroanilida	GGL	0,03	Amarillo	Entre incoloro	
1B	Esculina	ESC	0,14	Pardo / marrón	Transparente / paja	La hidrólisis de la esculina produce un precipitado negro en presencia de iones férricos
1C	p-nitro-DL-fenilalanina	PHE	0,1	Dorado osc / Naranja	Amarillo	La desaminación oxidativa de la fenilalanina produce un color pardo en presencia de iones férricos
1D	Urea	URE	0,2	Turquesa / Azul	Amarillo / verde	La hidrólisis de la urea y el amonio resultante cambia el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
1E	Glicina	GLY	0,7	Turquesa / Azul	Amarillo / verde	La degradación de la glicina libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH

						(azul de bromotimol)
1F	Citrato	CIT	0,8	Turquesa / Azul	Amarillo / verde	La degradación del citrato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
1G	Ácido malónico	MLO	1,5	Turquesa / Azul	Amarillo / verde	La degradación del malonato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
1H	Cloruro de trifenil tetrazolio	TTC	0,15	Rosa /rojo*	Transparente	La reducción del compuesto de tetrazolio produce la formación de un formazán rojo
1I	Arginina	ARG	1,5	Rojo / púrpura	Amarillo / pardo	El catabolismo anaerobio produce
1J	Lisina	LYS	0,5	Rojo / púrpura	Amarillo / pardo	aumento del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura bromocresol)

Procedimiento Inoculación

A.- Rotular un tubo de inóculo. Colectar una colonia grande bien aislada (con un diámetro de 2 - 3 mm o mayor) o 4 - 5 colonias más pequeñas de la misma morfología a partir de una placa de ATS o

agar MacConkey. Resuspender las colonias en un tubo de fluido de inóculo BBL Crystal.

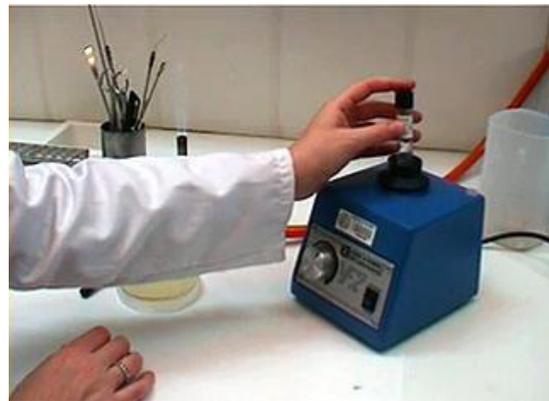
B.- Tapar el tubo y agitarlo en un vórtex durante 10 a 15 seg.

C.- Rotular una base en la pared lateral. Sacar las tapas de la bolsa y utilizarlas en el plazo de 1 h. No utilizar el panel si no hay secante en la bolsa.

D.- Volcar todo el contenido del fluido de inóculo en el área objetivo de la base.

E.- Sostener la base con ambas manos y mover el inóculo suavemente de un lado a otro hasta que se llenen todos los pocillos.

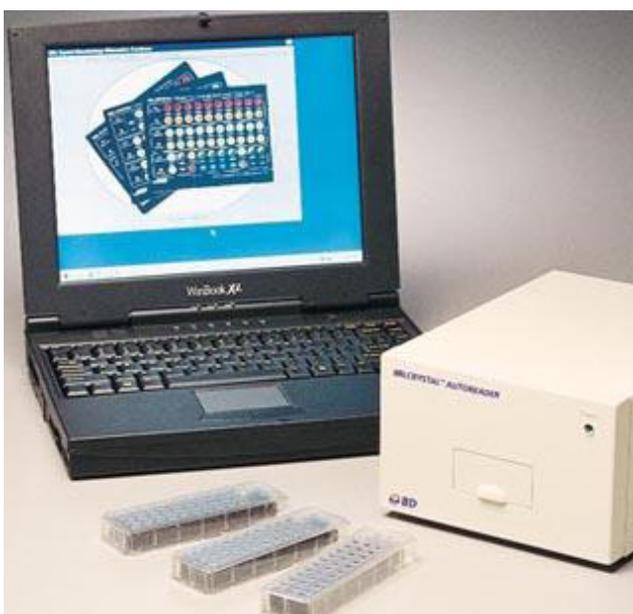
F.- Alinear la tapa de forma que el extremo marcado de la tapa esté en la parte superior del área objetivo de la base. Apretar hasta que la tapa encaje en su lugar.



G - Incubación.- Colocar los paneles inoculados en las bandejas de incubación. En una bandeja pueden caber diez paneles (5 filas de 2 paneles). Todos los paneles deben incubarse mirando hacia abajo (las ventanas más grandes mirando hacia arriba; la etiqueta mirando hacia abajo) en una estufa sin CO₂ con una humedad del 40 - 60%. El tiempo de incubación es de 18 - 20 h a 35 - 37°C.

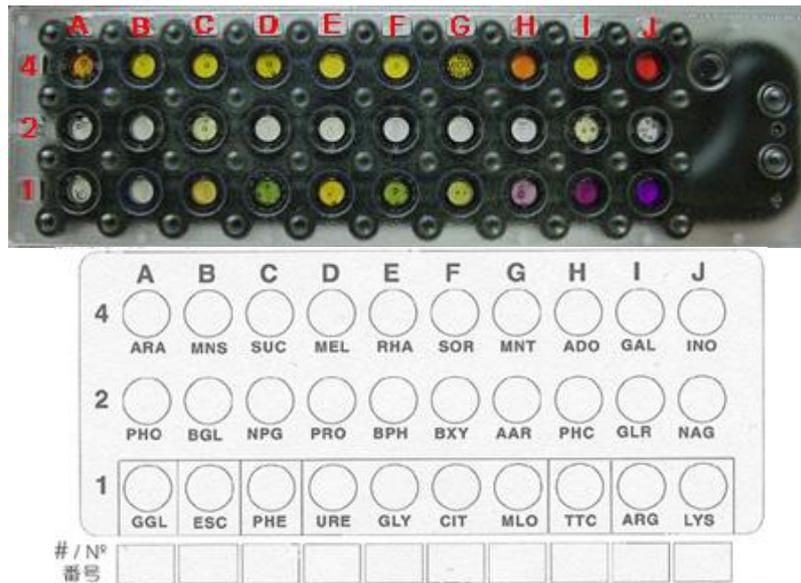
H - Lectura de los resultados.- Retirar los paneles de la estufa. Todos los paneles deben leerse boca abajo utilizando la caja de luz o el visor del panel BBLCrystal. Consultar la tabla de colores de la reacción para obtener una interpretación de las reacciones. Usar el cuaderno de informes BBL Crystal para registrar las reacciones.

I.- Como método alternativo, puede utilizar el lector automático BBLCrystal para leer los paneles.



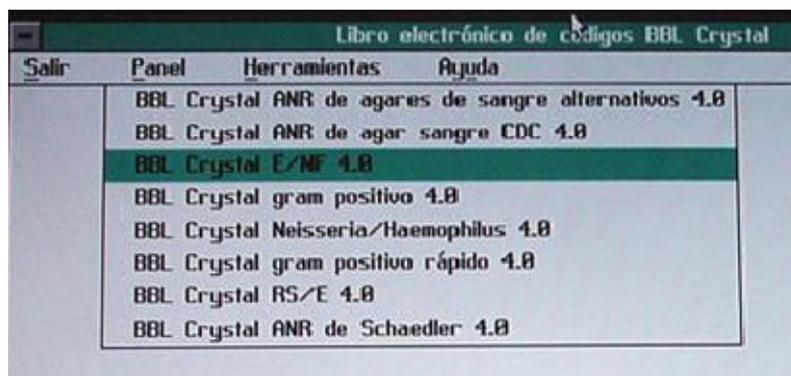
Interpretación de resultados

A cada resultado positivo del análisis se le asigna un valor de 4, 2, o 1, correspondiente a la fila donde está ubicado el análisis. Se asigna un valor de 0 (cero) a cualquier resultado negativo. Después se suman los números (valores) resultantes de cada reacción positiva en cada columna. Se genera un número de 10 dígitos; éste es el número de perfil.

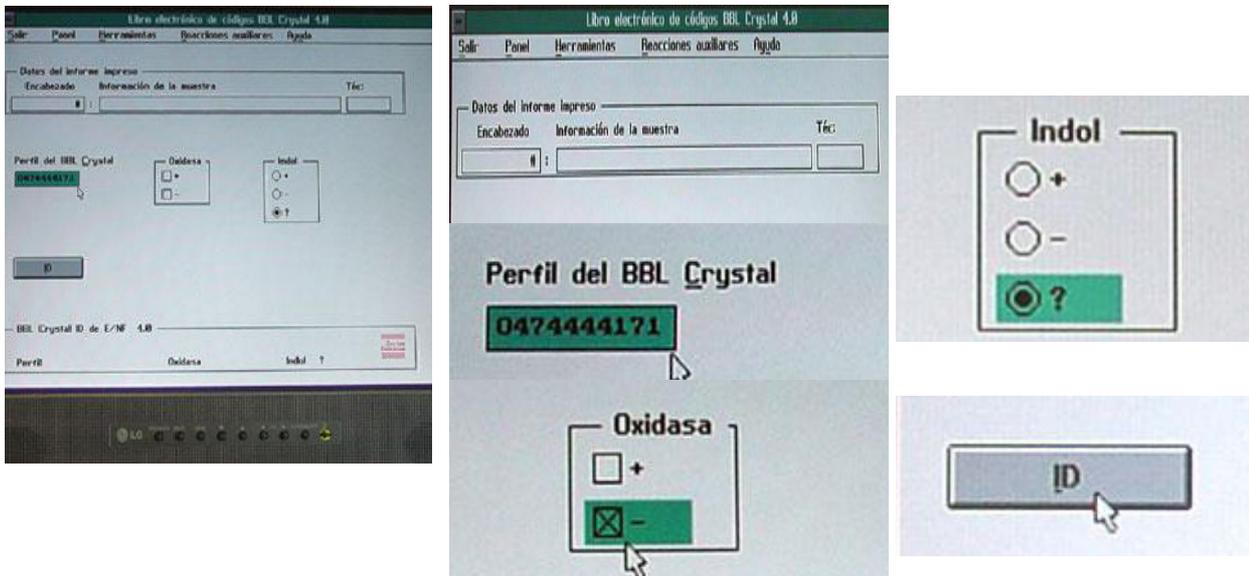


Identificación mediante el libro de códigos electrónico

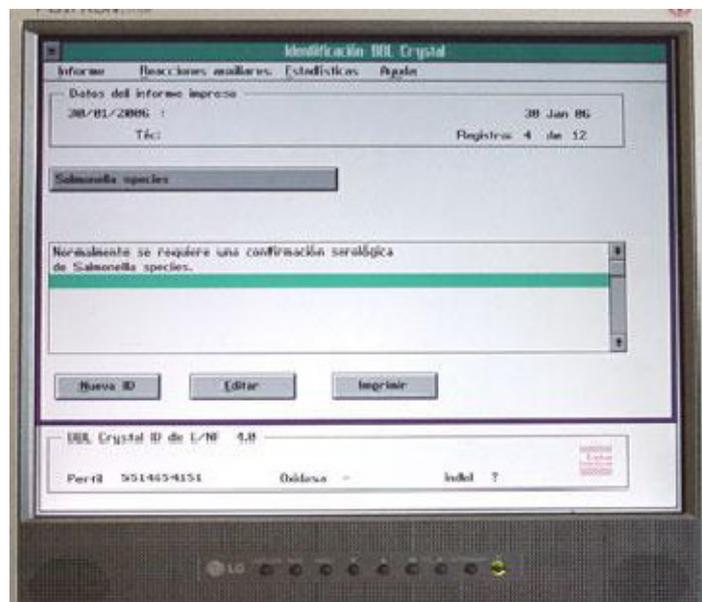
El número de perfil resultante y los resultados del análisis fuera de línea (indol y oxidasa) deben introducirse en el libro de códigos electrónico del sistema BBL Crystal ID, para obtener la identificación. Si se utiliza el lector automático BBL Crystal, el software identifica automáticamente los microorganismos. Ejecutar el programa: "Libro electrónico de códigos BBL Crystal". Elegir la galería BBL Crystal que estemos utilizando en el menú desplegable.



Completar los siguientes datos: muestra, perfil numérico, resultados de la prueba de la oxidasa, resultado de la prueba del indol y por último pulsar en el botón ID.



El programa ofrece el resultado de la identificación en una pantalla similar a la de la derecha.



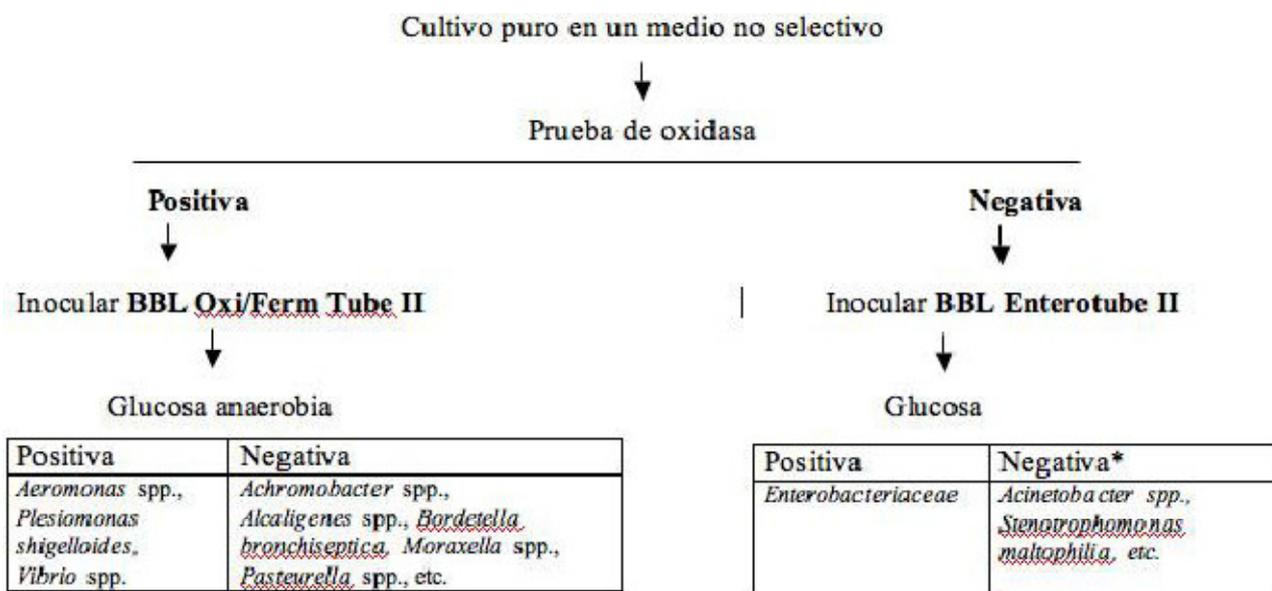
4.8.2.5 BBL Enterotube II BBL Enterotube II

Es un tubo de plástico con compartimientos, formado por 12 medios de cultivo diferentes, que permiten la determinación de 15 reacciones bioquímicas. Está diseñado para la inoculación simultánea de los

12 medios con una sola colonia, utilizando una aguja de inoculación dispuesta en el centro. La combinación de reacciones resultante, junto con la guía de interpretación (libro de códigos), permite la identificación de *Enterobacteriaceae* con importancia clínica.

Procedimiento de inoculación y lectura del sistema de identificación

A partir de un cultivo puro de bacterias gram negativas y luego de realizar la prueba de la oxidasa podemos definir qué sistema de identificación utilizar. En el siguiente diagrama de flujo se muestra cuándo debe utilizarse BBL Enterotube II o BBL Oxi/Ferm Tube II:



* Estas especies pueden ser identificadas con el sistema **BBL Enterotube II**, pero puede ser necesario el uso de **BBL Oxi/Ferm Tube II** para su confirmación.

Para la inoculación de BBL Enterotube II, se pueden utilizar colonias en agar MacConkey, EMB, SS, HE o agar sangre. El cultivo utilizado para la inoculación debe tener por lo menos 18 h, pero no más de 48 h. Es necesario asegurarse de que el aislamiento a identificar proceda de un cultivo puro de un bacilo gram negativo. BBL Enterotube II puede utilizarse solamente en colonias con resultados negativos a la oxidasa (*Enterobacteriaceae*).

Procedimiento

1. Preparar una hoja del bloc de códigos para la muestra con el número de muestra y la fecha.

2. Rotular el Enterotube II correctamente

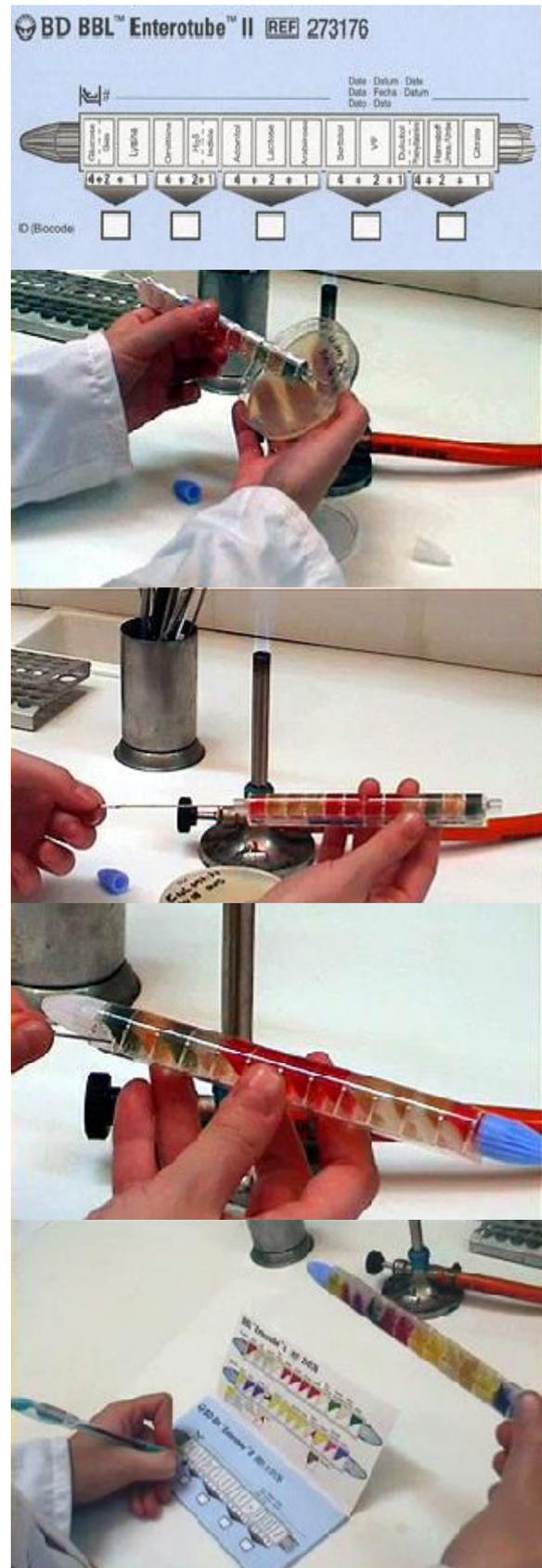
3. Retirar las dos tapas.

4. Seleccionar una colonia bien aislada directamente con la punta de la guía de inoculación BBL Enterotube II. Se debe observar una cantidad visible de inóculo en la punta y en el costado de la guía. No tocar el agar con la guía.

5. Inocular el Enterotube II primero retorciendo la guía y luego retirando la guía por todos los compartimientos mediante un movimiento giratorio. La punta de la guía debe estar visible en el compartimiento de citrato. Cortar la guía en la muesca mediante torsión.

6. Con la parte restante de la guía, hacer orificios a través del papel metalizado que cubre las entradas de aire de los últimos 8 compartimientos para favorecer el crecimiento aerobio. Colocar las tapas e incubar a 35 o 37°C durante 18 a 24 h. Permitir la circulación de aire entre los tubos incubados.

7. Efectuar la interpretación y registrar todas las reacciones con excepción de indol y Voges-Proskauer.



Revelado

Agregar los reactivos indol y Voges-Proskauer de la siguiente forma: a) colocar el BBL Enterotube II de forma horizontal, b) realizar un orificio de 3–4 mm de diámetro en la película de plástico por encima de los compartimentos de indol/H₂S y VP. Agregar 3 gotas de reactivo de Kovacs al compartimento H₂S/indol. Una prueba positiva se indica por la aparición de color rojo en el reactivo añadido al cabo de 10 seg. Para realizar la prueba de VP agregar 2 gotas de solución de hidróxido de potasio al 20% con 0,3% de creatina y 3 gotas de alfa-naftol al 5% en alcohol etílico puro. Una prueba positiva se indica por la aparición de un color rojo a los 20 min.

Interpretación de resultados

Seguir las instrucciones suministradas a continuación para identificar el aislado. Realizar la interpretación de todas las pruebas luego de 18 - 24 h de incubación. A excepción de indol y VP, efectuar la lectura de las reacciones de manera secuencial, comparando los colores de los medios en el tubo con los suministrados en el esquema de colores.

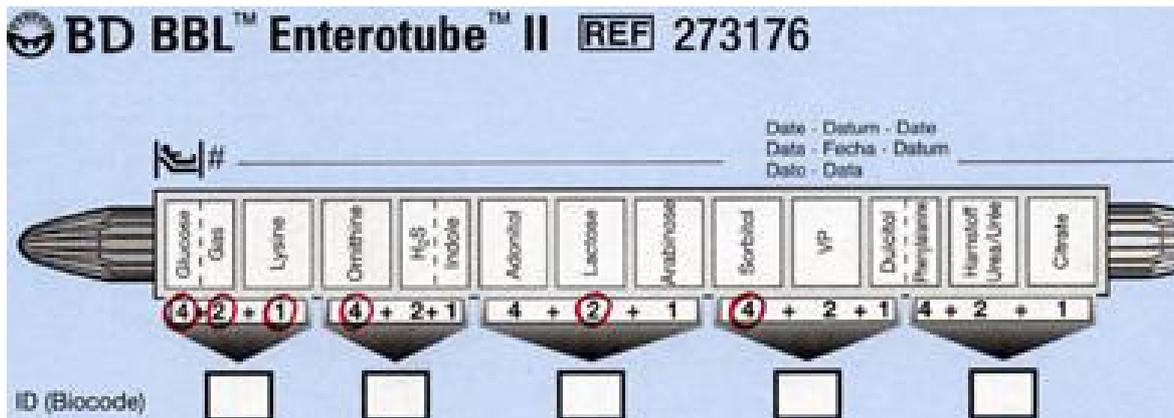


Tabla 4.13.-

Prueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
Glucosa	fermentación de glucosa	rojo (a naranja)	amarillo (a dorado)

Gas	producción de gas en la fermentación de la glucosa	sin desprendimiento de cera	sin desprendimiento de cera
Lisina	lisina descarboxilasa	amarillo	morado
Ornitina	ornitina descarboxilasa	amarillo	morado
H ₂ S	producción de H ₂ S	de beige a ámbar claro	negro
Indol	producción de indol	incolore	rojo o rosa
Adonitol	producción de adonitol	rojo (a naranja)	amarillo (a dorado)
Lactosa	fermentación/oxidación de lactosa	rojo (a naranja)	amarillo (a dorado)
Arabinosa	fermentación/oxidación de arabinosa	rojo (a naranja)	amarillo (a dorado)
Sorbitol	fermentación/oxidación de sorbitol	rojo (a naranja)	amarillo (a dorado)
VP	producción de acetoina	de incolore a ámbar claro	rojo
Dulcitol	utilización del dulcitol	verde	amarillo (a dorado)
PA	fenilalanina descarboxilasa	cualquier tono de verde	de negro a gris oscuro
Urea	ureasa	de incolore a ámbar claro	de rosa claro a rosa
Citrato	utilización del citrato	verde	azul

Indicar cada resultado positivo marcando un círculo en el número que aparece debajo del compartimiento apropiado en el bloc de resultados.

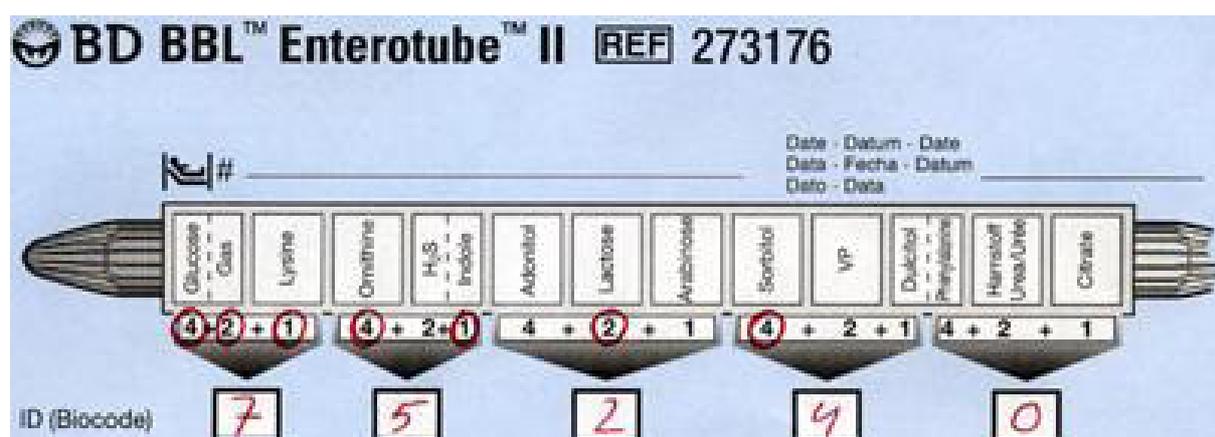


Finalmente, realizar las pruebas de indol y VP. En caso de resultado positivo, marcar con un círculo los números apropiados en la hoja preparada. 169

Las pruebas de VP son obligatorias solo si se utiliza la base de datos con VP. En la imagen se muestra la vista trasera tras revelar indol y VP.



Sumar todos los números marcados con un círculo en la sección entre corchetes e ingresar la suma en el espacio suministrado debajo de las flecha.



Buscar el número de cinco dígitos en la guía de interpretación y encontrar la o las mejores respuestas en la columna denominada "ID Value".

4.8.2.6. VITEK (BioMérieux)

Los sistemas automatizados acortan los tiempos porque mejoran la sensibilidad analítica de los métodos convencionales, es decir, son capaces de detectar tempranamente el desarrollo bacteriano en una suspensión. Uno de los sistemas miniaturizados y automatizados más conocidos es el sistema VITEK (BioMérieux Hazelwood, Mo, USA) que se basa en la detección de cambios de color de los sustratos o en la producción de gas de los cultivos inoculados en los pocillos de una tarjeta plástica que contiene los sustratos bioquímicos en forma deshidratada.



El sistema VITEK realiza de manera automatizada todas las etapas necesarias para la realización de las pruebas de identificación y antibiograma bacterianos con las tarjetas VITEK. Está constituido por un inoculador/sellador, un incubador/lector, un ordenador y una impresora. El inoculador/sellador permite la inoculación de las tarjetas en pocos minutos. El incubador/lector asegura simultáneamente la incubación y la lectura de las tarjetas para una capacidad que varía de 32 a 480 tarjetas según el modelo. El ordenador equipado con los programas de VITEK efectúa un control permanente de las operaciones en curso, memoriza los valores, trata e interpreta los resultados.

El pequeño tamaño de la tarjeta VITEK (10 x 6 x 0.5 cm y 16 g) facilita su almacenamiento, manipulación y eliminación. Una vez inoculada, se encuentra herméticamente cerrada, y por tanto es manipulable sin riesgo de contaminación. Cada tarjeta de identificación posee 30 pocillos que contienen los sustratos bioquímicos en forma deshidratada que no necesitan del posterior agregado de ningún reactivo para ser revelados. La identificación VITEK cubre más de 300 especies encontradas en el campo de la microbiología clínica e industrial. Los equipos están disponibles en dos niveles de automatización: Completamente automatizados (VITEK 2 XL y VITEK 2 60) y semi-automatizados (VITEK 2 Compact 60; VITEK 2 Compact 3.0 y VITEK 2 Compact 15).

Procedimiento

1. Navegar hacia el espacio de trabajo “virtual cassette”

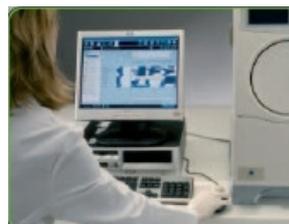
2. Inocular los tubos y ubicarlos en el cassette.

3. Escanear la tarjeta correspondiente y ubicarla en el cassette

4. Escanear el número de identificación del aislamiento o utilizar la clave indicada en la parte superior de la placa

5. Ubicar el cassette en el interior del equipo

6. Ubicar el cassette en el lector



4.8.2.7. Biolog Microlog

La tecnología Biolog™ utiliza microplacas de 96 pocillos con 6 a 8 sustratos carbonados diferentes. La capacidad de un microorganismo de metabolizar cada sustrato se mide por la presencia o ausencia de una coloración violeta. Esta coloración se debe a la reducción del violeta de tetrazol generada por la respiración celular de los microorganismos. El viraje de ciertos pocillos crea una huella fenotípica que es analizada por el software para identificar o caracterizar el organismo.

El poder de discriminación del sistema Biolog™ hace de esta una herramienta útil para la identificación de bacterias y también de hongos filamentosos (utilizando el mismo principio pero con iodonitrotetrazolio como sustrato, el que produce una coloración roja).



Biolog ofrece diferentes versiones automatizadas y manuales:

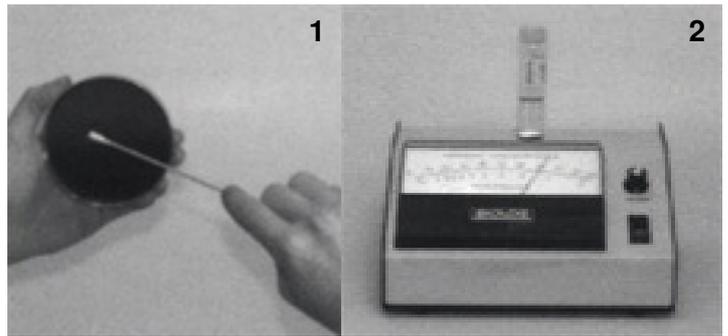
OmniLog II Combo System incluye: una PC, monitor, e impresora configuradas para la incubación e identificación automática de bacterias aerobias y el Análisis del Fenotipo Phenotype MicroArray (PM) Analysis.

La MicroStation incluye los instrumentos y el software para la lecturas de los MicroPlates; un turbidímetro, para lograr una conveniente y precisa preparación del inculo; una lámpara magnificadora de colonias; y una pipeta electrónica de 8 canales, reactivos y una base de datos.

MicroLog 2 and MicroLog 1 son sistemas manuales recomendados para laboratorios con presupuestos limitados o bajos volúmenes de ensayo. Los sistemas manuales ofrecen la misma calidad de state-of-the-art reference-level capability que las versiones automatizadas.

Procedimiento

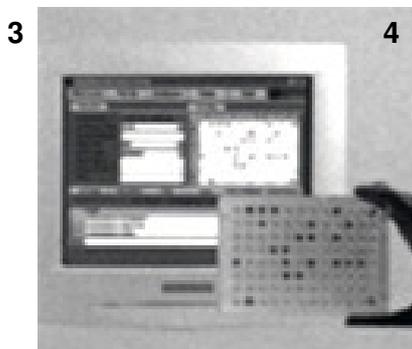
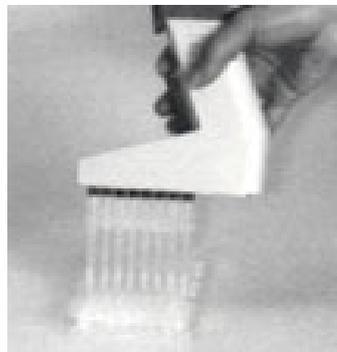
1) Aislar el microorganismo en medio de cultivo Biolog y realizar la tinción de Gram para determinar el protocolo a seguir.

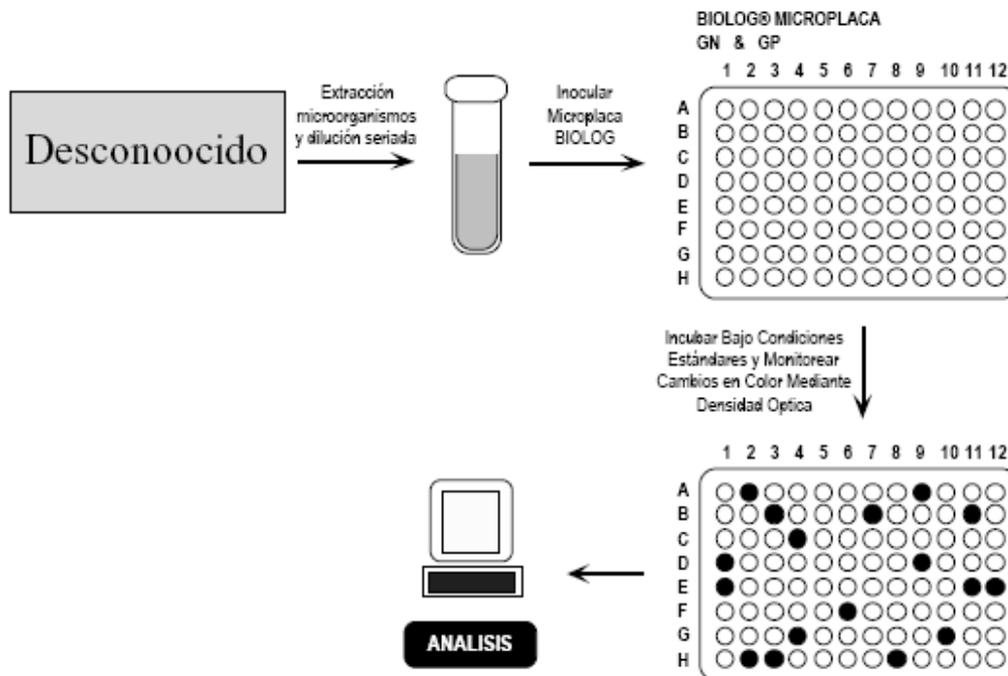


2) Preparar el inóculo en la densidad celular determinado.

3) Inocular e incubar las microplacas

4) Lectura





El software evalúa automáticamente las diferentes intensidades de color / turbidez eliminando la subjetividad de la interpretación visual. El innovador algoritmo de identificación progresiva (PID) para determinar la identidad del microorganismo se realiza una búsqueda de patrones coincidentes considerando no sólo el patrón completo de reacción sino también el uso preferente de determinadas fuentes carbonadas. También permite plasmar en forma de gráficos de clúster o dendrogramas las relaciones entre diferentes cepas basadas en la utilización de una determinada fuente de carbono. Este sistema de detección metabólica permite a su vez realizar diferentes tipos de ensayos, puesto que la información referida a la características bioquímicas contenida en cada Microplaca es enorme – una sola placa provee información de la utilización de 95 compuestos diferentes. Utilizando este sistema se pueden analizar comunidades bacterianas; rastrear cepas individuales de fuentes ambientales hasta el punto de contaminación del producto, analizando sus huellas bioquímicas.

CAPÍTULO V

Subtipificación

5.1. INTRODUCCIÓN

La premisa básica inherente a todos los sistemas de tipificación es que los aislamientos epidemiológicamente relacionados derivan de la expansión clonal de un único precursor. Consecuentemente, comparten características comunes que difieren de aquellos aislamientos epidemiológicamente no relacionados. Las especies del género *Cronobacter* presentan linajes genéticos divergentes, y esta divergencia evolutiva refleja la acumulación de mutaciones no letales al azar, como sustitución de un par de bases, delección de un gen individual o la adquisición de ADN de otras especies microbianas. Con el desarrollo de técnicas moleculares altamente sensibles, es posible detectar alteraciones genéticas mínimas con precisión, como así también los complejos mecanismos que originan tales variaciones genéticas.

Las técnicas de subtipificación sirven de complemento a las investigaciones epidemiológicas. Estas técnicas tienen una amplia aplicación en microbiología veterinaria ya que permiten: a) establecer si un animal infectado es parte o no de un brote; b) detectar la vía de transmisión de patógenos; c) identificar la fuente de infección en brotes y casos esporádicos; d) determinar si las cepas aisladas pertenecen a clones previamente reconocidos como virulentos; y e) controlar programas de inmunización.

5.2. TÉCNICAS DE SUBTIPIFICACIÓN FENOTÍPICA

Inicialmente la subtipificación se realizaba mediante la caracterización de uno o varios marcadores fenotípicos. La limitación de estas técnicas es que los microorganismos pueden alterar la expresión de los genes que codifican. Tales cambios pueden ocurrir en forma no predecible, o bien, en respuesta a estímulos del medio ambiente. Además, la ocurrencia de mutaciones puntuales que afecten a un simple nucleótido en todo el cromosoma, pueden modificar la regulación o la función de los genes responsables para un fenotipo particular. Así, aislamientos que representan la misma cepa y que son genéticamente indistinguibles entre sí pueden variar en el fenotipo detectado. Entre las técnicas clásicas se encuentran: biotipificación, serotipificación, sensibilidad a los antimicrobianos, fagotipificación y técnicas basadas en la separación de proteínas.

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> Bajo costo Fáciles de realizar 	<ul style="list-style-type: none"> Dependen de la expresión fenotípica de la característica a analizar Requieren reactivos específicos. Poco poder discriminatorio

Tabla 5.1.- Ventajas y desventajas del uso de métodos de subtipificación fenotípica

5.3.- TÉCNICAS DE SUBTIPIFICACIÓN GENOTÍPICA

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la existencia de relación clonal entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes, ya que permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva.

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> Alto poder discriminatorio. De aplicación universal. No dependen de la expresión fenotípica de la característica a analizar. 	<ul style="list-style-type: none"> Elevado costo. Complejidad.

Tabla 5.2.- Ventajas y desventajas del uso de métodos de subtipificación genotípica

Las técnicas de subtipificación molecular revolucionaron la epidemiología. El avance en las técnicas de purificación, separación y amplificación de los ácidos nucleicos producido desde 1975 y las limitaciones que presentan la mayoría de las técnicas fenotípicas (problemas de tipificación, baja reproducibilidad y bajo poder discriminatorio) estimularon el desarrollo y mejoramiento de las técnicas de tipificación basadas en el estudio del ADN. Entre las técnicas más utilizadas se encuentra el análisis de los perfiles genéticos obtenidos mediante el corte de ADN plasmídico y cromosómico utilizando enzimas de restricción; las técnicas basadas en PCR; y las técnicas combinadas (Leotta XXXX).

TABLA 5.3. Características más relevantes de algunos métodos de tipificación basados en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR en comparación con la electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Método	Facilidad de la técnica	Interpretación de resultados	Duración (días)	Reproductibilidad entre laboratorios	Reproductibilidad entre laboratorios	Costo por prueba
PFGE	Moderada	Fácil	3	Buena	Buena	Moderado
RFLP-PCR	Fácil	Fácil	1	Buena	Buena	Bajo
Rep-PCR	Fácil	Fácil	1	Buena	Moderada	Bajo
AP-PCR	Fácil	Fácil	1	Moderada	Baja	Bajo
AFLP	Moderada	Moderada	2	Buena	Buena	Moderado
MLT	Difícil	Moderada	2	Buena	Buena	Elevado

Diversos esquemas de tipificación molecular se aplicaron en diferentes estudios de *Cronobacter* spp., como por ejemplo en la caracterización de una cepa relacionada a un caso clínico, o un aislamiento alimentario (Nazarowec-White & Farber 1999; El Sharoud et al. 2009, Miled-Bennour et al. 2010, Iversen et al. 2007), la caracterización de las cepas obtenidas en un brote específico, (Muytjens et al. 1983, Bierling et al. 1989) la identificación del origen de la infección mediante el establecimiento de correlación entre las cepas aisladas de los individuos afectados y cepas obtenidas de FLID (Clark et al. 1990, van Acker et al. 2001 Caubilla-Barron et al. 2007), la investigación de la distribución geográfica de determinadas cepas (Drudy et al. 2006) el análisis de la dispersión de las cepas encontradas en instalaciones de fabricación, (Mullane et al 2007), y el análisis de las posibles fuentes de contaminación a nivel industrial (Mullane et al. 2008). Entre las técnicas utilizadas para la subtipificación molecular de *Cronobacter* spp. se encuentran: a) electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Nazarowec – White & Farber 1999, Proudly et al. 2008, Fanning & Forsythe 2007, Mullane et al. 2007-2008, Binsztein et al. 2009, Miled-Bennour et al. 2010), b) tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Baldwin et al. 2009), c) análisis con endonucleasas de restricción (REA), d) ribotipificación (Clark et al. 1990, Iversen et al. 2007, Nazarowec – White & Farber 1997, Pei et al. 2009, Miled-Bennour et al. 2010) e) técnicas basadas en PCR (Nazarowec – White & Farber 1997, Van Acker et al. 2001, Drudy et al. 2006, Healy et al. 2008, Proudly et al. 2008, El-Sharoud et al. 2009, Ye

et al. 2010, Funk 2010), f) amplificación de fragmentos polimórficos largos (AFLP) (Turcovský et al. 2011), y g) análisis del ADN plasmídico (Muytjens et al. 1983, Bierling et al. (1989).

5.3.1. Perfiles Plasmídicos

Para la realización del análisis de ADN plasmídico, los plásmidos son purificados y separados por electroforesis en gel de agarosa para determinar su número y tamaño. Puede obtenerse información adicional mediante la digestión del plásmido con endonucleasas de restricción, para luego comparar el patrón de restricción resultante. Técnicamente, el análisis de plásmidos es la más simple de las técnicas basadas en el uso de ADN y puede ser realizada eficientemente con equipamiento electroforético básico y reactivos comerciales. Sin embargo, este análisis solo puede utilizarse en cepas que portan plásmidos de diferente peso molecular. Además, los plásmidos al ser moléculas de ADN extracromosomales pueden presentar el mismo origen de replicación, pertenecer a una misma línea clonal, lo que podría dificultar su diferenciación.

Muytjens et al. (1983) utilizaron esta técnica para investigar la existencia de una relación entre las cepas de *E. sakazakii* aisladas de pacientes con enterocolitis necrotizante y meningitis registrados simultáneamente y cepas de esta misma especie encontradas en las FLID utilizadas para su alimentación. Estos estudios revelaron la existencia de perfiles de plásmidos comunes a tres o cuatro de las cinco cepas aisladas de los pacientes, pero sin embargo no se pudo establecer relación entre las cepas clínicas y las cepas provenientes de FLID analizado. Bierling et al. (1989) al estudiar un brote ocurrido en Islandia encontraron que los perfiles plasmídicos de las cepas de *E. sakazakii* aisladas de tres pacientes con meningitis neonatal estaban muy relacionados de las cepas encontradas en la fórmula utilizada en el hospital. Clark et al. (1990) investigaron dos brotes hospitalarios no relacionados, en los que *E. sakazaki* produjo meningitis, bacteriemia y colonización de recién nacidos. En cada uno de los brotes, *E. sakazakii* fue aislado de los pacientes y las FLID. Tras la posterior evaluación de la relación de las cepas obtenidas, estos investigadores encontraron que aunque los perfiles plasmídicos de los aislamientos clínicos fueron diferentes entre sí, estos se correlacionaron con los obtenidos de las cepas aisladas de FLID. Está en una metodología adecuada para la tipificación y el análisis epidemiológico de *E. sakazakii*, sobre todo si se combina con otros métodos como el análisis con enzimas de restricción REA, ribotipado y electroforesis de enzimas multilocus.

5.3.2. Métodos basados en Polimorfismos de fragmentos de restricción del ADN cromosómico

5.3.2.1. Análisis convencional con enzimas de restricción (REA)

A través del análisis de los sitios de restricción es posible determinar variaciones en la secuencia de ADN. Este método consiste en la comparación del número y el tamaño de los fragmentos producidos por la digestión del ADN cromosómico con REA. Estas enzimas clivan el ADN en una posición constante dentro de un sitio de reconocimiento específico compuesto por 4 a 6 pares de bases. Debido a la alta especificidad de las enzimas de restricción, la digestión completa de un ADN determinado con una enzima específica provee perfiles de fragmentos reproducibles. Estos fragmentos usualmente presentan un tamaño entre 100 y 20.000 pb que pueden ser separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

Las variaciones de los perfiles de los fragmentos generados por una enzima de restricción específica se denominan RFLP; estas pueden resultar de modificaciones en la secuencia debido a inserciones o deleciones del ADN, o sustitución de bases dentro del sitio de clivaje. La selección de la enzima a utilizar se realiza en forma empírica y se basa en 2 criterios importantes: a) el tamaño de los fragmentos de restricción deben ser adecuados para que el patrón obtenido sea comparable, y b) los fragmentos en este rango de tamaño no deben ser demasiado numerosos, para evitar la superposición de bandas que podrían ocultar las diferencias entre los patrones.

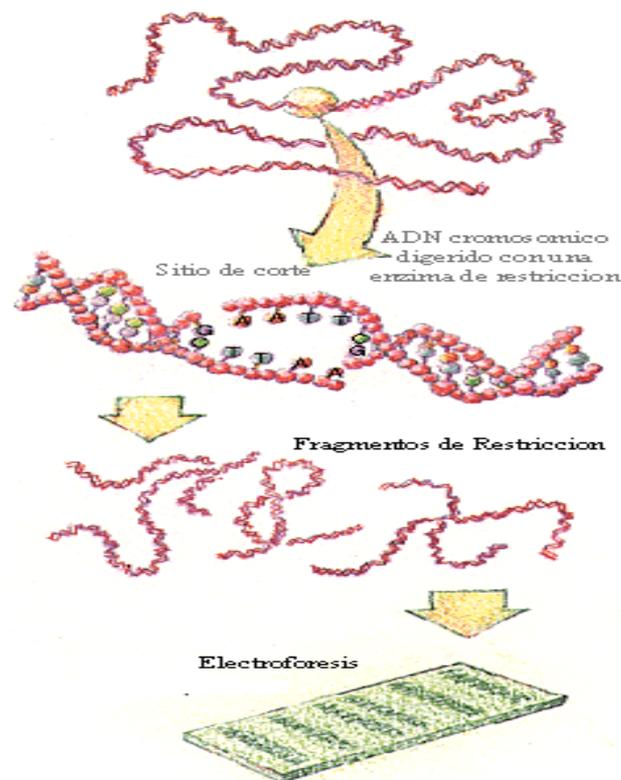


Figura 5.1.- Esquema que muestra los principales pasos del análisis utilizando enzimas de restricción.

5.3.2.2. Hibridación

Ribotipificación

La ribotipificación consiste en el tratamiento del ADN con enzimas de restricción, la posterior separación de los fragmentos obtenidos por electroforesis y la transferencia a un soporte (membrana de nylon u otros). Una vez transferidos se realiza la hibridación con una sonda de ADNr correspondiente a la molécula 16S o 23S de ARNr (Grimont y Grimont, 1986). Esta secuencia ribosomal es altamente conservada. La sonda se encuentra marcada con una molécula radioactiva o no radioactiva, lo que permitirá la visualización de los patrones de bandas o perfiles de identidad. La mayor ventaja de este método es que no requiere ajustes en la metodología para su puesta a punto con diferentes especies bacterianas, ni tampoco el uso de reactivos especie específicos.

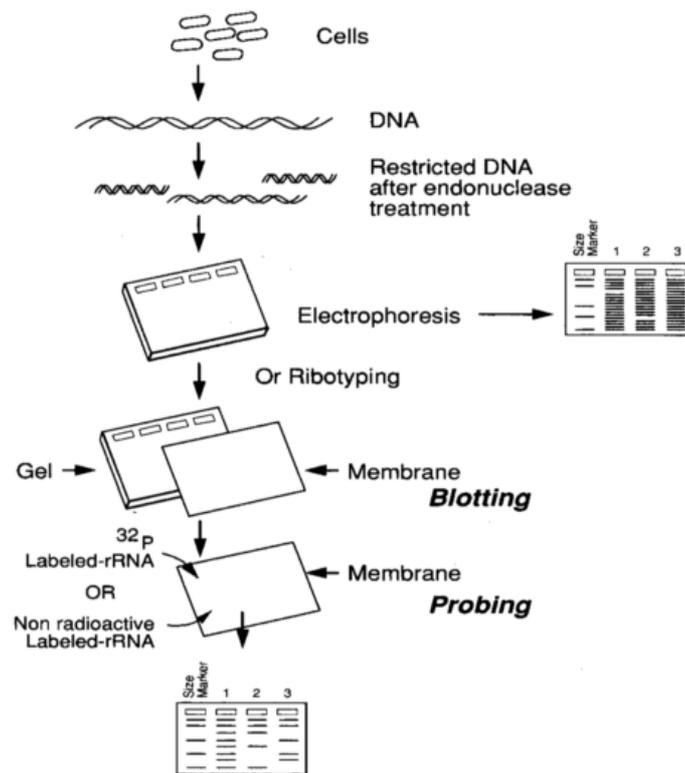


FIGURA 5.2. Esquema que muestra los principales pasos de la técnica de Ribotipado.

Bingen et al. (1994) señalaron que la ribotipificación es un método adecuado para el estudio de las principales especies bacterianas responsables de las infecciones nosocomiales, y particularmente para discriminar a las enterobacterias. Estas afirmaciones son compartidas por Clark et al. (1990), quienes señalan que la ribotipificación es una técnica más discriminativa que el análisis de restricción con endonucleasas (REA) y que permite una mejor identificación de las cepas de *E. sakazakii*. Si bien la ribotipificación fue utilizada con epidemiólogos por Clark et al. (1990) dichos autores complementaron el análisis epidemiológico con la realización de otros métodos de tipificación para establecer relaciones entre dos cepas aisladas de un brote con cepas encontradas en FLID contaminados.

El sistema de caracterización microbiana RiboPrinter™ fue utilizado para tipificar cepas de *E. sakazakii* aisladas de: medio ambiente, materia prima y FLID de tres plantas de producción europeas. Treinta cepas de *E. sakazakii*, obtenidas de una de las fábricas producción de FLID, se agruparon en ocho patrones de ribotipo, lo que sugiere múltiples fuentes de procedencia del

organismo. La identificación de los ribotipos permitió a los funcionarios de la empresa determinar cuáles fueron las cepas de *E. sakazakii* aislados de un solo sitio y cuáles eran comunes a las tres fábricas de producción de FLID [anónimo 1996].

Nazarowec-White & Farber (1999) caracterizaron fenotípicamente y genotípicamente aislamientos de origen clínico y alimentario (FLID) provenientes de Canadá. El análisis de los patrones de ribotipado realizado utilizando el sistema de caracterización microbiana RiboPrinter™ fue utilizado para tipificar, este estudio permitió la identificación de 10 ribotipos. Tres aislamientos clínicos del mismo hospital en años diferentes (1981, 1990 y 1992, respectivamente) compartieron un mismo perfil. Otras dos cepas clínicas tuvieron el mismo ribotipo de la tipo de cepa (ATCC 29544), que también fue un aislamiento clínico. Los otros tres aislamientos clínicos evaluados mostraron ribotipos únicos. Tres aislamientos FLID producidos por la misma empresa, obtenidos a partir de tres lotes diferentes, también compartieron un ribotipo común.

En cuanto a la elección de las endonucleasas de restricción para ribotipificación, Clark et al. (1990) encontró que comparada con la *Barn* H1, la *Hind*III provee patrones ribotipificación, de *E. sakazakii*, mas discriminatorios probado, pero no probaron la enzima de restricción *Eco*RI, utilizada en sistema de caracterización microbiana Dupont RiboPrinter TM.

Iversen et al. (2007) utilizaron esta técnica para caracterizar 210 cepas de *E. sakazakii* utilizando un equipo automatizado denominado Ribo-Printer™ Microbial Characterization System (Qualicon Inc., DE, USA) y la enzima de restricción *Eco*R1. Los patrones de ribotipificación fueron analizados en el software Bionumerics v.4.5, mediante el cual se elaboro un dendograma. Los porcentajes de similitud en los patrones de ribotipado de todas las cepas de *E. sakazakii* fueron superiores al 62%. Porcentajes de similitud superiores al 70% fueron utilizados para definir los distintos grupos de *E. sakazakii*, 1-R, 2-R, 3-R, y R-4, los que se corresponden a 16S rRNA grupos de 1-4. Estos y otros análisis adicionales fueron la base de la modificación taxonómica que propusieron Iversen y colaboradores según la cual este microorganismo paso a denominarse *Cronobacter sakazakii*, y para entonces se propuso que esta especie incluía por cinco genoma especies.

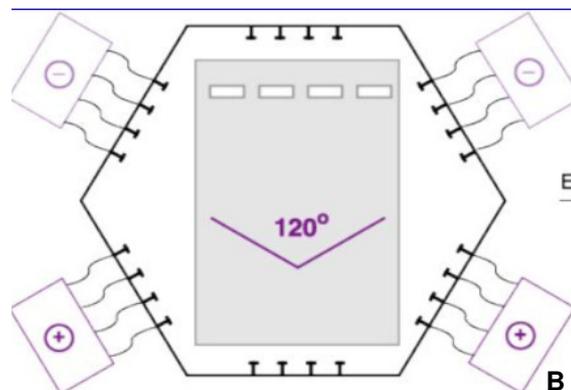
Pei et al. (2009) ribotiparon 28 aislamientos y 2 cepas estándar de *E. sakazakii* utilizando el sistema de caracterización microbiana automatizado Riboprinter™ (Du Pont), esta sistema agrupo los aislamientos 26 ribotipos, encontrando además la bajos porcentajes de similitud (31,58%) con

aproximadamente 10 bandas por ribotipo con pesos moleculares entre 1 y 50 Kb. Por reagrupamiento utilizando el software Bionumerics se obtuvieron 4 clusters.

Miled-Bennour et al. (2010) también utilizaron la ribotipificación, pero esta vez con la finalidad de establecer la relación filogenética 150 cepas de *Cronobacter* spp. de distinta procedencia y combinando esta técnica con el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA. La ribotipificación fue realizada utilizando la enzima de restricción *EcoRI* en el sistema automatizado RiboPrinter (Qualicon Inc., Wilmington, DE). Los resultados obtenidos demostraron la presencia de agrupaciones de ribotipos claramente definidas, las que, de acuerdo con el análisis bioquímico, fueron correspondientes a su especiación, encontrando únicamente dos excepciones: una cepa aislada e identificada por pruebas bioquímicas como *C. sakazakii* que por ribotipificación fue agrupada con cepas no *sakazakii* y la cepa 05CHPL53, identificada bioquímicamente como *C. malonaticus* pero por ribotipificación incluida dentro de *C. sakazakii*.

5.3.2.3. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

La PFGE es considerada como la técnica *gold-standard* para la subtipificación molecular. Este método es altamente discriminatorio y se basa en el análisis del genoma completo utilizando enzimas de restricción, como la *XbaI*, que realizan cortes poco frecuentes generando un número relativamente pequeño de fragmentos de ADN de gran tamaño. La separación electroforética de estos fragmentos de ADN se logra por la reorientación molecular los mismos inducida por cambios periódicos en la orientación del campo eléctrico **Figura XXA-C**. Finalmente, como resultado de las variaciones en la presencia de sitios de restricción, se obtiene un perfil genético especie específico (también conocido como perfil de macrorestricción) que puede ser analizado con un software y con él elaborar cladogramas **Figura XXD-E**.



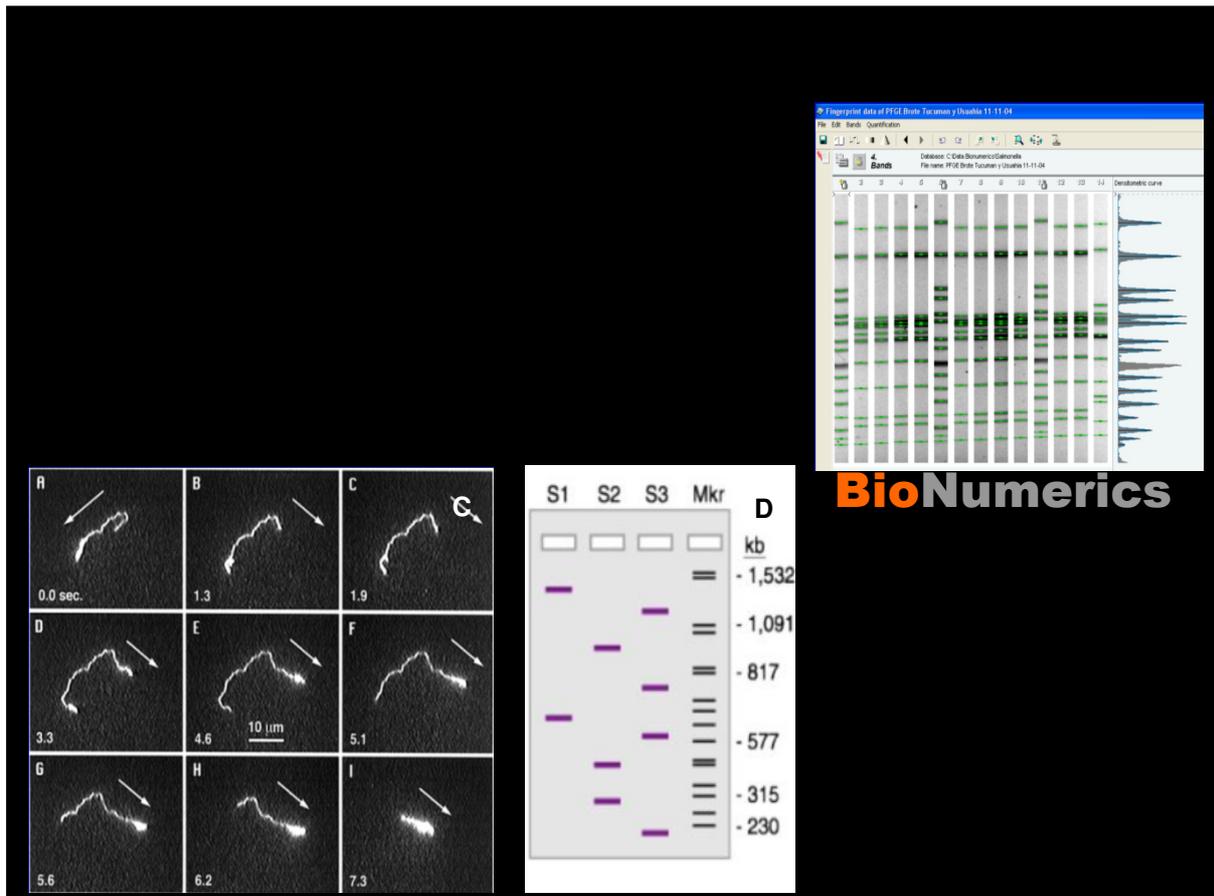


Figura 5.3.- Electroforesis en campo pulsado. A-B. Fotografía y esquematización de una cuba de PFGE. C. migración del material sometido a la PFGE. D perfil de nanorestricción. E. Software utilizado para el análisis de las imágenes obtenidas.

La técnica de PFGE es aplicada con fines epidemiológicos debido a su sensibilidad, reproducibilidad y alto índice discriminatorio cercano al valor ideal de 1 (Maslow et al., 1993). PulseNet provee un protocolo estandarizado desarrollado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades, la utilización de este protocolo facilita la comparación directa de los resultados, generadas en laboratorios de diferentes regiones geográficas obtenidos bajo condiciones estandarizadas (Swaminathan et al. 2001). La normalización de los patrones de bandas permite que los perfiles del gel puedan ser comparados directamente luego de ser transferidos a imágenes Este sistema facilita la trazabilidad global de numerosos patógenos entéricos. En la actualidad se utiliza el protocolo diseñado para *Shigella*, pero se espera que en el futuro *E. sakazakii* pase a formar parte de la lista de PulseNet.

Diversos autores obtuvieron excelentes resultados al utilizar PFGE en la investigación epidemiológica de una variedad de microorganismos, incluyendo *E. coli* (Chinen et al., 2002), *S. Gallinarum* (Leotta et al., 2004), *Streptococcus bovis* (Pedersen et al., 2003), *Pseudomona aeruginosa* (Hammer et al., 2003), *Campylobacter jejuni* (Pedersen y Wedderkopp, 2003) y *Clostridium perfringens* (Nauerby et al., 2003).

En el caso de *Cronobacter* spp., en los últimos años esta técnica ha sido extensamente empleada para su subtipificación. Nazarowec – White & Farber (1997) reportaron que los perfiles de PFGE de 18 aislamientos de *E. sakazakii* (10 de origen clínico y 8 provenientes de FLID de diferentes marcas) utilizando dos enzimas *XbaI* y *SpeI*. Este estudio resulto en la identificación de 18 perfiles de 40 a 690 kb y un índice de discriminación de 1,0; lo que indica un alto nivel de diversidad genómica en las cepas. Estos estudios demostraron que esta técnica posee un mayor poder discriminatorio que la ribotipificación. Ambas enzimas produjo patrones discriminatorios que permitieron una fácil interpretación visual de los de perfiles de bandas. Finalmente los autores señalaron que, dependiendo de las especies bacterianas analizadas, la PFGE puede ser el método de genotipado más discriminatorio disponible. Estas afirmaciones fueron posteriormente confirmadas por Proudly et al. (2008), quienes al evaluar la capacidad de tipificación y el poder discriminatorio de la PFGE en 27 cepas clínicas y ambientales de *E. sakazakii*, las clasificaron en 7 pulsotipos y determinaron que este es el método más apropiado para el análisis y la determinación de mono y policlonalidad.

Fanning & Forsythe (2007) analizaron más de 500 asilamientos de *E. sakazakii* y obtuvieron patrones de bandas de entre 9 y 19 fragmentos de ADN, con tamaños entre 50 y 1000 Kpb. Tras el análisis de dichos perfiles, utilizando la configuración del software establecida por defecto, establecieron la existencia de 19 clusters con un porcentaje de similitud superior al 95%. En la **Figura XX** se muestran los perfiles PFG de dos de los 19 clusters reportados por Fanning & Forsythe (2007).

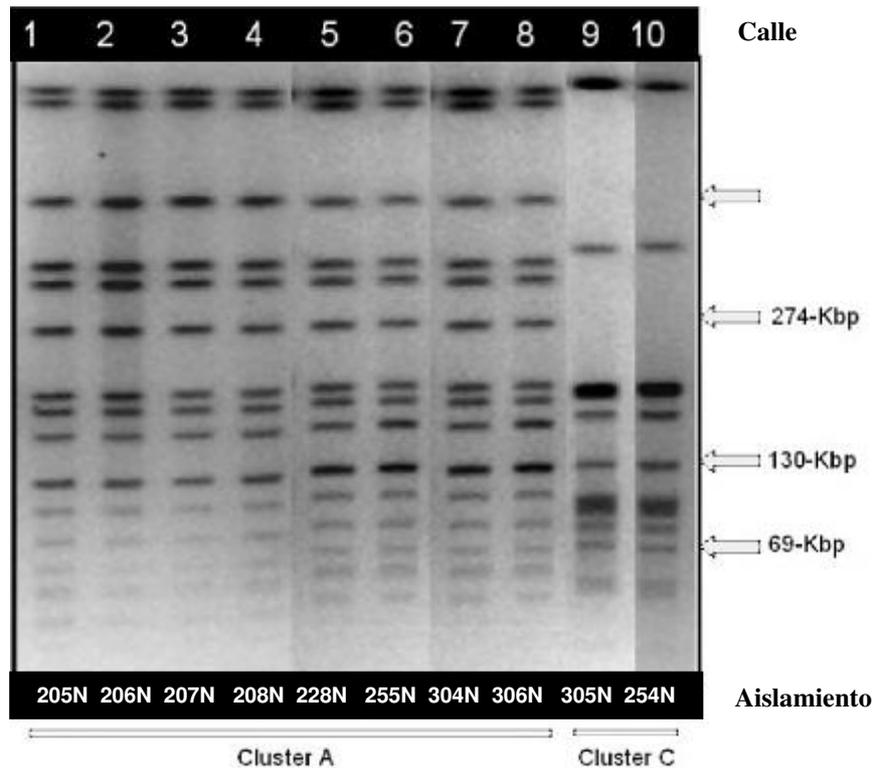


Figura 5.4.- Perfiles PFGE obtenidos por Faning & Forsythe (XXX buscar cita) de una colección de *E. sakazakii* generados con enzima *XbaI*.

Esta metodología ha sido empleada para la caracterización de los aislamientos de este género, ya sean de origen clínico o alimentario. Así por ejemplo, El-Sharoud et al. (2009) identificaron y caracterizaron 16 cepas *Cronobacter* spp. aisladas de FLID comercializados en Egipto, encontrando 8 perfiles PFGE. Miled-Bennour et al. (2010) también utilizaron este método para caracterizar una colección de aislamientos de *Cronobacter* de origen diverso. Esta técnica exhibió un elevado poder discriminatorio dando a conocer 61 pulsotipos distintos entre los 150 aislamientos de *Cronobacter* spp. analizados, en base a la combinación de información sobre el origen de las muestras, y los pulsotipos encontrados, se pudo definir que 64 de los aislamientos analizados pueden ser considerados como cepas únicas.

Esta técnica también puede ser utilizada con el propósito de localizar los puntos de contaminación, investigar la persistencia clonal, e identificar las posibles vías de difusión en la cadena de procesamiento tal como lo describe Mullane et al. (2007) quienes entre 2005 y 2006 recuperaron de las instalaciones de fabricación de FLID un total de 80 aislamientos de *E. sakazakii*, los que tras su caracterización por PFGE fueron agrupados en 19 pulsotipos que podrían ser agrupados en 6 grupos

que incluyen entre 5 a 32 aislamientos. No se observó que alguna de estas agrupaciones estuviera limitada a una ubicación específica, los perfiles PFGE generados a partir de las cepas cultivadas entorno de fabricación, puntos de muestreo a lo largo de la cadena de elaboración y de productos intermedios y finales no reflejaron diferencias. Estos hallazgos sugieren que el entorno de fabricación sirve como una ruta clave para la contaminación esporádica de PIF. Más adelante, Mullane et al. (2008) analizaron la existencia de posibles vínculos entre la contaminación microbiana de los filtros de aire y la de los FLID en las instalación de procesamiento encontrando que los 30 aislamientos obtenidos pertenecían a tres poblaciones clonales, determinadas por PFGE y las que estuvieron distribuidas por toda el área de producción.

En 1994, tras la ocurrencia de un brote infecciones de *E. sakazakii* UCIN en Francia que afecto a 13 recién nacidos y resultó en la muerte de 3 de ellos, Caubilla-Barron et al. (2007) analizaron los pulsotipos de los aislamientos clínicos y los compararon con los provenientes del FLD proporcionado a los pacientes. Se encontraron tres pulsotipos de *E. sakazakii* asociados con los recién nacidos infectados, cada neonato estuvo infectado por más de un genotipo y se encontró coincidencia entre el pulsotipo de una cepa encontrado en una muestra de FLID y el de uno de los aislamientos clínicos.

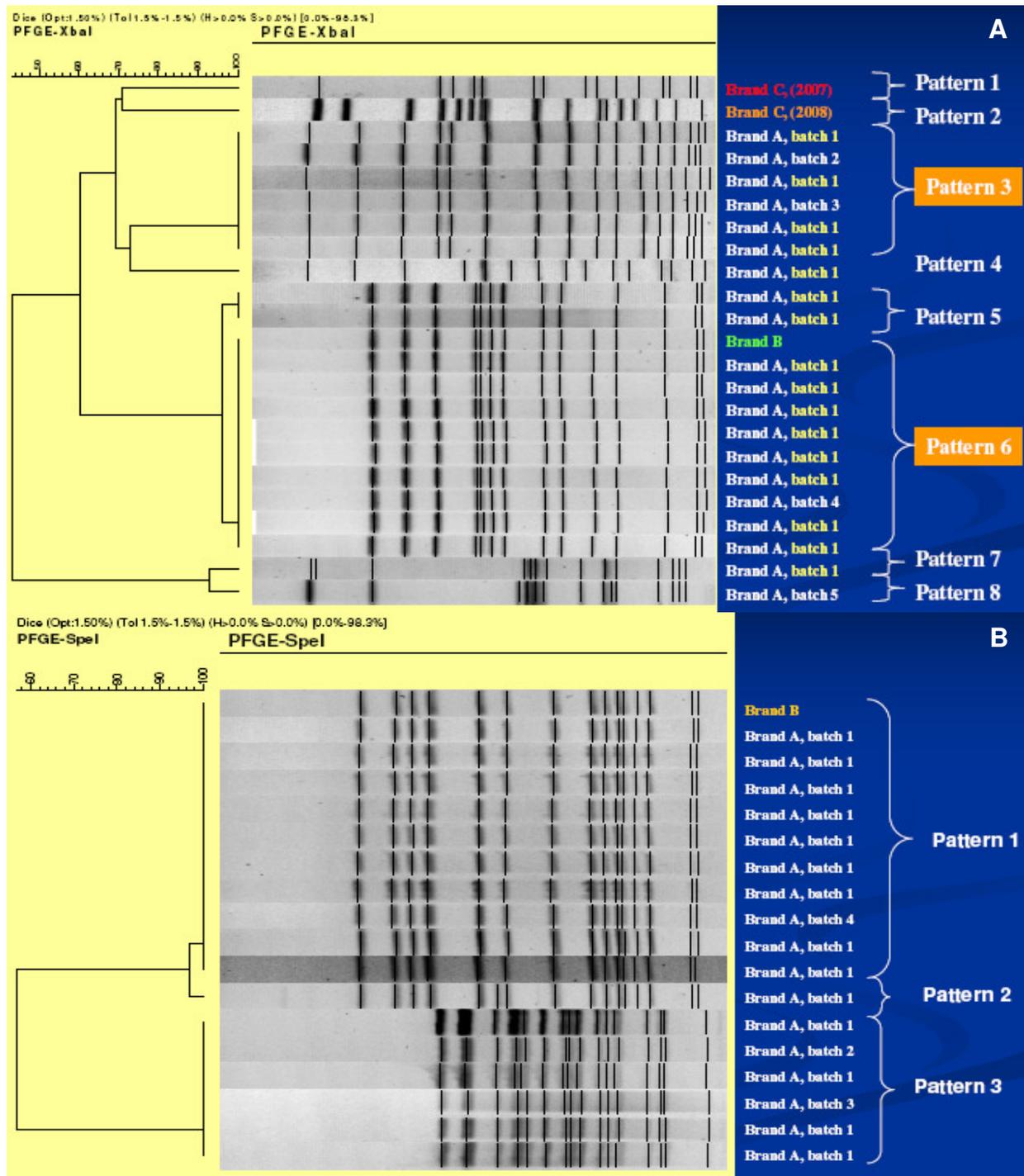


Figura 5.5. Diversidad genética de diversos aislamientos de *E. sakazakii* analizada por PFGE. A. utilizando la enzima *XbaI* (A) y *SpeI* (B). Estudio denominado “*Cronobacter* spp. isolates in Argentina: characterization and subtyping by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and proposal for the standardization of a PFGE protocol”, realizado por el INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán”, de

Buenos Aires, presentado en la 1st International Conference on *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* University College Dublín January 22 – 23, 2009.

En Argentina, Binsztein et al. (2009) realizaron la subtipificación de 23 aislamientos de *Cronobacter* spp. (16 *C. sakazakii* y 7 *C. malonaticus*), obtenidos a partir de tres marcas comerciales de FLID en Argentina entre 2005 y 2008, estos fueron caracterizados por PFGE utilizando el protocolo de PulseNet para *Shigella sonnei* y otro basado en el de *Yersinia pestis*, utilizando las enzimas *XbaI* y *SpeI* (Figura XX). Mediante este método se logró determinar los aislamientos analizados exhibieron un gran diversidad genética, el tratamiento con la enzima *XbaI* permitió definir 8 pulsotipos mientras que la enzima *SpeI* diferencio 3 pulsotipos. Los diferentes patrones de PFGE encontrados en un mismo batch de producción (Marca A, Batch 1) sugieren la existencia de diferentes fuentes de contaminación, ante estos resultados los autores subrayan la importancia de analizar más de una colonia de cada batch analizado. Además, el mismo pulsotipo fue encontrado en diferentes batches de la marca A (patrón 3 en los batch 1,2 y3 y patrón 6 en los batch 1 y 4), esto sugiere la existencia de una fuente de contaminación común. Finalmente, el mismo pulsotipo fue encontrado en dos marcas distintas (A y B), lo que indica posibles que ambas compañías comparten una misma fuente de contaminación (ingredientes o aditivos).

5.3.3. Métodos basados en la amplificación de fragmentos del ADN por PCR

La característica esencial de PCR es la habilidad para amplificar rápidamente y en forma exponencial una secuencia particular de ADN. La reacción requiere de una ADN polimerasa, una mínima cantidad de ADN y 2 oligonucleótidos utilizados como cebadores o “*primers*”. Bajo condiciones adecuadas, en pocas horas se genera una cantidad detectable de producto.

Los métodos basados en PCR son relativamente baratos, fáciles de realizar y proporcionan resultados rápidos (2 días).

5.3.3.1. Amplificación al azar del ADN polimórfico

Esta metodología utiliza oligonucleótidos cortos (10 bases), de secuencias al azar en condiciones de baja astringencia para el *annealing*. Entre estas técnicas se incluyen a la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR) y a la amplificación con iniciadores arbitrarios (AP-PCR). En ambas se utilizan uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorias y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja

astringencia (temperatura de *annealing* 36-45 °C y > 2 mM MgCl₂). Para llevarlas a cabo es necesario seleccionar un cebador adecuado, y trabajar bajo condiciones estandarizadas debido a que son altamente sensibles a pequeñas variaciones en la temperatura, concentración de Magnesio, *taq* polimerasa y ciclado.

En el análisis del ADN polimórfico amplificado al azar o RAPD-PCR se utiliza un cebador de secuencia corta, aproximadamente de 10 pb, que reconoce y amplifica secuencias al azar dentro del ADN genómico. El número y lugar de estos sitios de reconocimiento de secuencias dentro del ADN genómico varían entre aislamientos diferentes de una especie bacteriana. Los productos de amplificación se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, dando un patrón de bandas que, en teoría, es característico de una cepa bacteriana particular. El número y tamaño de los fragmentos es la base para la subtipificación del aislamiento. Como resultados de su alta sensibilidad a variaciones metodológicas una de las principales limitaciones de esta técnica es su baja reproducibilidad.

Nazarowec – White & Farber (1997) demostraron que bajo condiciones de laboratorio este método proporciona perfiles de ADN estables y reproducibles. En un estudio más reciente Drudy et al. (2006) analizaron los perfiles de RAPD de 56 aislamientos de *E. sakazakii* de origen alimentario, ambiental y clínico junto con el de cepas tipo. Cada cepa proporcionó de 3 a 11 productos de amplificación que oscilan entre 350 a 2600 pb. En base al análisis cuantitativo de los patrones de bandas obtenidos, se identificaron tres clusters, el primero incluía 6 aislamientos de la región Australasia que estuvieron altamente relacionados (100%), otros tres aislamientos adicionales estuvieron altamente relacionados con estos seis (88%). Un segundo clúster con 8 aislamientos y un 84 % de similitud, todos ellos fueron obtenidos en Europa y fueron de origen ambiental. El último clúster, con 6 aislamientos exhibió un 84% de similitud a pesar de que estuvo compuesto por 2 de los aislamientos obtenidos de Australasia y 4 de Europa. Estos datos demostraron que las cepas individuales con patrones RAPD indistinguibles pueden haber sido originadas regiones geográficas dispersas, como es el caso de Australasia y Europa. Además, se desconoce la existencia de alguna conexión epidemiológica entre las fuentes de estos dos aislamientos. Los restantes 33 aislamientos mostraron diversos perfiles de bandas RAPD, con porcentajes de similitud inferiores a 80% por lo que fueron considerados como no genéticamente relacionados.

Ye et al. (2010) realizaron la caracterización fenotípica y genotípica de 22 las cepas de *E. sakazakii*, identificando la diversidad genética mediante el análisis del ADN polimórfico amplificado al

azar (RAPD-PCR) encontraron 18 tipos y determinaron que el poder discriminatorio de esta técnica es de 0,973. Los patrones RAPD-PCR mostraron una correlación cercana de los patrones de caracterización fenotípica. Por su parte Funk (2010) utilizó esta técnica para corroborar la sensibilidad de la una PCR diseñada para la detección de *E. sakazakii*. De los 102 aislamientos analizados con RAPD – PCR 57 mostraron diferentes patrones RAPD y muchos de los aislamientos provenientes de alimentos infantiles fueron idénticos.

La amplificación con iniciadores arbitrarios (AP-PCR) Ofrece como ventajas rapidez, flexibilidad, fácil interpretación y relativamente bajo costo. Existen diversos estudios que indican que la AP-PCR posee una baja reproducibilidad (sobre todo entre laboratorios), por lo que es recomendable que esta técnica se valide y se optimice en cada laboratorio. Al igual que en la RAPD – PCR, la baja reproducibilidad de la AP-PCR se debe a que es muy sensible a pequeñas variaciones metodológicas, como el procedimiento de extracción de ADN, el tipo de termociclador, la concentración de molde de ADN, la temperatura de anillamiento, la concentración de iones magnesio, etc. En general, la AP-PCR suele tener un poder de discriminación inferior al de la PFGE, aunque puede incrementarse con la utilización de varios cebadores y mediante la optimización de la PCR. La AP-PCR se ha utilizado en diversos estudios de tipificación bacteriana (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella pneumophila*, etc.) y hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*).

Van Acker et al. (2001) describieron un brote de ECN en Bruselas - Bélgica, entre Junio y Julio de 1998, que afectó a 12 recién nacidos provocando la muerte de dos de ellos. *E. sakazakii* fue aislado de estómago, sangre y esponjados anales de seis de los 12 recién nacidos involucrados, 10 de ellos fueron alimentados por vía oral con la misma marca de FLID a partir de la cual *E. sakazakii* también fue recuperado. La tipificación molecular por RAPD-PCR determinó el hallazgo de tres perfiles distintos, también se confirmó la similitud entre las cepas clínicas y las obtenidas de los FLID. Tras la suspensión del uso de dicho FLID no se registraron otros casos en dicho hospital.

5.3.3.2. Amplificación de fragmentos comprendidos en secuencias repetitivas

Estas técnicas se basan en la amplificación de secuencias altamente conservadas, intergénicas y repetitivas, que permiten obtener un mayor número de fragmentos y por consiguiente un mayor número de bandas. Existen 2 grupos principales de elementos repetitivos que son utilizados para la subtipificación de bacterias, a) los elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP) que

ocupan el 1% del genoma y están representados por 500 a 1.000 secuencias repetidas de ADN con un tamaño de 33 a 44 pb (Stern et al., 1984), y b) las secuencias repetitivas intergénicas de consenso de las enterobacterias (ERIC) que son otras secuencias utilizadas con éxito para la subtipificación de enterobacterias (Versalovic et al 1991; Stumpf et al. 2005). Pero su uso no es recomendable para estudios a largo plazo, ni para aquellos que no sean de aplicación local. Además, por su sensibilidad a variaciones en las condiciones de ensayo es necesario estandarizar la técnica. Finalmente, podemos mencionar que en este grupo también se incluye el análisis de elementos BOX de 154 pb, el que a continuación será descrito con mayor detalle.

Amplificación de secuencias repetitivas extragénicas y palindrómicas (Rep-PCR)

La Rep-PCR es otra técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias, algunas bacterias grampositivas y hongos. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias Rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN.

La técnica de REP-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo costo, una vez que se dispone de un termociclador.

Los patrones de bandas suelen ser sencillos, como en *A. baumannii*, aunque en otros microorganismos, como *Escherichia coli*, la interpretación de los patrones es algo más dificultosa debido al mayor número de bandas obtenido y a la proximidad que existe entre algunas bandas.

Fernández-Cuenca (2004) menciona que esta técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferiores a los de la PFGE, estas afirmación fue corroborada por Healy et al. (2008), quienes emplearon Rep-PCR y PFGE para realizar la subtipificación de una colección de aislamientos de *E. sakazakii* de origen diverso previamente caracterizados. El análisis de Rep PCR permitió la identificación de 65 tipos, mientras que la PFGE evidenció la presencia de 110 pulsotipos.

Sin embargo, Vila et al. (1996) observaron que la REP-PCR presenta un poder de discriminación similar al de la PFGE y superior al de la AP-PCR en la subtipificación de *A. baumannii*.

Estudios realizados por Tenover et al. (1994), y Van Belkum et al. (1995) indican que la rep-PCR es tan discriminatoria como la AP-PCR y el PFGE en la tipificación de *S. aureus*.

El-Sharoud et al. (2009) identificaron y caracterizaron 16 cepas *Cronobacter* spp. aisladas de productos lácteos comercializados en Egipto. Posteriormente subtipificaron las cepas obtenidas utilizando rep-PCR e identificaron 3 grupos (A, B y C) con porcentajes de similitud superiores al 95%; todos los aislamientos identificados como *C. malonaticus* estuvieron incluidos en un único clúster (C), mientras que los identificados como *C. sakazakii* estuvieron distribuidos en dos grupos B y C. Del Vecchio et al. (1995) sugieren la utilización de cebadores fluorescentes para incrementar el poder discriminatorio de esta técnica, aunque esto encarece bastante la técnica debido a que se necesita un secuenciador automatizado de ADN para analizar los patrones de bandas obtenidos.

Amplificación de secuencias de consenso repetitivas de Enterobacterias ERIC-PCR

La amplificación de secuencias ERIC mediante PCR (ERIC-PCR) es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gram-negativas. Las secuencias ERIC son elementos de 126 bp los cuales contienen una secuencia central altamente conservada que está localizada en regiones extragénicas del genoma bacteriano. Inicialmente fueron definidas sobre las secuencias obtenidas de *E. coli* y *S. Typhimurium* (Versalovic et al., 1991). Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR.

En este método un par de cebadores originalmente descritos siguiendo los alineamientos de varios elementos ERIC es utilizado sobre ADN genómico purificado del organismo en estudio. Estos cebadores contienen entre 32 y 34 bases. Mullane (datos no publicados) evaluó la aplicación de ERIC – PCR para la subtipificación de una colección de aislamientos de *E. sakazakii*, la **Figura XX** muestra un gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio que contiene 9 aislamientos de *E. sakazakii* (carriles 1 y 2) y uno de *Pantoea agglomerans* (carril 3). Las dos cepas tipo de *E. sakazakii* fueron comparadas con 8 aislamientos de *E. sakazakii* seleccionados al azar de una base de datos conformada por cepas de diversos orígenes. Los perfiles de ADN de los carriles 1, 4 y 5 fueron indistinguibles y contienen la cepa tipo antes mencionada y dos aislamientos ambientales (4 y 5).

Se observaron semejanzas en los carriles 6, 7, 8 y 10, que tienen muestras obtenidas de aislamientos clínicos (6 y 7) y ambientales, estos parecen ser indistinguibles entre sí con menores diferencias en comparación con las tres cepas analizadas anteriormente. Los carriles 1 y 9 contienen

cepas de *E. sakazakii* notablemente distintas y *Pantoea agglomerans* produjo un patrón ERIC distintivo y característico.

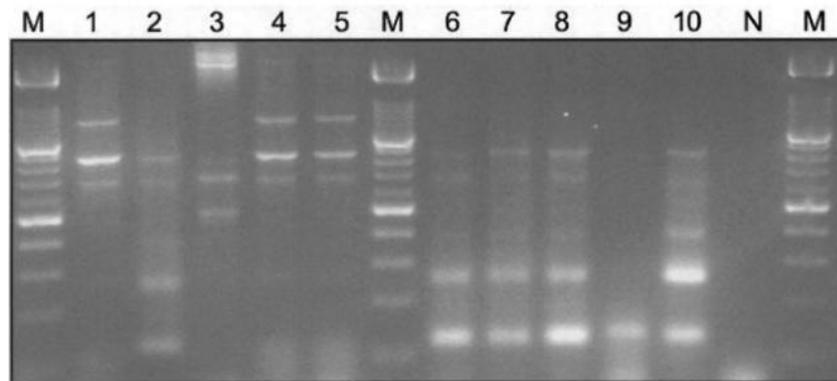


Figura 5.6. Perfiles de ADN de una colección de aislamientos de *E. sakazakii* y *Pantoea agglomerans* analizados por ERIC-PCR.

Cuando los perfiles de bandas fueron posteriormente comparados usando RAPD y PFGE, los aislamientos de los carriles 4 y 5 fueron indistinguibles y se determinó que poseen un 85% de similitud por PFGE. Además, empleando el método RAPD, la cepa de tipo *E. sakazaki* del carril 1 también fue similar a aquellas ubicadas en los carriles posteriores pero exhibió una similitud aproximada del 75% al ser analizada por PFGE. Los aislamientos de *E. sakazakii* de los carriles 6 y 7 fueron indistinguibles por PFGE y RAPD; y basados en los perfiles PFGE y RAPD, los de los carriles 8 y 10 fueron considerados muy diferentes. Ye et al. (2010) caracterizaron genotípicamente 22 cepas de *E. sakazakii* mediante esta técnica encontrando 16 tipos de *fingerprints* o patrones ERIC-PCR con un umbral de similitud del 80%, y calcularon que el poder de discriminación (D) de esta técnica fue de 0,933. Los resultados de ambos autores indican que esta técnica provee un poder discriminatorio comparable al de la electroforesis en campo pulsado.

Amplificación de secuencias BOX (BOX-PCR)

Esta es una técnica económica simple y eficiente, que surge de la modificación de la Rep-PCR y utiliza como cebador al segmento BOX-AIR (Versalovic et al. 1991; Versalovic et al. 1994). Este es un análisis de *fingerprint* basado en la presencia en el ADN de motivos repetidos, lo que pueden ser identificados por primera vez en *Streptococcus* y posteriormente encontrado en otras especies bacterianas. Estas secuencias BOX se encuentran intercaladas en todo el genoma, y por ello la PCR-BOX puede amplificarlas simultáneamente (Brusetti et al. 2008). Esta técnica es más fácil, RFLP, AFLP

y RADP (Niemann et al. 1997; Olive & Bean 1999; Chmielewski et al. 2002), y es más rápida, económica y en algunos casos más discriminatoria que la PFGE, aunque menos reproducible (Olive & Bean 1999). Los patrones BOX no se ven afectados la edad de cultivo de la cepa en estudio (Kang & Dunne 2003), siendo fácilmente mediante analizados con la ayuda de un software. Sin embargo, los productos, al ser separados en un gel de agarosa pueden presentar problemas de resolución y dificultades en la estandarización y comparación de los perfiles. Para superar estas limitaciones en la se diseño una nueva versión de esta técnica (F-BOXPCR), en la que los productos son marcados con fluorocromos y analizados en un secuenciador de ADN automatizado Brusetti et al. (2008).

Proudy et al. (2008) utilizaron esta técnica para comparar el poder discriminatorio de esta técnica frente al de la PFGE, en 27 cepas de *E. sakazakii*. Las principales agrupaciones obtenidas por PCR-BOX y PFGE fueron semejantes. Siete cepas mostraron perfiles singulares, tanto en PFGE y BOX-PCR. En general, los patrones obtenidos con BOX-PCR arrojaron 92% de concordancia con los obtenidos con PFGE, estos resultados permite proponer a la BOX-PCR como un método alternativo para la subtipificación de *E. sakazakii*. La BOX-PCR es un técnica de tipificación molecular repetible y discriminatoria para cepas de *E. sakazakii* y la accesibilidad de los equipos de PCR es mayor que la de los sistemas de PFGE. Además, la preparación y análisis de muestras es más fácil, y rápido obteniendo datos en tan solo 2 días (frente a 5 días con PFGE).

5.3.4 Métodos Combinados

5.3.4.1. PCR locus específica –RFLP

La técnica de PCR-RFLP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas. Con esta técnica se estudia una región muy limitada del genoma (p. ej., un determinado gen que codifica para una proteína específica), por lo que su poder de discriminación y reproducibilidad suelen ser algo inferiores al de los métodos de tipificación citados anteriormente. En general, el poder de discriminación de esta técnica depende de una serie de factores como la especie del microorganismo, el gen analizado y el tipo de enzima de restricción. El poder de discriminación de la técnica de PCR-RFLP es inferior al de la PFGE aunque puede incrementarse utilizando varias enzimas de restricción. La principal ventaja de la PCR-RFLP radica en la rapidez y simplicidad de la técnica, que permite la obtención de resultados en una sola jornada, y la reproducibilidad de los patrones de restricción.

El análisis del gen de la flagelina *fliC* por PCR-RFLP ha sido empleado con numerosas Enterobacteriaceae (Winstanley & Morgan, 1997; Dauga et al. 1998, Machado et al. 2000). Proudly et al. (2008) utilizaron esta técnica para la subtipificación genotípica de 27 cepas de *E. sakazakii*, este estudio mostró que el gen de la flagelina *fliC* de *E. sakazakii* tiene la particularidad de ser menos variable que la mayoría genes *fliC* de otras enterobacterias, debido a la ausencia de un dominio central y, en consecuencia, que el análisis de este gen por PCR-RFLP resulta ser insuficiente para discriminación exacta diferentes cepas de *E. sakazakii* y su análisis resulta poco informativo. Sun et al. (2011), analizaron la agrupación de los genes para el antígeno-O mediante PCR-RFLP, obteniendo a partir de las 119 cepas de *C. sakazakii* analizadas productos de aproximadamente 9 a 12 kb, que fueron amplificados y digeridos con la enzima *MbolI* obteniendo patrones claramente identificables. Posteriormente la elaboración de un dendrograma reveló la presencia de siete grupos estrechamente correlacionado con la agrupación obtenida en base al esquema de serotipificación propuesto en el mismo trabajo.

5.3.4.2. Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se fundamenta en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción (generados a partir de ADN cromosómico) a los que previamente se les ha unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos. Existen variaciones metodológicas del AFLP, dependiendo del número de cebadores (normalmente se utilizan 1 ó 2), del tipo de marcaje de los cebadores (radiactivo o fluorescente) y del número de enzimas de restricción utilizadas (1 ó 2). Los protocolos de AFLP más utilizados suelen emplear 2 enzimas de restricción y cebadores fluorescentes. En la **Figura XX** se presenta un esquema que ilustra los principales pasos a seguir para el desarrollo de esta técnica.

Las ventajas más interesantes de este método son su elevada sensibilidad y su excelente poder de discriminación. La técnica de AFLP suele ser menos discriminativa que el PFGE, aunque para algunos microorganismos, como *Enterococcus faecium*, se ha observado que el poder de discriminación de ambos métodos son muy similares. En cepas de *Salmonella enterica* serovar *enteitidis*, se ha observado que el AFLP es mucho más discriminativo que la PFGE. Turcovský et al. (2011) utilizaron AFLP con el fin de caracterizar 71 cepas de *Cronobacter* spp. aisladas de 602 alimentos. La genotipificación por AFLP facilitó la discriminación de los seis grupos principales con nivel de similitud del 70% y la agrupación de las cepas estuvo claramente relacionada con la identificación de las especies. La tipificación molecular por AFLP puede ser aplicada como una

herramienta útil no sólo para la comparación directa de los aislamientos de *Cronobacter* spp., proporcionando la trazabilidad, sino también para la clasificación de las especies.

Entre los principales inconvenientes de esta técnica hay que destacar su laboriosidad, el elevado coste del equipo (se requiere un secuenciador automatizado de ADN), la obtención de patrones de bandas complejos (entre 30 y 50 fragmentos de distinto tamaño) y el análisis de los mismos con un *software* adecuado. Todo esto hace que el AFLP se utilice fundamentalmente en centros de referencia.

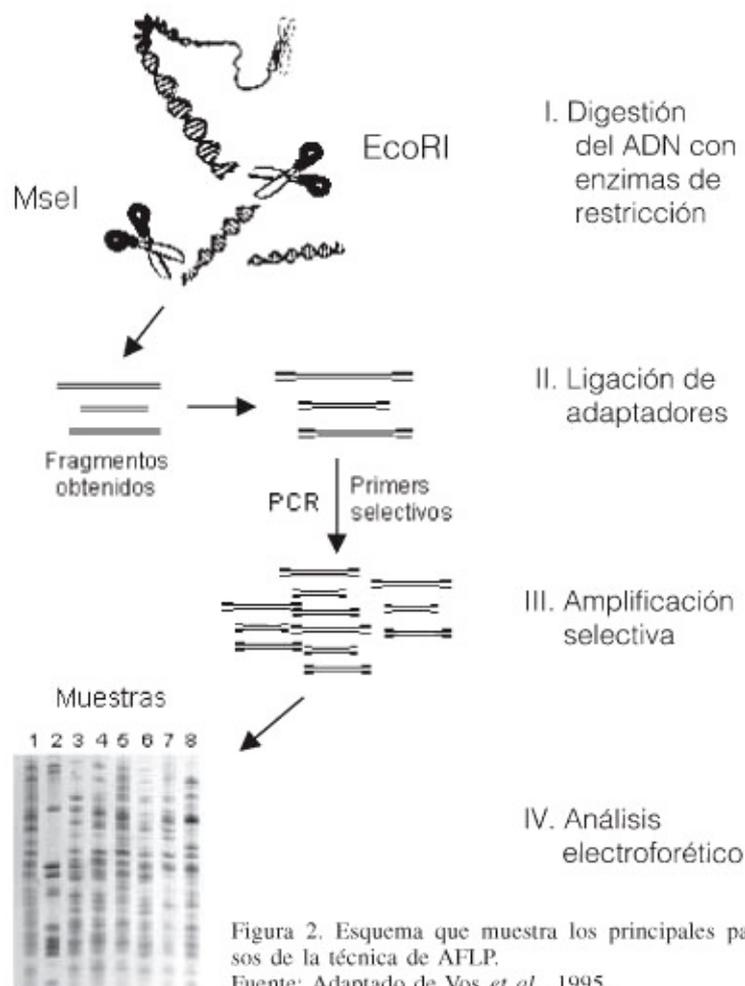


Figura 5.7. Esquema que muestra los principales pasos de la técnica AFLP.

5.3.4.3. Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

Esta técnica, desarrollada en los últimos años, se basa en la amplificación y secuenciación de genes denominados *housekeeping*, genes ribosomales, genes relacionados con factores de virulencia,

o genes implicados en el metabolismo celular cuyos segmentos poseen entre 500-600 pb. Los genes *housekeeping* son definidos como genes constitutivos cuyos productos son necesarios para el mantenimiento celular. Además de que su expresión es virtualmente idéntica entre diferentes cepas genéticas (genotipos), dichos genes son típicamente presentados en una sola copia dentro del genoma, están sujetos a bajas tasas de inserciones y deleciones y pueden ser rápidamente divididos en sitios sinónimos o no sinónimos los que experimentan diversas tasas y patrones de evolución. Al analizar la secuencia de estos genes se pueden establecer la relación genética existente entre las bacterias. Se han identificado 10 genes *housekeeping* como candidatos potencialmente universales para análisis filogenético de especies bacterianas. (Santos & Ochman 2004).

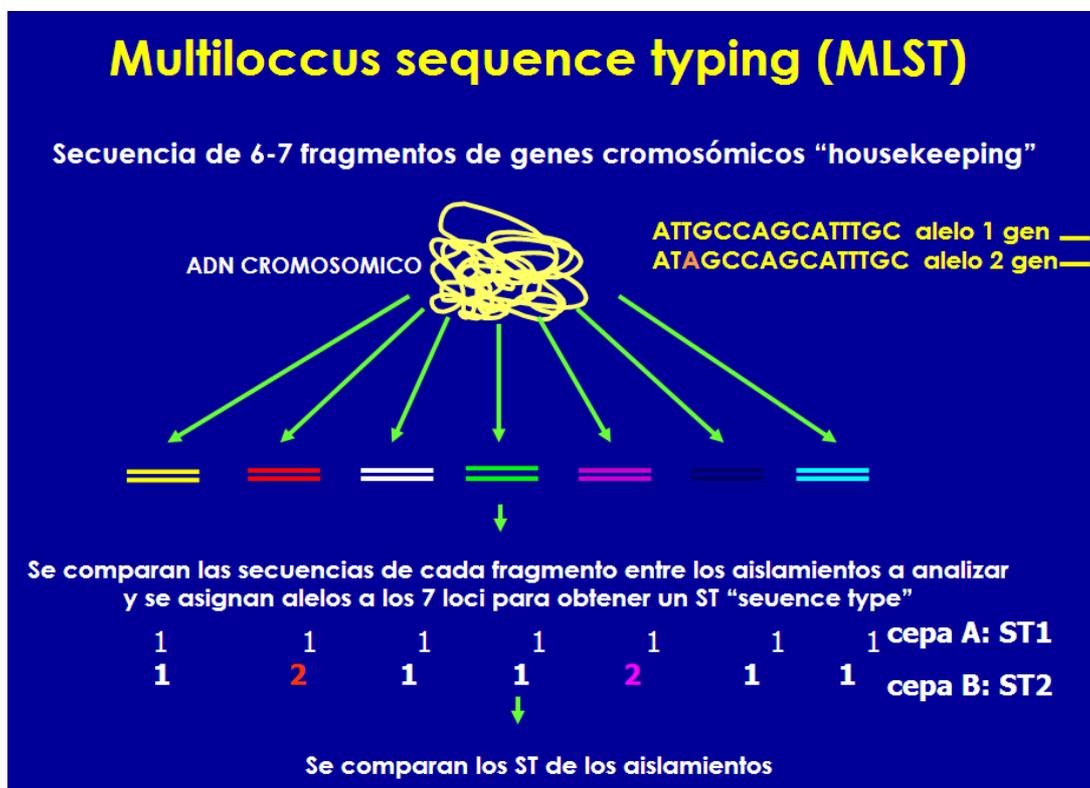


Figura 5.8. Esquematización del fundamento de la MLST

Tanto MLST como PFGE son técnicas que presentan un gran poder discriminatorio y muy buena reproducibilidad entre laboratorios. Debido a su alto costo, a que requieren la utilización de equipos especiales y una meticulosa extracción de ADN en manos de personal experimentado (Gunawardana et al., 2000; Pedersen et al., 2003) su utilización se limita a laboratorios de referencia (Blackall y Mifflin, 2000).

Esta técnica fue aplicada con éxito para el estudio de *Salmonella* spp. y *Vibrio cholerae* (Kotetishvili et al., 2002) Baldwin et al. (2009) desarrollaron un sistema MLST para la identificación y diferenciación de *C. malonaticus* y *C. sakazakii*. Esta técnica fue probada con 60 cepas de *C. sakazakii* y 16 de *C. malonaticus*, de origen clínico y no-clínico obtenidas en USA, Canadá, Europa, Nueva Zelanda Korea y China, entre 1951 y 2008. Este sistema utilizó siete loci; *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB* y *pps*. Se identificaron 12 secuencias tipo (ST) en *C. sakazakii*, y 3 en *C. malonaticus*. Un tercio (22/60) de las cepas de *C. sakazakii* se ubicaron dentro de la secuencia tipo 4 (ST4), la que incluyó un número semejante de aislamientos clínicos y alimentarios. La ST8 representa un grupo particularmente virulento de *C. sakazakii*, 7 de las 8 cepas de este grupo fueron de origen clínico, y fueron aisladas de cuatro países entre 1977 - 2006. *C. malonaticus* se dividió en tres secuencias tipo (ST7, ST10 y ST11). Finalmente estos autores sugirieron que el rol de la biotipificación en la identificación y la discriminación de *C. sakazakii* y *C. malonaticus* necesita ser seriamente revisado y que el MLST permite identificar secuencias tipo asociadas a la una mayor virulencia, lo que contribuye a aumentar la comprensión de la patogenicidad de este microorganismo.

ANEXOS

LISTADO DE GENES Y REGIONES EXCLUSIVAS DE *CRONOBACTER* SPP. BASADAS EN EL ANÁLISIS COMPUTACIONAL COMPARATIVO. TABLA ORIGINAL DE YAN ET AL. 2011.

Nro. de acceso GeneBank	Posiciones	Función del gen
CP000783.1	268708-272424	Proteína hipotética (ESA_00298 – ESA_00300)
CP000783.1	273598-287078	Proteína hipotética (ESA_00304 – ESA_00310, excepto alginato O-acetyltransferasa AlgI [ESA_00303]. lipoproteína putativa [ESA_00305], y el alfa-2-macro globulina región familiar [ESA_00308])
CP000783.1	578742-591835	Proteína hipotética (ESA_00611, ESA_00612, ESA_00615, ESA_00616 y ESA_00618)
CP000783.1	957212-969835	Proteína hipotética (ESA_00981 - ESA_00990, excepto putative invasin [ESA_00987] fago integrasa [ESA_0090])
CP000783.1	991095-994496	Proteína hipotética (ESA_01026), peptidasa S14 ClpP (ESA_01027), Fago de la proteína mayor de la cápside, de la familia HK 97 (ESA_01028)
CP000783.1	1152718-1158275	Grupo antígeno O (ESA_01181-ESA_01185)
CP000783.1	1186371-1190015	Proteína hipotética (ESA_01216-ESA_01218)
CP000783.1	1391367-1394671	Acido graso hidroxilasa putativa (ESA_01448), Acido graso desaturasa putativa (ESA_01449), Proteína de membrana putativa (ESA_01450)
CP000783.1	2137914-2140588	Proteína hipotética (ESA_02201), esterase/lipasa/ tioesterasa putativas (ESA_02202), regulador transcripcional de la familia LysR (ESA_02203)
CP000783.1	2256328-2258819	Putative caudovirus prohead protease (ESA_02319), Putative phage portal protein, lambda family (ESA_02320), Putative phage terminase large subunit (ESA_02321)
CP000783.1	3289362-3297665	Grupo de genes para la biosíntesis del polisacárido capsular (ESA_03352-ESA_03357)
CP000783.1	3762752-3765513	Grupo de genes fimbriales (ESA_03812-ESA_03814)
CP000783.1	3861832-3864117	Proteína hipotética (ESA_03913-ESA_03916)
CP000783.1	4039090-4042971	Proteína hipotética (ESA_04084-ESA_04086)
CP000783.1	4348939-4352405	fosfoforibosil pirofosfato sintetasa putativa (ESA_04383), nicotinamida fosforibosil transferasa putativa (ESA_04384), Proteína hipotética (ESA_04385), Putative tellurite resistance protein (ESA_04386)

IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES BIOMARCADORES QUE PUEDEN SER UTILIZADOS PARA DISTINGUIR A *CRONOBACTER* SPP. DE OTROS PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS. INFORMACIÓN BASADA EN LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA. TABLA ORIGINAL DE YAN ET AL. 2011.

<i>C. sakazakii</i> Locus tag	Proteína de <i>C. sakazakii</i> Numero de acceso del Genbank	Género/ nombre de la proteína (símbolo)	Presencia de Homología										
			<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Shigella</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Campylobacter/</i> <i>Listeria</i>	
ESA_01183	YP_001437286.1	Wzx	Si	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
ESA_01185	YP_001437288.1	Wzy	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
ESA_03317	YP_001439374.1	Quitinase	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No
ESA_02201	YP_001438286.1	Hipothetical protein	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
ESA_02709	YP_001438777.1	Gen de la α - 1,4- glucosidasa (<i>gluA</i>)	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No
ESA_02516	YP_001438597.1	Putative hemolisina/ hemaglutinina	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
ESA_02084	YP_001438170.1	Putative adhesina	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
ESA_00341	YP_001436476.1	Beta – carotene hydroxylase pigment (<i>crtZ</i>)	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
ESA_00341	YP_001436477.1	Phytoene / squalene sintetasa (<i>crtB</i>)	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
ESA_00343	YP_001436478.1	Phytoene dehidrogenasa (<i>crtI</i>)	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
ESA_00344	YP_001436479.1	Lycopene ciclasa (<i>crtL</i>)	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
ESA_00345	YP_001436480.1	Glicocil transfera (<i>crtX</i>)	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
ESA_00346	YP_001436481.1	Isopentenil pirofosfato isomerasa	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
ESA_00347	YP_001436482.1	Geranylgeranyl profosfato sintetasa (<i>crt E</i>)	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
ESA_03721	YP_001439754.1	DNase (<i>TatD</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	No
ESA_02154	YP_001438239.1	Succinil arginina Dehidrodrolasa	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	No
ESA_02391	YP_001438473.1	Proteína de membrana externa A (<i>ompA</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	No
ESA_00314	YP_001436449.1	Ornitina decarboxilasa	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	No

ESA_01872	YP_001437962.1	Catalasa	Si	Si	Si	Si	No	No	No	Si	No	No
ESA_01203	YP_001437307.1	4-A aminobutirato aminotransferasa	No	Si	Si	Si	No	No	No	Si	No	No
ESA_01574	YP_001437664.1	Aconitato hidratasa	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_04127	YP_001440144.1	6- fosfopiruvato hidratasa	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_01954	YP_001438044.1	regulador transcripcional de la reducción del Fumarato a nitrato	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_04154	YP_001440171.1	Alpha- xylosidasa (<i>Yicl</i>)	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	No
ESA_00357	YP_001436490.1	DNA primasa (<i>dna G</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_03853	YP_001439875.1	Galactosido permeasa	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_04206	YP_001440222.1	Endo-1.4 –D – glucanasa(<i>BscZ</i>)	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	No
ESA_00523	YP_001436650.1	Fosfopiruvato hidratasa	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_03753	YP_001439786.1	Porfobilinógeno deaminasa	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_00373	YP_001436507.1	Outer menbrain chanel protein	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_02807	YP_001438873.1	proteína A precursora de la resistencia a Acriflavina (<i>AcrA</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_03723	YP_001439756.1	Translocasa (Sec – independent <i>TatB</i>)	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	No
ESA_02187	YP_001438272.1	Proteína de virulencia (<i>VirK</i>)	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	No	No
ESA_02251	YP_001438336.1	Proteína transportadora de Acilos	Si	No	Si	No	No	Si	Si	No	No	No
ESA_00752	YP_001436865.1	Metaloproteasa extracelular Prt 1	Si	Si	No	No	No	Si	No	No	No	No
ESA_00690	YP_001436805.1	GTP –proteína de unión (<i>lep A</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_04401	YP_001440417.1	Factor de elongación G	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_03312	YP_001439369.1	Isoleucil - t RNA sintetasa (<i>ile S</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_03973	YP_001439995.1	subunidad B de la DNA girasa (<i>gyrB</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_03690	YP_001439730.1	DNA - directed RNA polymerase subunit Beta (<i>rpoB</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
GU 122171	GU 122171	16S r RNA	No									
ACE 74909	ACE 74909	ATPasa (<i>RecN</i>)	Si	Si	Si	Si	No	No	No	Si	Si	No
ESA_00031	YP_0014361076	DNA – directed RNA polymerase subunit Alpha (<i>rpoA</i>)	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
ESA_03979	YP_001440001.1	t RNA modification GTPase TrmE (<i>thdF</i>)	Si	Si	Si	Si	No	No	No	Si	Si	No

CASOS CLÍNICOS RECOPIADOS POR NAZAROWEC-WHITE & FARBER 1997

En 1961, Urmenyi y Franklin en Inglaterra reportaron los dos primeros casos conocidos de meningitis neonatal por *E. sakazakii* (descrito como *E. cloacae* de pigmentación amarilla). Ambos bebés murieron de una infección generalizada (incluyendo meningitis).

Joker et al. (1965) en Dinamarca, informó sobre un caso de un neonato de 4 días con signos meníngeos, complicados por absceso cerebral e hidrocefalia. En consulta con Urmenyi y Franklin, Joker et al. (1965) concluyó que las bacterias aisladas fue un raro Enterobacter, casi idéntica a la cepa aislada del líquido cefalorraquídeo en los dos casos de meningitis neonatal en Inglaterra.

Monroe & Tift (1979) describió el primer caso reportado de bacteriemia neonatal en ausencia de meningitis asociada a *E. sakazakii*. La infección se produjo seis días después de su nacimiento y fue tratado con ampicilina, luego de los meses se observó la recuperación total del paciente, sin secuelas aparentes.

Kleiman et al., 1981 informaron de un caso de meningitis neonatal severa en Indiana, EE.UU., en este caso se estableció con certeza la patogenicidad de *E. sakazakii*. El informe describe una previamente sanos de 5 semanas de edad infantil que desarrollaron meningitis grave causada por *E. sakazakii*. Al ingreso al hospital el bebé ha estado irritable y afebril, sin embargo, no hubo evidencia clínica o de laboratorio de la sífilis congénita malformaciones del tracto urinario, tracto gastrointestinal o del sistema nervioso central. El niño fue tratado con ampicilina y gentamicina durante 21 días y dado de alta. Sin embargo, dos meses después. la circunferencia de la cabeza aumenta rápidamente, lo que exige una derivación ventrículo-peritoneal, el progreso del desarrollo se retrasó con graves secuelas neurológicas.

Adamson y Rogers (1981) también describió un caso de meningitis y sepsis por *E. sakazakii* en un paciente varón de edad de 5 semanas. Los cultivos de sangre, LCR y orina fueron positivos para *E. sakazakii*. Después de un régimen de 14 días de la ampicilina, el paciente fue dado de alta en buenas condiciones, sin secuelas aparentes. Sin embargo, no hubo seguimiento a largo plazo hasta para este paciente.

Este es el segundo caso donde la infección con *E. sakazakii* ocurrido a las 5 semanas de edad, varias semanas después de salir del hospital, lo que indica adquisición de la infección en el entorno del hogar.

Naqvi et al. (1985) en los informes de la terapia neonatal cefotaxima meningitis por bacilos Gram negativos, describió un caso de meningitis en un bebé de 21 días *E. sakazakii* donde, tenía el cerebro abscesos. El paciente, que sobrevivió, posteriormente desarrollado hidrocefalia que requiere una derivación.

E. sakazakii también ha sido descrito como agente causal de numerosas infecciones registradas en Grecia.

Arseni et al. (1984) describió un caso fatal de bacteriemia por *E. sakazakii* en un recién nacido prematuro. Un mes después de este incidente, se encontró que otros 11 recién nacidos atendidos en la misma unidad neonatal fueron colonizados por *E. sakazakii* y presentaban signos clínicos de sepsis grave, cuatro de ellos murieron. Un año más tarde, estos mismos investigadores aislaron a *E. sakazakii* de sangre de un paciente de 3 años leucemia y un niño de 4 años de edad. Ambos pacientes sobrevivieron tras la terapia antibiótica.

En 1988, Willis & Robinson describieron otros tres casos de infección por *E. sakazakii*. A pesar de que estos fueran tratados con ampicilina y cefotaxima uno de los pacientes (bebé de cinco días) falleció a causa de la meningitis. El consumo de una fórmula en polvo para lactantes fue implicada como el modo de transmisión.

E. sakazakii y *Leuconostoc mesenteroides* fueron identificados como agentes causales de un caso de bacteriemia nosocomial en un lactante de 6 meses (Noriega et al., 1990). El posterior tratamiento con Ampicilina y gentamicina condujo a la recuperación del bebé.

CASOS REGISTRADOS DE INFECCIONES Y COLONIZACIONES POR *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) INFANTES Y NIÑOS PEQUEÑOS.

PAIS	Referencia (fecha del reporte)	Género	Peso al nacer	Semanas de gestación	Edad al contraer la enfermedad	Enfermedad síntomas	Resultados	Consumo de FLID	Número de casos (muertes)	Fuente de ES/ comentarios
Inglaterra	Urmenyl & White-Franklin 1961	M	3033 g (6 lb 11 oz)	38	11 d	Meningitis sepsis	Muerto	ND	2 (2)	Primer reporte grupal - misma guardería e incubadora. Dos primeros casos conocidos, 1958.
Inglaterra	AM	F	2.017 g (4 lb 7 oz)	32 (sección C)	5 d	Meningitis y sepsis	Muerto	ND		
Dinamarca	Jøker et al. 1965	F	3250 g	D	4 d	Meningitis	Recuperado	D	1	
EE.UU (GA)	Monroe & Tift 1979	M	2600 g	Término	7 d	Bacteremia	Recuperado	Si	1	Primer reporte de bacteremia. La formula no fue analizada y no hubo relación sugerida. no hubo examen medio ambiental
EE.UU (IN)	Kleiman et al. 1981	F	D	Término	35 d	Meningitis – Enterocolitis necrotizante, formación de absceso	Recuperado (con secuelas graves)	D	1	Previamente sano cinco semanas
EE.UU (OK)	Adamson & Rogers, 1981	M	D	Nacimiento y embarazo normal	35 d	Meningitis y sepsis	Recuperado	D	1	Previamente sano cinco semanas

Países bajos	Muytjens, 1983; Smeets, 1998	M	2830 g	36	5d	Meningitis	Recuperado	Si	1	Hospital A, 9/77 <i>E. sak.</i> encontrado en FLID preparada y utensilios pero no en FLID deshidratada. Perfil plasmídico de <i>E.sak</i> en una FLID difiere del perfil encontrado en todos los pacientes. Los autores concluyen que los factores medioambientales no causaron la infección (se asume que estaba incluido en la formula)
Países bajos	AM	F	2400 g	Término	3d	Meningitis / Bacteremia	Muerto	Si	1(1)	Hospital A, 4/79 Co-morbilidad con mielomeningocele
Países Bajos	AM	F	1670 g	32	3d	Meningitis	Muerto	Si	1(1)	Hospital A, 4/81
Países Bajos	AM	M	1900 g	32	4d	Meningitis	Muerto	Si	1(1)	Hospital A, 4/81
Países Bajos	AM	F	2690 g	Término	5d	Meningitis/ bacteria en sangre	Muerto	Si	1(1)	Hospital A ,7/81
Países Bajos	AM	M	2085 g	38	5d	Meningitis / NEC	Muerto	Si	1(1)	Hospital B y D, 2/78 gemelos, incubadora
Países Bajos	AM	F	1370 g	Prema- turo	5d	Meningitis/ NEC	Muerto	Si	1(1)	Hospital C y D, 7/79
Países Bajos	AM	F	850 g	30	9d	Meningitis/ Bacteremia	Recuperado (retraso)	Si	1	Hospital E, 9/79
EE.UU (MO)	Naqvi et al.1985	F	D	D	21d	Meningitis/ absceso cerebral	Recuperado	D	1	
España	UCD, 2008. Reina, J. 1989	D	D	neonato	D	Conjuntivitis	D	D	1	La referencia e información fue incluida en el resumen de la universidad de Dublín presentado al

										Codex para consideración por el grupo de expertos. Washington DC Julio, 2008- esperando el documento original para verificación
Grecia	Arseni , 1984	D	D	Prema- turo	3d	Bacteremia	Muerto	D	1	Fuente desconocida, coinfección con <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Grecia	Arseni , 1987	8 ♂ 3 ♀	1000 g – 2990 g	2 prema- turos 9 D	2-58 d	Colonizado	Variado	D	11(4)	Septiembre y Octubre, 1984 11 neonatos en una UCIN colonizados con <i>E. sak.</i> , 5 de ellos tuvieron señales clínicas de sepsis y 4 murieron. <i>E. sak.</i> no fue aislado de sangre, CFS, o medio ambientales. En la mayoría de los casos coinfección con: <i>Pseudomonas spp</i> , <i>Klebsiella spp</i> , <i>ser. marcescens</i> , <i>E.cloacae</i> o <i>aerogenes</i> .
USA (LA)	Will & Robinson, 1998	M	D	Término	28d	Meningitis / bacteremia (hidrocefalia)	Recuperado (con secuelas)	D	1	Dos reportes de casos no relacionados
USA (MA)	AM	M	2040 g	37	8d	Meningitis (bacteremia)	Recuperado (con secuelas)	D	1	
Islandia	Biering 1989; Clarke 1990	M	3144 g	36	5d	Meningitis	Recuperado - retardo, cuadriplejía	Si y leche materna	3(1)	Primer estudio que aisló <i>E. sak.</i> de latas no abiertas de FLID (5) asociadas con enfermedades en infantes. Las cepas aisladas de FLID y pacientes fueron del mismo biotipo, antibiótico y perfil plasmídico. <i>E. sak.</i> no fue aislado del FLID, utensilios o medioambiente.
Islandia	AM	M	2508 g	Término	5d	Meningitis	Muerto	Si	AM	

Islandia	AM	M	3308 g	38	5d	Meningitis	Recuperado	si	AM	
USA (TN)	Simmons 1989, Clarke 1990.	D	780 g	28	28d	Sepsis	Recuperado	si	4(0)	Agrupación 7 Feb.- 14 Mar, 1998 Los 4 fueron alimentados con la misma la formula de hidrolizado proteico deshidratado en el hospital, no hubo reportes de exámenes medioambientales o exámenes de latas cerradas. <i>E. sak.</i> aislado de latas abiertas de PIF y 4 casos tuvieron los mismos perfiles plasmídicos y enzimáticos (multilocus).
USA (TN)	AM	D	850 g	27.5	52d	Sepsis	Recuperado	Si	AM	
USA (TN)	AM	D	1270 g	34.5	13d	Sangrado y diarrea	Recuperado	Si	AM	
Portugal	Leocut 1989	D	D	D	D	Meningitis	Muerto	D	1(1)	Serie de casos de 187 niños con meningitis bacteriana evaluados por tratamiento con cefotaxima. Un niño murió de infección por <i>E. sak.</i> No se dieron detalles.
USA (MD)	Noriega 1990.	F	D	D	6 meses	Bacteremia, <i>E. sakazakii</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> encontrado en hemocultivo.	Recuperado	si	1	Descrito como contaminación extrínseca. <i>E. sak.</i> fue encontrado en la licuadora usada para preparar FLID. La formula en sí misma no contuvo <i>E. sak.</i> La historia clínica remarcable para niños sometidos a resecación del intestino grueso al primer día, en TPN para los primeros 3 meses de vida alimentación continua vía tubo.
USA	Gallagher &	M	2520 g	35	2d	Meningitis y	Recuperado	D	1	

(OH)	Ball 1991.					bacteremia.				
Alemania	Reis et al. 1994	M	1420 g	31 pre-maturo	D	Meningitis	Recuperado	D	1	Resultados en múltiples quistes encefalomalacia.
Tailandia	UCD (chotpitayas unon Dh, 1994)				Neonatos (<1m ,niño (1-15m)	11- años estudio de meningitis				La referencia e información fueron incluidas en el resumen de la universidad de Dublin presentado al Codex para consideración por los expertos, Washington Dc julio, 2008- esperando el documento original para verificación.
Canadá (reportado como US)	Tekkok,	F	D	D	Absceso cerebral	Absceso cerebral	Recuperado	NO	1	También se encontraron en el tejido: <i>Corynebacterium aquaticum</i> y <i>Enterobacter cloacae</i>
Escocia	MacDonal N. SCIEH weekly report 11.3.97	F	D	D	Neonato	Meningitis	D	D	1	Primer caso reportado desde 1986 (computarización de registros)
Brasil	Santos , M. 2000	D	D	D	4 neonatos 1 infante	Bacteremia	Recuperado	NO	5	Un brote en 4 unidades hospitalarias de Rio de Janeiro 26 sept- 16 oct, 1998. Todos los casos recibieron IV fluidos (nutrientes parenterales). <i>E. sak.</i> fue aislado de bolsas no utilizadas y de una esponja usada para limpiar los viales de las soluciones de IV.

USA (NC)	Burdette & Santos, 2000	F	3000 g	35	6d	Meningitis	Recuperado	D	1	Adquirió la enfermedad en casa.
USA	Lai, KK.	M	D	D	3 años	Bacteremia	Recuperado	D	1	Rabdoiosarcoma embrionario,

	2001									quimioterapia vía línea central.
Bélgica	Van Acker, 2001	M (1)	850 g	17	55d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si – formula A	12(2) 6 <i>E.sak</i> +	Junio- Julio 1998, ECN brote en la UCIN. <i>E. sak.</i> fue aislado de formulas A cerradas, se encontraron 3 subtipos de <i>E. sak.</i> en los pacientes. 3/6 aislamientos de pacientes coincidieron con los aislamientos de formulas.
Bélgica	AM	F (2)	1930 g	31	16d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si – formula P	AM	No se encontró <i>E. sak.</i> en la formula P.
Bélgica	AM	M (4)	965 g	27	33d	Enterocolitis necrotizante	Muerto	Si, formula -A	AM	La cepas de <i>E. sak.</i> fueron diferentes para pacientes, lugares estériles, y formulas (preparados y pulverizado cerrados)
Bélgica	AM	M (7)	1100 g	28	9d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si, formula -A	AM	El cultivo del paciente no fue completamente analizado.
Bélgica	AM	F (8)	590 g	27	39d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si, formula -A	AM	La misma cepa de <i>E. sak.</i> fue aislada de pacientes, lugares no estériles y formulas (preparados y pulverizados cerrados)
Bélgica	AM	F (9)	1350 g	31	17d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si, formula -A	AM	La misma cepa de <i>E. sak.</i> fue aislada de pacientes, lugares no estériles y formula (preparados y pulverizado cerrados)
Bélgica	AM	M (11)	1290 g	32	7d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si, formula -A	AM	La misma prueba de <i>E. sak.</i> fue aislada de pacientes, lugares no estériles y formula (preparados y pulverizado cerrados)
Bélgica	AM	M (3)	995 g	27	40d	Enterocolitis necrotizante	muerto	Si, formula -A	AM	Paciente sin cultivo
Bélgica	AM	F (5)	815 g	29	41d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si, formula -A	AM	Paciente sin cultivo
Bélgica	AM	F (6)	1200 g	28	22d	Enterocolitis	recuperado	Si, formula	AM	Paciente con cultivo negativo de <i>E. sak.</i>

						necrotizante		-A		
Bélgica	AM	F (10)	1490 g	32	9d	Enterocolitis necrotizante	recuperado	Si, fórmula A	AM	Paciente sin cultivo
Bélgica	AM	M (12)	1550 g	30	4d	Enterocolitis necrotizante	recuperado	Si, fórmula A	AM	Paciente con cultivo negativo de <i>E. sak.</i>
USA (MN)	CDC 2001	D	D	27	1 mes	Infección del tracto urinario	D	Si	1	Se desconoce si se completaron las pruebas medioambientales.
USA (MN)	CDC 2001	D	D	34	1 mes	Aislado de secreción nasal	D	D	1	El paciente fue alimentado con dos marcas de formulado, no se sabe si PIF o líquido.
USA (MN)	CDC 2001	D	D	40	< 1 mes	Meningitis	Recuperado	Si	1	Se desconoce si se completaron las pruebas medioambientales
USA (GA)	CDC 2002	D	D	D	< 1 año		D	D	1	Se desconoce si se completaron las pruebas medioambientales. Caso identificado durante evaluación FoodNet de la incidencia de las enfermedades invasivas por <i>E. sak.</i>
USA (TN)	CDC 2002	D	D	D	<1 año		D	D	5	Se desconoce si se completaron las pruebas medioambientales. Caso identificado durante evaluación FoodNet de la incidencia de las enfermedades invasivas por <i>E. sak.</i>
USA (CO)	CDC 2002	M	760 g	25	<1 mes	Aislado del tracto respiratorio	D	No	1	Se desconoce si se completaron las pruebas medioambientales
Israel	Bar – oz, 2001	F	2155 g	36	4d	Bacteremia/ meningitis	Recuperado (con derivaciones VP)	Si	5	2 casos en neonatos, 3 portadores en materia fecal, prematuros. <i>E. sak.</i> aislado de la licuadora y del FLID (una ocasión). Según PFGE las cepas de

										<i>E. sak.</i> de los 2 pacientes, 3 portadores, licuadora y FLID fueron idénticas.
Israel	AM	F	620 g	27	9d	Bacteremia	Recuperado	Si	AM	AM
Israel	Block, 2002	F	2720 g	Termino	6d	Meningitis	D	D	3	Búsqueda en el historial del hospital desde 1987. Se encontró 6 casos, 2 reportes AM (Bar-oz) y 1 - 6 años, trasplante de medula, no en la lista.

Israel	AM	F	Bacteremia neonatal en neonato alimentado con formula	Término	Neonato	Bacteremia	D	Si	AM	AM.
Israel	AM	F	D	35 sección-C	D	Conjuntivitis	D	D	AM	AM
Bélgica	Ver comentario 2002	D	Neonato	D	D	Meningitis	Muerto	D	1(1)	http://www.baybemilk.nestle.com/news/allmas.countries/belgium/infan+formula+safety.htm
USA (WI)	CDC 2002	D	D	37	< 1 mes	¿Meningitis? CFS aislamiento	Recuperado	Si	1	El examen inicial de latas abiertas de FLID fue negativo
USA (MI)	CDC 2002	M	D	37	< 1 mes	Meningitis	Recuperado Discapacidad neurológica	si	1	FLID abierta y reconstituida fueron positivas para <i>E. sak.</i> El patrón de PFGE no coincidió con el de los aislamientos de los pacientes
USA	CDC	D	D	36	< 1mes	Meningitis /	Muerto	Si	1(1)	Se desconoce si se realizaron pruebas

(MN)	2002			prema- turo		bacteremia				medioambientales.
USA (TN)	Himelright 2002	M	1270 g	33.5	11 d	Meningitis	Muerto	Si	10(1)	10 infantes de una UCIN. Todos consumieron el mismo FLID. La misma cepa de <i>E. sak.</i> fue encontrada en latas abiertas y cerradas de FLID y en el CSF de pacientes muertos indexados. Dos con la sospecha de infección por <i>E. sak.</i> de aspirado traqueal con deterioro en el estado clínico documentado. 7 colonizaciones

Francia	Caudilla-Barron, 2007 (el maadani, 1996PhD Tesis)	F (E)	1.47 kg	31	27 d	Asintomático	Recuperado	Si	18(4)	5 may. -11 jul. 1994 Brote en una UCIN, relacionado con FLID, abuso probable (almacenamiento por 24 horas y jeringas usadas para mandar productos que no fueron refrigerados durante las 4-6 horas previas a la alimentación) diferentes cepas y clones aislados. 18 casos (4 muertes); sin embargo el aislamiento de un caso fatal (R) no fue confirmado como <i>E. sak.</i>
Francia	AM	F (I)	1507 g	31	12 d	Bacteremia	Recuperado	Si	AM	
Francia	AM	M (o)	2090 g	33	20 d	Asintomático	Recuperado	Si	AM	
Francia	AM	F (B)	1200 g	29	16 d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si	AM	
Francia	Antes menciona	M (J)	1560 g	32	15d	Enterocolitis necrotizante	Muerto	si	AM	
Francia	AM	M (D)	1800 g	32	17 d	Enterocolitis necrotizante	recuperado	Si	AM	
Francia	AM	M (k)	1180 g	30	87 d	Enterocolitis necrotizante	recuperado	Si	AM	
Francia	AM	F (B)	1200 g	28	13 d	Enterocolitis necrotizante	recuperado	Si	AM	

Francia	AM	M (H)	1500 g	31	19 d	Meningitis	Muerto	Si	AM	
Francia	AM	F (F)	1000 g	28	28 d	Enterocolitis necrotizante	Muerto	Si	AM	
Francia	AM	F (A)	D	D	D	No detallado Aislamiento traqueal de <i>E. sak.</i>	D	D	AM	
Francia	AM	D (R)	D	D	D	Bacteremia	Muerto	D	AM	
Francia	AM	M (C)	1380 g	29	18 d	Asintomático	recuperado	Si	AM	
Francia	AM	M (N)	D	D	D	Problemas digestivos	Recuperado	Si	AM	
Francia	AM	M (P)	D	D	D	Problemas digestivos	Recuperado	Si	AM	
Francia	AM	F (G)	D	D	D	No detallado <i>E. sak.</i> aislado de esputo	D	D	AM	
Francia	AM	M (L)	1450 g	33	6 d	Enterocolitis necrotizante	Recuperado	Si	AM	
Francia	AM	M (Q)	1600 g	41	13 d	Asintomático	Recuperado	Si	AM	

Brasil	Barreira, 2003	F	2650 g	Término	14 d	Meningitis	Fatal		1(0)	Hipótesis: transmisión vertical Lactancia.
USA (CA)	Brown & Bowen, 2006 (2003)	M	D	Término	240 d	Bacteremia	Recuperado	Si	1(0)	Caso reportado en el 2003. Latas abiertas de FLID y el examen medioambiental del hogar fueron negativos para <i>E. sak.</i>
Hungría	Hungría, oficina de seguridad alimentaria,	D	D	D	6 meses	Úlcera gástrica y secreción nasal	D	D	1	Presentadas en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS

	2003									
USA (MN)	CDC, información sin publicar 2003	D	D	33	10 meses	Bacteremia/ meningitis	D	Si	1	Se desconoce si se realizaron pruebas medioambientales.
USA (KY)	CDC 2003	M	1155 g	30	< 1 mes	Meningitis / bacteremia	Recuperado	No	2(1)	El examen de los gemelos fue positivo. Las latas abiertas del FLID y el agua utilizada para la preparación fue negativa para <i>E. sak.</i>
USA (KY)	AM	M	1361 g	30	< 1 mes	Meningitis / bacteremia	Muerto	Si	AM	Antes mencionado. El infante también tubo <i>E. sak.</i> desarrollándose en el cultivo nasofaríngeo.
USA (UT)	CDC 2003	D	1681g	31	1 mes	Bacteremia/ onfalocele , y mas	D	Si	1	Las latas abiertas y cerradas de FLID fueron negativas para <i>E. sak.</i>
USA (TX)	CDC 2003	F	540	23.5	1 mes	Bacteremia	Recuperado	Si	1	Imposible de rastrear el número de lote del FLID. El producto no fue examinado
USA (NC)	CDC 2004	M	3068 g	Termino	< 1 mes	Meningitis / bacteremia	D convulsiones	Si	1	Alimentado con tres tipos de FLID y leche materna. El examen de la lata abierta fue negativo. El ambiente de la cocina (lavaplatos de la casa) cedió a <i>E. sak.</i> con el patrón PFGE del aislamiento del paciente
USA	Stoll 2004	M	1091 g	28	12 d	Bacteremia	Recuperado	No	1(0)	Alimentado con un mix RTD mezcla de formula con la leche materna. No FLID

Francia	Coignard 2006 (2004)	F	1995 g	36	6 d	Meningitis	Muerto	Si	9(2)	<i>E. sak.</i> Detectado en Pregestimil consumida por 8 infantes); 4 infantes infectados, 5 colonizados sin rastros de infección- 4 hospitales involucrados
Francia	AM	M	1980 g	35	8d	Meningitis	Muerto	Si	AM	
Francia	AM	M	1420 g	30	26 d	Infección ocular	Recuperado	Si	AM	
Francia	AM	F	3250 g	37	26 d	Diarrea	Recuperado	Si	AM	
Nueva Zelanda	Jarvis 2004	F	D	Prema- turo	D	Meningitis	Muerto	Si y leche materna	5 (1)	Otros 4 infantes fueron colonizados sin síntomas. 2 tipos de FLID. <i>E. sak.</i> positivo, la misma cepa de los 4 casos infantiles se encontró en uno de los tipos de FLID.
Hungría	Hungría oficina de seguridad alimentaria 2004	D	D	D	2 meses	Desconocido Secreción nasal y ótica	D	D	1	Presentadas en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS
USA (UT)	Bowen & Braden, 2006 (CASO 2004)	F	3011 g	36	10 meses	Bacteremia, ver comentarios	Recuperado	Si	1	Caso ocurrido en 2004 Grave combinación de inmunodeficiencia. Administración continua de FLID oral y por goteo. El examen de las latas abiertas fue negativo para <i>E. sak</i>
USA (MN)	CDC, Información no publicada 2005	F	3550 g	39	8 meses	Aislado de orina, ver comentarios	D	D	1	Anomalías del cromosoma 17. alimentación con formula infantil, no se sabe si con FLID
USA (MN)	CDC, 2005	M	3401 g	38	< 1 mes	Meningitis	Recuperado Hidrocefalia	Si	1	<i>E. sak.</i> no fue encontrado en latas abiertas. Los aislamientos clínicos

							conclusiones desarrollo de retraso				mostraron 2 patrones de PFGE diferentes
Hungría	Hungría oficina de seguridad alimentaria, 2005	D	D	D	3 meses	Desconocida Aislado de orina	D	D	1		Presentadas en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS

USA (LA)	CDC, 2006	F	3518 g	39	<1 mes	Meningitis	Recuperado Infarto cerebral	Si	1		<i>E. sak.</i> no fue encontrado en latas abiertas.
USA (sc)	CDC, 2006	F	2557 g	37	< 1 mes	Meningitis / bacteremia	Recuperado	Si	1		<i>E. sak.</i> no encontrado en latas abiertas.
USA (TN)	CDC, 2006	M	2160 g	37	1 mes	Meningitis	Recuperado con múltiples abscesos cerebrales	Si	1		<i>E. sak.</i> no fue encontrado en dos latas abiertas de FLID y muestras medioambientales de la casa de un paciente.
Hungría	Centro de salubridad de los alimentos Hungría, 2006	D	D	D	3 meses	Orina fuente de secreción	D	D	1		Presentadas en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS
USA (LA)	CDC 2007	M	D	28	< 1 mes	Bacteremia/ meningitis clínica con quiste cerebral	Quiste cerebral e hidrocefalia, último caso conocido de sobreviviente >1 mes post enfermedad	Si	1		El infante nacido por cesárea. Latas abiertas del producto no estuvieron disponibles para exanimación. La leche materna y las muestras medioambientales fueron negativas para <i>E. sak.</i>

USA (AZ)	CDC 2007	M	D	35	< 1 mes	Bacteremia/ meningitis	Muerto	No	2(1)	<i>E. sak.</i> se aisló de heces de uno de dos gemelos, ambos nacieron por cesárea y fueron pacientes de la UCIN en el periodo de contagio. Muestras de medio ambiente y de leche materna y medio-ambientales fueron negativas para <i>E. sak.</i>
USA (AZ)	AM	M	D	35	< 1 mes	Aislado de heces	Recuperado	No		En el caso del los gemelo antes mencionado el patrón de PFGE aislado heces fue diferente al del aislado de su gemelo.

USA (VA)	CDC 2007	M	1818 g	36 pre-maturo	< 1 mes	Bacteremia	Recuperado	Si	1	CDC probó una lata abierta y una cerrada del FLID pero no encontró <i>E. sak.</i> FDA tampoco encontró a <i>E. sak.</i> en producto sellado del mismo lote. La muestra del mostrador de la cocina donde el FLID fue preparado y el área en donde el biberón fue guardado fueron positivas para <i>E. sak.</i> Las otras muestras de la casa del paciente fueron negativas.
USA (L)	CDC 2007	M	1815 g	32	< 1 mes	Meningitis / bacteremia	Recuperado	Si	1 Posiblemente 2	Gemelo contrajo NEC y meningitis con lesiones cerebrales sospechosas. 6 muestras de leche materna fortificada y de leche materna fueron negativas para <i>E. sak.</i>
USA (IA)	CDC 2007	F	3714 g	41	1 mes	Bacteremia	D	Si	1	El FLID abierto no estuvo disponible, se desconoce el número de lote de producción.

USA (GA)	CDC 2007	M	D	29	1 mes	Bacteremia	Recuperado	No	1	Niño con gastroquiasis, alimentado con formula lista para consumir, y leche materna, ninguno fue positivo par a <i>E. sak</i> .
USA (GA)	CDC 2007	F	526	23	3 meses	ECN Bacteremia	D	No	1	Infante con perforación del intestino grueso previa a adquirir una infección en el torrente sanguíneo. Fue alimentado por la formula lista para consumir, el patrón de PFGE del aislamiento clínico fue diferente al del otro caso en GA 2007.
Canadá	Centro de salubridad alimentaria, Canadá	D	2900 g	Término	17 d	Meningitis	Recuperado	Si	1	Presentadas en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS

India	Ray, 2007	F	1400 g	34	5 d	Meningitis	Muerto	Si	1(1)	Caso de 1992, se asume que la fuente fue un FLID suministrado parenteral mente – sin embargo los análisis no fueron llevados a cabo.
India	AM	F	D	D	60 d	Bacteremia	Recuperado	No	1	Caso de 2006, alimentado con leche materna – se asume infección nosocomial
España	Aquirre Conde, 2007	M	1715 g	31	5 d	Bacteremia	Recuperado	No	1	El infante fue alimentado con una mezcla de leche materna y formula RTF.
USA (MI)	CDC información sin publicar 2007	F	3438 g	40	13 meses	Bacteremia	D	Si	1	Síndrome Kasabach- merrit y quimioterapia reciente. <i>E. sak</i> . aislado de latas abiertas comparte el patrón de PFGE de los aislamientos clínicos. FDA no encontró a <i>E. sak</i> .

										en dos lotes asociados con el paciente. En las muestras ambientales de la casa del paciente y la guardería no se encontró a <i>E. sak</i> .
USA (IA)	CDC información sin publicar 2008	F	1875 g	37	< 1 mes	¿Meningitis? aislado de CFS	D	Si	1	El infante nació por cesárea. Los cultivos de lata abierta y cerrada de FLID y la casa no fueron positivos para <i>E. sak</i> .
USA (MD)	CDC información sin publicar 2008	M	3289 g	37	<1 mes	¿Meningitis? Aislado de CFS	D con quiste cerebral	Si	1	El infante nacido por cesárea. Los cultivos de latas abiertas y selladas de FLID, y de la casa no fueron positivos para <i>E. sak</i> . Sin embargo los investigadores no estuvieron seguros de haber obtenido el lote del producto correcto.
USA (NE)	CDC 2008	M	D	38	2 meses	Aislado del tracto respiratorio	D	Si	1	El infante tubo defectos cardiacos, No se encontró a <i>E. sak</i> en latas abiertas
Japón	Centro de salubridad de los alimentos Japón, 2008	M	1269 g	27	22 d	Meningitis, absceso cerebral	Recuperado	Si, ver comentarios	1	La formula fue dada en los primeros días, luego leche materna Fue dado de alta del hospital luego de 85 d. Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS.

La siguiente información está basada en la observación de datos de laboratorio y mientras los casos no fueron descritos, no indica la edad de los pacientes ni el sitio de aislamiento.

Inglaterra y Gales	Resumen de laboratorio UK,1992-2007	D	D	D	< 1 mes	Aislado de sangre y CSF			14	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008
Inglaterra y Gales	Resumen de laboratorio UK,1992-2007	D	D	D	1-11 meses	Aislado de sangre y CSF			18	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008
Inglaterra y Gales	Resumen de laboratorio UK,1992-2007	D	D	D	1-4 años	Aislado de sangre y CSF			27	Presentados en respuesta del FAO/WHO 2008
Filipinas	Autoridad de salubridad de los alimentos, 1998	D	D	D	1 d	Aislado de sangre			3	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008
Filipinas	Autoridad de seguridad de los alimentos, 1998	D	D	D	2-14 d	Aislado de sangre (4) y orina (2)			6	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008
Filipinas	Autoridad de salubridad de los	D	D	D	1 mes	Aislado de sangre			3	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008

	alimentos, 1998									
Filipinas	Autoridad de salubridad de comida, 1998	D	D	D	2-6 meses	Aislado de sangre (2) y orina (1)			3	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008
Filipinas	Autoridad de salubridad de los alimentos, 1998	D	D	D	< 1 año (la edad no es específica)	Aislado de sangre (4) y de cordón umbilical(2)			6	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008

Filipinas	Autoridad de salubridad de los alimentos, 1998	D	D	D	2 años	Aislado de sangre (1) y orina (3)			4	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008
Filipinas	Autoridad de salubridad de los alimentos, 1998	D	D	D	3 años	Aislado de sangre (2) y orina (1)			3	Presentados en respuesta a la solicitud de datos de la FAO / OMS 2008

ND: no determinado

M: masculino

oz: onzas

AM: antes mencionado

F: femenino

UCIN: Unidad de cuidados intensivo neonatal

D: desconocido

g: gramos

ECN: Enterocolitis necrotizante

lb: libras

CSF: Fluido cerebro espinal

MUESTREO

Debido a que los protocolos de aislamiento estandarizados descritos por las Normas BAM e ISO no describen la metodología de muestreo, se sugiere la adopción de la metodología descrita en el Capítulo XXI: Procedimientos del CAA.

En el CAA se establecen los planes de muestreo para elaboradores, fraccionadores, distribuidores e importadores; siendo estos por variables o por atributos. Para el muestro de FLI se adoptará un plan de muestreo por atributos debido a que se trata de variables discretas, donde la calidad de un lote se define por la presencia/ausencia de *C. sakazakii* en una determinada muestra.

Según esta metodología se procederá a definir el nivel de inspección, que está basado principalmente en los hallazgos previos de *C. sakazakii*. Como se observa en la Tabla 2, a un determinado tamaño de lote y nivel de inspección le corresponderá una letra (A-H) la que servirá como clave de entrada a la Tabla 3.

Tabla 1.- Tabla para determinar el tamaño apropiado de muestra para planes de muestreo por atributo.

Tamaño del Lote (N)	Nivel de Inspección		
	Reducido (S-1)	Normal (S-2)	Reforzado (S-3)
2 a 8	A	A	A
9 a 15	A	A	A
16 a 25	A	A	B
26 a 50	A	B	B
51 a 90	B	B	C
91 a 150	B	B	C
151 a 280	B	C	D

281 a 500	B	C	D
501 a 1200	C	C	E
1201 a 3200	C	D	E
3201 a 10000	C	D	F
10001 a 35000	C	D	F
35001 a 150000	D	E	G
150001 a 500000	D	E	G
>500000	D	E	H

Ref. ISO 2859-1 Sampling procedures for inspection by attribute Part 1. Sampling plans indexed by acceptable quality level (AQL) for lot by lot inspection.

En la Tabla 3 se proporciona información sobre el tamaño de muestra correspondiente al Lote según el Nivel de Inspección definido. Con esta información se podrán determinar los valores de Nivel de calidad Aceptable (NCA), el número de unidades defectuosas (x) y el número de aceptación (c).

Tabla 1.- Tabla para determinar los niveles de aceptación y rechazo para planes de muestreo por atributo. En esta tabla se incluyen únicamente alimentos Clase I (FLI)

Código de Letra	Tamaño de la Muestra (n)	NCA	Aceptación (c)	Rechazo (r)
A	2			
B	3			
C	5			
D	8			
E	13			
F	20	0,1	0	1
G	32			
H	50			

ISO 2859-1 Sampling procedures for inspection by attribute Part 1. Sampling plans indexed by acceptable quality level (AQL) for lot by lot inspection.

Finalmente, la Aceptación o Rechazo de un lote será definido por la relación entre el número de unidades defectuosas (x) (en las que se haya aislado o identificado la presencia de *C. sakazakii*) y el número de aceptación (c).

Si: $x \leq c$, aceptar el lote

Si: $x > c$, rechazar el lote

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS - ISO/TS 22964

Detección de *Enterobacater sakazakii* — Leche y productos lácteos

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS ISO/TS 22964**IDF/RM****210**

Primera Edición

2006-01-01

LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS - DETECCIÓN DE *Cronobacater sakazakii***Contenidos**

Prefacio

1. Objetivos
2. Referencias Normativas
3. Términos y Definiciones
4. Principios (ver también Anexo A)
 - 4.1. Pre-enriquecimiento en medio liquido no selectivo
 - 4.2. Enriquecimiento en medio liquido selectivo
 - 4.3. Siembra e identificación
 - 4.4. Confirmación
5. Medio de Cultivo y Reactivos
 - 5.1. Generalidades
 - 5.2. Medios de Cultivo
6. Equipos y Material de Vidrio
7. Toma de muestras
8. Preparación de las muestras
9. Procedimiento (ver el esquema del anexo A)
 - 9.1. Lote de ensayo (*test portion*)
 - 9.2. Pre-enriquecimiento
 - 9.3. Enriquecimiento selectivo
 - 9.4. Aislamiento presuntivo de *Cronobacter sakazakii*
 - 9.5. Confirmación
 - 9.6. Interpretación de los resultados y confirmación del test
10. Cultivos control
11. Expresión de Resultados
12. Reporte del ensayo

Anexo A (Informativo) Diagrama de Flujo del Método
Bibliografía

PREFACIO

La ISO (Organización Internacional para Estandarización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (miembros del organismo ISO). El trabajo de preparar normas internacionales es normalmente llevado a cabo a través de comités técnicos de la ISO. Cada miembro del organismo interesado en un tema para el cual se creó un comité técnico tiene el derecho de estar representado en ese comité. Organizaciones internacionales, gubernamentales o no gubernamentales también participan en el trabajo en colaboración con la ISO. ISO colabora cercanamente con la Comisión Internacional de Electrotecnia (IEC) en todos los asuntos de estandarización electrotécnica.

Los estándares internacionales son redactados de acuerdo con las reglas proporcionadas en las Directivas ISO/IEC, Parte 2.

La principal tarea de los comités técnicos es preparar estándares internacionales. Proyectos de normas internacionales adoptados por los comités técnicos son enviados a los miembros del organismo para la votación. La publicación de una norma internacional requiere la aprobación por al menos el 75% de los miembros del organismo con derecho a voto.

En otras circunstancias, particularmente cuando hay una exigencia del mercado urgente de dichos documentos, un comité técnico puede decidir la publicación de otro tipo de documentos normativos:

- Una especificación ISO disponible al público (ISO/PAS) representa un acuerdo entre expertos técnicos de un grupo de trabajo ISO y es aceptado para publicación si este es aprobado por más del 50% de los miembros del comité con derecho a voto.
- Una especificación técnica de la ISO (ISO/TS) representa un acuerdo entre los miembros de un comité técnico y es aceptado para publicación si este ha sido aprobado por 2/3 de los miembros con derecho a voto.

Los ISO/PAS o ISO/TS son revisados luego de tres años con el objetivo de decidir si estos pueden ser confirmados para los siguientes tres años, revisados para convertirse en normas internacionales o descartados. Si el ISO/PAS o el ISO/TS es confirmado, este es

revisado nuevamente al cabo de los tres años siguientes momento en el que este deberá transformarse en una Norma internacional o ser descartado.

Se advierte sobre la posibilidad de que algunos elementos de este documento puedan ser sujeto de derecho de patente. ISO no se hace responsable de la identificación de cualquiera o todos los derechos como las patentes.

ISO/TS 2964 IDF/RM 210 fue preparado por el comité técnico ISO/TC 34, *Productos alimenticios*, Subcomité SC 5, *Leche y productos lácteos*, y la Federación Láctea Internacional — Internacional Dairy Federation — (IDF), este está siendo publicado conjuntamente por ISO e IDF.

La federación internacional es una federación mundial del sector lácteo con un Comité Nacional en cada país miembro. Cada Comité Nacional tiene el derecho de ser representado en el IDF La IDF colabora con la ISO en el desarrollo de métodos estándar de análisis y muestreo de leche y productos lácteos.

La principal tarea de los comités técnicos es preparar Normas Internacionales. Los proyectos de Normas Internacionales adoptadas por el Equipo de Acción y los Comités Permanentes son enviados a los Comités Nacionales para votación. La publicación como una Norma Internacional requiere la aprobación por más del 50% de los miembros del comité con derecho a voto

En otras circunstancias, particularmente cuando hay una exigencia del mercado urgente de dichos documentos, un Comité Permanente puede decidir la publicación de otro tipo de documentos normativos los que son denominados por IDF: Método de Revisado. Como un método representa un acuerdo entre los miembros de un Comité Permanente y es aceptado para su publicación si este es aprobado por más del 50% de los miembros del comité con derecho a voto. Un Método Revisado es igual a un ISO/PAS o un ISO/TS y por lo tanto también puede ser publicado de manera conjunta bajo las condiciones de la ISO

Se advierte sobre la posibilidad de que algunos elementos de este documento puedan ser sujetos de derecho de patente. IDF no se hace responsable de la identificación de cualquiera o todos los derechos como las patentes.

ISO/TS 22964| IDF/RM 210 fue preparada por la Federación Láctea Internacional — Internacional Dairy Federation — (IDF) y el Comité Técnico ISO/TC 34, *Productos alimenticios*, Subcomité SC 5, *Leche y productos lácteos*. Este documento es publicado conjuntamente por ISO e IDF.

Todos los trabajos fueron llevados a cabo en conjunto por el Equipo de Acción sobre la *Harmonización* ISO-IDF del comité permanente sobre Métodos Microbiológicos de análisis, bajo la tutela de los líderes de este proyecto, Sr. D.J.C. van den Berg (NL) y Sr. H. Joosten (CH).

LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS— DETECCIÓN DE *Enterobacater sakazakii*

1. Objetivos

Estas especificaciones técnicas detallan un método para la detección de *Cronobacter sakazakii* de leche en polvo y formulas infantiles pulverizadas.

Este método es también aplicable a muestras ambientales colectadas de leche en polvo o fabricas de formulas infantiles.

2. Referencias Normativas

Los documentos siguientes a los que se hace referencia son indispensables para la aplicación de este documento. Para referencias con fecha solo es aplicable la edición citada. Para referencias sin fecha, utilizar la última edición del documento referido (incluyendo alguna enmienda).

ISO8261|IDF 122 Leche y productos lácteos - Guía general para la preparación de muestras, suspensiones iniciales y diluciones decimales para examinación microbiológica.

ISO 7218 Microbiología de los alimentos productos alimenticios animales - Requerimientos generales y guía para la examinación microbiológica.

3. Términos y Definiciones

Para el propósito de este documento, aplican los siguientes términos y definiciones:

3.1. Presuntos *Enterobacter sakazakii*

Microorganismos provenientes del aislamiento de colonias típicas de agar cromogénico, cuando los ensayos son llevados a cabo de acuerdo con la presente Especificación Técnica.

3.2. *Cronobacter sakazakii*

Microorganismos provenientes de colonias típicas aislados de agar cromogénico, que forman colonias amarillas en agar Triptona de Soja y exhiben características bioquímicas como las descritas, cuando los ensayos son llevados a cabo de acuerdo con la presente Especificación Técnica.

4. Principios (ver también Anexo A)

4.1. Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

El caldo de pre-enriquecimiento es inoculado con los lotes de ensayo (*test portion*) e incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16- 20 horas.

4.2. Enriquecimiento en medio líquido selectivo

El medio de enriquecimiento selectivo es inoculado con el cultivo obtenido en 4.1. e incubado a 44°C durante 22 a 26 horas.

4.3. Siembra e Identificación

Inocular el agar cromogénico con el cultivo de enriquecimiento obtenido en 4.2. e incubar a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 22 - 26 horas.

4.4. Confirmación

Seleccionar las colonias típicas y aisladas del agar cromogénico, los aislamientos productores de un pigmento amarillo en agar Triptona de Soja son caracterizados bioquímicamente.

5. Medios de cultivos y reactivos

5.1. Generalidades

Usar únicamente reactivos de grado analítico reconocido, y agua destilada, desmineralizada o de pureza equivalente. El agua deberá estar libre de sustancias que puedan inhibir el crecimiento de los microorganismos bajo las condiciones de ensayo detalladas en estas Especificaciones Técnicas. Véase también ISO 6887-1 e ISO 8261 | IDF 122.

Con la finalidad de mejorar la reproducibilidad de los resultados, se recomienda que, para la preparación de medios de cultivo deben ser usados componentes básicos deshidratados o medios completos deshidratados. En este último caso, seguir rigurosamente las instrucciones del fabricante. Ver también ISO 6887-1.

Los valores de pH deben medirse a 25 °C. En caso de ser necesarios, los ajustes debe realizarse mediante el agregado de soluciones de Ácido Clorhídrico (HCl = 1mol/ml) o Hidróxido de Sodio (NaOH = 1mol/ml).

Si los medios de cultivo o reactivos no son utilizados inmediatamente estos deben ser almacenados bajo condiciones que no produzcan ningún cambio en su composición, en oscuridad y a temperaturas entre 0 °C y 5 °C, por periodos no mayores a un mes, a menos que se indique lo contrario.

5.2. Medios de cultivo

5.2.1. Agua bufferada peptonada (ABP)

5.2.1.1. Composición

Digestos enzimático de Caseína	10,0 g
Cloruro de Sodio (ClNa)	5,0 g
Fosfato Disódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2,75 g
Fosfato de Dipotasio (K_2HPO_4)	2,75 g
Agua	1000 ml

5.2.1.2. Preparación

Disolver cada uno de los componentes en agua, si es necesario, por calentamiento. Si es necesario, ajustar el pH hasta $7,0 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuir frascos tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

5.2.2. Caldo Laurilsulfato Tripotosa modificado (m LST) /vancomicina

5.2.2.1. Caldo Lauril sulfato Tripotosa modificado (m LST)

5.2.2.1.1. Composición

Cloruro de Sodio (ClNa)	34,0 g
Digestos enzimáticos de tejidos animales y de plantas	20,0 g
Lactosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	5,0 g
Fosfato de Potasio dihidrogenado (KH_2PO_4)	2,75 g
Fosfato de Dipotasio (K_2HPO_4)	2,75 g
Laurilsulfato de Sodio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)	0,1g
Agua	1000 ml

5.2.2.1.2. Preparación

- Disolver cada uno de los componentes en el agua, si es necesario por calentamiento.
- Si es necesario, ajustar el pH hasta $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . Dispensar 10 ml de mLST en tubos de 18 mm x 16 mm. Esterilizar los tubos a 121°C durante 15 minutos.

5.2.2.2. Solución de Vancomicina

5.2.2.2.1. Composición

Vancomicina	10 mg
Agua	10 ml

5.2.2.2.2. Preparación

- Disolver la Vancomicina en agua destilada. Mezclar y esterilizar por filtración.
- La solución de Vancomicina debe mantenerse a 0 - 5 °C hasta 15 días.

5.2.2.3. Medio mLST/Vancomicina

Añadir 0,1 ml de la solución de Vancomicina (5.2.2.2.2) a 10 ml de solución mLST (5.2.2.1.2) hasta obtener una concentración final de Vancomicina de 10 µg por mililitro de mLST. El medio completo mLST/ Vancomicina debe mantenerse a 0 - 5 °C hasta 1 día.

5.2.3. Agar para el aislamiento de *Cronobacter sakazakii* (EISA™)¹

5.2.3.1. Composición

Peptona pancreática de Caseína	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Cloruro de Sodio (ClNa)	5,0 g
Desoxicolato de Sodio	0,6 g
5 - Bromo 4 – Cloro – 3 – indolil α - D – glucopiranosido	
(C ₁₄ H ₁₅ BrClN ₆)	0,15 g
Cristal violeta	2 g

¹ EISA™ es nombre comercial de un producto distribuido / suministrado por Laboratorios AES, calle Matse Bastie, Ker Lann, F-35172 Bruz (Fr). Esta información es proporcionada para la conveniencia de los usuarios de estas especificaciones técnicas | IDF y no constituye la aprobación del producto antes mencionado, por parte de la ISO o la IDF. Productos equivalentes pueden ser utilizados si se demuestra que con ellos se obtienen resultados semejantes.

Agar	12,0 g a 18,0 g ^a
Agua	1000 ml

^a Dependiendo de la resistencia del agar

5.2.3.2. Preparación

- Disolver cada uno de los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH, hasta $7,0 \pm 0,2$ a 25°C. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Enfriar hasta 44 °C a 47 °C. Verter aproximadamente 15 ml de medio EISA™ en placas de Petri estériles vacías y dejar solidificar en una superficie fría.
- Este medio puede mantenerse a 0°C – 5°C por hasta 14 días.

5.2.4 Agar Triptona de Soja (ATS)

5.2.4.1. Composición

Digesto enzimático de Caseína	15,0 g
Digesto enzimático de Soja	5,0 g
Cloruro de Sodio (ClNa)	5,0 g
Agar	9,0 g a 18,0 g ^a
Agua	1000 ml

^a Dependiendo de la resistencia del agar

5.2.4.2. Preparación

- Disolver cada uno de los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH hasta $7,3 \pm 0,2$ a 25°C. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Enfriar hasta entre 44 °C y 47 °C. Verter aproximadamente 15 ml de ATS en placas de Petri estériles vacías y dejar solidificar en una superficie fría.

5.2.5 Medios y reactivos para la caracterización bioquímica

5.2.5.1. Reactivos para la detección de Oxidasa

5.2.5.1.1. Composición

N, N, N', N' – Tetrametil – p –fenilendiamina diclorhidrato ($C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$)	1,0 g
Agua	100 ml

5.2.5.1.2. Preparación

- Disolver el componente en el agua inmediatamente antes de usar.

5.2.5.2. Medio para descarboxilación de L- Lisina

5.2.5.2.1. Composición

L –Lisina monohidroclorada ($C_6H_{14}N_2 O_2 \cdot HCl$)	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	1,0 g
Púrpura de Bromocresol	0,015 g
Agua	1000 ml

5.2.5.2.2 Preparación

- Disolver cada uno de los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH, hasta que luego de la estilización sea de $6,8 \pm 0,2$ a $25^\circ C$. Dispensar 5ml de medio para la descarboxilación de L- Lisina en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a $121^\circ C$ durante 15 minutos.

5.2.5.3. Medio para descarboxilación de L- Ornitina

5.2.5.3.1. Composición

L – Ornitina mono hidroclicorada ($C_6H_{12}N_2 O_2 \cdot HCl$)	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	1,0 g
Púrpura de Bromocresol	0,015 g
Agua	1000 ml

5.2.5.3.2. Preparación

- Disolver cada uno de los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH, hasta que luego de la estilización sea de $6,8 \pm 0,2$ a $25^\circ C$. Dispensar 5ml de medio para la descarboxilación de L- Ornitina en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a $121^\circ C$ durante 15 minutos.

5.2.5.4. Medio para deshidroxilación de L- Arginina

5.2.5.4.1. Composición

L – Arginina mono hidroclicorada ($C_6H_{14}N_4 O_2 \cdot HCl$)	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	1,0 g
Púrpura de Bromocresol	0,015 g
Agua	1000 ml

5.2.5.4.2. Preparación

- Disolver cada uno de los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH hasta que luego de la estilización sea de $6,8 \pm 0,2$ a $25^\circ C$. Dispensar 5ml de medio para la descarboxilación de L- Arginina en tubos de 18 mm x 160 mm. Esterilizar a $121^\circ C$ durante 15 minutos.

5.2.5.5. *Medio para la fermentación de Carbohidratos* (agua peptonada con rojo de Fenol, D-sorbitol, D-sacarosa, D- ramnosa, D-melobiosa y amigdalín)

5.2.5.5.1. *Medio Básico*

5.2.5.5.1.1. *Composición*

Digesto Enzimático de Caseína	10 g
Cloruro de Sodio (ClNa)	5 g
Rojo de Fenol	0,002 g
Agua	1000 ml

5.2.5.5.1.2 *Preparación*

- Disolver cada uno de los componentes en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH, hasta que luego de la estilización sea de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C. Dispensar el medio básico en frascos de tamaño adecuado. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

5.2.5.5.2. *Solución de Carbohidratos* (D- sorbitol, D-sacarosa, D- ramnosa, D-melobiosa o amigdalín) 80mg/ml.

5.2.5.5.2.1. *Composición*

Carbohidrato	8 g
Agua	100 ml

5.2.5.5.2.2. *Preparación*

- Disolver separadamente cada uno de los cuatro componentes carbohidratos hasta obtener cuatro soluciones de carbohidratos. Esterilizar por filtración.

5.2.5.5.3. *Medio Completo para la Fermentación de Carbohidratos*

5.2.5.5.3.1. *Composición*

Medio Básico (5.2.5.5.1)	875 ml
Carbohidrato en solución (5.2.5.5.2.)	125 ml

5.2.5.5.3.2. Preparación

- Para cada carbohidrato, añadir asépticamente la solución de carbohidrato preparada (5.2.5.5.2.) al medio básico (5.2.5.5.1.) y mezclar. Dispensar 10 ml del medio completo de cada carbohidrato en tubos de 18 mm x 160 mm.

5.2.5.6. Medio citrato de Simons

5.2.5.6.1. Composición

Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	2,0 g
Cloruro de Sodio (ClNa)	5,0 g
Fosfato de Potasio dihidrogenado (K_2HPO_4)	1,0 g
Fosfato de Amonio dihidrogenado ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1,0 g
Sulfato de Magnesio (MgSO_4)	0,2 g
Azul de Bromotimol	0,08 g
Agar	8,0 g a 18,0 g ^a
Agua	1000 ml

^a Dependiendo de la resistencia del agar

5.2.5.6.2. Preparación

- Disolver cada uno de los componentes o el medio deshidratado completo en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH hasta que luego de la esterilización sea de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . Dispensar 10 ml de medio Citrato de Simons en tubos (6.7.) de 18 mm x 160 mm. Esterilizar los tubos a 121°C durante 15 minutos. Dejar los tubos recostados en posición inclinada para obtener un culote de 2,5 cm de profundidad.

6. Equipos y material de vidrio

Material de vidrio desechable es una alternativa aceptable en reemplazo de material reutilizables, siempre que tenga especificaciones adecuadas. Equipamiento habitual de laboratorio microbiológico y en particular, lo siguiente:

6.1. Equipos para esterilización en seco (horno) o esterilización húmeda (autoclave)

Ver ISO 7218

- **Pipetas.** Con una capacidad nominal de 1ml.
- **Baños térmicos.** Capaces de mantenerse a $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Placas de Petri.** De vidrio o plástico, de 90 mm a 100 mm de diámetro.
- **Incubadoras.** Capaces de operar a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.
- **Ansas.** Hechas de platino-iridio o níquel-cromo, de un diámetro aproximado de 3 mm o ansas descartables.
- **Tubos de ensayo.** De 18 mm de diámetro y 160 mm de longitud (con tapones o tapas de rosca).
- **pHmetro,** con una precisión de 0,1 unidades de pH a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

7. Toma de muestras

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que verdaderamente representativa y que no haya sido dañada o cambiada durante el transporte o almacenamiento. La toma de muestra no forma parte del método específico en estas Especificaciones Técnicas. Un método de muestro recomendado se detalla en ISO 707 |IDF50.

8. Preparación de las muestras

Preparar las muestras de ensayo de acuerdo con ISO 8261 | IDF 122.

9. Procedimiento

9.1. Lote de ensayo (test portion)

Para preparar las diluciones primarias añadir x g de la muestra de ensayo (cláusula 8) a 9 veces x ml de medio de pre-enriquecimiento (5.2.), el que está en la proporción de muestra de ensayo-medio de pre-enriquecimiento especificada en este método. Dejar que la muestras seca se disperse en el líquido sin agitar. Si una muestra no se ha disuelto completamente después de 30 minutos, mézclela suavemente con el medio.

9.2. Pre-enriquecimiento

Incubar el medio de pre- enriquecimiento inoculado (9.1.) a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.

9.3. Enriquecimiento selectivo

Después de la incubación del medio de pre-enriquecimiento inoculado, transferir 0,1 ml del cultivo obtenido al medio mLST/vancomicina (5.2.2.3.). Incubar a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 h. Se recomienda el uso de un baño termostático (6.3.) o un incubador de aire forzado para asegurarse que no se supere de la temperatura máxima ($44,5^{\circ}\text{C}$).

9.4. Aislamiento presuntivo de *Cronobacter sakazakii*

Después de la inoculación del medio mLST/vancomicina (9.3.), estriar una ansada (ca 10 μl) sobre la superficie de placas con agar para aislamiento de *Cronobacter sakazakii* (5.2.3.2.). Incubar las placas a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 h. Después de la incubación examinar en las placas cromogénicas e identificar la presencia de colonias típicas de *Cronobacter sakazakii*.

NOTA: las colonias típicas son de tamaño pequeño a mediano (1mm a 3 mm; colonias verde o verde-azuladas. Las colonias ni típicas son ligeramente transparentes de color violeta)

9.5. Confirmación

9.5.1. Producción de pigmento amarillo

9.5.1.1. Selección de colonias

Seleccione 1 a 5 colonias típicas de *Cronobacter sakazakii* del agar cromogénico (9.4.)

9.5.1.2. Incubación

Reaislar las colonias seleccionadas (9.5.1.1.) en la superficie de una placa de ATS (5.2.4.2) hasta que luego de la incubación se puedan observar colonias aisladas. Incubar las placas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 44 a 48 horas. Después de la incubación, examinar la presencia de colonias con pigmento amarillo en las placas de ATS. Cuando solo se ha seleccionado (9.5.1.1.) y transferido una única colonia a la placa de ATS y luego de la incubación no se observan colonias con pigmento amarillo, seleccionar, adicionalmente, cuatro colonias típicas (9.5.1.1.) y proseguir acorde con (9.5.1.2.). Si hay menos de cinco colonias típicas, selecciones todas estas.

PRECAUCION — Excepcionalmente, algunas cepas de *Cronobacter sakazakii* podrían no formar pigmento amarillo bajo las condiciones de ensayo especificadas en la presente Especificación Técnica, o el pigmento se pierda debido al sub-cultivo. En estos casos, este método podría, por tanto, pasar por alto estas cepas.

9.5.2. Confirmación bioquímica

9.5.2.1. Generalidades

Pueden utilizarse Kits miniaturizados de identificación bioquímica, actualmente disponibles comercialmente, que permiten la identificación de *Cronobacter sakazakii*.

Selección de colonias

Seleccione una colonia con pigmento a amarillo de cada placa de agar Triptona de Soja (9.5.1.2.) para proseguir con la identificación bioquímica de acuerdo con lo descrito en los puntos 9.5.2.3. a 9.5.2.8.

9.5.2.3. Oxidasa

Utilizando una varilla de vidrio o una aguja de inoculación descartable, tome una porción de cada colonia característica seleccionada (9.5.2.2.). Coloque la porción tomada sobre un papel de filtro húmedo con el reactivo oxidasa (5.2.5.1.) o sobre un disco disponible comercialmente. No use ansas en aro o en aguja de níquel-cromo. Considere el ensayo como negativo cuando el color del papel de filtro no cambie a malva, violeta o azul oscuro al cabo de 10 segundos.

9.5.2.4. Descarboxilación de L- Lisina

Usando un ansa en aro, en aguja o una varilla de vidrio, inocule el medio para la descarboxilación de L- Lisina (5.2.5.2.) por debajo de la superficie del medio líquido con cada una de las colonias seleccionadas respectivamente (9.5.2.2.). Incubar los tubos a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Después de la incubación una coloración violeta indicara la positividad de la reacción. El color amarillo indica reacción negativa.

9.5.2.5. Descarboxilación de la L-Ornitina

Usando un ansa en aro, en aguja o una varilla de vidrio, inocule el medio para la descarboxilación de L-Ornitina (5.2.5.3.) por debajo de la superficie del medio líquido, con cada una de las colonias seleccionadas respectivamente (9.5.2.2.). Incubar los tubos a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Después de la incubación una coloración violeta indicara la positividad de la reacción. Un color amarillo indica reacción negativa.

9.5.2.6. Deshidroxilación de la L- Arginina

Usando un ansa en aro, en aguja o una varilla de vidrio, inocule el medio para la deshidroxilación de L- Arginina (5.2.5.4.) con cada una de las colonias seleccionadas respectivamente (9.5.2.2.) por debajo de la superficie del medio líquido. Incubar los tubos a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Después de la incubación una coloración violeta indicara la positividad de la reacción. Un color amarillo indica reacción negativa.

9.5.2.7. Fermentación de varios azucares

Usando un ansa en aro, en aguja o una varilla de vidrio, inocule cada medio para la fermentación de carbohidratos (5.2.5.5.3.) con cada una de las colonias seleccionadas respectivamente (9.5.2.2.) por debajo de la superficie del medio líquido. Incubar los tubos a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Después de la incubación una coloración amarilla indicara la positividad de la reacción. Una coloración violeta indicara reacción negativa.

9.5.2.8. Utilización del Citrato

Usando una ansa en aro, en aguja o una varilla de vidrio, se sembrarán las colonias seleccionadas (9.5.2.2.) sobre la superficie inclinada del medio de de Citrato de Simons (5.2.5.6.). Incubar los tubos a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. La reacción es positiva si el medio se torna azul.

9.6. Interpretación de los resultados de los ensayos de confirmación

Interprete los resultados de acuerdo a la Tabla 1.

Tabla 1 — Interpretación de los resultados

Test confirmatorio	Reacción	
	positiva o negativa	Porcentaje de cepas de <i>Cronobacter sakazakii</i> que exhiben esta reacción
Producción de pigmento amarillo	+	> 99
Oxidasa	-	> 99
L-lisina decarboxilasa	-	> 99
L-ornitina decarboxilasa	+	± 90
L-Arginina dehidrolasa	+	> 99
Producción de Ácido a partir de		
— Fermentación de D- Sorbitol	-	± 95
— Fermentación de L- manosa	+	> 99
— Fermentación de D- Sacarosa	+	> 99
— Fermentación del D- Melobiosa	+	> 99
— Fermentación del D- amigdaline	+	> 99
Hidrolisis del Citrato	+	> 95

10. Cultivos de control

Con la finalidad de verificar la habilidad de los medios de enriquecimiento y aislamiento para soportar el crecimiento de *Enterobacter sakazakii*, introducir un bajo nivel de inóculo de un cultivo de referencia de una cepa recientemente aislada de *Cronobacter sakazakii*, o de una cepa de referencia proveniente de un centro de colección de cultivos reconocido, en frascos controles del medio de pre-enriquecimiento (9.2.). Proceda con estos frascos controles de la misma forma que para los cultivos ensayados para demostrar que el control positivo es recuperado.

11. Expresión de los resultados

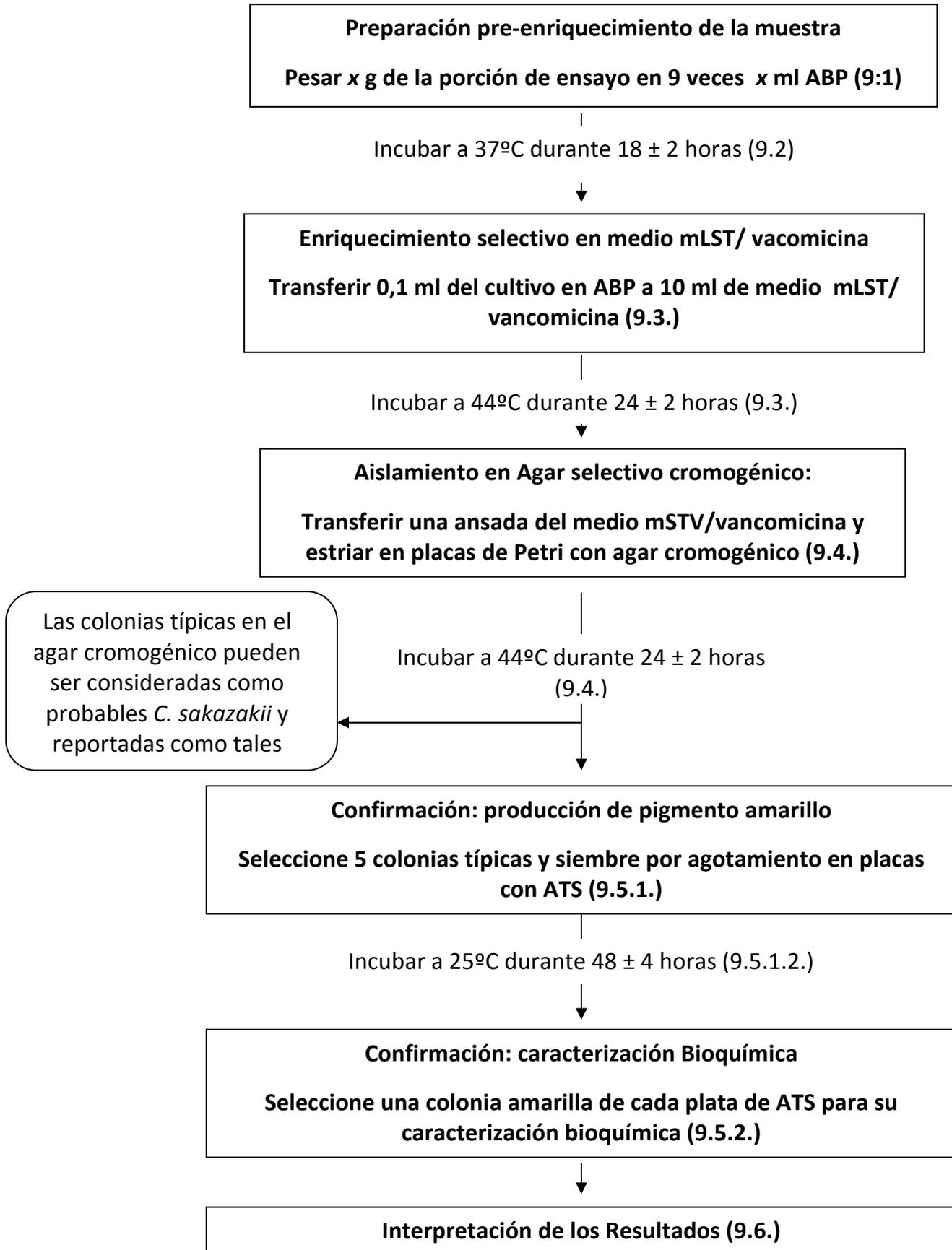
De acuerdo con la interpretación de los resultados (9.4.), reporte la presencia o ausencia de posibles *Cronobacter sakazakii* en la muestra analizada. En este caso no se llevará

a cabo la confirmación de los presuntos *Cronobacter sakazakii* sobre agar cromogénico. Después de la confirmación, según los procedimientos descritos en 9.5., de uno o más de los posibles *Cronobacter sakazakii* obtenidos en el punto 9.4. reporte la presencia o ausencia de *Cronobacter sakazakii* en la muestra analizada. Especifique el resultado final del ensayo por masa (en gramos) o por volumen (en mililitros) de muestra de ensayo analizada.

12. Reporte del ensayo

El reporte del ensayo especifica:

- a) Toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra
- b) El método de toma de muestra utilizado, si es conocido;
- c) El método de ensayo utilizado, con referencia a esta Especificación Técnica
- d) Todos los detalles de operación no especificados en esta Especificación Técnica, o considerados como opcionales, junto con detalles de todos los incidentes que puedan haber influenciado los resultados.
- e) Los resultados obtenidos.



BIBLIOGRAFÍA

- [1] ISO 707 | IDF 50. *Milk and milk products — Guidance on sampling.*
- [2] ISO 6887-1. *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.*
- [3] ISO/TS 11133-1. *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General Guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.*
- [4] GUILLAUME-GENTIL, O., SONNARO, V., KANDHAI, M.C., MARUGG, J.D. and JOOSTEN, H. A Simple and rapid Cultural Method for Detection of *Cronobacter sakazakii* in Environmental Samples. *Journal of Food Protection*, **68**(1). 2005. pp. 64-69.

NORMA BAM

Aislamiento y Enumeración de *Cronobacter sakazakii* a partir de fórmulas infantiles deshidratadas y pulverizadas

Julio 2002; Revisado en Agosto 2002

Antecedentes

Cronobacter sakazakii es un bacilo gram negativo que pertenece a la familia *Cronobacteriaceae*, género *Cronobacter*. Este organismo fue denominado "*Cronobacter cloacae* de pigmento amarillo" hasta 1980 cuando fue reclasificado *Cronobacter sakazakii*. Urményi & Franklin (1) reportaron los primeros dos casos conocidos de meningitis causados por *C. sakazakii* en 1961. Posteriormente, otros casos de meningitis, septicemia, y enterocolitis necrotizante debidas a *C. sakazakii* han sido reportados a nivel mundial. Aunque muchos casos documentados involucran infantes, también se han descrito reportes de infecciones en adultos (2). En general, las tasas de casos fatales (mortalidad) varían considerablemente llegando en algunos casos al con 80%. Aunque el reservorio de *C. sakazakii* es desconocido, un creciente número de reportes sugiere que fórmulas de leche en polvo para lactantes actúan como vehículo de la infección (3-5).

Equipos y materiales

- Baño termostático, con sistema de circulación para mantener la temperatura a $45,5 \pm 0,2$ °C. El nivel del agua debe estar por encima de la mitad del tubo sumergido.
- Termómetro de inmersión, 1-55 °C, de aproximadamente 55 cm de longitud, con subdivisiones de 0.1°C, certificado por el Instituto Nacional de Estandarización y Tecnología (National Institute of Standards and Technology) (NIST), o equivalente.
- Incubadoras, 35-37 °C y 24-26 °C.
- Pipetas, 1, 5, y 10 ml, graduadas en unidades de 0.1 ml.
- Varillas de dispersión de vidrio (por ejemplo, palo de hockey) 3-4 mm de diámetro con un área de dispersión de 45-55 mm.
- Ansas de inoculación estériles en aro de 3 mm de diámetro.
- Balanza de 2 kg de capacidad y 0,1 g de sensibilidad.
- Pipetas estériles graduadas de 1.0 y 10.0 ml.
- Utensilios estériles para toma de muestras (ver [BAM Capítulo 1](#)¹).

- Botellas de dilución hechas de vidrio borosilicato, con tapas de rosca o tapón de polietileno equipadas con cubiertas de teflón. 160 ml de capacidad.
- Matraces Erlenmeyer estériles con tapones de rosca de polietileno equipados con cubiertas de teflón. De 2 litros, 250 ml y 125 ml de capacidad. Pueden ser sustituidos por utensilios descartables (de plástico) estériles.
- Botellas estériles con tapones de rosca de polietileno equipados con cubiertas de teflón. De 100 ml de capacidad. Pueden ser sustituidas por utensilios descartables (de plástico) estériles.
- Contador de colonias Quebec, o equivalente, con lentes de magnificación.
- Tiras bioquímicas API 20E.
- Placas de Petri, descartables (de plástico), estériles, 15 x 150 mm.

Medios² y reactivos³

- Agar Tripticasa (Tríptico) de Soya ([BAM M152⁴](#)). Una vez preparado el medio deberá ser almacenado a 2-8 °C no más de 4 semanas.
- Agar violeta rojo bilis glucosa (agar VRBG): añadir los ingredientes en 1 litro de agua destilada, (añadir los colorantes filtrados en solución acuosa al 1%) y calentar hasta la ebullición agitando hasta que todos los ingredientes estén disueltos. No esterilizar este medio. Enfriar hasta 45 °C y verter en placas de Petri, preferentemente de 15 cm de diámetro. Si no es usado inmediatamente, almacenar el agar en un refrigerador a 5-8 °C. Este medio se encuentra disponible comercialmente en forma deshidratada (Oxoid, CM0485); reconstituir directamente en el contenedor. Una vez preparado, el medio debe ser almacenado a 2-8 °C por no más de 4 semanas.

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	7,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Sales biliares No. 3	1,5 g
Lactosa	10,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g

Agar	15,0 g
Glucosa	10,0g

- *Caldo de enriquecimiento para Cronobacteriaceae* (EE medio líquido): Solo debe usarse Ox-gall sales biliares y verde brillante purificados a fin de no inhibir el muy escaso número de células debilitadas de *Cronobacteriaceae*. Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentar hasta ebullición, y dispensarlo en volúmenes de 90 mL. Este medio está disponible comercialmente en forma deshidratada (Oxoid CM0317); reconstituir directamente en el contenedor. Terminada la preparación el medio deberá ser de color verde. Una vez preparado el medio líquido podrá ser almacenado a 2-8°C por no más de 4 semanas.

Peptona	10,0 g
Glucosa	5,0 g
Fosfato de Sodio Monohidrogenado deshidratado	8,0g
Fosfato de Potasio Dihidrogenado	2,0 g
Ox-gall sales biliares	20,0 g
Verde brillante	0,015 g

- Reactivos para el test de Oxidasa ([BAM R54⁵](#))

Test presuntivo para *C. sakazakii*:

El test presuntivo se basa en un enriquecimiento “tres - tubos” a fin de que los bajos niveles del microorganismo esperados en el producto puedan ser detectados y cuantificados. El test presuntivo requiere un tamaño de muestra de al menos 333 g.

1. Esterilizar los bordes de los envases y las cucharas o espátulas utilizados para el pesaje antes de retirar las muestras. Utilizando el procedimiento del NMP de tres tubos, pesar asépticamente y por triplicado, 100 g, 10 g, y 1 g de la fórmula infantil en polvo y colocarlos en matraces Erlenmeyer de 2 litros, 250 ml y 125 ml de capacidad, o bien bolsas estériles de 2 litros y 750 ml respectivamente. Añadir nueve partes (dilución 1:10)

de agua destilada estéril, previamente calentada a 45 ° C y agitar suavemente con la mano hasta que el polvo se suspenda de manera uniforme. Véase la figura 1. (Nota: Para facilitar la inoculación preparar previamente volúmenes previamente medidos de agua caliente a 45 ° C y añadir directamente a los frascos. Las botellas de 100 ml con tapa de rosca pueden ser sustituidas por contenedores de 10 ml y porciones de 1g). Incubar durante la noche a 36 ° C.



Figura 1. Izquierda, Sin homogeneizar; Derecha, Homogeneizado. (Fotografía cortesía de Sharon Edelson Mammel)

2. Remover 10 ml de cada suspensión y añadir 90 ml de caldo de enriquecimiento para *Enterobacteriaceae* en botellas de dilución estériles de 160 ml o bien en bolsas estériles de 750ml. Incubar a 36°C durante la noche.
3. Mezclar cuidadosamente cada botella y proceder con los siguientes métodos de siembra:
 - A. Método de Dispersión Directa: Inocular por duplicado en placas de agar VRBG con cada cultivo de enriquecimiento por dispersión de 0.1 ml en la superficie de cada placa con una varilla de dispersión de vidrio estéril. (Nota: Si se sospecha que la formula infantil pulverizada contiene un una elevada carga de *C. sakazakii*, el caldo EE debe ser diluido hasta 10^{-4} a 10^{-6} con caldo EE estéril antes de sembrar).

- B. Método Directo de agotamiento: Inocular por duplicado placas de VRBG con cada cultivo de enriquecimiento por agotamiento mediante un ansa de 3 mm (10 µl) por lo menos tres cuadrantes de la placa para la obtención de colonias aisladas. (Nota: La siembra de placas por agotamiento se incluyen como resguardo o *backup* en el caso de que el crecimiento en las placas inoculadas por dispersión esté muy concentrado como para obtener colonias aisladas).
4. Las placas de Petri se incuban a 36°C durante toda la noche. Observe en las placas la morfología típica de las colonias de *C. sakazakii* (ver más abajo).
 5. Elija un total de 5 colonias sospechas o presumibles *C. sakazakii* de las placas anteriores y realice subcultivos de cada aislamiento por agotamiento en placas de ATS. Incubar a 25°C durante 48-72 h.
 6. Seleccione de las placas de ATS solo únicamente las colonias con pigmento amarillo y confirme usando el sistema de identificación bioquímica API 20E de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la identificación positiva de *C. sakazakii* deberá incluirse el test de oxidasa (Ver más abajo Tabla 1 Propiedades bioquímicas de las especies de *Cronobacter*).
 7. Cálculo del NMP (Manual BAM, Apéndice 2; [Most Probable Number Determination from Serial Dilutions](#)⁶). Cálculo del NMP de células de *C. sakazakii* /g de muestra basado en el número de "tubos" de cada dilución en los que la presencia de *C. sakazakii* fue confirmada.

Morfología de la colonia típica de *C. sakazakii*:

- Agar VRBG: Las colonias típicas aparecerán como colonias de color púrpura rodeadas de un halo de precipitación de los ácidos biliares. Ver Figura 2.



Figura 2. (Fotografía cortesía de Sharon Edelson Mammel)

- Agar TSA: Las colonias típicas aparecerán como colonias con pigmento amarillo luego de 48-72 horas de incubación a 25°C. Ver Figura 3.



Figura 3. (Fotografía cortesía de Sharon Edelson Mammel)

Bibliografía

1. Urmenyi, A.M.C. and Franklin, A.W. 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1:313-315.
2. Hawkins, R.E., Lissner, C.R. and Sanford, J.P. 1991. *Cronobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South Med J.* 84(6):793-5.
3. Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L. and Ferguson, J. 1989. *Cronobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol* 10:398-401.
4. van Acker, J., De Smet, F., Muyldermans, G., Bougateg, A., Naessens, A. and Lauwers, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Cronobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol* 39:293-97.
5. Biering, G., Karlsson, S., Clark, N.C., Jonsdottir, K.E., Ludvigsson, P., and Steingrimsson, O. 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Cronobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol.* 27(9):2054-6.
6. Food and Agriculture Organization. 1994 Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for infants and children. CAC/RCP 21-1979. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
7. Nazarowec-White, M. and Farber, J.M. 1999. Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Cronobacter sakazakii*. *J Med Microbiol* 48:559-67.
8. Nazarowec-White, M. and Farber, J.M. 1997. *Cronobacter sakazakii*: a review. *Int J Food Microbiol.* 34:103-13.
9. Muytjens, H.L., Roelofs-Willems H. and Jaspar, G.H.J. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Cronobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 26:743-746.
10. Nazarowec-White, M., and Farber, J.M. 1997. Thermal resistance of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. *Lett Appl Microbiol* 24:9-13.
11. Muytjens, H.L., van der Ros-van de Ripe, J. and van Druten, H.A.M. 1984. Enzymatic profiles of *Cronobacter sakazakii* and related species with special reference to the alpha-glucosidase reaction and reproducibility of the test system. *J. Clin Microbiol.* 20:684-686.

TABLA 1: Tomado de la Referencia 8 (Nazarowec-White y Farber, 1997)

Diferenciación Bioquímica de especies de *Cronobacter* oportunistas^a

Test	Reacción ^b				
	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>
Lisina decarboxilasa	-	-	+	-	+
Arginina dehidrolasa	+	+	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	+	+	+	-	+
Crecimiento en KCN	+	+	+	v	-
Sacarosa	+	+	+	(+)	+
Dulcitol	-	(-)	-	(-)	-
Adonitol	-	(-)	+	-	-
Fermentación de:					
Rafinosa	+	+	+	v	+
D-sorbitol	-	+	+	v	-
x-metil-D-glucósido	+	(+)	-	-	-
D-arabitol	-	(-)	+	-	+
Pigmento amarillo	+	-	-	(+)	-

^a Adaptado de Farmer and Kelly, 1992.

^b Cuando + representa 90-100% positivo; (+) : 75-89% positivo; v: 25-74% positivo; (-): 10-24% positivo; -: 0-9% positivo