



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, PSIQUIATRÍA E
HISTORIA DE LA CIENCIA

TESIS DOCTORAL:

ESTUDIO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS ENTÉRICAS VEHICULADAS POR ALIMENTOS

Presentada por Irene Fernández Escudero para optar al
grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Emiliano José Quinto Fernández

Dra. María José Cao Torija

Dra. María José Castro Alija



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D. Emiliano José Quinto Fernández, con D.N.I. nº 33305808Z, profesor del departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia de la Facultad de Medicina, y Dña. María José Cao Torija, con DNI nº 34247049A, y Dña. María José Castro Alija, con DNI nº 9735847Q, ambas del departamento de Enfermería de la Facultad de Enfermería, como Directores de la Tesis Doctoral titulada ESTUDIO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS ENTÉRICAS VEHICULADAS POR ALIMENTOS, presentada por DÑA. IRENE FERNÁNDEZ ESCUDERO, alumna del programa "Investigación en Ciencias de la Salud" impartido por el departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia, autoriza la presentación de la misma, considerando que se cumplen las condiciones necesarias para ello en cuanto a la calidad del trabajo realizado y a su repercusión científica.

Valladolid, 7 de Mayo de 2015

Los Directores de la Tesis,

Fdo.: Emiliano J. Quinto Fernández

Fdo.: M^a José Cao Torija

Fdo.: M^a José Castro Alija

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

A mis padres

AGRADECIMIENTOS



Con la escritura del presente trabajo finaliza un capítulo de mi vida. Durante el mismo han sido muchas las personas que me han acompañado y ayudado, haciendo que fuese posible el punto en el que ahora me encuentro; así como ameno el camino hasta conseguirlo. Es por tanto necesario que dedique estas líneas a agradecer a todos ellos la ayuda desinteresada que me han ido prestando.

Gracias en primer lugar a mi familia, en especial a mis padres, por vuestro apoyo, consejos, consuelos y en definitiva por estar a mi lado siempre que os he necesitado. Gracias porque todos mis logros tanto académicos como personales se deben al trabajo y los esfuerzos que día a día lleváis realizando durante 23 años.

Gracias a mis directores: Emiliano, María José Cao y María José Castro por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de hacer realidad este proyecto.

Emiliano, muchas gracias por haberme hecho partícipe de tus estudios y haber renacido en mí el interés por la Microbiología que desde pequeña he tenido pero mantenía en estado latente. Mil gracias por los consejos, el apoyo, la amabilidad y la cercanía mostrada en todo momento.

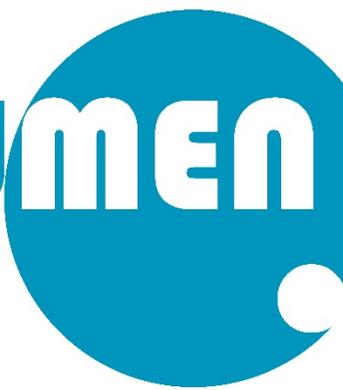
María José Cao y María José Castro, gracias por aceptarme para realizar la tesis con vosotras desde el primer momento que crucé vuestra puerta. También quisiera agradeceros que hayáis seguido contando conmigo a lo largo de este tiempo, iniciándome incluso en el mundo de la docencia. Muchas gracias por vuestro apoyo y energía.

Quisiera nombrar aquí también a todos mis compañeros, especialmente a Celia por toda su ayuda y a Irma por su entrega y trabajo.

Gracias asimismo a todos mis amigos por servirme de desconexión de este mundo. Mario, muchas gracias por tu capacidad de hacer que los momentos malos sean menos malos y los buenos aún mejores.

Muchas gracias a todos. Un trocito de este trabajo es de cada uno de vosotros.

RESUMEN



En Microbiología de los alimentos destacan dos campos de interés: la protección de los consumidores frente a enfermedades transmitidas por alimentos y la prevención de alteraciones de los productos por estos agentes. La familia *Enterobacteriaceae* constituye uno de los principales ejemplos de bacterias vehiculadas por alimentos, de la que forman parte las especies *Escherichia coli* y *Cronobacter sakazakii*. La creación de modelos predictivos y el estudio de su comportamiento constituyen herramientas con las que satisfacer las necesidades actuales de seguridad alimentaria.

El presente estudio se ha dividido en tres secciones con objetivos bien diferenciados:

i) Estudiar de la variabilidad de los parámetros de crecimiento y estado fisiológico de cepas de *E. coli*: Se realizó el estudio impedanciométrico y estadístico de diferentes cepas de *E. coli* a una serie de temperaturas en infusión de cerebro y corazón (BHI) y leche, con lo que se obtuvieron los parámetros de crecimiento y su variabilidad. Se observaron leves diferencias entre los parámetros de crecimiento de las cepas y ausencia de variabilidad significativa entre ellas.

ii) Estudiar del comportamiento de *C. sakazakii* CECT 858 en leche maternizada reconstituida (LMR) a las temperaturas y manipulaciones de este producto más aplicadas a nivel doméstico: Se estudió el comportamiento de la bacteria en LMR y caldo triptona de soja (TSB) a temperatura de refrigeración (-4°C), ambiente (24°C de media) y de congelación (-20°C); así como su afectación por microondas. Los cultivos no crecieron en refrigeración, mientras que a temperatura ambiente mostraron una elevada capacidad de crecimiento. En congelación se observó una reducción de la concentración pese a la elevada desviación estándar

iii) presentada. Por último, las microondas mostraron un efecto prácticamente nulo sobre la población bacteriana.

iv) Estudiar el efecto de la inoculación de diversos sobrenadantes libres de células en el crecimiento de cultivos de *C. sakazakii* CECT 858 y su relación con el quorum sensing: Cultivos de *C. sakazakii* fueron inoculados con sobrenadantes libres de células extraídos de diferentes fases del crecimiento bacteriano y de diferente concentración. Se realizó el seguimiento de las poblaciones bacterianas a lo largo del tiempo. Se observó mayor alteración del crecimiento con la inoculación de sobrenadantes concentrados, especialmente con el de fase exponencial.

Se puede afirmar, por tanto, que i) la elaboración de modelos de crecimiento específicos para medios de cultivo y alimentos es necesaria para la correcta toma de decisiones sobre la gestión de riesgos microbianos, ii) se corrobora la importancia del empleo de medidas asépticas y temperaturas apropiadas en la preparación, uso y almacenamiento de la leche maternizada y iii) los resultados obtenidos podrían avalar que los mismos sean atribuidos al efecto del fenómeno del quorum sensing.

ABSTRACT



Food Microbiology have two remarkable fields: the protection of consumers against foodborne diseases and the prevention of food alterations by microorganisms. The *Enterobacteriaceae* family represents one of the main examples of foodborne bacteria, in which are included *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii*. The creation of predictive models and the study of the bacterial behavior are important tools in food security.

The present study has been divided into three sections with its own objectives:

i) To study of the variation of growth parameters and physiological state among *Escherichia coli* strains: Impedance and statistical test were applied to several *E. coli* strains at different temperatures in brain heart broth and milk. Growth parameters and their variation among strains were obtained. Slightly differences in the growth parameters and significant variation were observed.

ii) To study the behavior of *C. sakazakii* CECT 858 in powdered infant formula at the temperatures and manipulations more applied at the domestic level: The bacterial growth in powdered infant formula and tryptic soy broth was studied at cooling (4°C), ambient (average: 24°C) and freezing (-20°C) temperatures. The effect of microwaves in the bacterial concentration was also studied. Cultures did not growth at 4°C, while a high capacity of growth was observed at ambient temperature. A reduction of the bacterial concentration at -20°C was detected, despite the high standard deviation. Finally, microwaves did not have effect on the bacterial population.

iii) To study the effect of several cell free supernatants on the *C. sakazakii* cultures growth and their relation with quorum sensing: cell free supernatants from different phases of the bacterial growth and different

iv) concentrations were inoculated into *C. sakazakii* cultures. Populations of the cultures were monitored over time. The greatest growth variations were observed when concentrated cell free supernatants were inoculated, in particular with stationary phase cell free supernatant.

We can concluded that i) the elaboration of specific growth models for food products and environments is required for the management of microbial risk, ii) it is important the use of aseptic measures and appropriate temperatures in the preparation, use and storage of powdered infant formula, and iii) the results could be attributed to the effect of the quorum sensing phenomenon.

ABREVIATURAS



A/D: adherencia/destrucción.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AHL: acil-homoserina-lactona.

BHI: infusión de cerebro y corazón.

C. sakazakii: *Cronobacter sakazakii*.

CB: ComBase Predictor.

CCP: coeficiente de correlación de Pearson.

CDC: Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

CH: colitis hemorrágica.

CV: coeficiente de variación.

D: tiempo de destrucción decimal.

DMFit: modelo dinámico de ajuste.

DPD: dihidropentadiona; autoinductor tipo 2.

DS: desviación estándar.

E. cloacae: *Enterobacter cloacae*.

E. coli: *Escherichia coli*.

ECEH: *Escherichia coli* enterohemorrágica.

ECEI: *Escherichia coli* enteroinvasiva.

ECEP: *Escherichia coli* enteropatógena.

ECET: *Escherichia coli* enterotoxigénica.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

F-test: prueba F de Fischer.

H: antígeno flagelar.

K: antígeno capsular.

L. monocytogenes: *Listeria monocytogenes*.

LD10%: leche desnatada reconstituida al 10%.

LMR: leche maternizada reconstituida.

LRRC: Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli*.

$N_{(\text{GEN al TD})}$: número de generaciones o duplicaciones de la población celular antes de llegar al tiempo de detección.

N_0 : densidad de población celular a tiempo 0.

N_{ii} : inóculo de población 10^2 ufc/ml procedente de la dilución 10^{-6} .

N_{iv} : inóculo de población 10^4 ufc/ml procedente de la dilución 10^{-4} .

N_{TD} : densidad de población celular en el momento del tiempo de detección.

O: antígeno somático.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PMP: Pathogen Modeling Program.

QS: quorum sensing.

R²: coeficiente de determinación.

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

S. calcitrans: *Stomoxys calcitrans*.

S3: sobrenadante extraído de un cultivo de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 incubado durante 4 h; población 10³ ufc/ml.

S3C: concentrado del sobrenadante S3.

S9: sobrenadante extraído de un cultivo de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 incubado durante 18-24 h; población 10⁹ ufc/ml.

S9C: concentrado del sobrenadante S9.

SUH: síndrome urémico hemolítico.

TD: tiempo de detección.

Tg: tiempo de generación.

TSA: agar de soja triptona.

TSB: caldo de soja triptona.

T-test: prueba T de Student.

UFC: unidad formadora de colonias.

UHT: ultrapasteurización.

Vmax: velocidad máxima.

VT: verotoxina.

α : valor de estado fisiológico de un cultivo bacteriano.

ΔTD : incremento del tiempo de detección.

λ : tiempo de latencia.

$\lambda\text{-CB-adj.}\alpha$: tiempo de latencia estimado en ComBase tras el ajuste del estado fisiológico.

λ_{ij} : tiempo de latencia calculado con el valor medio del tiempo de detección del inóculo de población 10^2 ufc/ml.

λ_{iv} : tiempo de latencia calculado con el valor medio del tiempo de detección del inóculo de población 10^4 ufc/ml.

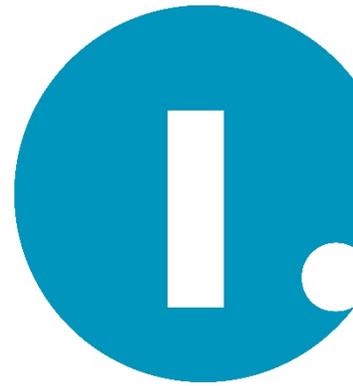
Índice



Capítulo 1. Introducción general.....	33
Capítulo 2. Objetivos generales	39
Capítulo 3. Variabilidad de los parámetros de crecimiento y estado fisiológico de las cepas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, O26:H11 y no-O157:H7 cultivadas en BHI y LD10% a diferentes temperaturas	43
3.1. Introducción	45
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	45
3.1.2. Variabilidad.....	47
3.1.3. Métodos impedanciométricos	48
3.2. Objetivos	50
3.3. Material y métodos	51
3.3.1. Cepas utilizadas, reconstitución y cultivo.....	51
3.3.2. Estudios de impedancia.....	52
3.3.3. Cálculo de los parámetros cinéticos del crecimiento	54
3.3.4. Análisis estadístico.....	56
3.4. Resultados	57
3.4.1. Parámetros de crecimiento estimados.....	57
3.4.2. CV de los parámetros de crecimiento	67
3.4.3. F-test de los parámetros de crecimiento.....	69
3.4.4. Estado fisiológico de los cultivos	71
3.5. Discusión	72
Capítulo 4. Comportamiento de <i>Cronobacter sakazakii</i> CECT 858 a temperaturas y manipulaciones frecuentes a nivel doméstico	77
4.1. Introducción	79
4.1.1. <i>Cronobacter sakazakii</i>	79
4.2. Objetivos	83
4.3. Material y métodos	84
4.3.1. Cepas utilizadas, reconstitución y cultivo.....	84
4.3.2. Preparación de inóculos	84
4.3.3. Estudios de crecimiento	85

4.3.4. Análisis estadístico.....	86
4.4. Resultados	87
4.5. Discusión	91
Capítulo 5. Alteración del comportamiento de <i>C. sakazakii</i> CECT 858 mediante la inoculación de sobrenadantes libres de células y relación con el quorum sensing.....	97
5.1. Introducción	99
5.1.1. Quorum sensing (QS).....	99
5.2. Objetivos	103
5.3. Material y métodos	104
5.3.1. Cepas utilizadas, reconstitución y cultivo.....	104
5.3.2. Obtención de sobrenadantes libres de células.....	104
5.3.3. Influencia de los sobrenadantes libres de células sobre los cultivos .	105
5.3.4. Análisis estadístico.....	107
5.4. Resultados	108
5.5. Discusión	114
Capítulo 6. Conclusiones	119
Capítulo 7. Bibliografía	123
Capítulo 8. Divulgación de resultados.....	137
8.1. Artículos científicos publicados en revistas indexadas	139
8.2. Comunicaciones a congresos	139
8.2.1. Congresos internacionales.....	139

CAPÍTULO
INTRODUCCIÓN
GENERAL



Entre los diversos aspectos que abarca la Microbiología de los alimentos, destacan dos campos de interés bien definidos: la protección del consumidor frente a enfermedades de origen microbiano que se transmiten por alimentos y, por otro lado, la prevención de las alteraciones de estos productos que se originan a causa de microorganismos^(1; 2). Las diferencias en el origen y en las propiedades bioquímicas entre los microorganismos de interés sanitario y los causantes de las alteraciones en los alimentos constituyen el fundamento de esta división, hecho que determina tres situaciones esenciales⁽³⁾:

a) Los alimentos que contienen niveles de bacterias patógenas o de toxinas bacterianas superiores al umbral necesario para producir sintomatología clínica en el consumidor no suelen presentar signos claros de alteración. De este modo, este tipo de productos son consumidos frecuentemente, al contrario de lo que ocurre en los casos en los que la alteración es evidente⁽¹⁻³⁾.

b) Por lo general, las medidas eficaces para controlar el crecimiento de los microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos no evitan el crecimiento de microorganismos responsables de alteraciones. Así sucede con los principales alimentos proteicos, como los productos lácteos y la carne de mamíferos y aves. Este aspecto es causa de gran confusión en los consumidores⁽¹⁻³⁾.

c) Por el contrario, la inhibición del crecimiento de los microorganismos productores de alteraciones, especialmente por una refrigeración adecuada, también es efectiva en la mayoría de los casos para el control del crecimiento de microorganismos patógenos. Sin embargo, las medidas tendentes a reducir o inhibir el crecimiento de los microorganismos alterantes no lo hacen inocuo en todos los casos.

Algunos microorganismos patógenos, virus, protozoos y helmintos conservan generalmente su poder infectivo o infestante. Además, la dosis infectiva de algunas bacterias patógenas es pequeña, por lo que pueden causar enfermedades sin necesidad de multiplicarse⁽¹⁻³⁾.

Los casos anteriormente mencionados presentan un segundo aspecto esencial en relación con la Microbiología de los alimentos: la necesidad de distinguir entre contaminación por microorganismos de los alimentos y su multiplicación en estos productos^(4; 3). Exceptuando los casos a los que se ha hecho referencia en c), la simple contaminación no suele suponer riesgos para el consumidor ni ocasionar la alteración de los alimentos. El principal peligro surge de la posibilidad de su posterior multiplicación en los productos, pudiéndose originar números de microorganismos suficientes como para producir casos de enfermedad en el consumidor o modificar los caracteres organolépticos de los mismos. Debido a la dificultad para evitar la contaminación, las medidas prácticas tienden fundamentalmente a inhibir o reducir el crecimiento de los patógenos en los productos, asegurando su calidad microbiológica⁽³⁾.

En términos generales, puede decirse que se cuenta con suficientes conocimientos científicos y tecnológicos como para producir alimentos de buena calidad microbiana⁽³⁾. Sin embargo, más de 200 enfermedades conocidas son transmitidas a través de los alimentos por una variedad de agentes que incluyen bacterias, hongos, virus y parásitos. Acorde con los expertos de salud pública y seguridad alimentaria, cada año millones de enfermedades en el mundo son producidas por microorganismos vehiculados por alimentos⁽⁵⁾. En el año 2011, los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) estimaron una media anual en Estados Unidos de 48 millones de enfermos, 128.000 hospitalizaciones y 3.000 defunciones por estos patógenos⁽⁶⁾. Asimismo, sus supervivientes

pueden incluso sufrir secuelas crónicas o incapacidad⁽⁷⁾. El incremento de viajes y comercio internacional, cambio en los hábitos alimentarios, globalización de la industria alimentaria, demanda de la reducción de aditivos y procesamiento en los alimentos por parte de los consumidores y los cambios tecnológicos en la industrialización y distribución alimentaria son algunas de las causas que han propiciado el aumento de la incidencia de estas enfermedades^(8-10; 2).

La familia *Enterobacteriaceae* (enterobacterias) constituye uno de los principales ejemplos de bacterias vehiculadas por alimentos. Las enterobacterias son organismos Gram negativos, distribuidos tanto en el medio ambiente como en la microbiota humana y animal. Sus miembros crecen con rapidez bajo condiciones tanto aerobias como anaerobias, siendo activos metabólicamente. Son la causa más frecuente de infecciones de las vías urinarias, así como importantes agentes etiológicos de diarrea. Su difusión hacia la sangre produce choque endotóxico Gram negativo, lo que supone una complicación muy temida y a menudo fatal⁽¹¹⁾.

La garantía de la calidad microbiológica de los alimentos se basa esencialmente en el control de la multiplicación de los microorganismos en el nicho ecológico, constituido por el substrato alimentario y el ambiente en el que se mantiene o conserva⁽³⁾. La Microbiología predictiva proporciona una base científica sólida para satisfacer las necesidades actuales de seguridad alimentaria⁽¹²⁻¹⁴⁾, ya sea mediante el uso de herramientas de evaluación de riesgo que determinen las estrategias para la mejora de dicha seguridad o el diseño de planes específicos que las promulguen.

CAPÍTULO

OBJETIVOS GENERALES



Objetivo 1. Estudiar la variabilidad de los parámetros de crecimiento y estado fisiológico de una serie de cepas de *Escherichia coli* en BHI, así como en leche desnatada reconstituida al 10% (LD10%) a diferentes temperaturas.

Objetivo 2. Estudiar el comportamiento de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 en infusión de cerebro y corazón (BHI) y leche maternizada reconstituida (LMR) a diferentes temperaturas (refrigeración a 4°C, temperatura ambiente y congelación a -20°C) y manipulaciones (calentamiento y descongelación por microondas) llevadas a cabo frecuentemente a nivel doméstico.

Objetivo 3. Estudiar el efecto de la inoculación de diversos sobrenadantes libres de células en el crecimiento de cultivos de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 y valorar si los resultados obtenidos podrían deberse al fenómeno del quorum sensing.

CAPÍTULO



**VARIABILIDAD DE LOS
PARÁMETROS DE CRECIMIENTO
Y ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS
CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
O157:H7, O26:H11 Y
no-O157:H7 CULTIVADAS EN BHI y
LD10% A DIFERENTES TEMPERATURAS**

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli es un anaerobio facultativo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. La mayoría de las *E. coli* son bacterias comensales que se encuentran en el tracto digestivo en humanos y determinados animales de sangre caliente, coexistiendo con su huésped en una relación simbiótica⁽¹⁵⁾. Varios serotipos, sin embargo, han adquirido factores de virulencia que les han permitido adaptarse a nuevos nichos y ocasionar enfermedades graves en algunos casos⁽¹⁶⁾. Un ejemplo de ello lo constituyen las *E. coli* diarreogénicas. Estas se clasifican en grupos específicos basados en su virulencia, mecanismo de patogenicidad, síndrome clínico y serotipificación según sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K)⁽¹⁷⁾. En la actualidad, cuatro de ellas (*E. coli* enteropatógeno (ECEP), *E. coli* enterotoxigénico (ECET), *E. coli* enteroinvasivo (ECEI) y *E. coli* enterohemorrágico (ECEH)) han sido relacionadas con enfermedades transmitidas por los alimentos⁽¹⁸⁾.

3.1.1.1. *E. COLI* ENTEROHEMORRÁGICO (ECEH)

Origen. El reconocimiento de ECEH como una clase distinta de patógenos de *E. coli* resultó de dos observaciones epidemiológicas clave. La primera fue fruto de investigaciones llevadas a cabo por Riley *et al.*⁽¹⁹⁾ de dos brotes de una enfermedad gastrointestinal distintiva a la que se denominó colitis hemorrágica (CH). El estudio de la misma permitió su asociación con la ingestión de hamburguesas poco hechas de una cadena de restaurantes de

comida rápida, así como la identificación del serotipo O157:H7 en los coprocultivos de los pacientes. La segunda averiguación clave fue obtenida por Karmali *et al.*⁽²⁰⁾, los cuales informaron de la presencia de citotoxinas y *E. coli* productora de citotoxinas en las heces de enfermos con casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (SUH). De tal manera, dos observaciones microbiológicas clínicas fueron las responsables del reconocimiento de una nueva y cada vez más importante clase de patógenos entéricos⁽²¹⁾.

Patogenia. Las ECEH poseen capacidad para causar lesiones de adherencia/destrucción (A/D) en el epitelio intestinal humano. Las lesiones de A/D se caracterizan por una adhesión bacteriana estrecha a la membrana celular y la destrucción de las microvellosidades en el lugar de la adherencia^(22; 23).

Todas las ECEH son productoras de verotoxinas (VT) o toxina semejante a Shiga, existiendo dos variantes: VT1 y VT2⁽¹⁷⁾. Esta denominación surgió del efecto citopático irreversible de las toxinas de *E. coli* enterohemorrágico en las células Vero procedentes del riñón del mono verde africano⁽²⁴⁾, así como de la similitud con la toxina producida por *Shigella dysenteriae*^(25; 26; 21). O'Brien y Holmes⁽²⁷⁾ observaron que la subunidad B de las toxinas podría fijarse a los receptores de los glucolípidos existentes en la superficie de la célula e incorporarse a ella. A continuación, la subunidad A se reduciría enzimáticamente al fragmento A1 que al unirse al ribosoma inhibiría la síntesis proteica y provocaría la muerte de la célula⁽²²⁾.

Epidemiología. A pesar de que los brotes ocasionados por *E. coli* acaparan la gran parte de la atención, las mayores cifras de casos de enfermedad por este patógeno son producidas por infecciones esporádicas de ECEH.

Según los CDC, en los Estados Unidos se producen anualmente más de 20.000 infecciones y hasta 250 muertes por este patógeno⁽²⁸⁾, siendo causadas entre el 50 y el 80% de ellas por el serotipo O157:H7⁽²¹⁾. Además de su importancia en América del Norte, ECEH es un patógeno con relevancia mundial. En Europa y Japón la infección presenta diferencias estacionarias al producirse la mayor parte de los casos esporádicos en los meses de verano. Por otro lado, en países del hemisferio sur como Argentina, Australia, Chile y Sudáfrica los serotipos no-O157:H7 son a menudo los causantes de la mayor proporción de infecciones por *E. coli*⁽²¹⁾.

La mayoría de los casos son producidos por la ingestión de alimentos contaminados, principalmente aquellos de origen bovino como la carne insuficientemente cocinada y la leche cruda o fermentada (yogur). Asimismo, la carne de origen porcino, aviar y ovino^(29; 30), mayonesa⁽³⁰⁾, vegetales crudos como la lechuga⁽³¹⁾, zumo de manzana sin pasteurizar^(32; 33), aguas recreativas⁽³⁴⁾, pozos e incluso sistemas de aguas municipales⁽³⁵⁾ han sido relacionados con la aparición de brotes.

Una pequeña dosis infecciosa, del orden de 100 a 200 organismos, ha sido estimada como posible causante de infecciones^(30; 21).

3.1.2. VARIABILIDAD

Las decisiones sobre la gestión de los riesgos ocasionados por microorganismos vehiculados por alimentos se basan cada vez más en la evaluación cuantitativa de los mismos⁽³⁶⁾. El uso de modelos predictivos que describan respuestas microbianas y la estimación de parámetros de modelo constituyen un paso importante en dichas evaluaciones^(37; 38).

Además de una estimación precisa de los valores individuales de los parámetros, como el tiempo de generación (T_g) y el tiempo de latencia (λ), también es deseable contar con información sobre sus distribuciones. Desde un enfoque determinista, ignorar la variabilidad de las cepas puede proporcionar resultados incompletos o engañosos^(39; 40); a pesar de ser todavía bastante escasa la existencia de literatura que los mencione⁽⁴¹⁾. Una posible causa de esta brecha en el conocimiento es el apreciable trabajo necesario para obtener dichos datos.

Conocer la variación entre cepas es un componente importante en la evaluación de la potencial exposición de un consumidor a un patógeno. Por lo general, los modelos están destinados a representar todas las cepas propensas a estar presentes en un alimento. De esta forma, un modelo estocástico que incorpore la distribución de cepas proporcionará un análisis más completo que aquel determinista que evalúe los valores de los parámetros de un patógeno puntual⁽⁴¹⁾. La aplicación del coeficiente de variación (CV) permite determinar tal dispersión, habiendo sido aplicado en la actualidad por algunos autores^(42; 41; 43; 44).

3.1.3. MÉTODOS IMPEDANCIOMÉTRICOS

La creciente necesidad de obtener datos precisos en Microbiología de los alimentos es difícilmente satisfecha mediante el empleo de métodos clásicos de recuento de viabilidad⁽⁴⁵⁾.

Los métodos impedanciométricos de detección de microorganismos son técnicas originalmente diseñadas para una cuantificación rápida del número de bacterias presentes en un producto⁽⁴⁶⁾. Son considerados el mejor

método de recuento microbiológico en la industria alimentaria⁽⁴⁷⁾ al haber demostrado ser más eficiente en tiempo y en ahorro de tiempo de trabajo que los protocolos de análisis tradicionales⁽⁴⁸⁾. Se basan en la determinación del recuento microbiano durante la fase exponencial, donde los substratos se metabolizan en productos con una mayor conductividad, disminuyendo por tanto la impedancia^(49; 50). Otros usos potenciales de estos métodos incluyen la determinación de la ruptura de la cadena de frío sobre los productos alimentarios⁽⁵¹⁾, la estimación de la vida útil o caducidad de los mismos y la estimación de su frescura⁽⁵²⁾. Debido a que la medición de la impedancia depende de los cambios metabólicos, factores como el medio de cultivo, el tiempo y la temperatura son parámetros críticos en los ensayos⁽⁵³⁾. Cuando la población alcanza los niveles de 10^5 ufc/ml se puede observar un cambio significativo en la señal de impedancia, conductancia o capacitancia del medio⁽⁵⁰⁾. El tiempo que se requiere para lograr este cambio exponencial es conocido como tiempo de detección (TD) y está en función del recuento (ufc/ml) en las muestras estudiadas⁽⁵⁰⁾. Así, el cambio eléctrico puede ser correlacionado de forma indirectamente proporcional con el número de microorganismos⁽⁵⁴⁾, siendo una herramienta eficaz en la generación de curvas de crecimiento de patógenos bacterianos⁽⁵⁵⁾.

Se han comercializado distintos equipos basados en las técnicas impedanciométricas; destacando Malthus, Bactometer y Rabbit. Una gran ventaja de estas técnicas es que no es necesario que los microorganismos estén en suspensión o adheridos a la superficie, ya que mientras se mantengan vivos pueden cambiar las propiedades eléctricas del medio de incubación⁽⁵⁶⁾.

3.2. OBJETIVOS

Objetivo 1. Estudiar el comportamiento de diferentes cepas O157:H7 y O26:H11, así como de la patrón CECT 516 de *Escherichia coli* en BHI y LD10%.

Objetivo 2. Obtener los TD de los distintos cultivos estudiados bajo una batería de temperaturas que abarque de forma aproximada el intervalo de crecimiento de *E. coli*.

Objetivo 3. Aplicar modelos matemáticos para la estimación del T_g y λ , así como modelar los parámetros a lo largo de la batería de temperaturas seleccionada.

Objetivo 4. Emplear análisis estadístico para estudiar la variabilidad en los parámetros de crecimiento, estado fisiológico de las cepas a las temperaturas seleccionadas y significación de las diferencias encontradas.

3.3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1. CEPAS UTILIZADAS, RECONSTITUCIÓN Y CULTIVO

Para la realización del presente trabajo se emplearon 10 cepas de *Escherichia coli* (Tabla 1). Cuatro de las mismas fueron suministradas por el Dr. J. Blanco y aisladas por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, España) a partir de muestras de heces de ganado vacuno: LREC 1 y LREC 2 (*E. coli* O157:H7 VT1 y VT2 *eae*), LREC 3 y LREC 4 (*E. coli* O26:H11 VT1 *eae*). Asimismo, se usaron 5 cepas de *E. coli* O157:H7 proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España): CECT 4076 (*E. coli* O157:H7 aislada de humano con colitis hemorrágica, Canadá), CECT 4267 (*E. coli* O157:H7 VT1 y VT2 aislada de humano con colitis hemorrágica, CDC, USA), CECT 4782 (*E. coli* O157:H7 VT1 y VT2 exopolisacárido+ aislada de humano con colitis hemorrágica, USA), CECT 4783 (*E. coli* O157:H7 VT1 y VT2 aislada de humano con colitis hemorrágica, USA) y CECT 4972 (*E. coli* O157:H7 no patógena). Adicionalmente se utilizó la cepa CECT 516 como referencia no patógena y no-O157:H7. Todas las cepas se reconstituyeron en infusión de cerebro y corazón (BHI, Difco) y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

A partir de las cepas ya reconstituidas se procedió a la inoculación de 1 ml de cada una de ellas en tubos con 10 ml de BHI, incubándose a 37°C durante 18-24 h. Se realizaron tres pases consecutivos con el fin de activar adecuadamente el sistema metabólico de las bacterias. Tras el tiempo citado a la temperatura indicada se obtuvieron poblaciones de aproximadamente

10⁹ ufc/ml. Las cepas fueron almacenadas en caldo nutritivo (Difco) con 0,75% de agar nutritivo (Difco) a temperatura ambiente.

Tabla 1. Clasificación de las cepas de *E. coli* seleccionadas para el estudio.

Serotipo	Cepa	Verotoxina producida
O157:H7	LREC 1	VT1 y VT2
O157:H7	LREC 2	VT1 y VT2
O26:H11	LREC 3	VT1
O26:H11	LREC 4	VT1
O157:H7	CECT 4076	
O157:H7	CECT 4267	VT1 y VT2
O157:H7	CECT4782	VT1 y VT2 exopolisacárido+
O157:H7	CECT 4783	VT1 y VT2
O157:H7	CECT 4972	No patógena
No-O157:H7	CECT 516	No patógena

3.3.2. ESTUDIOS DE IMPEDANCIA

Con la finalidad de llevar a cabo estudios de impedancia de las cepas anteriormente citadas, se efectuaron diluciones decimales seriadas de cada uno de los cultivos correspondientes. Para ello, se inoculó 1 ml de los mismos en tubos que contenían 9 ml de agua de peptona tamponada (Difco). Se realizaron las diluciones pertinentes hasta llegar a la 10⁻⁶, correspondiendo aproximadamente a una concentración de 10³ ufc/ml.

A continuación, según detalla el método descrito por MacDonald y Sutherland⁽⁵⁷⁾, se inocularon alícuotas de 0,9 ml de caldo BHI o de LD10% en cada una de las 16 celdillas que componen el módulo que se introduce en el Bactometer (bioMérieux, France). Estas celdillas fueron posteriormente inoculadas por duplicado con 0,1 ml de las diluciones 10⁻⁶ y 10⁻⁴ de una única cepa de *E. coli*. De tal manera, se obtuvieron unas concentraciones finales

del microorganismo en cada celdilla de aprox. 10^2 y 10^4 ufc/ml, respectivamente. Paralelamente se llevó a cabo el protocolo control, es decir, sin la presencia del microorganismo; inoculando 0,1 ml de BHI o LD10% en 2 pocillos de cada módulo. Según indica el manual del Bactometer, la muestra introducida en cada pocillo no debe superar la concentración de 10^6 ufc/ml al ser el umbral máximo del instrumento.

Los cultivos fueron introducidos en el Bactometer. El sistema se ajustó para la realización de un test de capacitancia (Test Code 3, Signal C), elegido porque su medida tiene relación directa con el número de bacterias presentes en el medio. La duración del mismo varió dependiendo de la temperatura seleccionada:

- A 5, 10 y 15°C se incubaron durante 72 h.
- A 20°C se incubaron durante 48 h.
- A 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55°C se incubaron durante 24 h.

Todo el proceso descrito fue realizado por duplicado con cada una de las cepas de *E. coli*.

Previamente a la introducción de los módulos en la unidad del Bactometer se tomaron alícuotas de 1 ml de la dilución adecuada. Estas fueron sembradas en placas de Petri con agar de soja triptona (TSA, Difco) e incubadas a 37°C durante 18-24 horas. De esta forma se pudo conocer con exactitud la población inicial de cada cepa de *E. coli* al comienzo de cada ensayo impedanciométrico.

Los datos obtenidos del TD fueron introducidos manualmente en el programa Excel (Microsoft) para proceder a los cálculos a continuación descritos.

3.3.3. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL CRECIMIENTO

3.3.3.1. CÁLCULO DEL TIEMPO DE GENERACIÓN

Dado que se introdujeron en el Bactometer cultivos de concentraciones finales 10^2 y 10^4 ufc/ml de cada cepa de *E. coli*, se obtuvieron dos TD correspondientes a cada una de ellas. A partir de los TD se calcularon los Tg de cada cepa según Firstenberg-Eden y Eden⁽⁵⁸⁾ y Baranyi y Roberts⁽⁵⁹⁾:

$$Tg = \frac{(\Delta TD \times \log_{10} 2)}{(\log_{10} N_{iv} - \log_{10} N_{ii})} \quad (1)$$

Donde ΔTD es el incremento del tiempo de detección entre las dos poblaciones inoculadas, $\log_{10} N_{iv}$ es el logaritmo decimal del recuento del inóculo con mayor población o de la dilución más baja (esto es, la población con 10^4 ufc/ml procedente de la dilución 10^{-4}) y $\log_{10} N_{ii}$ es el logaritmo decimal del recuento del inóculo con menor población o de la dilución más alta (10^2 ufc/ml procedente de la dilución 10^{-6}).

Debido a que la diferencia entre las dos poblaciones es de dos ciclos logarítmicos [$(\log_{10} N_{iv} - \log_{10} N_{ii}) = 2$] y que $\log_{10} 2 = 0,301$, la expresión (1) se pudo redefinir como:

$$Tg = 0,15 \times \Delta TD \quad (2)$$

3.3.3.2. CÁLCULO DEL TIEMPO DE LATENCIA

La estimación de λ mediante métodos impedanciométricos es más compleja, ya que se necesita conocer^(60; 61):

- El tiempo de generación Tg.
- La densidad de población celular en el momento del TD, N_{TD}.
- La densidad de población celular en t = 0, N₀.
- La relación N_{TD} / N₀.

En primer lugar, es necesario calcular el número de duplicaciones de la población celular o número de generaciones antes de llegar al TD (N_{GEN al TD}). Para ello se aplica:

$$N_{\text{GEN al TD}} = 3,32 \times \log_{10} \left(\frac{N_{\text{TD}}}{N_0} \right) \quad (3)$$

El número de generaciones se multiplica por el tiempo de generación con el fin de estimar el tiempo necesario para que se produzca ese aumento en el número de bacterias. La diferencia entre ese tiempo y el TD es una estimación del tiempo de latencia:

$$\lambda = \text{TD} - (Tg \times N_{\text{GEN al TD}}) \quad (4)$$

Los siguientes componentes fueron considerados para la aplicación de las expresiones (3) y (4):

- El tiempo de generación Tg: Fue calculado mediante el modelo (2) descrito en el apartado anterior.
- La densidad de población celular en el momento del TD, N_{TD}: Se consideró una población de 10⁶ ufc/ml, ya que según el manual del Bactometer la muestra introducida en cada pocillo no debería exceder dicha densidad de población.
- La densidad de población celular en t = 0, N₀: En este caso fue necesario considerar dos N₀, ya que tal como se ha explicado anteriormente, se inocularon dos poblaciones diferentes: 10² y

10^4 ufc/ml. Con objeto de simplificar la notación, dichas poblaciones recibieron la denominación ii y iv, respectivamente.

- La relación N_{TD}/N_0 : Debido a la consideración de las poblaciones iniciales N_0 ii y iv, se obtuvieron dos relaciones N_{TD}/N_0 y consecuentemente, dos $N_{(GEN\ al\ TD)}$ (expresión (3)).
- Finalmente, se calcularon dos λ (λ_{ii} y λ_{iv}) mediante la expresión (4).

Todos los datos obtenidos fueron introducidos manualmente en el programa Excel para continuar con el análisis estadístico.

3.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó la media de los valores de los TD de cada inóculo inicial, cepa de *E. coli* y temperatura. Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (CCP) entre los resultados de λ de cada inóculo a cada temperatura con el fin de comprobar si existía una correlación lineal o de dependencia. Seguidamente se estimó la media y desviación estándar de los parámetros de crecimiento (T_g y λ). Se calculó el CV de los mismos, es decir, la relación entre la desviación estándar y la media para investigar la importancia de la variabilidad entre las temperaturas o las cepas. Finalmente, se empleó la prueba F de Fischer (F-test) con el fin de comprobar diferencias significativas entre *E. coli* O157:H7 y O26:H11 respecto de CECT 516, así como entre las cepas patógenas y no patógenas. Todos los estudios estadísticos se llevaron a cabo en Excel.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO ESTIMADOS

3.4.1.1. ENSAYOS EN MEDIO BHI

La realización por duplicado del test de capacitancia en el Bactometer para la dilución más baja (10^{-4} ; aproximadamente 10^4 ufc/ml) de todas las cepas de *E. coli*, originó dos valores de TD. Se calculó la media de los valores obtenidos (datos no mostrados) con la finalidad de poder introducirlos en la ecuación (2) para el cálculo del Tg y el posterior cálculo de λ . Seguidamente se llevó a cabo el mismo procedimiento con los valores obtenidos de la dilución más alta (10^{-6} ; aproximadamente 10^2 ufc/ml).

La Tabla 2 recoge los valores de Tg y λ estimados a partir de los tiempos de detección del impedanciómetro de las cepas de *E. coli* cultivadas en BHI a distintas temperaturas. Las Figuras 1A y 1B muestran los valores medios del Tg y λ , respectivamente y la desviación estándar (DS) obtenidos de las cepas estudiadas. El nivel de detección del Bactometer no fue alcanzado a 5 y 10°C durante 72 h, ni a 50 y 55°C durante 24 h, por lo que no se registró crecimiento a esas temperaturas. Las medias del Tg disminuyeron con el incremento de temperatura desde 15°C (2,57 h) hasta 40°C (0,26 h), sin embargo mostraron un leve incremento a 45°C (0,38 h) al alcanzar valores similares a los obtenidos a 35°C. Respecto a la DS, es curioso observar como los valores obtenidos a 15°C (0,152) fueron muy similares de aquellos recogidos a 45°C (0,136) y sin embargo, mucho mayores que el resto; como por ejemplo 0,032 a 35°C. Esto indica mucha mayor desviación de los valores medios del Tg a estas dos temperaturas (Figura 1A). El rango

de los valores del Tg abarcó desde 2,36-2,90 h (DS 0,152) a 15°C hasta 0,21-0,29 h (DS 0,025) a 40°C. A 45°C los valores del Tg se situaron entre 0,07 y 0,59 h (DS 0,136).

Los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos con el Pathogen Modeling Program, PMP⁽⁶²⁾. Para su realización se seleccionó el modelo de crecimiento aeróbico en caldo de *E. coli* O157:H7 con las siguientes condiciones de entrada: temperatura (15, 20, 25, 30, 35, 40, ó 42°C; ya que 45°C no está incluido en el modelo), pH 7,2, cloruro sódico 0,5% (g/dl) y nivel de población inicial 4 log ufc/ml. La Figura 1A recoge los valores del Tg obtenidos. En ella se puede observar una buena correspondencia entre ambas series de datos a todas las temperaturas, destacando únicamente que a 15, 20, 25 y 45°C los resultados aportados por el PMP se encontraron por debajo del límite inferior del rango del Tg de nuestro estudio. Por otro lado, nuestros datos fueron también comparados con aquellos obtenidos al usar el ComBase Predictor, CB⁽⁶³⁾. Para ello se seleccionó el modelo de crecimiento de *E. coli* con las siguientes entradas: nivel de población inicial 4 log ufc/ml, valor de estado fisiológico (α) predeterminado 0,042426, temperatura (15, 20, 25, 30, 35, 40 ó 42°C; dado que la temperatura de 45°C no está incluida en el modelo), pH 7,2 y actividad de agua de 0,995. Finalmente se pudo constatar una buena concordancia entre los valores del Tg de los datos experimentales y los estimados por el CB, exceptuando los obtenidos a 15°C (Figura 1A).

Se obtuvieron dos valores de λ para cada cepa y temperatura al realizarse el experimento con dos concentraciones iniciales, siendo en todos los casos ambos datos prácticamente iguales (datos no mostrados). Con la finalidad de ver la relación entre los valores de λ de cada inóculo a cada temperatura, se calculó el CCP. A todas las temperaturas el CCP fue 0,999; mostrando prácticamente una total correlación positiva. Cuando el inóculo

está en la fase estacionaria, λ es independiente del tamaño del mismo⁽⁶⁴⁾. La Figura 1B recoge la media de ambas series de tiempos de latencia. En ella se puede observar como los valores medios de λ mostraron comportamientos similares a los valores medios del Tg, decreciendo desde 23,25 a 15°C hasta 1,41 h a 40°C y aumentando ligeramente a 1,90 h a 45°C. Los valores de DS obtenidos entre 35 y 45°C fueron muy diferentes (0,253 y 1,9, respectivamente). El rango de valores de λ estuvo comprendido entre 20,91-26,20 h (DS 1,431) a 15°C y 1,01-1,91 h a 40°C (DS 0,292). A 45°C dicho rango fue de 0,18-6,95 h (DS 1,980). Es de destacar como los valores de DS obtenidos a 45°C fueron muy similares de aquellos a 15°C (1,431) y 20°C (0,565).

La Figura 1B aúna la media de los valores λ experimentales y los teóricos de PMP y CB. En ella se puede observar como nuestros datos difieren de los obtenidos por los modelos a 15 y 20°C; comenzando a asemejarse a 25, 30 y 35°C en donde los resultados se encontraron en el límite inferior del rango de valores obtenidos en nuestro estudio. CB manifestó incluso mayores diferencias a 15 y 20°C, así como una falta de ajuste cuando se utilizó el valor predeterminado del factor de estado fisiológico α (0,042426). El estado fisiológico α ^(59; 65) es un número adimensional entre 0 y 1 que expresa la idoneidad física de las células con su medio. Si este valor es 0 el crecimiento no ocurrirá, representando una latencia infinita; mientras que si el valor es 1 el crecimiento comenzará inmediatamente, sin latencia. La duración de la latencia no depende sólo del medio actual sino también de la historia previa de las células, por lo que los valores de α cuantifican el efecto de la historia previa del cultivo sobre λ . Se probaron distintos valores ajustados de α hasta que los resultados obtenidos de λ se localizaron entre nuestros resultados y los de PMP a 15, 20, y 25°C: 20,71 h ($1,0 \times 10^{-10}$); 7,80 h (0,0001) y 3,84 h (0,01). De igual manera se

pueden probar diferentes valores α obteniendo otros resultados de λ . Por ejemplo, si a 15°C se aplica el valor $\alpha = 1,0 \times 10^{-9}$ se obtiene $\lambda = 18,4$ h, logrando el mismo valor que con PMP; mientras que si se emplea $\alpha = 1,0 \times 10^{-8}$ se obtiene $\lambda = 16,1$ h, valor por debajo del de PMP.

3.4.1.2. ENSAYOS EN MEDIO LD10%

La Tabla 2 reúne los valores de Tg y λ estimados a través de los tiempos de detección impedanciométricos de las cepas de *E. coli* cultivadas en LD10% a una serie de temperaturas. Las Figuras 2A y 2B muestran los valores medios de Tg y λ , así como la DS de dichas cepas en las condiciones citadas. El Bactometer no pudo detectar crecimiento a 5, 10 y 15°C durante 72 h; a 20°C durante 48 h, ni a 50 y 55°C durante 24 h. El cálculo de los valores medios del Tg y su distribución en la Figura 2A permiten observar como estos disminuyeron con el incremento de temperatura desde 25°C (1,53 h) hasta 35-40°C (0,40-0,41 h), pero aumentaron ligeramente a 45°C (0,49 h). Asimismo, también se pudieron percibir valores altos de DS a 25°C (0,233) e incluso más altos a 45°C (0,375). Es importante señalar que se observaron algunos cambios en el medio a 45°C que explicarían la alta DS encontrada. La Figura 2A también recoge los valores del Tg obtenidos con el PMP. En ella se observa una buena concordancia entre las series de datos a todas las temperaturas (estando incluidos en el rango de DS) excepto a 25°C. Se obtuvieron resultados similares mediante el uso del CB. El pH introducido en el ComBase para su aplicación en medio LD10% fue modificado a 6,2 a 25°C ⁽⁶⁶⁾ y a 4,5 a 30, 35, 40 y 42°C ⁽⁶⁷⁾. Los datos de λ obtenidos de las dos concentraciones iniciales de las cepas cultivadas en LD10% a diferentes temperaturas fueron prácticamente iguales (datos no mostrados). El CCP fue 0,999 a todas las temperaturas, lo cual representa una casi absoluta correlación positiva. La media de las dos series de datos de λ y los valores obtenidos con PMP y CB se muestran en la Figura 2B. Nuestros resultados

fueron diferentes a lo largo de las temperaturas, con unos valores de λ (7,26 h) y DS (5,243) máximos a 45°C. Los cambios observados en el medio LD10% a esa temperatura pudieron ser la causa de las altas desviaciones. λ_{PMP} y λ_{CB} mostraron tendencias similares a los datos experimentales, excepto a 45°C. No fue necesario ajustar el estado fisiológico.

Tabla 2. Valores estimados de Tg y λ de las cepas de *E. coli* cultivadas en medio BHI y LD10% a diferentes temperaturas. Datos obtenidos a través de los tiempos de detección impedanciométricos.

Tª (°C)	Cepa	BHI		LD10%		
		Tg	λ	Tg	λ	
15	1	2,49	24,20	-	-	
	2	2,57	22,10	-	-	
	3	2,60	22,25	-	-	
	4	2,90	23,47	-	-	
	4076	2,66	20,91	-	-	
	4267	2,54	23,90	-	-	
	4782	2,60	22,80	-	-	
	4783	2,38	26,20	-	-	
	4972	2,56	23,75	-	-	
	516	2,36	22,89	-	-	
	20	1	1,17	10,70	-	-
		2	1,18	11,60	-	-
3		1,27	9,70	-	-	
4		1,16	11,65	-	-	
4076		1,35	8,70	-	-	
4267		1,22	11,00	-	-	
4782		1,29	9,95	-	-	
4783		1,19	10,85	-	-	
4972		1,13	12,05	-	-	
516		1,34	6,90	-	-	
25		1	0,79	4,08	1,16	4,45
		2	0,77	4,43	1,49	3,51
	3	0,68	4,62	1,49	4,16	
	4	0,79	4,53	1,94	0,52	
	4076	0,80	3,78	1,52	1,71	
	4267	0,72	4,93	1,69	1,02	
	4782	0,80	3,88	1,83	0,53	
	4783	0,80	3,83	1,33	2,35	
	4972	0,80	4,53	1,41	1,51	
	516	0,68	3,68	1,43	1,91	

Tabla 2 (Continuación). Valores estimados de Tg y λ de las cepas de *E. coli* cultivadas en medio BHI y LD10% a diferentes temperaturas. Datos obtenidos a través de los tiempos de detección impedanciométricos.

Tª (°C)	Cepa	BHI		LD10%		
		Tg	Λ	Tg	λ	
30	1	0,41	2,82	0,47	3,12	
	2	0,47	2,52	0,39	3,57	
	3	0,49	1,82	0,20	5,11	
	4	0,49	2,32	0,36	4,11	
	4076	0,41	3,22	0,41	3,22	
	4267	0,40	3,37	0,33	4,06	
	4782	-	-	0,39	3,47	
	4783	0,41	3,22	0,54	2,92	
	4972	0,35	3,81	0,44	3,62	
	516	0,38	2,97	0,39	3,57	
	35	1	0,32	3,01	0,69	0,08
		2	0,37	2,56	0,60	0,97
		3	0,38	2,27	0,46	1,37
4		0,37	2,71	0,53	1,07	
4076		0,37	2,56	0,36	2,51	
4267		0,38	2,27	0,39	2,27	
4782		0,37	2,71	0,30	2,76	
4783		0,41	2,22	0,26	3,26	
4972		0,33	2,36	0,15	4,01	
516		0,30	2,61	0,27	2,91	
40		1	0,27	1,21	0,58	0,92
		2	0,29	1,06	0,53	1,72
		3	0,29	1,01	0,35	2,16
	4	0,29	1,21	0,42	1,62	
	4076	0,26	1,41	0,34	2,31	
	4267	0,26	1,41	0,44	1,77	
	4782	0,25	1,66	0,36	2,01	
	4783	0,21	1,91	0,34	1,91	
	4972	0,24	1,71	0,43	1,77	
	516	0,23	1,51	0,28	1,66	

Tabla 2 (Continuación). Valores estimados de Tg y λ de las cepas de *E. coli* cultivadas en medio BHI y LD10% a diferentes temperaturas. Datos obtenidos a través de los tiempos de detección impedanciométricos.

Tª (°C)	Cepa	BHI		LD10%	
		Tg	λ	Tg	λ
45	1	0,07	6,95	-	-
	2	0,32	3,41	-	-
	3	0,44	0,82	-	-
	4	0,50	0,82	0,10	2,85
	4076	0,41	1,07	-	-
	4267	0,35	1,46	0,38	5,22
	4782	0,37	1,21	-	-
	4783	0,39	1,02	1,05	13,94
	4972	0,34	1,71	0,66	2,58
	516	0,59	0,18	0,26	11,71

Figura 1. (A) Valores medios del Tg obtenidos de *E. coli* O157:H7, O26:H11 y cepa de referencia cultivadas en medio BHI a diferentes temperaturas. Se muestran las estimaciones obtenidas con PMP y CB. **(B)** Valores medios de λ obtenidos de los cultivos en BHI y estimaciones del PMP y CB. λ -CB-adj. α : tiempos de latencia estimados con CB tras ajustar α .

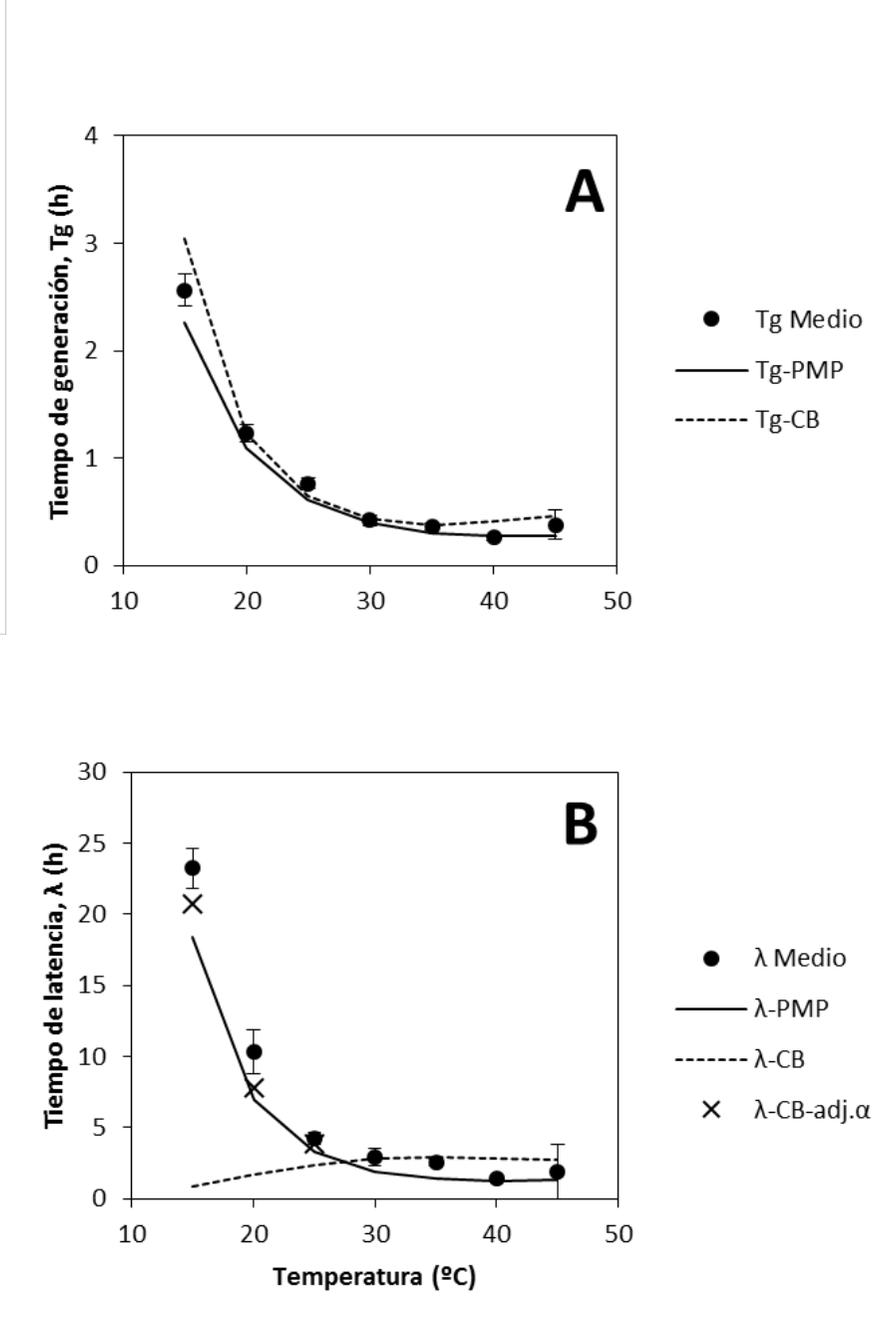
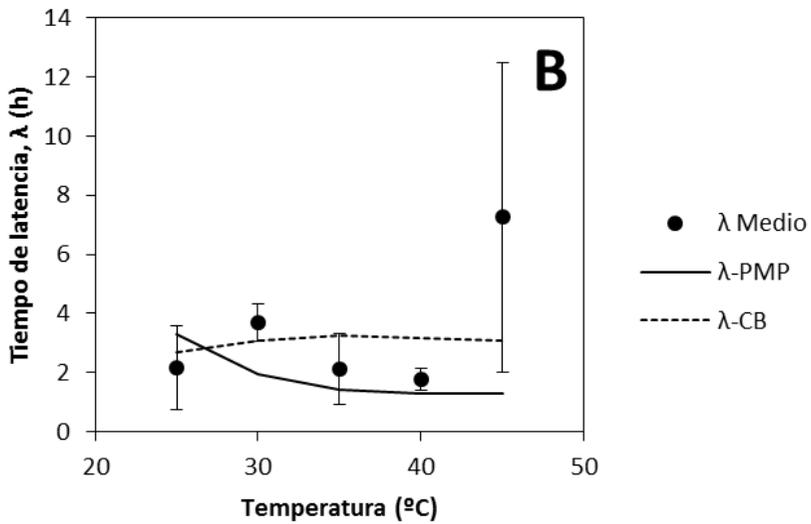
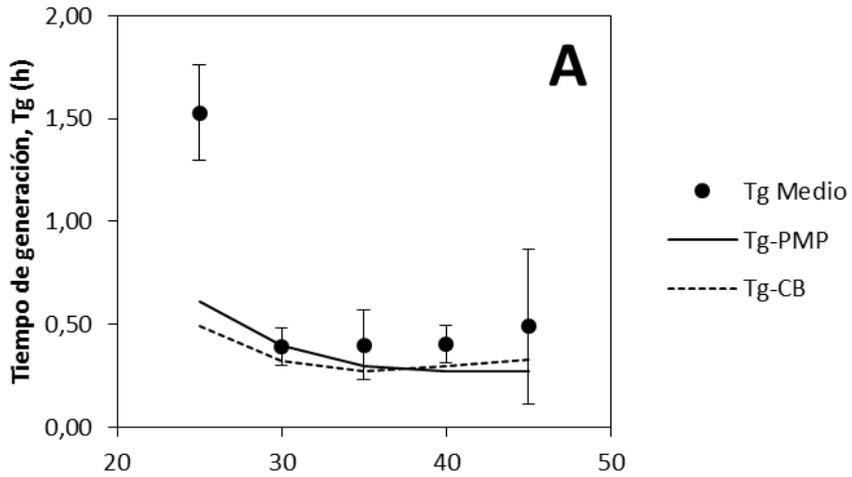


Figura 2. (A) Valores medios del Tg obtenidos de *E. coli* O157:H7, O26:H11 y cepa de referencia cultivadas en medio LD10% a diferentes temperaturas. Se muestran las estimaciones obtenidas con PMP y CB. **(B)** Valores medios de λ obtenidos de los cultivos en BHI y estimaciones de PMP y CB.



3.4.2. CV DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

El CV o variabilidad relativa, ejecutado para una sola variable, pretende describir la dispersión de la misma de forma que no dependa de la unidad de la variable medida. No tiene unidades, por ello puede ser expresado como fracción o porcentaje⁽⁶⁸⁾. Se interpreta de forma que la dispersión de la variable será mayor cuanto más alto sea el valor del coeficiente. Con la finalidad de obtener los CV de los valores del Tg en BHI y LD10% se calculó la media y la desviación estándar de todas las cepas a cada temperatura. Como muestra la Tabla 3, los valores más altos se detectaron a 45°C (0,361 ó 36,1% en BHI; 1,468 ó 146% en LD10%), mientras que los más bajos fueron a 15°C en BHI (0,059 ó 5,9%) y a 25°C en LD10% (0,153 ó 15,3%). A todas las temperaturas la variabilidad entre cepas fue muy pequeña, excepto a 45°C en leche. Igualmente, para todas las temperaturas los valores del Tg fueron mayores en LD10% que en BHI. El mismo procedimiento se realizó con el parámetro de crecimiento λ . En este caso, todos los valores del coeficiente en BHI estuvieron comprendidos entre 0,062 y 0,209; exceptuando a 45°C (1,062 ó 106,2%). Los valores del CV para $\lambda_{LD10\%}$ fueron más altos que para λ_{BHI} a cada temperatura, con un máximo a 45°C (1,428 ó 142,8%). Una posible explicación a este hecho sería que sólo cuando el inóculo es sometido a condiciones de estrés su tamaño podría influenciar la duración del tiempo de latencia⁽⁶⁴⁾. En nuestro trabajo la temperatura de 45°C podría haber causado estrés a las células bacterianas, originando un tiempo de latencia prolongado. Es importante señalar que la temperatura usada para la diferenciación de *E. coli* respecto del grupo de coliformes fecales es 42°C. La Tabla 3 muestra el CV para cada cepa de *E. coli* a todas las temperaturas estudiadas. Los resultados exhiben valores similares en todas las cepas, oscilando entre 0,539-1,059 para Tg_{BHI} y 1,055-1,281 para

λ_{BHI} . Los valores más altos del CV representan la influencia directa de las temperaturas en el crecimiento de cada cepa. Un amplio rango de valores del CV fue observado en $T_{g_{\text{LD10\%}}}$ (0,720-1,246) y $\lambda_{\text{LD10\%}}$ (0,409-1,156), lo cual indica que los cambios físicos detectados en la leche representan un componente adicional de la variabilidad.

Tabla 3. CV del T_g y λ obtenido de las cepas de *E. coli* cultivadas en medio BHI o LD10%.

Criterio	CV_{BHI}		$CV_{\text{LD10\%}}$		$CV_{\text{LD10\%}} \text{ (no } 45^\circ\text{C)}$	
	$T_g \text{ (h)}$	$\lambda \text{ (h)}$	$T_g \text{ (h)}$	$\lambda \text{ (h)}$	$T_g \text{ (h)}$	$\lambda \text{ (h)}$
T^a ($^\circ\text{C}$)						
15	0,059	0,062	-	-	-	-
20	0,063	0,152	-	-	-	-
25	0,066	0,102	0,153	0,661	0,153	0,661
30	0,117	0,209	0,227	0,171	0,227	0,171
35	0,088	0,100	0,421	0,572	0,421	0,572
40	0,098	0,207	0,227	0,211	0,227	0,211
45	0,361	1,062	1,468	1,428	-	-
Cepa						
1	1,059	1,055	0,720	1,156	0,420	0,934
2	0,964	1,111	0,913	0,803	0,667	0,533
3	0,943	1,281	1,155	0,810	0,934	0,541
4	0,993	1,239	1,090	0,711	0,932	0,866
4076	0,642	1,084	1,102	0,623	0,877	0,255
4267	0,626	1,098	0,909	0,603	0,918	0,569
4782	0,934	1,236	1,246	0,840	1,029	0,574
4783	0,539	1,164	0,665	1,044	0,797	0,229
4972	0,770	1,100	0,777	0,409	0,912	0,466
516	0,558	1,230	0,964	0,962	0,946	0,353

3.4.3. F-TEST DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Como recoge la Tabla 4, se llevó a cabo el F-test entre cada cepa de *E. coli* O157:H7 y O26:H11 respecto a la cepa de referencia (CECT 516) y entre cada cepa patógena respecto de las cepas no patógenas (CECT 4972 y CECT 516). Abordando en primer lugar los cultivos en BHI, los resultados no mostraron diferencias significativas entre la cepa de referencia y el resto de cepas (los valores críticos de F-test al 5% ó 1% de nivel de confianza fueron 3,79 y 6,99; respectivamente) ni entre las cepas patógenas y no patógenas (los valores críticos para el F-test al nivel de confianza del 5% ó 1% de fueron 5,05 y 10,97; respectivamente). El mismo procedimiento fue realizado con los resultados en LD10%. En este caso la comparación del tiempo de latencia de todas las cepas respecto a la de referencia reveló la existencia de diferencias significativas en todos los casos excepto en LREC 1, LREC 3 y CECT 4783. Asimismo, cuando el estudio se realizó entre las patógenas y no patógenas, todas las cepas a excepción de LREC 1 y LREC 3 mostraron alguna diferencia. En todos los casos la cepa de referencia fue la implicada en estas diferencias estadísticas, excepto en CECT 4783. Debido a la alta variabilidad observada en los resultados obtenidos a 45°C en LD10% se llevó a cabo un F-test adicional excluyendo los resultados a esa temperatura, no obteniéndose diferencias (los valores críticos para el F-test al 5% ó 1% del nivel de confianza fueron 6,39 y 15,98; respectivamente).

Tabla 4. Comparación mediante F-test del Tg y λ entre las cepas de *E. coli* cultivadas en BHI y LD10%. Los valores del F-test estadístico son fiables si el valor crítico se encuadra dentro del nivel de confianza del (a) 5% ó (b) 1%.

Valores obtenidos con F-test							
Comparaciones		Ensayos en BHI		Ensayos en LD10%		Ensayos en LD10% (no 45°C)	
		Tg (h)	λ (h)	Tg (h)	λ (h)	Tg (h)	λ (h)
Cepas O157 y O26 vs cepa de referencia							
1	516	1,185	1,045	1,463	4,468	3,370	0,196
2	516	1,141	1,066	1,179	7,113 ^a	0,804	0,465
3	516	1,162	1,009	1,302	4,078	1,089	0,262
4	516	1,438	1,120	2,078	8,354 ^a	1,833	0,312
4076	516	1,132	1,160	1,315	11,846 ^{a,b}	1,066	2,041
4267	516	1,265	1,158	1,337	5,870 ^a	1,363	0,468
4782	516	1,573	1,083	2,015	8,151 ^a	1,757	0,497
4783	516	1,097	1,349	1,175	1,481	1,302	0,454
4972	516	1,388	1,198	1,115	14,424 ^{a,b}	1,024	0,487
Cepas patógenas vs no patógenas							
1	4972	1,009	1,044	1,312	3,228	3,291	2,482
	516	1,185	1,045	1,463	4,468	3,370	0,196
2	4972	1,029	1,164	1,314	2,028	0,824	1,049
	516	1,141	1,066	1,179	7,113 ^a	0,804	0,465
3	4972	1,011	1,101	1,452	3,537	1,115	1,857
	516	1,162	1,009	1,302	4,078	1,089	0,262
4	4972	1,224	1,026	2,317	1,727	1,877	1,560
	516	1,438	1,120	2,078	8,354 ^a	1,833	0,312
4076	4972	1,226	1,390	1,466	1,218	1,091	0,239
	516	1,132	1,160	1,315	11,846 ^{a,b}	1,066	2,041
4267	4972	1,098	1,034	1,491	2,457	1,396	1,041
	516	1,265	1,158	1,337	5,870 ^a	1,363	0,468
4782	4972	1,854	1,107	2,246	1,770	1,799	0,982
	516	1,573	1,083	2,015	8,151 ^a	1,757	0,497
4783	4972	1,265	1,127	1,053	21,355 ^{a,b}	1,272	0,221
	516	1,097	1,349	1,175	1,481	1,302	0,454

3.4.4. ESTADO FISIOLÓGICO DE LOS CULTIVOS

La Tabla 5 muestra los valores de α obtenidos después de ajustar en ComBase los resultados de λ_{BHI} y $\lambda_{\text{LD10\%}}$ (Figuras 1B y 2B, respectivamente). Las cepas, niveles iniciales de microorganismos, pH y parámetros de actividad del agua fueron fijados como se explicó previamente. El valor de estado fisiológico refleja el nivel de estrés de los cultivos en el momento de la inoculación. Los resultados avalan una reducción de los valores de α_{BHI} (aprox. 10^{-4} - 10^{-6}) respecto al valor por defecto utilizado por el programa ($4,24 \times 10^{-2}$). Esto indica un valor más cercano a 0 y un λ_{BHI} mayor, así como un ligero nivel de estrés celular en el momento de la inoculación. Curiosamente, el descenso fue menos importante en los valores de $\alpha_{\text{LD10\%}}$ (de aprox. 10^{-3} - 10^{-4} a aprox. 10^{-2}).

Tabla 5. Valores de α obtenidos tras ajustar en CB los resultados de λ_{BHI} y $\lambda_{\text{LD10\%}}$ (Figuras 1B y 2B, respectivamente). Las cepas, nivel inicial del microorganismo, pH y parámetros de actividad del agua fueron fijados como se explica en el texto.

T ^a (°C)	Ensayos en BHI		Ensayos en LD10%	
	λ_{BHI}	CB α_{BHI}	$\lambda_{\text{LD10\%}}$	CB $\alpha_{\text{LD10\%}}$
15	23,25	$1,01 \times 10^{-5}$	-	-
20	10,31	$3,73 \times 10^{-6}$	-	-
25	4,23	$1,37 \times 10^{-5}$	2,17	$3,71 \times 10^{-4}$
30	2,89	$8,29 \times 10^{-6}$	3,68	$8,25 \times 10^{-4}$
35	2,53	$6,14 \times 10^{-6}$	2,12	$2,03 \times 10^{-3}$
40	1,41	$2,03 \times 10^{-4}$	1,79	$3,35 \times 10^{-3}$
45 ^a	1,87	$9,14 \times 10^{-5}$	3,63	$6,76 \times 10^{-4}$

^a 45°C no está incluido en CB, por lo que se elige 42°C.

3.5. DISCUSIÓN

Las conclusiones sobre la variabilidad son diversas dependiendo de las condiciones, cepas y especies usadas en los diferentes estudios. Algunos autores han analizado las diferencias entre cepas sin emplear el CV y han obtenido diferentes resultados: Duh y Schaffner ⁽⁶⁹⁾ y Begot *et al.* ⁽⁷⁰⁾ compararon los parámetros de crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*. Dengremont y Membre ⁽⁷¹⁾ estudiaron las tasas de crecimiento de cinco cepas de *Staphylococcus aureus* en diferentes combinaciones de temperatura, pH y concentración de NaCl. Coleman *et al.* ⁽⁷²⁾, Wenz *et al.* ⁽⁷³⁾ y Baker *et al.* ⁽⁷⁴⁾ estudiaron las diferencias entre cepas de *Escherichia coli* O157:H7 procedentes de carne, ganado y asociadas a enfermedades humanas; encontrando diferencias en su virulencia. Estos autores demostraron la necesidad de elaborar modelos de crecimiento específicos para medios y productos alimenticios con el objetivo de su extrapolación a los modelos de evaluación de riesgo.

Comparar el CV de los parámetros de crecimiento de una cepa y de una serie de cepas es una aproximación que permite evaluar la importancia de la oscilación entre ellas con la finalidad de estimar los parámetros en modelos predictivos ⁽⁴²⁾. Varios autores han empleado el CV para estudiar la variabilidad en diferentes microorganismos. Oscar ⁽⁴²⁾ comunicó que el CV de los parámetros de crecimiento era similar en las cepas individuales de *Salmonella* que crecían en hamburguesas de pollo estériles a 25°C (9,4% para el tiempo de latencia y 5,7% para la tasa de crecimiento específica). Sus resultados muestran leves diferencias en los parámetros de crecimiento entre dichas cepas, al igual que lo encontrado en el presente estudio. Este autor concluyó que los valores de la cinética de crecimiento obtenidos con

una cepa de *Salmonella* podrían ser útiles para predecir el crecimiento de otras cepas del mismo género sobre las que no existan datos. Las mediciones en las cepas individuales arrojaron como resultado un CV medio de 11,7% para el tiempo de latencia y de 6,7% para la tasa de crecimiento específica. Whiting y Golden ⁽⁴¹⁾ encontraron que el CV de los parámetros de crecimiento estimados en 17 cepas de la misma bacteria era mayor que el obtenido de una única cepa. Los valores medios del CV de todas las cepas fueron 0,16 para la velocidad de crecimiento exponencial y 0,38 para el tiempo de latencia. De Jesus y Whiting ⁽⁴³⁾ publicaron un amplio estudio sobre linajes y variaciones entre cepas de los tiempos de latencia y velocidades de crecimiento de tres linajes genotípicos diferentes de *L. monocytogenes*. Se observaron diferencias significativas entre ellos, además de una amplia variación entre las cepas en todos los parámetros evaluados. La media del CV de los parámetros de crecimientos estudiados fue 0,18; similar a la obtenida en nuestro estudio en los ensayos con BHI. Lindqvist ⁽⁴⁴⁾ usó los tiempos de detección para estudiar la variabilidad en *S. aureus*, encontrando un CV de aprox. 0,45 en la tasa de crecimiento exponencial y de 16,7 en el tiempo de latencia. Estos resultados fueron mayores que los obtenidos en el presente trabajo.

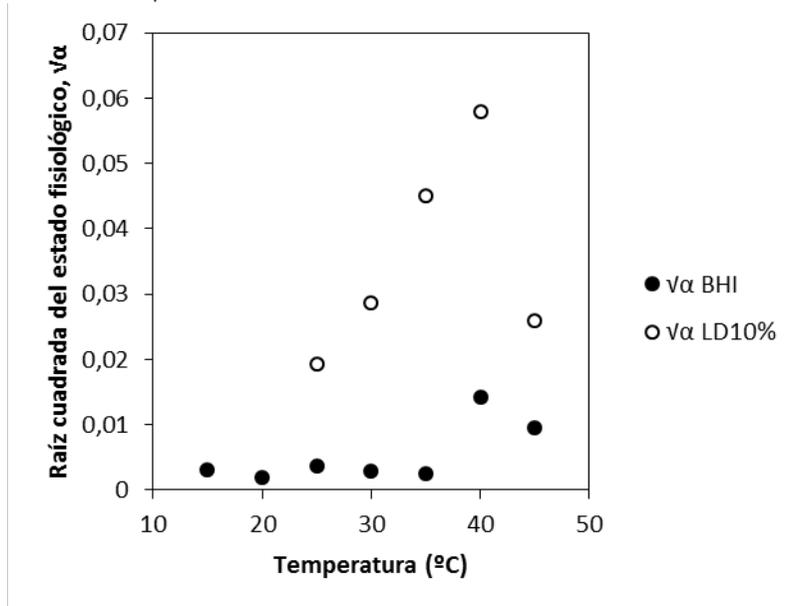
El parámetro de estado fisiológico ha sido descrito como un cuantificador de la idoneidad del cultivo al medio actual. Asimismo, también se ha definido como la fracción potencial de la población inicial que puede alcanzar la curva de crecimiento sin latencia ⁽⁶⁵⁾. Es interesante tener en cuenta los pequeños valores de α obtenidos en BHI y LD10%. Estos fueron más cercanos al 0 que al valor empleado por defecto por el ComBase, lo cual representa tiempos de latencia mayores. El teorema del estado fisiológico alega que el valor α del inóculo es igual a la media aritmética de los estados fisiológicos de las células individuales. Este teorema es válido

independientemente de la distribución de los tiempos de latencia⁽⁶⁵⁾, por lo que las condiciones ambientales son más importantes en el crecimiento celular. En el presente trabajo los valores de α fueron diferentes entre temperaturas, lo cual indica diferencias en el nivel de estrés de las células en el momento de la inoculación. Aunque el estado fisiológico de la población inicial es importante, las células se ven inmediatamente afectadas por la temperatura y las condiciones del medio en las que son inoculadas. Esto significa que el efecto del medio y de las condiciones ambientales (i) podría ser más influyente en el estado fisiológico de las células que las condiciones previas y (ii) podría añadirse e incrementar el efecto de las condiciones previas a la inoculación. Para disminuir la variación de los valores del estado fisiológico se calculó la raíz cuadrada ($\sqrt{\alpha}$) (Figura 3). Los valores de $\sqrt{\alpha}$ fueron similares desde los 10°C (0,0032) hasta los 35°C (0,0025) en cultivos de BHI, aumentando ligeramente a 40°C (0,0143). Curiosamente, los resultados de los cultivos en LD10% aumentaron desde 25°C (0,0193) hasta 40°C (0,0579). En ambos medios, los valores de $\sqrt{\alpha}$ disminuyeron desde 40 hasta 45°C. Se puede concluir que el medio y las condiciones del cultivo afectan fuertemente al estado fisiológico de las células, pudiendo este hecho añadirse a la historia celular previa.

Los valores α estimados para $\lambda_{LD10\%}$ son mayores que los de λ_{BHI} , debido posiblemente a las características de la leche desnatada. Los valores más bajos de α podrían indicar un periodo de latencia más amplio. Hasta nuestro conocimiento no ha sido anteriormente publicada la variación de α a lo largo de una serie de temperaturas y cepas, por lo que dicho aspecto no pudo ser contrastado con la bibliografía. Lindqvist⁽⁴⁴⁾ estudió la variabilidad de α en 17 cepas de *E. coli* a una única temperatura de 17°C y encontró mayores valores del parámetro que los obtenidos en nuestro trabajo (0,01-0,92). Por otro lado, Baranyi y Pin⁽⁶⁵⁾ desarrollaron un método basado en el

teorema del estado fisiológico para estimar la tasa máxima de crecimiento específico y el tiempo de latencia de poblaciones bacterianas homogéneas. En el presente el estado fisiológico celular se calculó mediante los tiempos de latencia estimados desde los TD previamente calculados.

Figura 3. Raíz cuadrada de los valores de α obtenidos mediante el uso de los valores de λ estimados previamente en BHI o LD10%



Los microbiólogos predictivos consideran que los ensayos llevados a cabo en caldo de cultivo son estudios conservadores “a prueba de fallos” que permiten estimar el crecimiento bacteriano ante las condiciones alimentarias más comunes^(75; 72). Coleman *et al.*⁽⁷²⁾ indicaron que la presencia de bajas densidades iniciales en alimentos como la carne picada y la agitación eran dos situaciones típicas que en los estudios podían dar lugar a sesgos. Nuestro estudio ha tenido en cuenta la variación entre cepas, temperatura de incubación, estado fisiológico celular en el momento de la inoculación y el uso de un modelo de alimento. De tal manera, se han observado diferencias entre los ensayos realizados en medio LD10% y BHI. A pesar de lo declarado en los estudios anteriores, los resultados en BHI no mostraron diferencias

entre temperaturas y cepas que confirmen dicha sobrestimación⁽⁷⁶⁾. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en LD10%.

La variabilidad entre cepas cepas ha sido estudiada por alguno de los autores anteriormente citados. En el presente estudio no se observó variabilidad significativa entre las cepas O157:H7, O26:H11 respecto de la no-O157:H7, ni entre las patógenas y no patógenas. Se ha demostrado la necesidad del contacto célula-célula en la realización de algunas interacciones bacterianas dentro de una población. Dubey y Ben-Yehuda⁽⁷⁷⁾ observaron como las bacterias Gram positivas o Gram negativas intercambiaban moléculas citoplasmáticas o formaban nanotubos intercelulares tras 30-50 min a 37°C. Pese a que no ser el objetivo de la investigación, se podría suponer la existencia de conexiones directas entre las bacterias individuales en el presente trabajo, originando interacciones y variaciones. Numerosas bacterias Gram negativas intercambian información a través de las vesículas de la matriz extracelular para la entrega de moléculas de quorum sensing, ADN, etc. La interacción física entre bacterias mediante la formación de nanotubos facilitaría el transporte de las mismas para la posterior sincronización de los metabolismos individuales, reduciendo la variabilidad individual. Los resultados recientemente reportados por Labhsetwar *et al.*⁽⁷⁸⁾ en células isogénicas de *E. coli* sobre el efecto del ruido en la expresión génica del crecimiento y uso de vías metabólicas mostraron que la expresión del gen puede dar lugar a diferencias fenotípicas entre las células incluso en poblaciones isogénicas que crecen en condiciones macroscópicamente idénticas. El CV de las tasas de crecimiento fue bajo (0,30), por lo que los cambios en el metabolismo de las células individuales no cambian el aspecto macroscópico de las colonias ni aumentan el CV entre las tasas de crecimiento de las especies.

CAPÍTULO

**COMPORTAMIENTO DE *CRONOBACTER*
SAKAZAKII CECT 858 A TEMPERATURAS
Y MANIPULACIONES
FRECUENTES A NIVEL DOMÉSTICO**



4.

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. *CRONOBACTER SAKAZAKII*

Cronobacter sakazakii es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. El microorganismo fue originariamente conocido como *Enterobacter cloacae* pigmentada de amarillo, pasando en 1980 a denominarse *Enterobacter sakazakii* en base a las diferencias bioquímicas con *E. cloacae* encontradas por Farmer *et al.* ⁽⁷⁹⁾ ⁽⁸⁰⁾. Recientes investigaciones basadas en el uso de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados, ensayos fenotípicos, ribotipificación automatizada, secuenciación del gen 16S e hibridación ADN-ADN descubrieron nuevas evidencias capaces de sustentar un nuevo cambio en la nomenclatura del género, denominándose en 2008 *Cronobacter sakazakii*⁽⁸¹⁾.

4.1.1.1. INFECCIONES CAUSADAS POR *C. SAKAZAKII*

Urmenyi y Franklin ⁽⁸²⁾ informaron de los dos primeros casos conocidos de meningitis neonatal originada por *C. sakazakii*, denominado en aquel momento *E. cloacae* pigmentada de amarillo. Desde entonces el microorganismo ha sido aislado de localizaciones clínicas como líquido cefalorraquídeo, sangre, esputo, tracto respiratorio alto y bajo, tracto digestivo, heridas superficiales y orina⁽⁸³⁾.

La frecuencia de la enfermedad en recién nacidos parece ser baja. Una revisión de casos producidos en niños entre 1961 y 2003 reveló 48 casos de enfermedad causados por la bacteria. El estudio U.S. FoodNet 2002

declaró una tasa de infección invasiva originada por el organismo de 1 por cada 100.000 niños menores de un año y de 8,7 por cada 100.000 recién nacidos de bajo peso⁽⁸⁴⁾.

Las infecciones por *C. sakazakii* son una importante causa de meningitis, septicemia y enterocolitis necrotizante en bebés⁽⁸⁵⁾; pudiendo derivar la primera a ventriculitis, absceso e infarto cerebral, formación quística y desarrollo de hidrocefalia⁽⁸⁰⁾. Los recién nacidos prematuros, con bajo peso al nacer o aquellos con menos de 28 días de vida son el sector de la población con más riesgo. La tasa de mortalidad en las infecciones neonatales es superior al 50%, en cuyo caso la mitad de los fallecimientos se producen en la primera semana tras el diagnóstico. Asimismo, el 94% de los supervivientes desarrollan secuelas neurológicas irreversibles^(83; 86).

La infección en adultos es poco frecuente. Los pacientes infectados presentaron enfermedades subyacentes graves en todos los casos notificados. En esta franja de la población los aislamientos de la bacteria se produjeron en personas con bacteremia y osteomielitis. Sin embargo, no se presentó ningún caso de meningitis ni de compromiso de la vida del paciente^(87; 80; 85; 88; 86).

4.1.1.2. ECOLOGÍA

El hábitat natural de *C. sakazakii* es desconocido hasta el momento. El organismo no ha sido localizado en muestras de aguas superficiales, ganado, ni leche cruda de vaca⁽⁸⁹⁾. Sin embargo, un informe clínico redactado por Ongradi⁽⁸⁸⁾ sugirió la capacidad de este organismo de sobrevivir en aguas superficiales calientes.

Un primer indicio sobre el posible reservorio medioambiental de la bacteria fue proporcionado mediante la emisión de informes en los que se

comunicaba el aislamiento de *C. sakazakii* en el intestino de insectos como la mosca de la fruta mexicana *Anastrepha ludens*⁽⁹⁰⁾ y la mosca de los establos *Stomoxys calcitrans*⁽⁹¹⁾. Esta última se alimenta de la sangre de animales homeotermos y reptiles, y ha sido localizada en el hábitat de vacas, cerdos y caballos. *S. calcitrans* tiene una distribución mundial, correlacionándose con la variada localización de las infecciones por *C. sakazakii*. Como se observa, la contaminación ambiental por insectos juega un papel muy importante en la propagación de este organismo.

La presencia de *C. sakazakii* ha sido estudiada en hogares y ambientes de producción de leche en polvo, chocolate, cereal, patata y pasta mediante métodos de cultivo adaptado y ribotipificación. La bacteria ha sido aislada, con una frecuencia variable, en cadenas de producción alimentaria y bolsas de aspiradoras domésticas^(92; 93; 83).

4.1.1.3. PRESENCIA EN LOS ALIMENTOS Y MODO DE TRANSMISIÓN

Las fuentes y vehículos de transmisión de *C. sakazakii* son una incógnita a día de hoy. A pesar de que el organismo ha sido identificado en numerosos alimentos como queso, carne, verduras, granos, hierbas, especias y leche UHT⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾; sólo la leche maternizada ha mostrado una fuerte asociación. Muytjens *et al.*⁽⁹⁷⁾ identificaron miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en el 52,2% de 141 botes de leche maternizada procedentes de 35 países. *C. sakazakii* fue el tercer microorganismo más aislado con unos niveles de contaminación de entre 0,36 y 0,66 ufc/100 g.

La contaminación de estos productos con *C. sakazakii* puede producirse tanto a nivel intrínseco como extrínseco al ocurrir durante el proceso de manufacturación o mediante el empleo de utensilios contaminados en la reconstitución del producto⁽⁹⁸⁾. Asimismo, el

microorganismo posee capacidad de adhesión a superficies plásticas o siliconadas mediante la formación de biofilms. De tal manera, utensilios como los biberones o los equipos de alimentación enteral pueden albergar la bacteria en grandes cantidades⁽⁹⁹⁾.

4.1.1.4. PATOGÉNESIS Y FACTORES DE VIRULENCIA

C. sakazakii puede adherirse a las células intestinales y sobrevivir en macrófagos⁽¹⁰⁰⁾. Las adhesinas bacterianas específicas y los receptores celulares del hospedador involucrados en este proceso son desconocidos actualmente. Algunas cepas de *C. sakazakii* producen material capsular, cuya contribución a la evasión macrófaga no ha sido tampoco identificada⁽¹⁰¹⁾. Dicha cápsula podría aportar protección al microorganismo y facilitar su supervivencia en ambientes desecados⁽⁸⁶⁾.

Hasta ahora no hay evidencia epidemiológica que apoye la dosis infectiva mínima. Pagotto *et al.*⁽¹⁰⁰⁾ determinaron la dosis letal mínima de 18 cepas en ratones. Afirmaron que en neonatos esta dosis podría requerir unos valores celulares inusualmente altos, pero alcanzables cuando la LMR es expuesta a temperaturas inapropiadas durante un margen amplio de tiempo.

Hasta nuestro conocimiento, el microorganismo puede crecer desde 6 hasta 45°C, incluso algunas cepas a 47°C⁽¹⁰²⁾. Los procedimientos estándar de pasteurización pueden provocar una reducción de aprox. 21-log en las células viables del organismo. Por consiguiente, es posible que la contaminación de los productos se produzca tras el tratamiento térmico mediante el uso de equipos y/o aditivos no estériles, asumiendo que la bacteria sea capaz de sobrevivir en los ambientes secos de las fábricas⁽¹⁰³⁾.

4.2. OBJETIVOS

Objetivo 1. Conocer el comportamiento de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 en caldo de soja triptona (TSB) y LMR a distintas temperaturas (refrigeración, ambiente y congelación) y manipulaciones (calentamiento y descongelación con microondas) llevadas a cabo frecuentemente a nivel doméstico.

Objetivo 2. Modelar los valores medios y desviaciones estándar de las poblaciones obtenidas.

Objetivo 3. Aplicar modelos matemáticos para estimar las poblaciones iniciales y finales ajustadas, velocidad máxima (V_{max}), periodo de latencia, coeficiente de determinación (R^2), T_g y tiempo de destrucción decimal (D) de las curvas de crecimiento, según precise.

4.3. MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1. CEPAS UTILIZADAS, RECONSTITUCIÓN Y CULTIVO

Se empleó la cepa *Cronobacter sakazakii* CECT 858. Tras su reconstitución en caldo triptona de soja (TSB, Difco) se inoculó 1 ml del cultivo reconstituido en tubos con 10 ml de TSB y se incubó a 37°C durante 18-24 h. Las poblaciones se comprobaron tras el tiempo citado a la temperatura indicada, siendo de aprox. 10^9 ufc/ml. El procedimiento se repitió tres veces consecutivas para conseguir una correcta activación del sistema metabólico bacteriano.

4.3.2. PREPARACIÓN DE INÓCULOS

Se inocularon alícuotas de 0,5 ml procedentes de un cultivo de población 10^9 ufc/ml en botellas con 500 ml de TSB. De esta forma, se consiguieron concentraciones del microorganismo de aprox. 10^6 ufc/ml. Asimismo, 0,5 ml de los cultivos de 10^6 ufc/ml se transfirieron de nuevo a botellas con 500 ml de TSB, alcanzándose poblaciones finales de aprox. 10^3 ufc/ml. Finalmente, se inocularon alícuotas de 10 ml procedentes del cultivo con 10^3 ufc/ml en 32 tubos estériles. De igual manera, se inocularon 10 ml de cultivo de población 10^6 ufc/ml en 16 tubos, así como 100 ml del mismo cultivo en 7 botellas.

Se repitió el proceso con leche maternizada reconstituida (LMR; Nativa 1, Nestlé) esterilizada previamente a su uso.

4.3.3. ESTUDIOS DE CRECIMIENTO

El estudio emuló situaciones domésticas cotidianas de mantenimiento y manipulación de biberones para lactantes con la finalidad de conocer el comportamiento de *C. sakazakii* CECT 858. Los tiempos de muestreo excedieron ampliamente las prácticas normales de manipulación doméstica con el fin de conocer el comportamiento posterior del microorganismo bajo tales condiciones:

i) Ensayo a temperatura de refrigeración: Se introdujeron 16 tubos con cultivos de población 10^3 ufc/ml a 4°C durante 60 h. Se llevaron a cabo 4 muestreos al día, cada 4 h, mediante la extracción de 0,1 ml de uno de los tubos para su posterior dilución y siembra.

ii) Ensayo a temperatura ambiente: Se mantuvieron 16 tubos con poblaciones iniciales de 10^3 ufc/ml a temperatura ambiente durante 60 h. Se llevaron a cabo 4 muestreos al día, cada 4 h, mediante la selección de uno de los tubos y extracción de 0,1 ml de él para su posterior dilución y siembra. Paralelamente a cada muestreo se anotó la temperatura ambiental.

iii) Ensayo a temperatura de congelación: Se introdujeron 16 tubos con poblaciones de 10^6 ufc/ml a -20°C durante 60 h. Se realizaron 4 muestreos al día, cada 4 h, previo calentamiento de uno de los tubos al baño maría hasta alcanzar 37°C. Seguidamente, se extrajeron 0,1 ml del cultivo para su dilución y siembra.

iv) Estudio del efecto de las microondas sobre la concentración bacteriana: Una botella con 100 ml de población 10^6 ufc/ml fue seleccionada como control. Se extrajeron de la misma 0,1 ml para su dilución y siembra. Seguidamente se dieron dos situaciones:

- Tres botellas con 100 ml de cultivo 10^6 ufc/ml se introdujeron al microondas (Bluesky bmo20-4; potencia 800w; frecuencia 2450 MHz) hasta alcanzar su contenido 37°C . De cada botella se extrajeron alícuotas de 0,1 ml para su dilución y siembra.

- Tres botellas con 100 ml de cultivo 10^6 ufc/ml se sometieron a -20°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo fueron introducidas en el microondas hasta alcanzar su contenido 37°C . De cada botella se extrajeron alícuotas de 0,1 ml para su dilución y siembra.

Las placas sembradas se incubaron a 37°C durante 24 h, procediéndose a su conteo una vez transcurrido el tiempo. Todo el proceso se realizó por triplicado en TSB y LMR.

4.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

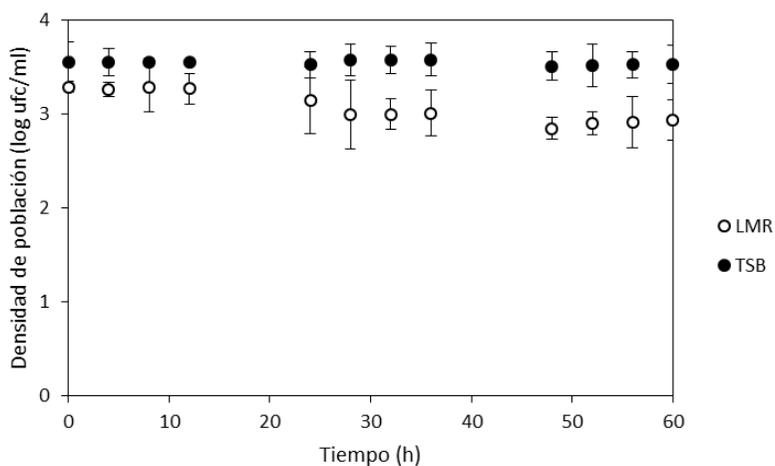
Se introdujeron los datos obtenidos del conteo de colonias en el programa Excel. Se calculó la media y DS de los resultados de los ensayos realizados por triplicado para el posterior modelado de curvas. En el ensayo a temperatura ambiente se estimó el T_g , así como los valores ajustados de las poblaciones iniciales y finales, V_{max} y R^2 ; con sus correspondientes DS mediante el modelo dinámico de ajuste (DMFit) de Baranyi y Roberts⁽⁶³⁾. El valor del tiempo de destrucción fue estimado para el ensayo a temperatura de congelación.

4.4. RESULTADOS

Los resultados de los estudios de comportamiento de *C. sakazakii* a distintas temperaturas y manipulaciones se muestran en las Figuras 4-8. En ellas se recogen las medias y desviaciones estándar de los datos triplicados de cada ensayo y se comparan los resultados en TSB y LMR.

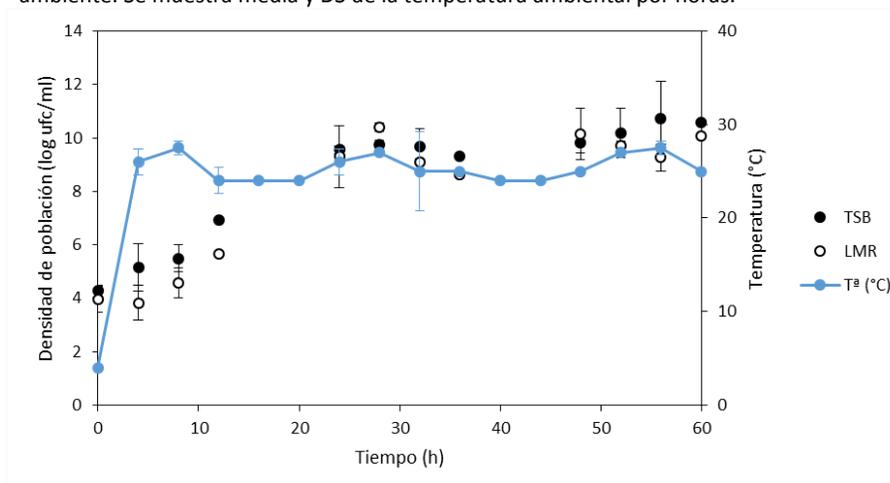
La Figura 4 muestra los datos respectivos al estudio del crecimiento bacteriano a 4°C en TSB y LMR. Como se observa, ambos cultivos mantienen una población constante a lo largo del periodo de estudio. El cultivo en TSB partió de una población media inicial de 3,56 log ufc/ml, alcanzó a las 36 h su población máxima con 3,58 log ufc/ml y terminó el estudio con una población final de 3,53 log ufc/ml. Por su parte, el cultivo en leche maternizada comenzó con 3,28 log ufc/ml, con un máximo a las 8 h de 3,29 log ufc/ml y una población final de 2,93 log ufc/ml. Las DS abarcaron 0,11-0,22 log ufc/ml y 0,04-0,36 log ufc/ml en TSB y LMR, respectivamente.

Figura 4. Media y DS de la población por horas de los cultivos en TSB y LMR a 4°C.



La Figura 5 recoge los resultados del comportamiento del microorganismo a temperatura ambiente. El cultivo en TSB partió de una población de 4,27 log ufc/ml, alcanzando su máximo a las 28 h con 9,76 log ufc/ml. Por su parte, el cultivo en leche partió de 3,97 log ufc/ml, logrando su población máxima a las 28 h con 10,39 log ufc/ml. Las DS comprendieron respectivamente 0,13-1,42 y 0,14-1,14 log ufc/ml. La temperatura ambiental osciló entre 24 y 27,5°C, con una media de 24°C dado que el ensayo se realizó en los meses de primavera. La inclusión de los datos en DMFit⁽⁶³⁾ aportó en TSB unas poblaciones iniciales y finales ajustadas de 4,36 (DS 0,287) y 9,831 (DS 0,376) log ufc/ml, respectivamente. La velocidad máxima de crecimiento para este medio fue de 0,266 (DS 0,0529) log ufc/ml/h y el valor de R² de 0,984 (DS 0,376) log ufc/ml. En LMR la población inicial y final ajustada fue de 3,837 (DS 0,134) y 10,47 (DS 0,125) log ufc/ml, respectivamente. Asimismo se obtuvo una velocidad máxima de 0,32 (DS 0,0204) log ufc/ml/h y un valor de R² de 0,997 (DS 0,165) log ufc/ml. Por último, el cálculo del tiempo de generación arrojó unos valores de 93 min en TSB y 76,7 min en leche.

Figura 5. Media y DS de la población por horas de los cultivos en TSB y LMR a temperatura ambiente. Se muestra media y DS de la temperatura ambiental por horas.



La Figura 6 muestra los datos obtenidos del estudio del comportamiento bacteriano a -20°C . Los cultivos en medio TSB y LMR partieron de una población inicial de 6,10 y 6,61 log ufc/ml, alcanzando a las 60 h una población final de 3,88 y 5,40 log ufc/ml, respectivamente. Las DS abarcaron los rangos de 0,29-2,19 log ufc/ml en TSB y 0,14-1,13 log ufc/ml en LMR. El tiempo de reducción decimal fue de 27,02 h en TSB y de 49,75 h en leche.

Las Figuras 7 y 8 recogen las medias de los resultados obtenidos del estudio del efecto de las microondas sobre las concentraciones de cultivos de *C. sakazakii* en TSB y LMR. Los resultados fueron comparados respecto a un ensayo control. La Figura 7 recoge los resultados del ensayo en TSB, siendo la población del control 6,33 log ufc/ml (DS 0,2), la del cultivo calentado 5,71 (DS 0,33) log ufc/ml y la del cultivo descongelado 5,53 (DS 0,51) log ufc/ml. La Figura 8 muestra los datos del experimento paralelo llevado a cabo en LMR, presentando control, ensayo calentado y descongelado unas poblaciones de 6,36 (0,35), 5,63 (DS 0,55) y 6,88 (DS 0,43) log ufc/ml, respectivamente (DS no mostradas).

Figura 6. Media y DS de la población por horas de los cultivos en TSB y LMR a -20°C .

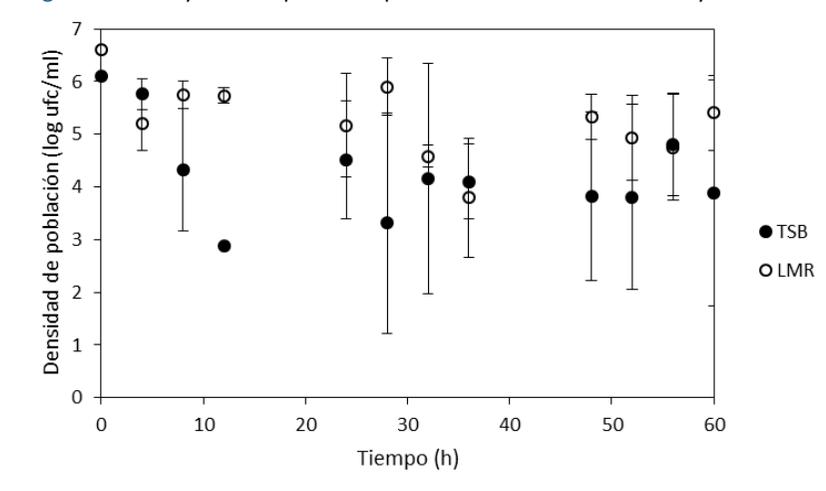


Figura 7. Comparación de las medias de los cultivos en TSB sometidos a calentamiento y descongelación por microondas respecto de un control

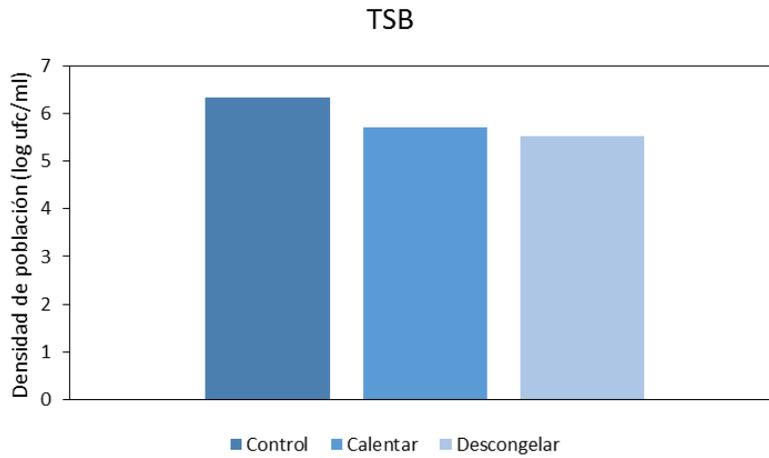
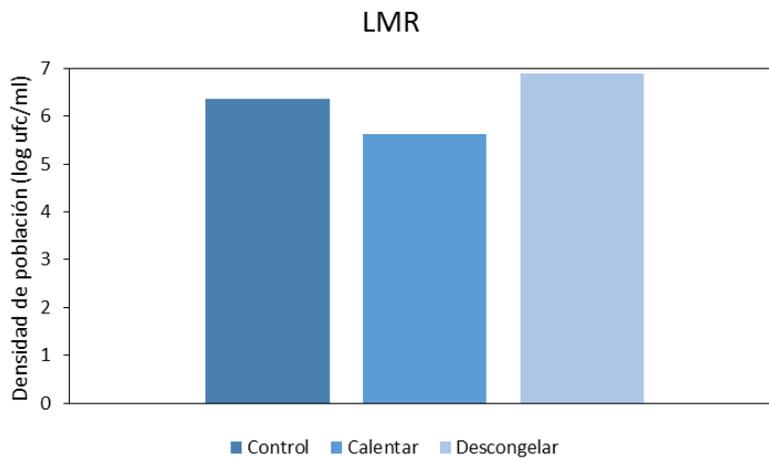


Figura 8. Comparación de las medias de los cultivos en LMR sometidos a calentamiento y descongelación por microondas respecto de un control



4.5. DISCUSIÓN

Cronobacter sakazakii ha sido relacionado con graves casos de meningitis en neonatos, cuya vía de entrada en el consumidor es la leche maternizada⁽¹⁰⁴⁾. Cuando la bacteria está presente en este producto puede crecer durante su reconstitución, calentamiento, almacenamiento y alimentación del recién nacido; lo cual incrementa la probabilidad de infección. Comprender el comportamiento del microorganismo a temperatura ambiente o subambiente es necesario para predecir posibles dosis ingeridas por el consumidor⁽¹⁰³⁾. El presente trabajo tiene por objeto el estudio de la conducta del microorganismo ante situaciones domésticas frecuentes de almacenamiento y manipulación de LMR con el fin de satisfacer tales necesidades.

El análisis del comportamiento de la bacteria a 4°C durante 60 h se llevó a cabo con la finalidad de conocer el comportamiento del microorganismo a temperatura de refrigeración. Durante el periodo de estudio *C. sakazakii* mantuvo una población estable dentro del ciclo logarítmico correspondiente al inóculo inicial (aproximadamente 10^3 log ufc/ml), con una ligera reducción a partir de las 24 h en LMR y de las 48 h en TSB. Hasta nuestro conocimiento las temperaturas mínimas publicadas que permitieron el crecimiento del microorganismo fueron 5,5°C⁽¹⁰⁴⁾ y 6°C⁽¹⁰³⁾. Nazarowec-White y Farber⁽¹⁰⁴⁾ estudiaron la temperatura mínima de crecimiento en BHI de 10 cepas de *C. sakazakii* clínicas y aisladas de alimentos, las cuales oscilaron entre 5,5 y 8°C. Su ensayo a 4°C mostró una concentración constante a la inicial de inoculación ($1,1 \times 10^3$ ufc/ml) durante el tiempo de estudio (20 días) o incluso disminuyó progresivamente. Farmer *et al.*⁽⁷⁹⁾ indicaron ausencia de crecimiento a 4°C en las 57 cepas estudiadas.

Nuestros resultados concuerdan con los notificados en dichas referencias al corroborar la ausencia de crecimiento del microorganismo a la temperatura de refrigeración de 4°C. Sin embargo, dicho crecimiento sí es posible en temperaturas de refrigeración abusivas, con un tiempo de duplicación de aprox. 13 h⁽¹⁰⁴⁾. Se confirma por tanto la importancia de llevar a cabo un almacenamiento de la leche reconstituida a temperaturas de refrigeración apropiadas con el fin de garantizar la ausencia de crecimiento bacteriano. Rhodehamel⁽¹⁰⁵⁾ descubrió que la temperatura de muchos frigoríficos de uso doméstico oscilaba entre 7 y 10°C. Asimismo, Harris⁽¹⁰⁶⁾ declaró que el 20% de los frigoríficos domésticos encuestados presentaban temperaturas entre 5 y 10°C, pero en ningún caso se superaba esta última. En contraste, Van Garde y Woodburn⁽¹⁰⁷⁾ encontraron que la temperatura en el 21% de los frigoríficos domésticos examinados era igual o superior a 10°C. Por último, Daniels⁽¹⁰⁸⁾ manifestó que 1 de cada 10 frigoríficos de uso doméstico presentaba más de 7,2°C y al menos 1 de cada 10 más de 10°C. Estas condiciones permitirían el crecimiento de la bacteria⁽¹⁰⁴⁾.

Se llevó a cabo el estudio microbiológico a temperatura ambiental. De esta manera se pudo conocer el comportamiento bacteriano ante situaciones de mantenimiento prolongado de LMR a dicha temperatura, como en el almacenamiento de biberones en la mesilla de noche para las tomas nocturnas o su transporte en largos viajes. La temperatura media ambiental fue de 24°C, dado que se efectuó en los meses de primavera. Bajo estas condiciones, *C. sakazakii* presentó una elevada capacidad de crecimiento al alcanzar su población máxima a las 28 h de estudio y un tiempo de duplicación de 93 min en TSB y 76,7 min en leche. Iversen *et al.*⁽¹⁰³⁾ declararon un promedio de tiempo de duplicación en LMR a 21°C de 102 min, mientras que para Iversen *et al.*⁽¹⁰⁹⁾ e Iversen y Forsythe⁽⁹⁶⁾ fue de 75 min bajo las mismas condiciones que en el ensayo anterior. Nazarowec-

White y Farber⁽¹⁰⁴⁾ encontraron un tiempo medio de generación de 40 min a 23°C en LMR. Nuestros resultados en leche corroboran lo expuesto por Iversen *et al.*⁽¹⁰⁹⁾ e Iversen y Forsythe⁽⁹⁶⁾; sin embargo, se alejan de lo indicado por el resto de autores citados. Las diferencias podrían deberse tanto a la variedad de cepas utilizadas en los diferentes estudios como a la oscilación térmica presentada en nuestro trabajo (entre 24 y 27,5°C). Nazarowec-White y Farber⁽¹⁰⁴⁾ obtuvieron un tiempo de latencia a 23°C entre 1,76 y 3,40 h para las cepas estudiadas. A pesar de que en nuestro estudio se observa un comienzo del crecimiento que correspondería con la fase de latencia, no resulta del todo evidente al no ser objeto del ensayo. Con la finalidad de determinar la velocidad máxima de crecimiento, se introdujeron en el programa DMFit⁽⁶³⁾ los datos correspondientes al periodo de estudio en el que se produjo dicha multiplicación (0-28 h). De esta forma, se obtuvieron unos valores en TSB y LMR de 0,266 h⁻¹ y 0,32 h⁻¹, respectivamente. Iversen *et al.*⁽¹⁰³⁾ publicaron una velocidad de crecimiento de diversas cepas de *C. sakazakii* a 25°C en BHI de 0,96 h⁻¹, muy superior a la de nuestro estudio. Asimismo, mediante DMFit también se obtuvieron unos valores de R² de 0,984 en TSB y 0,997 en LMR, los cuales representan una bondad de ajuste excelente. Iversen *et al.*⁽¹⁰³⁾ informaron de que la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria se extiende entre 37 y 43°C. Es importante recalcar la facilidad con que la primera puede alcanzarse a temperatura ambiente en los meses verano, lo que resalta la importancia de un adecuado almacenamiento de la leche maternizada tras su reconstitución.

Las recomendaciones de preparación y almacenamiento de biberones emitidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) no indican ninguna advertencia respecto a su conservación a temperatura de congelación⁽¹¹⁰⁾, por lo que es muy probable que numerosos

hogares estén realizando la congelación de LMR como método de ahorro de tiempo. De tal manera, se planteó un ensayo que permitiese conocer el comportamiento del organismo a -20°C . En este caso, se observó una disminución en la concentración inicial del cultivo a lo largo del tiempo de estudio. La reducción se produjo de forma más pronunciada en TSB que en LMR, siendo la del primero de $-2,22$ log ufc/ml. Los tiempos de reducción decimal fueron de 27,02 h en TSB y de 49,75 h en leche. Sin embargo, en ambos casos se produjeron unas elevadas desviaciones estándar que alcanzaban valores de hasta 2,19 log ufc/ml. No se encontraron estudios que describiesen ensayos similares, por lo que el contraste con los datos de otros autores no ha sido posible. Una justificación a estos valores podría encontrarse en el elevado estrés al que *C. sakazakii* fue sometido tras su almacenamiento a -20°C , temperatura muy alejada de la ideal para su crecimiento.

Finalmente el estudio trató de conocer el efecto de las microondas sobre la concentración de *C. sakazakii* en dos situaciones llevadas a cabo de forma cotidiana en los domicilios: el calentamiento y la descongelación de productos. Las microondas son ondas electromagnéticas usadas habitualmente a una frecuencia de 2450 MHz. Originan calor por fricción debido a la interacción con moléculas polarizadas (dipolos) como agua, lípidos, aminoácidos o proteínas⁽¹¹¹⁾. En medicina se emplean para la descontaminación de residuos, esterilización de recipientes plásticos y desinfección de lentes de contacto y catéteres urinarios⁽¹¹²⁻¹¹⁵⁾. Kindle *et al.*⁽¹¹⁶⁾ estudiaron el efecto de microondas emitidas a una frecuencia de 2450 MHz sobre cultivos de 10^5 ufc/ml en LMR, calentándose hasta conseguir la ebullición del producto. En todas sus muestras la concentración bacteriana se vio significativamente disminuida tras la aplicación de microondas, con una tasa de destrucción dependiente de la leche empleada. En nuestro

estudio se aplicaron ondas mediante el empleo de un electrodoméstico de idénticas características al indicado por Kindle *et al.* ⁽¹¹⁶⁾. Sin embargo, nuestros resultados mostraron una leve reducción de la población en TSB y nula en LMR. La diferencia con respecto al estudio de Kindle *et al.* ⁽¹¹⁶⁾ podría deberse a la diferencia de temperatura alcanzada por los cultivos. En nuestro caso se buscó el calentamiento hasta 37°C al ser la temperatura máxima indicada para la alimentación del recién nacido, mientras que Kindle *et al.* ⁽¹¹⁶⁾ lo hicieron hasta 100°C. A pesar de lo obtenido en nuestros resultados, la actividad antimicrobiana de los microondas ha sido observada en varios estudios^(117; 118). Todos ellos han informado de una significativa reducción de los niveles bacterianos mediante su uso, constituyendo por tanto un método simple y económico de reducción de los niveles bacterianos en productos como LMR. Se desconoce el mecanismo exacto que produce la inactivación de los microorganismos por este procedimiento. Algunos autores lo atribuyen a la producción de calor⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾, mientras que otros postulan que se debe a un efecto letal atómico adicional de las microondas⁽¹¹⁶⁾.

Nazarowec-White y Farber ⁽¹⁰⁴⁾ observaron que *C. sakazakii* era una de las especies más termotolerantes en la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, su resistencia térmica no es suficiente para sobrevivir a procedimientos estándares de pasteurización. Todo ello sugiere que la contaminación de los productos ocurre durante el secado, reconstitución o adición de componentes. A pesar de que este microorganismo se presenta a bajos niveles en las leches maternizadas, la incidencia presentada en su estudio (6,7%) y en el de Muytjens *et al.* ⁽⁹⁷⁾ (52%), en combinación con el relativo corto periodo de latencia y tiempo de generación de la bacteria, podría ser motivo de preocupación. A pesar de que la dosis infectiva de este microorganismo es desconocida, es bastante improbable que bajo condiciones de refrigeración se multiplique hasta niveles suficientes como

para conseguir causar una infección⁽¹⁰³⁾. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en refrigeración el presente trabajo demuestra que la población del microorganismo consigue sobrevivir durante un período suficiente como para infectar al lactante. Los recién nacidos prematuros tienen un tracto gastrointestinal más permeable debido a un retraso en la alimentación y a la ausencia de microbiota intestinal natural, lo cual en recién nacidos a término es sabido que les protege contra la invasión de microorganismos patógenos⁽¹²²⁾. Igualmente, es posible que la baja acidez del estómago de los neonatos, especialmente en los prematuros, represente un factor adicional que contribuya a su supervivencia e infección^(123; 124). Los resultados obtenidos en el estudio demuestran la importancia del empleo de medidas asépticas y temperaturas apropiadas en la preparación, uso y almacenamiento de la leche en polvo para lactantes⁽¹⁰⁴⁾. El seguimiento de las directrices establecidas por FAO/WHO⁽¹¹⁰⁾ respecto a las preparaciones en polvo para lactantes garantiza la seguridad del consumidor. En ellas se especifica la necesidad de una correcta esterilización de todos los utensilios implicados en la preparación del producto, así como su reconstitución con agua a 70°C y el almacenamiento en el frigorífico por un periodo máximo de 24 h, no debiéndose almacenar a temperatura ambiente más de 2 h.

CAPÍTULO



**ALTERACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE
C. SAKAZAKII CECT 858 MEDIANTE
LA INOCUACIÓN DE SOBRENADANTES
LIBRES DE CÉLULAS Y RELACIÓN CON
EL QUORUM SENSING**

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. QUORUM SENSING (QS)

5.1.1.1. ORIGEN DEL QUORUM SENSING

Desde las afirmaciones de van Leeuwenhoek, hace 300 años, en las que estableció que el mundo está lleno de microorganismos, una de las ideas que prevalecían en Microbiología era la concepción de las bacterias como organismos asociales, cuya única actividad era dividirse para generar nuevas bacterias. Sin embargo, desde hace 60 años se ha documentado que, lejos de este comportamiento aislado, existe una conducta bacteriana en grupo. En su forma más simple, podríamos afirmar que el quorum sensing es un mecanismo de comunicación entre células mediante el cual las bacterias son capaces de saber cuántas son a través de la producción y detección de la acumulación de una molécula de señalización. Esta última sería secretada a su entorno permitiendo conocer el momento en el que deben «actuar» para desarrollar sus funciones de la forma más eficaz⁽¹²⁵⁾.

El concepto de la comunicación intercelular dentro de una población bacteriana se originó con los descubrimientos de Tomasz⁽¹²⁶⁾ acerca de la competencia genética en *Streptococcus pneumoniae* (entonces conocido como *Pneumococcus*) y Hastings⁽¹²⁷⁾ sobre la bioluminiscencia en *Vibrio*. La competencia es un estado fisiológico en el que las bacterias son capaces de llevar a cabo la transformación genética de sus moléculas de ADN. En 1965, Tomasz⁽¹²⁶⁾ informó de que la entrada en el estado competente se regía por un factor extracelular fabricado por el propio *Streptococcus*. Por lo tanto, el factor de competencia fue descrito como un “activador similar a las

hormonas” que sincroniza el comportamiento de la población bacteriana. En 1970, Hastings mostró como dos especies de bacterias marinas bioluminiscentes, *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*, producían luz a altas densidades celulares; no siendo así en suspensiones diluidas⁽¹²⁷⁾. Se pensó que la producción de luz podría estar estimulada por la adición exógena de fluidos de cultivos libres de células; siendo el componente responsable, denominado autoinductor, identificado más tarde como una acil-homoserina-lactona (AHL)⁽¹²⁸⁾. La combinación de los resultados de Tomasz y Hastings sugirieron que ciertas bacterias podrían usar la producción, liberación, intercambio y detección de moléculas con la finalidad de medir su densidad de población y controlar su comportamiento en respuesta a las variaciones en el número de células⁽¹²⁹⁾.

El término que se utilizó para nombrar este fenómeno, QS, fue citado por primera vez en una revisión publicada por Fuqua *et al.*⁽¹³⁰⁾ en la revista *Journal of Bacteriology* en el año 1994. El origen del nombre se debe al doctor Winans, un colaborador del grupo dirigido por Greenberg, quien explicó a su cuñado en una reunión familiar el tipo de trabajo de investigación que estaba realizando, ocurriéndosele a este que la expresión QS (darse cuenta de que se había alcanzado el número mínimo para algo) describía mejor el fenómeno que el término autoinducción^(131; 125).

Durante casi 20 años estos fenómenos de señalización célula-célula se consideraron ocurrencias anómalas restringidas a unas pocas bacterias especializadas. En la actualidad es sabido que la comunicación intercelular no es una excepción, sino más bien una norma en el mundo bacteriano con gran importancia microbiológica⁽¹²⁹⁾.

5.1.1.2. FUNCIONAMIENTO DEL QUORUM SENSING

Cuando la concentración bacteriana es reducida, el autoinductor se forma y se excreta en baja cantidad. Pero, a medida que aumenta el número de bacterias, estos autoinductores se van acumulando en el medio extracelular. De esta forma, una vez que se llega a un umbral en la concentración de la molécula (y, por lo tanto, a una concentración bacteriana específica) se induce la expresión de una serie de genes que genera un cambio coordinado en el comportamiento del grupo bacteriano. Con este concepto se pasa a aludir a las bacterias como «organismos multicelulares que modifican su comportamiento como una unidad única», de manera que el resultado de estas interconexiones hace que surjan efectos que no pueden explicarse a partir de una sola célula aislada^(132; 129; 125). Algunas de las actividades fisiológicas de los microorganismos reguladas por mecanismos de QS son la adquisición de nutrientes, conjugación, transformación, síntesis de los factores de virulencia, colonización, producción y resistencia a antibióticos, motilidad, esporulación, regulación del estado de bacteria viable pero no cultivable, formación de biofilms y modificación del estado inmunitario del hospedador⁽¹²⁵⁾.

Hay una serie de criterios que deben cumplir los autoinductores para que puedan ser considerados como señales de QS^(133; 125):

- La producción de la señal de QS debe llevarse a cabo durante etapas específicas de crecimiento, o en respuesta particular a cambios ambientales.
- La señal de QS debe poder acumularse en el ambiente extracelular y ser reconocida por las bacterias receptoras.
- La acumulación de la señal de QS por encima de un umbral crítico de concentración debe estimular una respuesta.

- La respuesta celular debe extenderse más allá de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o detoxificar la molécula.

Existen 3 tipos de autoinductores^(134; 125):

1. Autoinductores tipo 1 o acil-homoserina-lactonas (AHL): se encargan de la comunicación entre bacterias Gram negativas que pertenecen a la misma especie.
2. Oligopéptidos: se encargan de la comunicación entre bacterias Gram positivas que pertenecen a la misma especie.
3. Autoinductores tipo 2: moléculas producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas que se encargan de la comunicación entre bacterias pertenecientes a diferentes especies.

Las AHL son productos de sintetetas autoinductoras tipo LuxI. Estas pequeñas moléculas son detectadas por las proteínas citoplasmáticas afines LuxR que, al acoplarse con el autoinductor, se unen a la secuencia promotora llamada lux-box y de esta forma activan la transcripción de genes de QS⁽¹³⁵⁾. Las AHL producidas por las diferentes especies de microorganismos Gram negativos difieren en la longitud de la cadena acil y en la presencia de un grupo metileno, oxo o hidroxilo en la posición C-3⁽¹³⁶⁾. Los oligopéptidos son reconocidos por los receptores de la membrana. La transducción de la señal se produce por cascadas bioquímicas de fosforilación que finalmente interaccionan con los factores de transcripción del ADN activándose así la expresión de los genes de QS⁽¹³⁷⁾. Los autoinductores tipo 2 son productos derivados del metabolismo bacteriano y poseen estructura dihidroxipentandiona o DPD, por lo que este tipo de autoinductores también son conocidos mediante las siglas DPD^(138; 125).

5.2. OBJETIVOS

Objetivo 1. Obtener sobrenadantes libres de células a partir de cultivos de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 en TSB en distintos momentos de la fase de crecimiento (fase exponencial y fase estacionaria).

Objetivo 2. Estudiar el fenómeno del quorum sensing en el comportamiento de cultivos de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 tras la inoculación de sobrenadantes libre de células.

Objetivo 3. Contrastar los resultados de los cultivos con sobrenadantes libres de células respecto a un control, mediante el modelado de los valores medios y desviaciones estándar de las poblaciones de los cultivos a cada hora de ensayo.

Objetivo 4. Aplicar modelos matemáticos que estimen las poblaciones iniciales y finales ajustadas, velocidad máxima, periodo de latencia, R^2 y las correspondientes DS de cada curva de crecimiento.

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1. CEPAS UTILIZADAS, RECONSTITUCIÓN Y CULTIVO

Se ha utilizado la cepa *Cronobacter sakazakii* CECT 858. Tras la reconstitución del liofilizado en TSB, se transfirieron alícuotas (1 ml) del cultivo a tubos con 10 ml de TSB y se incubaron a 37°C durante 18-24 h. Las poblaciones se comprobaron en placas de Petri con TSA incubadas a 37°C durante 24 h, obteniéndose aprox. 10^9 ufc/ml. Se realizaron tres pases consecutivos con el fin de activar adecuadamente el sistema metabólico de las bacterias.

5.3.2. OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS

Para la realización del presente ensayo se necesitaron cuatro tipos de sobrenadantes libres de células cuyas características se muestran en la Tabla 6.

Se inocularon alícuotas de 0,1 ml de un cultivo de *C. sakazakii* de concentración 10^9 ufc/ml en tubos con 10 ml de TSB. Seguidamente se incubaron a 37°C durante 24 h para obtener S9 ó durante 4 h para obtener S3. Transcurrido el tiempo los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. El contenido de los tubos se pasó a través de un filtro de 0,22 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

Tabla 6. Clasificación de los sobrenadantes libres de células respecto a las características de los cultivos de origen de cada uno (tiempo de incubación, población y fase del crecimiento bacteriano).

Sobrenadante libre de células	Características de los cultivos de origen de los sobrenadantes		
	Tiempo de incubación	Población	Fase del ciclo del crecimiento bacteriano
S9	18-24 h	10 ⁹ ufc/ml	Fase estacionaria
S3	4 h	10 ³ ufc/ml	Fase exponencial
S9C	Obtenido tras concentrar S9		
S3C	Obtenido tras concentrar S3		

Los sobrenadantes S9C y S3C se consiguieron a partir de la concentración de 10 ml de los sobrenadantes S9 y S3, respectivamente; a 50°C, 30 rpm, 60 min y condiciones de vacío en el evaporador rotatorio (Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Germany). Finalmente, se reconstituyeron al 20% con TSB justo en el momento previo a su uso.

5.3.3. INFLUENCIA DE LOS SOBRENADANTES LIBRES DE CÉLULAS SOBRE LOS CULTIVOS

Se inocularon alícuotas de 0,1 ml de un cultivo de *C. sakazakii* de población 10⁹ ufc/ml en tubos con 10 ml de TSB. Se incubaron a 37°C durante 18-24 h, obteniéndose concentraciones de 10⁹ ufc/ml. Se preparó una batería de tubos destinados a la realización de diluciones con 0,9 ml de TSB cada uno. Estos se introdujeron a 37°C los 10 minutos previos a su manipulación, con el fin de evitar que se produjeran alteraciones en el crecimiento bacteriano por la inoculación de las colonias en un medio con una temperatura inferior a la óptima para su desarrollo.

Con la objetivo de estudiar el crecimiento completo de la bacteria, se realizaron 7 diluciones decimales seriadas del cultivo con 10^9 ufc/ml. De tal manera, se obtuvo una población final de 10^2 ufc/ml. Esta última se incubó a 37°C durante 1 h para alcanzar la 3ª generación. Posteriormente se combinaron 0,9 ml del cultivo de 10^2 ufc/ml con 0,1 ml de S9, obteniendo un volumen final de 1 ml. Debido a los resultados encontrados en el supuesto anterior se procedió a invertir los volúmenes de los inóculos en los ensayos posteriores. Para ello, se llevaron a cabo 6 diluciones decimales seriadas de los cultivos de concentración 10^9 ufc/ml, obteniéndose una concentración final de 10^3 ufc/ml. Se incubaron a 37°C durante 1 h para lograr la 3ª generación y seguidamente se procedió a mezclar:

- 0,1 ml de un cultivo de 10^3 más 0,9 ml de S9.
- 0,1 ml de un cultivo de 10^3 más 0,9 ml de S3.
- 0,1 ml de un cultivo de 10^3 más 0,9 ml de S9C.
- 0,1 ml de un cultivo de 10^3 más 0,9 ml de S3C.

En todos de los casos se consiguieron volúmenes finales de 1 ml y poblaciones de 10^2 ufc/ml.

Los cultivos con S9 y S3 se incubaron a 37°C durante 10 h y aquellos con S9C y S3C durante 15 h. Cada hora se extrajeron alícuotas de 0,1 ml de cada cultivo para su posterior dilución en placa de 96 pocillos y siembra en TSA, de acuerdo a Chen *et al.* ⁽¹³⁹⁾. Las placas sembradas se incubaron a 37°C durante 24 h, procediéndose a su contaje transcurrido el tiempo.

Cada ensayo se realizó por triplicado. Asimismo, se llevó a cabo paralelamente un estudio control sin la inoculación de sobrenadante.

5.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos tras el conteo de colonias de las placas se introdujeron manualmente en el programa Excel. Se calculó la media y desviación estándar de los valores obtenidos en cada ensayo por triplicado. Posteriormente, se procedió al modelado de curvas en las que se comparó cada ensayo con su estudio control correspondiente. La prueba T de Student (T-test) para dos muestras emparejadas fue empleada para comprobar si las diferencias entre curvas eran estadísticamente significativas. Para ello, se consideró significativo un valor de $P < 0,05$. Usando DMFit se calcularon los valores ajustados de las poblaciones iniciales y finales, velocidad máxima, periodo de latencia y R^2 , con sus correspondientes DS ⁽⁶³⁾.

5.4. RESULTADOS

Los resultados del crecimiento de *C. sakazakii* tras la inoculación de los sobrenadantes se muestra en las Figuras 9-13. En ellas se recogen las medias y desviaciones estándar de los resultados obtenidos en cada ensayo y se comparan con los mismos parámetros de la curva control elaborada paralelamente.

La Figura 9 recoge los datos procedentes del ensayo en el que se estudia el crecimiento durante 10 h de la combinación de 0,9 ml de un cultivo de 10^2 ufc/ml con 0,1 ml de S9. Como se muestra, ambas curvas de crecimiento evolucionaron aparentemente de forma similar. El cultivo con S9 comenzó con una población de 2,11 log ufc/ml y alcanzó su máximo con 9,3 log ufc/ml, con una DS de 0,14-0,44 log ufc/ml. Por su parte, el cultivo control inició el crecimiento con una población de 2,05 log ufc/ml y consiguió su máximo con 9 log ufc/ml, presentando un rango de DS entre 0,19 y 0,58 log ufc/ml. La realización del T-test confirmó que ambas curvas eran iguales estadísticamente. La Tabla 7 recoge los valores iniciales y finales ajustados, λ , V_{max} y R^2 , junto con sus correspondientes DS, de las curvas de la Figura 9.

La Figura 10 muestra los datos relativos al experimento en el que se intenta conocer cómo afecta al crecimiento bacteriano la mezcla de 0,9 ml de S9 con 0,1 ml de cultivo de 10^3 ufc/ml. Los valores iniciales fueron 2,01 y 1,92 log ufc/ml; alcanzándose unas poblaciones máximas de 8,82 y 9 log ufc/ml para el cultivo combinado con S9 y el control, respectivamente. Los rangos de DS se situaron entre 0,16-0,76 y 0,05-0,74 log ufc/ml, respectivamente. La aplicación del T-test al ensayo confirmó la existencia de diferencia significativa entre las curvas con un valor $P=0,002$. Los valores

iniciales y finales ajustados, λ , V_{max} , R^2 y DS de las curvas se recogen en la Tabla 7.

Figura 9. Media y DS de la población por horas de los cultivos combinados de 0,9 ml de población 10^2 ufc/ml con 0,1 ml de S9 durante 10 h. Los resultados se comparan con una curva control.

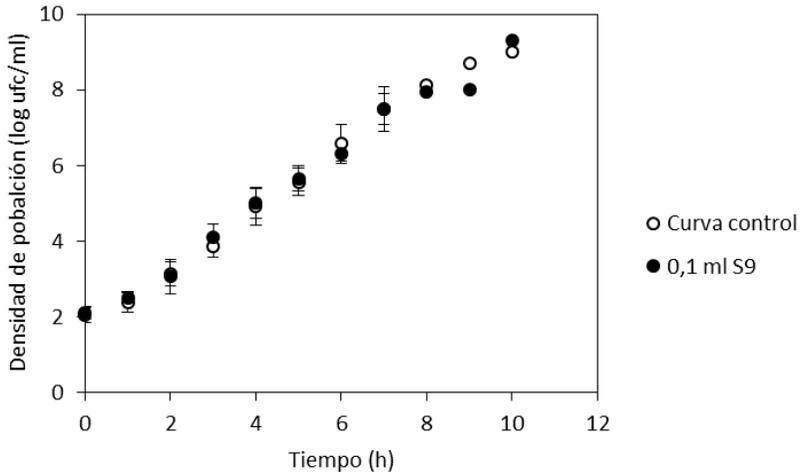
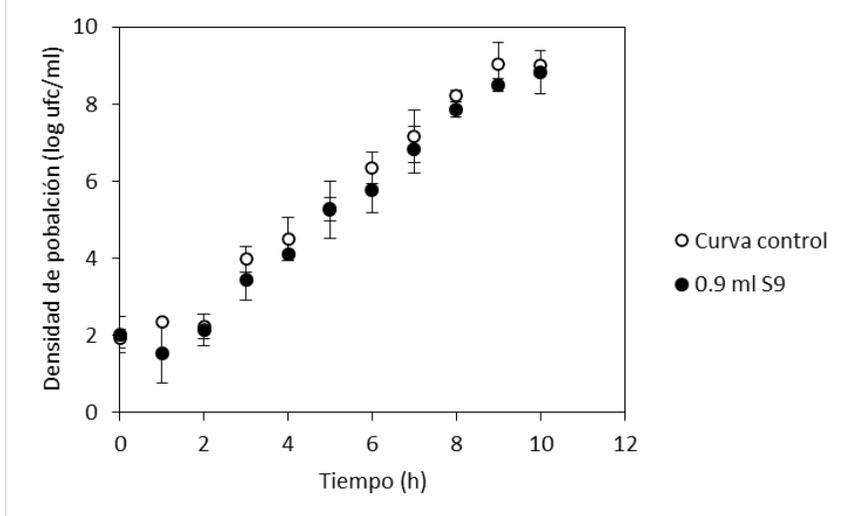
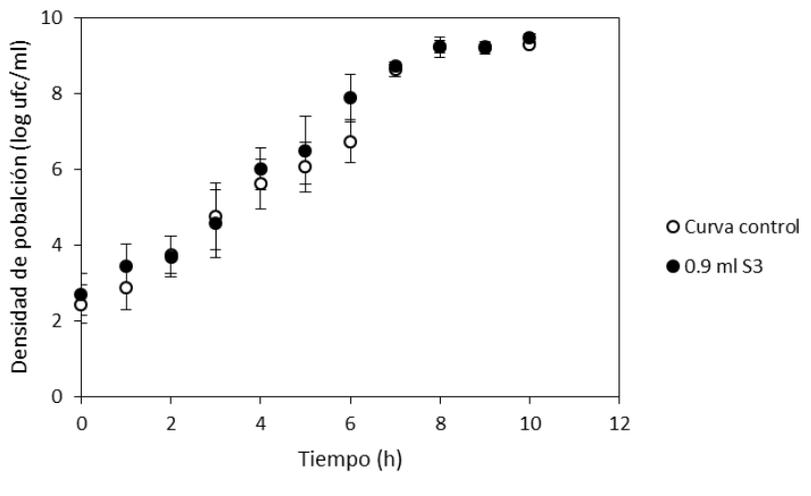


Figura 10. Media y DS de la población por horas de los cultivos combinados de 0,1 ml de población 10^3 ufc/ml con 0,9 ml de S9 durante 10 h. Los resultados se comparan con una curva control.



En la Figura 11 se muestran los resultados correspondientes al experimento en el que se combinan 0,1 ml de cultivo 10^3 ufc/ml con 0,9 ml de S3. La población inicial fue 2,69 log ufc/ml para el cultivo con S3 y 2,43 log ufc/ml para el cultivo control. Se alcanzó la concentración máxima a la octava hora, con poblaciones de 9,48 y 9,32 log ufc/ml, respectivamente. Las DS estuvieron comprendidas entre 0,05-0,89 log ufc/ml en el caso del cultivo con S3 y 0,03-0,87 log ufc/ml en el control. El análisis realizado a través de la T de Student reveló que la diferencia entre ambas curvas es estadísticamente significativa, con un valor $P=0,048$. Los valores iniciales y finales ajustados, λ , V_{max} , R^2 y sus respectivas desviaciones estándar se recogen en la Tabla 7.

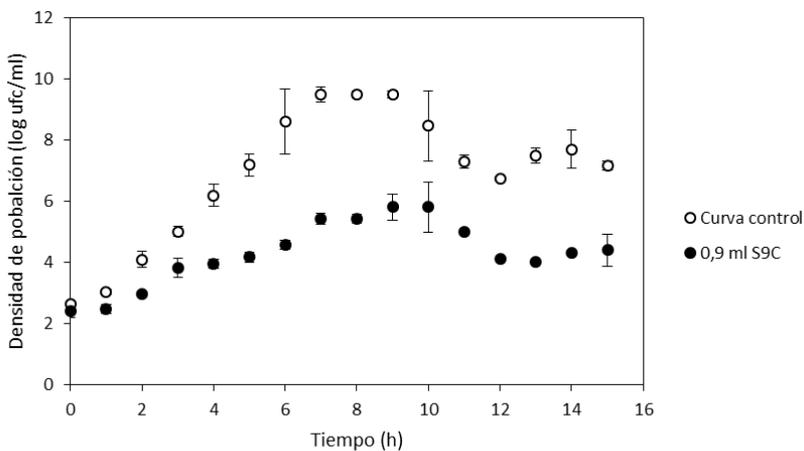
Figura 11. Media y DS de la población por horas de los cultivos combinados de 0,1 ml de población 10^3 ufc/ml con 0,9 ml de S3 durante 10 h. Los resultados se comparan con una curva control.



La Figura 12 muestra la comparación del crecimiento de un cultivo combinado de 0,9 ml de S9C más 0,1 ml de cultivo 10^3 ufc/ml con respecto a un control. El estudio se llevó a cabo durante 15 h para garantizar el alcance de la población máxima. El cultivo con sobrenadante comenzó su ciclo de crecimiento con una población inicial de 2,37 log ufc/ml, mientras que el control lo hizo con 2,63 log ufc/ml. La población máxima fue alcanzada a la

décima hora por el primer cultivo (5,8 log ufc/ml) y a la séptima por el segundo (9,49 log ufc/ml). Los márgenes en los que se situó la DS fueron 0,04-1,12 log ufc/ml para el ensayo con S9C y 0,04-1,14 log ufc/ml para el control. Se llevó a cabo el T-test confirmando, con valor $P=5,6^{-7}$, que ambas curvas eran estadísticamente significativas. Los valores iniciales y finales ajustados, λ , V_{max} , R^2 y las DS para las curvas de la Figura 12 se muestran en la Tabla 7.

Figura 12. Media y DS de la población por horas de los cultivos combinados de 0,1 ml de población 10^3 ufc/ml con 0,9 ml de S9C durante 15 h. Los resultados se comparan con una curva control.



Por último, se confrontó la curva de crecimiento del cultivo inoculado con 0,9 ml de S3C con la de un cultivo control durante 15 h. Los resultados se muestran en la Figura 13. El cultivo con sobrenadante comenzó con una población de 2,42 log ufc/ml, mientras que el control lo hizo con 2,63 log ufc/ml. El máximo lo alcanzaron a las 9 h (9,33 log ufc/ml) el cultivo con S3C y las 7 h (9,48 log ufc/ml) el control. Las DS se situaron entre 0,03-0,53 log ufc/ml para el cultivo con S3C y 0,04-1,14 log ufc/ml en el control. El T-test mostró que ambas curvas eran estadísticamente significativas con una probabilidad de error de $5,6^{-7}$. La Tabla 7 muestra los valores ajustados de las

poblaciones iniciales y finales, periodo de latencia, velocidad máxima, R^2 y DS de las curvas.

Figura 13. Media y DS de la población por horas de los cultivos combinados de 0,1 ml de población 10^3 ufc/ml con 0,9 ml de S3C durante 15 h. Los resultados se comparan con una curva control.

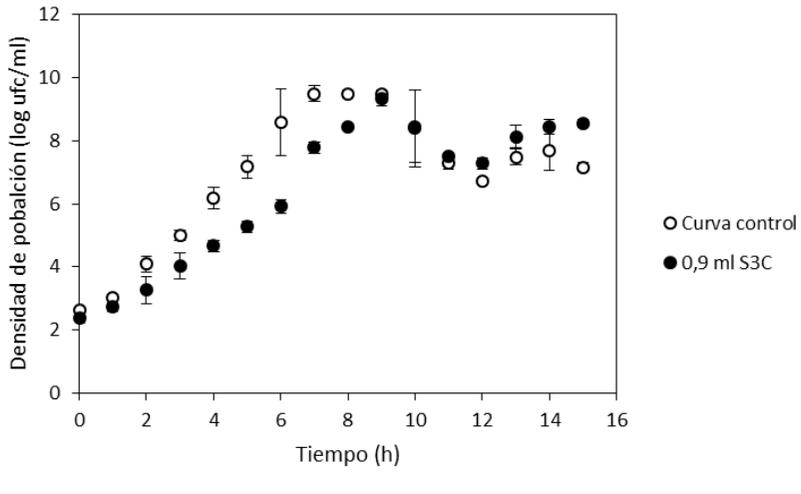


Tabla 7. Población inicial ajustada, tiempo de latencia, velocidad máxima, población final ajustada, R² y respectivas DS de cada ensayo obtenidos mediante Combase Predictor⁽⁶³⁾. Se incluyen los datos de los controles realizados paralelamente.

Ensayo	Población inicial ajustada		Tiempo de latencia		Velocidad máxima		Población final ajustada		R ²		
	Log ufc/ml	DS	h	DS	Log ufc/ml/h	DS	Log ufc/ml	DS	DS		
0,9 ml de cultivo 10 ² ufc/ml + 0,1 ml de S9		2,0229	0,272	0,474	0,601	0,793	0,064	9,594	0,852	0,986	0,292
	Control	2,00224	0,074	0,968	0,146	0,906	0,0201	9,12	0,104	0,999	0,0828
0,1 ml de cultivo 10 ³ ufc/ml + 0,9 ml de S9		1,676	0,227	1,599	0,441	0,982	0,0715	9,0264	0,401	0,989	0,279
	Control	1,927	0,243	1,481	0,458	0,988	0,0743	9,296	0,386	0,988	0,292
0,1 ml de cultivo 10 ³ ufc/ml + 0,9 ml de S3		2,855	0,187	1,308	0,33	1,0693	0,0686	9,415	0,154	0,993	0,218
	Control	2,461	0,321	0,857	0,59	0,957	0,0901	9,517	0,337	0,982	0,352
0,1 ml de cultivo 10 ³ ufc/ml + 0,9 ml de S9C		2,353	0,197	0,47	0,763	0,44	0,0495	5,894	0,233	0,973	0,209
	Control	2,686	0,348	1,144	0,533	1,246	0,151	9,253	0,22	0,978	0,391
0,1 ml de cultivo 10 ³ ufc/ml + 0,9 ml de S3C		2,577	0,336	2,0104	0,691	0,995	0,133	8,947	0,429	0,969	0,441
	Control	2,686	0,348	1,144	0,533	1,246	0,151	9,253	0,22	0,978	0,391

5.5. DISCUSIÓN

Quorum sensing, la habilidad celular para comunicarse con sus semejantes con el fin de controlar funciones celulares, se ha estudiado en un amplio rango de bacterias: *Erwinia*⁽¹⁴⁰⁾, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*⁽¹⁴¹⁾, *Vibrio harveyi*⁽¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾, *Escherichia coli*^(145-147; 138), *Salmonella typhimurium*^(145; 146; 144; 138; 148), *Pseudomonas aeruginosa*⁽¹⁴⁹⁾, *Acinetobacter*⁽¹⁵⁰⁾ y *Clostridium botulinum*⁽¹⁵¹⁾, entre otras. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento poco se sabe de este mecanismo de regulación en *Cronobacter sakazakii*. La elevada tasa de mortalidad descrita en recién nacidos por el consumo de leches maternizadas contaminadas^(79; 152) justifica el estudio de los fenómenos que regulan su comportamiento.

Lehner *et al.*⁽¹⁵³⁾ estudiaron la formación de biofilms, producción extracelular de polisacáridos y señalización célula-célula en 56 cepas de *C. sakazakii*, encontrando importantes evidencias que corroboran que los procesos de desarrollo de biofilms se encuentran mediados por sistemas de comunicación intercelular. Asimismo, identificaron dos moléculas de señalización emitidas por la bacteria al medio, tanto de forma individual con conjunta, que podrían ser las causantes de este fenómeno: 3-oxo-C6-HSL y 3-oxo-C8-HSL.

El presente estudio trata de conocer cómo afecta la inoculación de sobrenadantes libres de células al crecimiento de *C. sakazakii*. Varios autores han llevado a cabo ensayos con finalidades similares en distintas especies bacterianas. Zhao *et al.*⁽¹⁵¹⁾ estudiaron la producción de señales de quorum sensing en *Clostridium botulinum* 56A. Para ello, adicionaron sobrenadantes libres de células procedentes de cultivos incubados 8,5 h a cultivos con bajos

niveles de esporas y monitorizaron su turbidez por densidad óptica. Encontraron que el tiempo medio de detección de la turbidez fue siempre menor en los cultivos con sobrenadantes que en los controles. Avendano-Perez y Pin ⁽¹⁴⁸⁾ estudiaron cómo afectaba el contacto con bacterias fecales humanas a la concentración de *Salmonella entérica* subsp. *enterica* Serovar. Para descartar que el efecto encontrado fuese producido por moléculas suspendidas en el sobrenadante y no por el propio contacto, inocularon sobrenadantes libres de células procedentes del cocultivo de *Salmonella* y bacterias fecales a un cultivo individual de *Salmonella*. En este caso la concentración del cultivo no presentó ninguna alteración tras la combinación. En nuestro estudio se mezclaron cultivos de bajas poblaciones de *C. sakazakii* con sobrenadantes libres de células obtenidos de fase exponencial, estacionaria y los concentrados de los mismos con el fin de realizar un seguimiento de su crecimiento en el tiempo.

Cuando se inoculó un pequeño volumen de S9 en el cultivo (0,1 ml de S9 en 0,9 ml de cultivo 10^2 ufc/ml; proporción 1:9), no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento respecto a su control paralelo, siendo destacable que el tiempo de latencia fue el doble en el último. Sin embargo, cuando se incrementó el volumen inoculado de S9 (0,9 ml de S9 en 0,1 ml de cultivo 10^3 ufc/ml; proporción 9:1) se encontraron diferencias estadísticamente significativas, demostrando que el volumen empleado en el primer caso era insuficiente para producir alteraciones perceptibles.

La combinación de 0,9 ml de S3 con 0,1 ml del cultivo 10^3 ufc/ml mostró igualmente diferencias estadísticamente significativas, con una probabilidad de error muy cercana al valor de significación estadística (0,048 para $P < 0,05$). Las diferencias más pronunciadas se dieron al comienzo del

tiempo de latencia y mitad de la fase exponencial, presentando poblaciones prácticamente análogas en el resto de tiempos.

Se llevaron a cabo ensayos idénticos a los anteriores con sobrenadantes concentrados. El empleo de S9C produjo fuertes diferencias en el crecimiento del cultivo inoculado respecto al control; obteniendo el primero un periodo de latencia 2,5 veces menor, tres veces menos V_{max} y una población final ajustada 1,6 veces menor. El ensayo con S3C también mostró disparidades respecto del control, con la mitad de λ pero poblaciones ajustadas y V_{max} muy similares.

Nuestro estudio revela que la inoculación de sobrenadantes libres de células procedentes de fase exponencial y estacionaria de un cultivo de *C. sakazakii* altera el crecimiento de la bacteria cuando se inocula en una proporción 9:1 al producir una disminución en la V_{max} de crecimiento. El efecto se produjo de forma más significativa cuando se emplearon sobrenadantes concentrados, siendo mayor el efecto con el procedente de fase estacionaria. El empleo de S3 ocasionó resultados opuestos, debidos posiblemente al azar dada la alta probabilidad de error encontrada. Nuestros datos difieren de los reflejados por Zhao *et al.* ⁽¹⁵¹⁾ y Avendano-Perez y Pin ⁽¹⁴⁸⁾. Una justificación de las disparidades podría deberse a la diferencia de especies utilizadas en cada trabajo. Zhao *et al.* ⁽¹⁵¹⁾ encontraron que el tiempo medio de detección de turbidez fue siempre menor para los cultivos con sobrenadante añadido. Sin embargo, este efecto fue mayor a 22°C que a 30°C y los resultados no mostraron significación estadística. Nuestro estudio fue llevado a cabo en una temperatura aun mayor (37°C) y presentó fuerte significación. Además, sus resultados sólo tuvieron en cuenta el tiempo de detección de turbidez y no los tiempos de germinación como tal, pudiendo dar lugar a errores. Igualmente, el estudio sólo se llevó a cabo con sobrenadantes procedentes de cultivos incubados 8,5 h; mientras que

nuestros resultados más consistentes fueron obtenidos con sobrenadante procedentes de 24 h de incubación. Avendano-Perez y Pin ⁽¹⁴⁸⁾. declararon que la combinación de cultivos de *Salmonella* con sobrenadantes libres de células no producía alteración en la concentración bacteriana. Sin embargo, la proporción de los volúmenes inoculados no se especifica, pudiendo ser tan pequeña como en nuestro primer ensayo y no dando lugar a alteraciones observables.

Lehner *et al.* ⁽¹⁵³⁾ identificaron las moléculas 3-oxo-C6-HSL y 3-oxo-C8-HSL como mediadoras de quorum sensing en *C. sakazakii*, las cuales podrían ser las causantes de nuestros resultados. Fuqua y Greenberg ⁽¹⁵⁴⁾ estudiaron la comunicación célula-célula en la bacteria Gram negativa *Vibrio fischeri*. Observaron que cuando la concentración bacteriana es muy baja en un cultivo, las moléculas mediadoras de quorum sensing se producen en muy baja concentración y se secretan al medio extracelular por difusión, acumulándose en él. Una vez que los microorganismos se reproducen y alcanzan valores de 10^{10} - 10^{11} células/ml, la concentración del mediador alcanza valores en torno a 1-10 nM. En estas circunstancias la molécula entra al interior de la célula, también por difusión, y se une a su proteína receptora desencadenando una respuesta ⁽¹⁵⁵⁾. Este descubrimiento podría constituir la explicación a nuestros resultados. En nuestro estudio las mayores alteraciones del crecimiento se produjeron con sobrenadantes de fase estacionaria procedentes de poblaciones de aprox. 10^9 ufc/ml, que según Fuqua y Greenberg ⁽¹⁵⁴⁾ contendrían mediadores en concentración suficiente para producir quorum sensing. El equipo de Rustem F. Ismagilov de la Universidad de Chicago demostró que el fenómeno del quorum sensing no depende del número absoluto de moléculas mediadoras en el medio, sino del número de estas en un volumen dado, es decir, de su densidad ⁽¹⁵⁶⁾. La aplicación de estos resultados podría justificar que la inoculación de 0,1 ml

de S9 en 0,9 ml de cultivo de *C. sakazakii* no produjese diferencias significativas en el crecimiento de la bacteria, dada la baja densidad de las moléculas mediadoras en el cultivo. Sin embargo, la fuerte alteración en el crecimiento observada mediante el empleo de sobrenadantes concentrados podría deberse a la alta densidad molecular presente en los mismos.

Turovskiy y Chikindas⁽¹⁵⁷⁾ encontraron que la presencia de glucosa en las muestras podía inhibir el efecto de quorum sensing, hecho a menudo ignorado por los investigadores. Nuestros ensayos con 0,9 ml de S9 y S3 se llevaron a cabo en ausencia del nutriente. Sin embargo cuando se emplearon S9C y S3C, medios reconstituidos con TSB fresco que contiene glucosa, los resultados fueron aún más consistentes. Se descarta, por consiguiente, una posible inhibición de la comunicación por efecto del carbohidrato.

Las evidencias parecen sustentar que el presente estudio representa un caso de quorum sensing en *Cronobacter sakazakii* CECT 858. Aun así, es necesaria más investigación con la finalidad de identificar las moléculas mediadoras del fenómeno y profundizar más en el campo de estudio.

CAPÍTULO

CONCLUSIONES



Conclusión 1: La elaboración de modelos de crecimiento específicos de medios de cultivo y alimentos es necesaria para la correcta toma de decisiones sobre la gestión de riesgos microbianos. Por su parte, el empleo del CV de los parámetros de crecimiento entre cepas permite conocer su oscilación entre los miembros de una especie con la finalidad de elaborar modelos predictivos.

Conclusión 2: Se demuestra la existencia de leves diferencias en los parámetros de crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* estudiadas, la gran influencia del medio y condiciones de cultivo sobre α , así como la leve existencia de diferencias significativas entre las cepas O157:H7 y O26:H11 respecto de la no-O157:H7, y entre patógenas y no patógenas.

Conclusión 3: Es posible el uso de cepas no-O157:H7 y no patógenas de cara a futuros estudios de los parámetros de crecimiento. Esta circunstancia facilitaría en gran medida el trabajo en el laboratorio al poder utilizarse cepas no patógenas que necesitan unas condiciones de trabajo menos estrictas.

Conclusión 4: Se corrobora la importancia del empleo de medidas asépticas y temperaturas apropiadas en la preparación, uso y almacenamiento de la leche maternizada. El producto reconstituido deberá ser almacenado en el frigorífico durante un periodo máximo de 24 h y no permanecer a temperatura ambiente más de 2 h.

Conclusión 5: La presencia de sobrenadantes libres de células altera el comportamiento de *Cronobacter sakazakii*, con un efecto más pronunciado al inocular S9C en una proporción 9:1.

Conclusión 6: Los resultados obtenidos podrían avalar que los mismos sean atribuidos al efecto del fenómeno del quorum sensing

CAPÍTULO

BIBLIOGRAFÍA



1. Mossel, DAA. 1977. Microbiology of foods: occurrence, prevention and monitoring of hazards and deterioration. Utrecht, The Netherlands: University of Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine.
2. McMeekin, TA y Ross, T. 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *Int J Food Microbiol* 78: 133-153.
3. Mossel, DAA y Moreno Garcia, B. 2006. Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Zaragoza, España: Acribia.
4. Mossel, DAA. 1971. Symposium on microbial changes in foods. Physiological and metabolic attributes of microbial groups associated with foods. *J Appl Bacteriol* 34: 95-118.
5. Oliver, SP, Jayarao, BM y Almeida, RA. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis* 2: 115-129.
6. CDC: Centers for disease, control and prevention. 2011. CDC estimates of foodborne illness in the United States [internet]. Atlanta, Georgia, USA: CDC [consultado el 2 de Abril de 2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>.
7. IOM: Institute of medicine. 1992. Emerging Infections: microbial threats to health in the United States. Washington DC, Washington, USA: National Academy Press.
8. Maurice, J. 1994. The rise and rise of food poisoning. *New Sci* 144: 28-33.
9. Altekruze, SF, Cohen, ML y Swerdlow, DL. 1997. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 3: 285-293.
10. Miller, AJ, Smith, JL y Buchanan, RL. 1998. Factors affecting the emergence of new pathogens and research strategies leading to their control. *J Food Safety* 18: 243-263.
11. Ryan, K y Sherris, RG. 2005. Microbiología Médica: una introducción a las enfermedades infecciosas. México: McGraw-Hill/Interamericana Editores.
12. Hathaway, SC y Cook, RL. 1997. A regulatory perspective on the potential uses of microbial risk assessment in international trade. *Int J Food Microbiol* 36: 127-133.
13. Coleman, ME y Marks, HM. 1999. Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control* 10: 289-297.
14. Pearson, AM y Dutson, TR. 1999. HACCP in meat, poultry and fish processing: advances in Meat Research Series. London, England: Springer Science & Business Media.
15. Tchaptchet, S y Hansen, J. 2011. The Yin and Yang of host-commensal mutualism. *Gut Microbes* 2: 347-352.

16. Farrokh, C, Jordan, K, Auvray, F, Glass, K, Oppegaard, H, Raynaud, S, Thevenot, D, Condrón, R, De Reu, K, Govaris, A, Heggum, K, Heyndrickx, M, Hummerjohann, J, Lindsay, D, Miszczycha, S, Moussiégt, S, Verstraete, K y Cerf, O. 2013. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol* 162: 190-212.
17. Montville, TJ y Matthews, KR. 2005. *Food Microbiology: An Introduction*. Washington DC, Washington, USA: ASM Press.
18. ICMSF: International commission on microbiological specifications for foods. 1996. *Microorganisms in foods 5: characteristics of microbial pathogens*. London, England: Blackie Academic and Professional.
19. Riley, LW, Remis, RS, Helgerson, SD, McGee, HB, Wells, JG, Davis, BR, Hebert, RJ, Olcott, ES, Johnson, LM, Hargrett, NT, Blake, PA y Cohen, ML. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308: 681-685.
20. Karmali, MA, Steele, BT, Petric, M y Lim, C. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1: 619-620.
21. Nataro, JP y Kaper, JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.
22. Margall, N, Domínguez, À, Prats, G y Salleras, L. 1997. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Rev Esp Salud Publica* 71: 437-443.
23. CFSPH: The center for food security and public health. 2009. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections [internet]. Ames, Iowa, USA: Iowa State University [consultado el 1 de Febrero de 2015]. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/e_coli.pdf.
24. Konowalchuk, J, Speirs, JI y Stavric, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18: 775-779.
25. O'Brien, AD, Thompson, MR, Cantey, JR y Format, SB. 1977. Production of a *Shigella dysenteriae*-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*. En: Abstracts of the 77th annual meeting of the American society of microbiology. Washington DC, Washington, USA. American society of microbiology.
26. O'Brien, AD, LaVeck, GD, Griffin, DE y Thompson, MR. 1980. Characterization of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. *Infect Immun* 30: 170-179.
27. O'Brien, AD y Holmes, RK. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* 51: 206-220.
28. Boyce, TG, Swerdlow, DL y Griffin, PM. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 333: 364-368.
29. Griffin, PM y Tauxe, RV. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13: 60-98.

30. Griffin, PM. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. En: Blaser MJ, SP, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, editor. Infections of the gastrointestinal tract. New York, New York, USA: Raven Press. p. 739-761.
31. Morgan, GM, Newman, C, Palmer, SR, Allen, JB, Shepherd, W, Rampling, AM, Warren, RE, Gross, RJ, Scotland, SM y Smith, HR. 1988. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiol Infect* 101: 83-91.
32. Besser, RE, Lett, SM, Weber, JT, Doyle, MP, Barrett, TJ, Wells, JG y Griffin, PM. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269: 2217-2220.
33. McCarthy, M. 1996. *E coli* O157:H7 outbreak in USA traced to apple juice. *Lancet* 348: 1299.
34. Keene, WE, McAnulty, JM, Hoesly, FC, Williams, LP, Jr., Hedberg, K, Oxman, GL, Barrett, TJ, Pfaller, MA y Fleming, DW. 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 331: 579-584.
35. Swerdlow, DL, Woodruff, BA, Brady, RC, Griffin, PM, Tippen, S, Donnell, HD, Jr., Geldreich, E, Payne, BJ, Meyer, A, Jr., Wells, JG y et al. 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* 117: 812-819.
36. FAO/WHO: Food and agriculture organization of the United States / World health organization. 1991. Risk management and food safety: Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Rome, Italy: FAO Food Nutrition Paper 65: 1-27.
37. Lammerding, AM y Fazil, A. 2000. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int J Food Microbiol* 58: 147-157.
38. Ross, T y McMeekin, TA. 2003. Modeling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Anal* 23: 179-197.
39. Vose, DJ. 1998. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *J Food Prot* 61: 640-648.
40. Nauta, MJ. 2002. Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? *Int J Food Microbiol* 73: 297-304.
41. Whiting, RC y Golden, MH. 2002. Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *Int J Food Microbiol* 75: 127-133.
42. Oscar, TP. 2000. Variation of lag time and specific growth rate among 11 strains of *Salmonella* inoculated onto sterile ground chicken breast burgers and incubated at 25°C. *J Food Safety* 20: 225-236.
43. De Jesus, AJ y Whiting, RC. 2003. Thermal inactivation, growth, and survival studies of *Listeria monocytogenes* strains belonging to three distinct genotypic lineages. *J Food Prot* 66: 1611-1617.

44. Lindqvist, R. 2006. Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods. *Appl Environ Microbiol* 72: 4862-4870.
45. Francois, K, Devlieghere, F, Standaert, AR, Geeraerd, AH, Cools, I, Van Impe, JF y Debevere, J. 2005. Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 99: 1503-1515.
46. Duran, GM y Marshall, DL. 2002. Rapid determination of sanitizer concentration using impedance-based methods. *J Food Prot* 65: 1422-1427.
47. Mosteller, T y Bishop, J. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *J Food Prot* 56: 34-41.
48. Edmiston, AL y Russell, SM. 2000. Specificity of a conductance assay for enumeration of *Escherichia coli* from broiler carcass rinse samples containing genetically similar species. *J Food Prot* 63: 264-267.
49. Bundgaard-Nielsen, K y Nielsen, PV. 1996. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. *J Food Prot* 59: 268-275.
50. Edmiston, AL y Russell, SM. 1998. A rapid microbiological method for enumerating *Escherichia coli* from broiler chicken carcasses. *J Food Prot* 61: 1375-1377.
51. Russell, SM, Fletcher, DL y Cox, NA. 1992. A rapid method for the determination of temperature abuse of fresh broiler chicken. *Poult Sci* 71: 1391-1395.
52. Bishop, J y White, C. 1985. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. *J Food Protect* 48: 663-667.
53. Glassmoyer, KE y Russell, SM. 2001. Evaluation of a selective broth for detection of *Staphylococcus aureus* using impedance microbiology. *J Food Prot* 64: 44-50.
54. Firstenberg-Eden, R. 1983. Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Food technol* 37: 64-65.
55. Akins, ED, Rule, PL, Keener, MR, Sellers, HS, Line, JE, Simmons, M, Harrison, MA y Hiett, KL. 2009. Simplified capacitance monitoring for the determination of *Campylobacter* spp. growth rates. *J Rapid Methods Autom Microbiol* 17: 3-8.
56. Gibson, H, Elton, R, Peters, W y Holah, J. 1995. Surface and suspension testing: conflict or complementary. *Int Biodeter Biodegr* 36: 375-384.
57. MacDonald, F y Sutherland, AD. 1994. Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *List. innocua* in two *Listeria* enrichment broths. *J Dairy Res* 61: 433-436.
58. Firstenberg-Eden, R y Eden, G. 1984. Considerations in the development of impedance proceedings. *Impedance Microbiology*. New York: Research Studies Press Limited. p. 41-72.

59. Baranyi, J y Roberts, TA. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* 26: 199-218.
60. Richards, JC, Jason, AC, Hobbs, G, Gibson, DM y Christie, RH. 1978. Electronic measurement of bacterial growth. *J Phys E* 11: 560-568.
61. McMeekin, TA, Olley, JN, Ross, T y Ratkowsky, DA. 1993. Predictive microbiology: theory and application. Taunton, England: Research Studies Press Ltd.
62. USDA: US Department of Agriculture. 2003. PMP: Pathogen Modeling Program, online version 7.0 [internet]. Wyndmoor, Pennsylvania, USA: USDA [consultado el 15 de Abril de 2014]. Disponible en: <http://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx?ModelID=3&Aerobic=True>.
63. Baranyi, J y Roberts, TA. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* 23: 277-294.
64. Cuppers, HGAM y Smelt, JPPM. 1993. Time to turbidity measurement as a tool for modeling spoilage by *Lactobacillus*. *J Ind Microbiol* 12: 168-171.
65. Baranyi, J y Pin, C. 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Appl Environ Microbiol* 65: 732-736.
66. Quinto, E, Franco, C, Fente, C, Vazquez, B y Cepeda, A. 1997. Growth of *Escherichia coli* O157: H7 in the presence of *Pseudomonas fluorescens* in skimmed milk at 7 or 25°C. *J Food Safety* 16: 273-285.
67. Zhang, T, Zhang, C, Li, S, Zhang, Y y Yang, Z. 2011. Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Braz J Microbiol* 42: 1470-1478.
68. IDRE: Institute for digital research and education. 2014. What is the coefficient of variation? [internet]. Los Angeles, California, USA: IDRE [consultado el 26 de Abril de 2014]. Disponible en: http://www.ats.ucla.edu/stat/mult_pkg/faq/general/coefficient_of_variation.htm.
69. Duh, Y-H y Schaffner, DW. 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect* 56: 205-210.
70. Begot, C, Lebert, I y Lebert, A. 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiol* 14: 403-412.
71. Dengremont, E y Membre, JM. 1995. Statistical approach for comparison of the growth rates of five strains of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 61: 4389-4395.
72. Coleman, ME, Tamplin, ML, Phillips, JG y Marmer, BS. 2003. Influence of agitation, inoculum density, pH, and strain on the growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7--relevance to risk assessment. *Int J Food Microbiol* 83: 147-160.
73. Wenz, JR, Barrington, GM, Garry, FB, Ellis, RP y Magnuson, RJ. 2006. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J Dairy Sci* 89: 3408-3412.

74. Baker, DR, Moxley, RA, Steele, MB, Lejeune, JT, Christopher-Hennings, J, Chen, DG, Hardwidge, PR y Francis, DH. 2007. Differences in virulence among *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from humans during disease outbreaks and from healthy cattle. *Appl Environ Microbiol* 73: 7338-7346.
75. Ross, T, Dalgaard, P y Tienungoon, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* 62: 231-245.
76. Fernández-Escudero, I, Caro, I, Mateo, J, Tejero, J y Quinto, EJ. 2014. Low variability of growth parameters among six O157:H7 and non-O157:H7 *Escherichia coli* strains. *J Food Prot* 77: 1988-1991.
77. Dubey, GP y Ben-Yehuda, S. 2011. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* 144: 590-600.
78. Labhsetwar, P, Cole, JA, Roberts, E, Price, ND y Luthey-Schulten, ZA. 2013. Heterogeneity in protein expression induces metabolic variability in a modeled *Escherichia coli* population. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 14006-14011.
79. Farmer, JJ, Asbury, M, Hickman, F y Brenner, DJ. 1980. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 30: 569-584.
80. Nazarowec-White, M y Farber, JM. 1997. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int J Food Microbiol* 34: 103-113.
81. FDA: Food and drug administration. 2012. *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* spp. [internet]. Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. p. 50-53. [Consultado el 31 de Noviembre de 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>.
82. Urmenyi, AM y Franklin, AW. 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1: 313-315.
83. Lehner, A y Stephan, R. 2004. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot* 67: 2850-2857.
84. CDC: Centers for disease, control and prevention. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula--Tennessee, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51: 298-300.
85. Lai, KK. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 80: 113-122.
86. Drudy, D, Mullane, NR, Quinn, T, Wall, PG y Fanning, S. 2006. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. *Clin Infect Dis* 42: 996-1002.
87. Hawkins, RE, Lissner, CR y Sanford, JP. 1991. *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South Med J* 84: 793-795.
88. Ongradi, J. 2002. Vaginal infection by *Enterobacter sakazakii*. *Sex Transm Infect* 78: 467.

89. Muytjens, HL y Kollee, LA. 1990. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? *Pediatr Infect Dis J* 9: 372-373.
90. Kuzina, LV, Peloquin, JJ, Vacek, DC y Miller, TA. 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Curr Microbiol* 42: 290-294.
91. Hamilton, JV, Lehane, MJ y Braig, HR. 2003. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg Infect Dis* 9: 1355-1356.
92. Kandhai, MC, Reij, MW, Gorris, LG, Guillaume-Gentil, O y van Schothorst, M. 2004. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet* 363: 39-40.
93. Kandhai, MC, Reij, MW, van Puyvelde, K, Guillaume-Gentil, O, Beumer, RR y van Schothorst, M. 2004. A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. *J Food Prot* 67: 1267-1270.
94. Skladal, P, Mascini, M, Salvadori, C y Zannoni, G. 1993. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. *Enzyme Microb Technol* 15: 508-512.
95. Leclercq, A, Wanegue, C y Baylac, P. 2002. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl Environ Microbiol* 68: 1631-1638.
96. Iversen, C y Forsythe, S. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Tech* 14: 443-454.
97. Muytjens, HL, Roelofs-Willemse, H y Jaspar, G. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 26: 743-746.
98. Noriega, FR, Kotloff, KL, Martin, MA y Schwalbe, RS. 1990. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Pediatr Infect Dis J* 9: 447-449.
99. Zogaj, X, Bokranz, W, Nimtz, M y Romling, U. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* 71: 4151-4158.
100. Pagotto, FJ, Nazarowec-White, M, Bidawid, S y Farber, JM. 2003. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *J Food Prot* 66: 370-375.
101. Iversen, C, Lazar Adler, N y Forsythe, S. 2004. Virulence factors of *Enterobacter sakazakii*. En: Program and abstracts of the 104th general meeting of the American society for microbiology. Washington DC, Washington, USA. American society for microbiology. p. 108.
102. Breeuwer, P, Lardeau, A, Peterz, M y Joosten, HM. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol* 95: 967-973.

103. Iversen, C, Lane, M y Forsythe, SJ. 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett Appl Microbiol* 38: 378-382.
104. Nazarowec-White, M y Farber, JM. 1997. Incidence, Survival, and Growth of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. *J Food Prot* 60: 226-230.
105. Rhodehamel, E. 1992. FDA's concerns with sous vide processing. *Food Technol* 46: 73-76.
106. Harris, RD. 1989. Kraft builds safety into next generation refrigerated foods. *Food Proc* 50: 111-114.
107. Van Garde, SJ y Woodburn, MJ. 1987. Food discard practices of householders. *J Am Diet Assoc* 87: 322-329.
108. Daniels, RW. 1991. Applying HACCP to new-generation refrigerated foods at retail and beyond. *Food Technol* 45: 122-124.
109. Iversen, C, Hargreaves, A y Forsythe, S. 2003. Growth rates and D-values of *Enterobacter sakazakii* in 5 suspending media. En: Abstracts of the general meeting of the American Society for Microbiology. ASM conference; Washington DC, Washington, USA. American society for microbiology. p. 82.
110. FAO/WHO: Food and agriculture organization of the United States / World health organization. 2007. Guidelines for the safe preparation, storage and handling of powdered infant formula [internet]. Geneva, Switzerland: FAO/OMS [Consultado el 20 de Diciembre de 2015]. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf.
111. Bögl, K y Rosenberg, U. 1989. Was passiert bei der Mikrowellenerhitzung von Nahrungsmitteln?. *Bundesgesundheitsblatt* 10: 446-450.
112. Latimer, JM y Matsen, JM. 1977. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 6: 340-342.
113. Sanborn, MR, Wan, SK y Bulard, R. 1982. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl Environ Microbiol* 44: 960-964.
114. Douglas, C, Burke, B, Kessler, DL, Cicmanec, JF y Bracken, RB. 1990. Microwave: practical cost-effective method for sterilizing urinary catheters in the home. *Urology* 35: 219-222.
115. Harris, MG, Rechberger, J, Grant, T y Holden, BA. 1990. In-office microwave disinfection of soft contact lenses. *Optom Vis Sci* 67: 129-132.
116. Kindle, G, Busse, A, Kampa, D, Meyer-Koenig, U y Daschner, F. 1996. Killing activity of microwaves in milk. *J Hosp Infect* 33: 273-278.
117. Lund, BM, Knox, MR y Cole, MB. 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* during microwave cooking. *Lancet* 1: 218.
118. Najdovski, L, Dragas, AZ y Kotnik, V. 1991. The killing activity of microwaves on some non-sporogenic and sporogenic medically important bacterial strains. *J Hosp Infect* 19: 239-247.

119. Goldblith, SA y Wang, DI. 1967. Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol* 15: 1371-1375.
120. Lechowich, RV, Beuchat, LR, Fox, KI y Webster, FH. 1969. Procedure for evaluating the effects of 2,450-megahertz microwaves upon *Streptococcus faecalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol* 17: 106-110.
121. Rosenberg, U y Sinell, HJ. 1989. Effect of high frequency treatment on several microorganisms important to food health. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 188: 271-283.
122. Hammerman, C y Kaplan, M. 2006. Probiotics and neonatal intestinal infection. *Curr Opin Infect Dis* 19: 277-282.
123. Lenati, RF, O'Connor, DL, Hebert, KC, Farber, JM y Pagotto, FJ. 2008. Growth and survival of *Enterobacter sakazakii* in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula. *Int J Food Microbiol* 122: 171-179.
124. FAO/WHO: Food and agriculture organization of the United States / World health organization. 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. Geneva, Switzerland: Microbiol Risk Assess Ser 6: 1-59.
125. March, GA y Eiros, JM. 2013. Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Med Clin* 141: 353-357.
126. Tomasz, A. 1965. Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature* 208: 155-159.
127. Nealson, KH, Platt, T y Hastings, JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104: 313-322.
128. Eberhard, A, Burlingame, AL, Eberhard, C, Kenyon, GL, Nealson, KH y Oppenheimer, NJ. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20: 2444-2449.
129. Bassler, BL y Losick, R. 2006. Bacterially speaking. *Cell* 125: 237-246.
130. Fuqua, WC, Winans, SC y Greenberg, EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176: 269-275.
131. Greenberg, EP. 1997. Quorum sensing in gram-negative bacteria. *ASM News* 63: 371-377.
132. Redfield, RJ. 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* 10: 365-370.
133. Winzer, K, Hardie, KR y Williams, P. 2002. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now—gone to lunch! *Curr Opin Microbiol* 5: 216-222.

134. Hartmann, A y Schikora, A. 2012. Quorum sensing of bacteria and trans-kingdom interactions of N-acyl homoserine lactones with eukaryotes. *J Chem Ecol* 38: 704-713.
135. Eglund, KA y Greenberg, E. 2001. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: analysis of the LuxR DNA binding region by alanine-scanning mutagenesis. *J Bacteriol* 183: 382-386.
136. Bhargava, N, Sharma, P y Capalash, N. 2010. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol* 36: 349-360.
137. Kleerebezem, M, Quadri, LE, Kuipers, OP y De Vos, WM. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24: 895-904.
138. Surette, MG, Miller, MB y Bassler, BL. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1639-1644.
139. Chen, CY, Nace, GW y Irwin, PL. 2003. A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 55: 475-479.
140. Bainton, NJ, Bycroft, BW, Chhabra, SR, Stead, P, Gledhill, L, Hill, PJ, Rees, CE, Winson, MK, Salmond, GP, Stewart, GS y Williams, P. 1992. A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene* 116: 87-91.
141. Crockford, AJ, Davis, GA y Williams, HD. 1995. Evidence for cell-density-dependent regulation of catalase activity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Microbiology* 141: 843-851.
142. Bassler, BL, Greenberg, EP y Stevens, AM. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 179: 4043-4045.
143. Bassler, BL. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2: 582-587.
144. Surette, MG y Bassler, BL. 1999. Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 31: 585-595.
145. Fuqua, C y Greenberg, EP. 1998. Cell-to-cell communication in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: they may be talking, but who's listening? *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6571-6572.
146. Surette, MG y Bassler, BL. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7046-7050.
147. Withers, HL y Nordstrom, K. 1998. Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15694-15699.
148. Avendano-Perez, G y Pin, C. 2013. Loss of culturability of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium upon cell-cell contact with human fecal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 79: 3257-3263.

149. Dockery, JD y Keener, JP. 2001. A mathematical model for quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Bull Math Biol 63: 95-116.
150. Gonzalez, RH, Nusblat, A y Nudel, BC. 2001. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. Microbiol Res 155: 271-277.
151. Zhao, L, Montville, TJ y Schaffner, DW. 2006. Evidence for quorum sensing in *Clostridium botulinum* 56A. Lett Appl Microbiol 42: 54-58.
152. Kandhai, MC, Reij, MW, Grogno, C, van Schothorst, M, Gorris, LG y Zwietering, MH. 2006. Effects of preculturing conditions on lag time and specific growth rate of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula. Appl Environ Microbiol 72: 2721-2729.
153. Lehner, A, Riedel, K, Eberl, L, Breeuwer, P, Diep, B y Stephan, R. 2005. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. J Food Prot 68: 2287-2294.
154. Fuqua, C y Greenberg, EP. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nat Rev Mol Cell Bio 3: 685-695.
155. Marquina Díaz, D y Santos de la Sen, A. 2010. Sistemas de quorum sensing en bacterias. REDUCA (Biología) 3: 29-55.
156. Wiley-Blackwell 2009. Bacterial quorum sensing: a matter of density, not quantity [internet]. Rockville, Maryland, USA: ScienceDaily [consultado el 05 de Febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/07/090710101452.htm>.
157. Turovskiy, Y y Chikindas, ML. 2006. Autoinducer-2 bioassay is a qualitative, not quantitative method influenced by glucose. J Microbiol Methods 66: 497-503.

CAPÍTULO

DIVULGACIÓN DE RESULTADOS



8.1. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS

Fernández-Escudero, I, Caro, I, Mateo, J, Tejero, J y Quinto, EJ. 2014. Low variability of growth parameters among six O157:H7 and non-O157:H7 *Escherichia coli* strains. J Food Prot 77: 1988-1991. Factor de impacto: 1,797. Cuartil 2.

8.2. COMUNICACIONES A CONGRESOS

8.2.1. CONGRESOS INTERNACIONALES

Fernández-Escudero, I, Quinto EJ, Caro I. 2015. Seguridad en la alimentación de leche en polvo para lactantes. VI congreso internacional virtual de Enfermería y Fisioterapia “Ciudad de Granada”: impacto positivo de la seguridad del paciente en la atención sanitaria al ciudadano. Granada, España: 15 al 28 de mayo de 2015.

