



TRABAJO FIN DE GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA:

- ESTIMACIÓN DE POBLACIONES DE
CRONOBACTER SAKAZAKII MEDIANTE
DENSIDAD ÓPTICA -

AUTORA: OLGA HERNÁNDEZ DE MATÍAS

4º GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

- FACULTAD DE MEDICINA DE VALLADOLID-

TUTOR: EMILIANO QUINTO

INDICE:

PAGINAS:

RESUMEN	3
1.-INTRODUCCIÓN	4
1.1.-CARACTERÍSTICAS DE <i>C. SAKAZAKII</i>	4
1.2.-DENSIDAD OPTICA: LEY DE BEER-LAMBERT	5
2.-OBJETIVOS.....	7
3.-MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1.-CEPAS UTILIZADAS Y CULTIVO	7
3.2.-ESTUDIOS DE DENSIDAD ÓPTICA (OD)	7
3.2.1.-Ensayo 1: Relación lineal entre absorbancia y número de bacterias de <i>C. sakazakii</i> en dos medios diferentes.....	8
3.2.2.-Ensayo 2: Determinación de tiempo de detección.....	9
3.3.-CÁLCULO DEL TIEMPO DE GENERACIÓN (TG)	10
4.-RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	11
4.1.-Ensayo 1: Relación lineal entre absorbancia y número de bacterias de <i>C. sakazakii</i> en dos medios diferentes	11
4.2.-Ensayo 2: Determinación de tiempo de detección	12
4.3.-Recuentos en placa de <i>C. sakazakii</i>	15
4.4.-Cálculo del tiempo de generación	16
5.-CONCLUSIONES	16
6.-REFERENCIAS	17
7.-ANEXOS.....	19
7.1.-ENSAYO 1	19
7.1.1.-RESULTADOS CON TSB.....	19
7.1.2.-RESULTADOS CON SS.....	20
7.2.-ENSAYO 2	21
7.2.1.-RESULTADOS EN TSB	21
7.3. FOTOS DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	22

RESUMEN

Cronobacter sakazakii se ha aislado en fórmulas lácteas infantiles asociándolo con casos esporádicos o pequeños brotes de sepsis, meningitis y enterocolitis necrotizante en bebés prematuros e inmunodeprimidos. La infección es poco frecuente pero su tasa de mortalidad es elevada (40-80%) con graves secuelas neurológicas, hidrocefalia, retraso del desarrollo neural y tetraplejia en los individuos supervivientes.

El objetivo del ensayo experimental es hallar la relación lineal entre la absorbancia (o densidad óptica) y el número de bacterias de *C. sakazakii* y estimar el tiempo de detección a partir de poblaciones bajas de bacterias, para ello se observa el crecimiento exponencial de *C. sakazakii* en condiciones óptimas de temperatura (37°C) mediante una recta de calibrado y el tiempo de crecimiento a través del método de densidad óptica.

En primer lugar, se estudió la relación lineal entre la absorbancia y el número de bacterias de *C. sakazakii* en dos medios diferentes: caldo de soja tripticaseína (TSB) y solución salina (SS). En ambos casos, el coeficiente de determinación R^2 de la regresión lineal mostró unos valores aceptables para su aplicación posterior: 0.69 en TSB y 0.70 en SS.

Posteriormente, se estimó el tiempo de detección a partir de poblaciones bajas de bacterias (10^2 CFU/ml) y según los resultados, se concluye que el tiempo de detección para *C. sakazakii* es de aproximadamente 1h 15 min siguiendo un crecimiento exponencial a lo largo de la curva. Finalmente, se calculó la relación lineal entre los distintos tiempos de detección y las poblaciones bacterianas, obteniéndose un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9995$.

PALABRAS CLAVE: *Cronobacter sakazakii*, método de espectrofotometría, densidad óptica, correlación lineal, tiempo de detección.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-CARACTERÍSTICAS DE *C. SAKAZAKII*

Cronobacter sakazakii (conocido anteriormente como *Enterobacter sakazakii*) es un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracteriza por ser un bacilo móvil, Gram negativo, anaerobio facultativo y no esporulado que se comporta como un patógeno oportunista (Petrola, 2012).

Este microorganismo fue llamado inicialmente *Enterobacter cloacae* productor de pigmento amarillo, y en el año 1980 se clasificó como *Enterobacter sakazakii* por las diferencias obtenidas mediante pruebas de hibridación de ADN, reacciones químicas, producción de pigmento y susceptibilidad a antibióticos, con respecto al *Enterobacter cloacae* (Petrola 2012; Petrola et al., 2013).

Actualmente, *Cronobacter* ssp ha sido clasificado en 6 especies diferentes: *Cronobacter sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. dublinensis*, *C. mytjensii*, *C. turinensis* y *C. genomospecie* (Flores, 2011).

Las especies de *Cronobacter* son bioquímicamente ornitina positivas. Podemos decir que, *Cronobacter sakazakii* ha resultado ser más resistente a los cambios osmóticos y de baja humedad que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Cronobacter spp. se ha aislado en fórmulas lácteas infantiles en polvo asociado con casos esporádicos o pequeños brotes de sepsis, meningitis, infecciones de las vías urinarias y enterocolitis necrotizante (Pina Perez,, 2011).

La infección por este microorganismo es frecuente pero su tasa de mortalidad es elevada (40-80%) y puede acarrear graves secuelas neurológicas (hidrocefalia, retraso del desarrollo neural y tetraplejia) en los individuos supervivientes. La mayoría de las infecciones son observadas en bebés recién nacidos, en particular los bebés prematuros (menores a 28 semanas) con bajo peso al nacer (menos de 2.500g) e inmunocomprometidos (VIH positivos), siendo la mortalidad mayor de 50%, aunque este dato a disminuido en los últimos años a un 20% (Block et al., 2002; Breeuwer et al., 2003; Hamilton et al., 2003; Kandhai et al., 2004; WHO/FAO, 2004).

Aunque actualmente no se conoce el reservorio de *C. sakazakii*, este organismo ha sido identificado en los intestinos de ciertas moscas y en las fábricas donde se producen los preparados en polvo para lactantes estableciéndose como la causa de infección más frecuente en Estados Unidos y Europa con un patrón epidemiológico caracterizado por casos esporádicos y pequeños brotes en el ámbito

familiar y hospitalario, especialmente en las unidades de prematuros (Simmons et al., 1989; WHO/FAO, 2004).

Se cree que la contaminación por *C. sakazakii* puede tener lugar durante el proceso de fabricación con la adición posterior de micronutrientes al proceso de pasteurización, ya que *C. sakazakii* ha sido encontrada en muestras de latas selladas recién abiertas. Por lo tanto, la enfermedad causada por *C. sakazakii* en bebés ha sido asociada con el consumo de leche de fórmula comercialmente preparada para bebés y no estéril, sin que exista una evidencia de la transmisión de persona a persona o transmisión ambiental.

A pesar de todos los daños causados por *C. sakazakii*, es sensible a los desinfectantes y puede ser detectado siguiendo el tratamiento adecuado (Petrola, 2012).

1.2.-DENSIDAD OPTICA: LEY DE BEER-LAMBERT

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en una solución determinada. Se basa en la absorción de radiaciones electromagnéticas por las moléculas y depende de la cantidad de luz absorbida de forma lineal de la concentración. Para realizar estas medidas, se utiliza un espectrofotómetro, en el que se selecciona la longitud de onda de la luz que atravesara la solución obteniéndose finalmente un valor en nm.

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para su determinación y caracterización.

Se realizan cuantificaciones de las concentraciones de distintas muestras, pero para ello necesitamos conocer y utilizar la ley de Beer-Lambert.

La ley de Lambert-Beer fue descubierta entre 1790 y 1820. Esta ley propuso que la absorbancia de una muestra a determina longitud de onda depende de la cantidad de especie absorbente con la que se encuentra la luz al pasar por la muestra, es decir, expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución, estas relaciones se dan como:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Siendo a una constante de proporcionalidad llamada absorbancia. La magnitud de a dependerá de las unidades empleadas para b y c . A menudo b es dada en términos de cm y c en gramos por litro, entonces la absorbancia tiene unidades de $\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Cuando la concentración se expresa en moles por litro y la longitud de la celda en centímetros, la absorbancia se llama absorbancia molar, se designa como ϵ y tiene unidades de $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, entonces la absorbancia es:

$$A = \epsilon b c$$

Donde:

ϵ es el coeficiente de extinción molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b es la longitud de la muestra (cubeta) (cm)

c es la concentración del compuesto en solución (molL^{-1})

Por lo tanto, la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración –a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas-; pero también depende de la distancia que recorre la luz por la solución –a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará- (conocido como el trayecto óptico); y por último, depende de ϵ , probabilidad de que le fotón de cierta longitud de onda sea absorbido por el material -denominado coeficiente de extinción molar o coeficiente de absorción del material- que es específica de cada cromóforo (cubeta).

Cabe destacar que la ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de c altos, ϵ varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc.

La ley de Lambert-Beer es la base cuantitativa para los métodos espectroquímicos basados en medidas de absorbancia ya que establece una relación lineal entre ésta y la concentración de sustancia, mediante una recta de calibrado, de modo que mediante el ajuste lineal de las medidas obtenidas con disoluciones patrón de concentración conocida e interpolando el valor de absorbancia para nuestra muestra, podemos obtener la concentración de sustancia en la muestra problema (Zijlstra et al., 2000).

2.-OBJETIVOS

En este trabajo establecemos dos objetivos claramente diferenciados. En primer lugar se establece la relación lineal entre la absorbancia y el número de bacterias de *C. sakazakii* en dos medios diferentes: TSB y solución salina (SS). En segundo lugar, se estima el tiempo de detección a partir de poblaciones bajas de bacterias (10^2 ufc/ml).

Estos objetivos se buscan con el fin de demostrar el crecimiento exponencial lineal de *C. sakazakii* a lo largo del tiempo.

3.-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.-CEPAS UTILIZADAS Y CULTIVO

Se utilizó la cepa de *Cronobacter Sakazakii* CECT 858 suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo. La cepa fue reconstituida en caldo de soja tripticaseina (TSB; Pronadisa) incubándose a 37°C durante 24h.

A partir de la cepa ya reconstituida se procedió a la inoculación de 1 ml en tubos conteniendo 5 ml de TSB, incubándose a 37°C durante 24h. Se realizaron tres pases consecutivos con el fin de activar adecuadamente el sistema metabólico de las bacterias, obteniéndose así poblaciones, tras el tiempo indicado a la temperatura citada, de aproximadamente 10^9 ufc/ml.

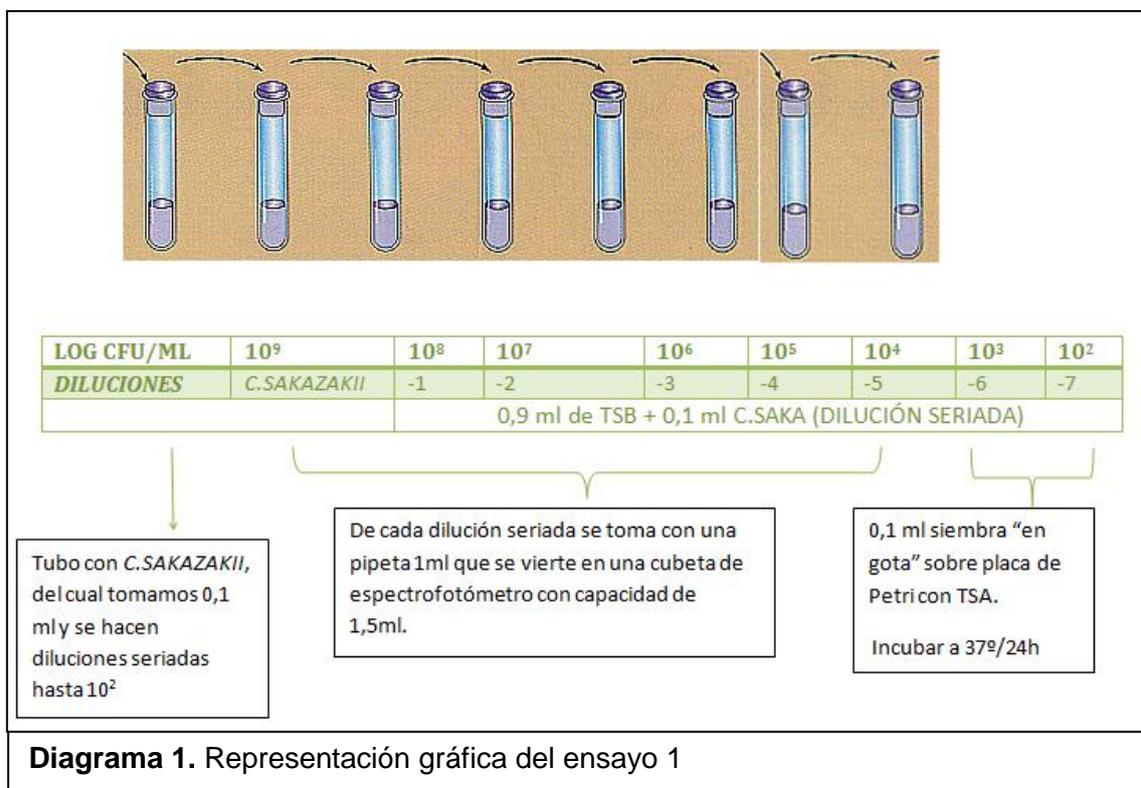
3.2.-ESTUDIOS DE DENSIDAD ÓPTICA (OD)

Se realizaron dos tipos de estudios de densidad óptica. Un primer estudio (ensayo 1) en el que se comprueba el crecimiento de *C. sakazakii* en dos medios TSB y solución salina (SS); y se mide su OD mediante un espectrofotómetro (Thermo Scientific Helios Epsilon) a una longitud de onda de 600 nm; y, un segundo estudio, (ensayo 2) donde se calcula el tiempo de detección de *C. sakazakii* en TSB, midiendo su OD cada 15 minutos.

3.2.1.-Ensayo 1: Relación lineal entre absorbancia y número de bacterias de *C. sakazakii* en dos medios diferentes.

En el ensayo 1, con el que se pretende obtener una recta de correlación $10^9 - 10^7$, a partir de los cultivos realizados en TSB, se realizaron diluciones decimales seriadas en TSB y SS, inoculando 0,1 ml del cultivo de la cepa de *C. sakazakii* en series de tubos que contenían 0,9 ml del diluyente citado; se realiza en TSB y en solución salina, para luego comprobar posibles diferencias entre los dos medios.

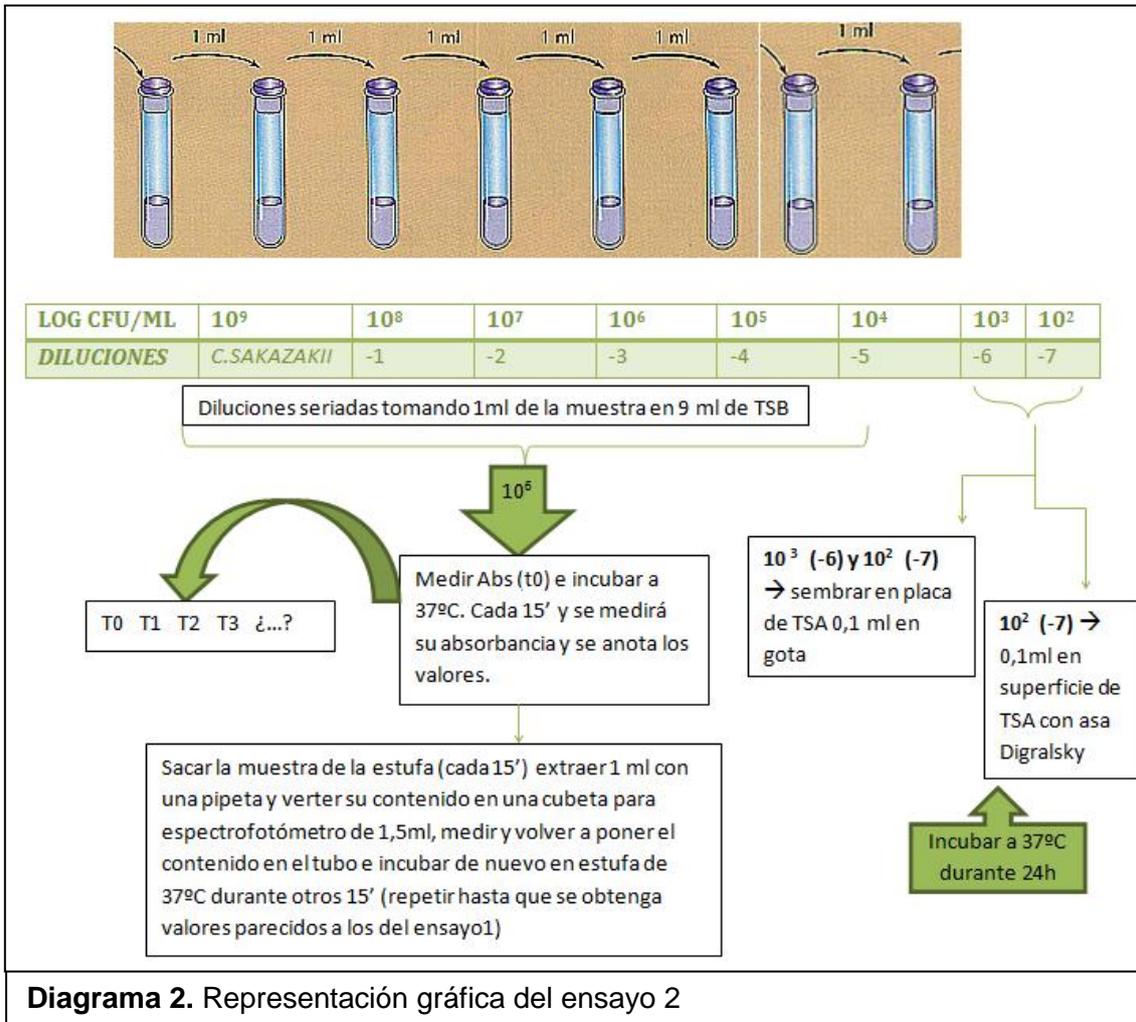
Se realizaron las diluciones seriadas pertinentes hasta llegar a la 10^{-7} (con aproximadamente 10^2 ufc/ml).



Adicionalmente, en el momento inmediatamente previo a la introducción de los módulos en la unidad del espectrofotómetro para medir su OD a 600 nm; se tomaron alícuotas de 0,1 ml de la dilución adecuada y se procedió a su siembra en placas de Petri que contienen Agar Trypticase Soy (TSA) incubándose a 37°C (ES-Orbital Shaker-Incubator.Biosan) durante 24 h. Las siembras se hacen siguiendo el método de "gota" con las muestras de los tubos correspondientes a las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} ; y además, se realiza una nueva siembra del tubo correspondiente a la dilución 10^{-7} en TSA con asa de Digrafsky. De esta forma se enumeró la población de *C. sakazakii* previamente al comienzo de cada ensayo espectrofotométrico.

3.2.2.-Ensayo 2: Determinación de tiempo de detección.

El ensayo 2 sigue la misma metodología que el ensayo 1; a partir de los cultivos realizados de *C. sakazakii* en TSB, se realizan diluciones seriadas inoculando 1 ml del cultivo de la cepa en series de tubos preparadas que contienen 9 ml de TSB. Se realizaron las diluciones hasta llegar a la 10^{-7} (con aproximadamente 10^2 CFU/ml).



En el ensayo 2, se pretende calcular los tiempos de detección t1, t2, t3,... de distintas poblaciones del microorganismo. Para ello, se comenzó buscando el tiempo de detección desde la dilución 10^{-3} (10^6 CFU/ml) hasta llegar a un valor de 10^{-2} (10^7 CFU/ml); se toman los tubos correspondientes a la dilución 10^{-3} (10^6 CFU/ml) y se incuban a 37°C en la estufa durante periodos repetidos de 15 min; tras estos periodos, se extraen de la estufa, se toma una alícuota de 1 ml, se vierte en una cubeta (cubillete semi-micro 1,5ml) y se mide su OD en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Se tomaron medidas hasta que las absorbancias obtenidas

mostraban un crecimiento evidente de la bacteria, superando el límite de detección de la técnica (10^7 CFU/ml).

Cuando ya se conocen los tiempos de detección para *C. sakazakii* desde la dilución 10^{-3} hasta 10^{-2} ; calculamos nuevamente el tiempo de detección para el segundo tramo comprendido desde la dilución correspondiente a 10^{-5} (10^4 CFU/ml) hasta llegar a valores cercanos al límite de detección de la técnica: dilución 10^{-2} (10^7 CFU/ml). Y, para finalizar, siguiendo el mismo método, tomamos el último tramo comprendido desde la dilución 10^{-7} (10^2 CFU/ml) hasta obtener valores de 10^4 CFU/ml. Uniendo los valores de los 3 tramos se obtiene una recta de calibrado.

Además de las diluciones seriadas y del control del tiempo de crecimiento de *C. sakazakii*, los recuentos en placa siguen la misma metodología que en el ensayo 1.

Como objetivo final se pretende buscar la unión del ensayo 1 y el ensayo 2 en el uso del tiempo de detección para determinar el tiempo de generación de *C. sakazakii*.

3.3.-CÁLCULO DEL TIEMPO DE GENERACIÓN (TG)

Debido a que se realizaron siembras de dos concentraciones diferentes de *C. sakazakii* (concentraciones finales 10^2 y 10^4 CFU/ml), se obtuvieron tiempos de detección diferentes para cada una de ellas. A partir de los tiempos de detección, se calcularon los tiempos de generación de cada cepa según Firstenberg-Eden y Eden (1984):

$$TG = (\Delta TD \times \log_{10} 2) / (\log_{10} N_1 - \log_{10} N_2) \quad (1)$$

Donde ΔTD es el incremento del tiempo de detección (TD) entre las dos poblaciones inoculadas seleccionadas, $\log_{10} N_1$ es el logaritmo decimal del recuento del inóculo con mayor población, y $\log_{10} N_2$ es el logaritmo decimal del recuento del inóculo con menor población.

Debido a que la diferencia entre las dos poblaciones es de dos ciclos logarítmicos, $(\log_{10} N_1 - \log_{10} N_2) = 2$. Además, $\log_{10} 2 = 0,301$. Por todo ello, la expresión (1) se redefine como:

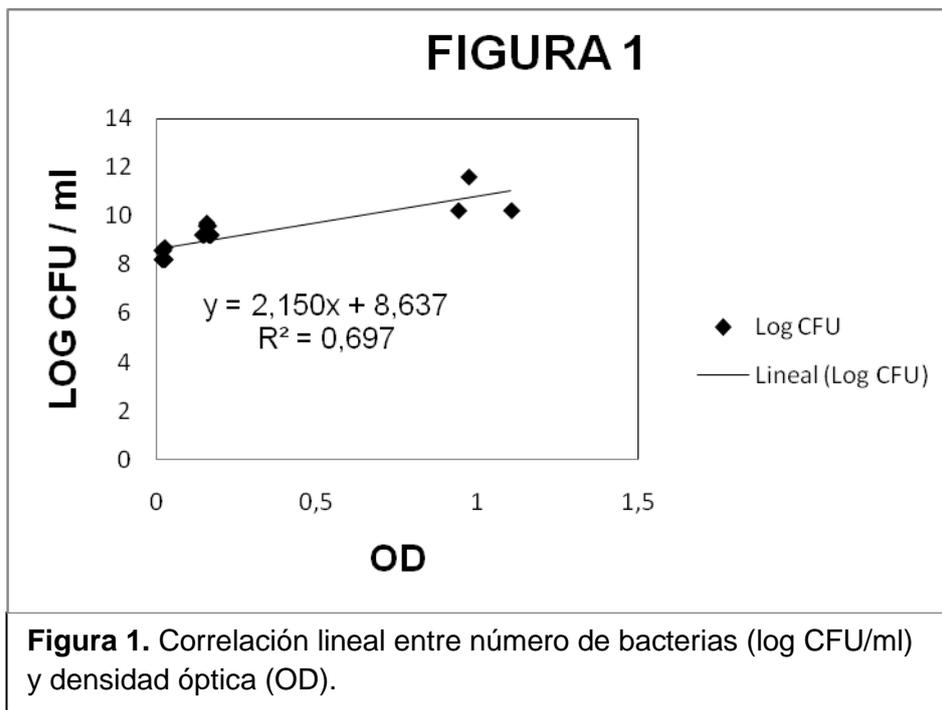
$$TG = 0,15 \times \Delta TD \quad (2)$$

4.-RESULTADOS y DISCUSIÓN

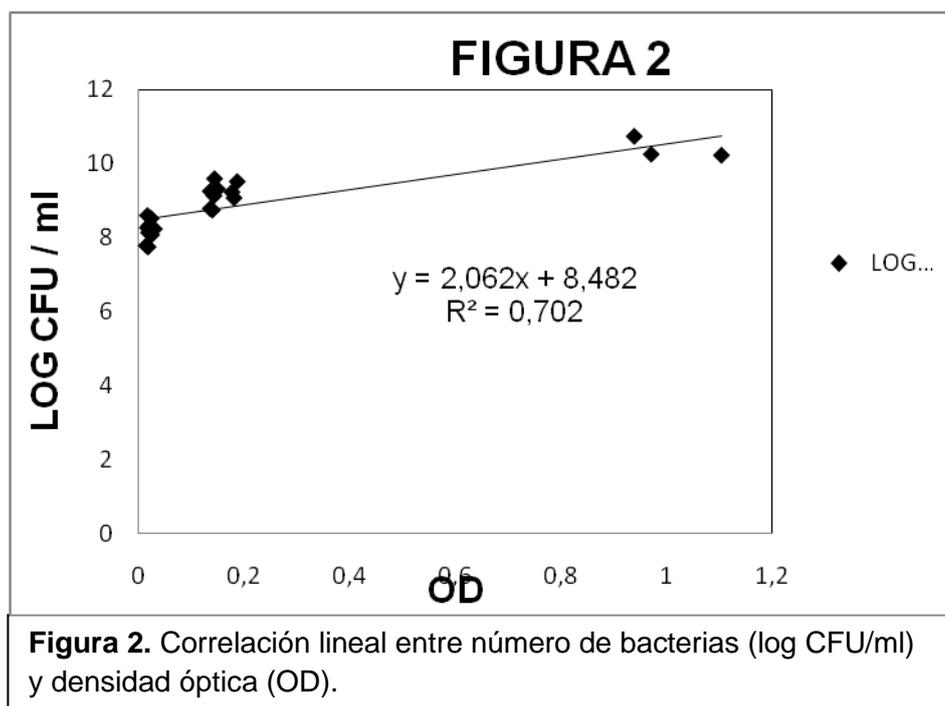
Para determinar el crecimiento de *C. sakazakii* se han realizado dos experimentos diferentes; en primer lugar, en el ensayo 1, se busca el crecimiento de *C. sakazakii* en dos medios de cultivo diferentes por medio de una recta de calibrado. Y, en segundo lugar, en el ensayo 2, se calcula el tiempo que tarda en crecer a unas determinadas condiciones de temperatura (37°C), el microorganismo *C. sakazakii* midiendo cada 15 min su OD en el espectrofotómetro: el tiempo de detección.

4.1.-Ensayo 1: Relación lineal entre absorbancia y número de bacterias de *C. sakazakii* en dos medios diferentes.

El ensayo 1, se realizó durante 3 días consecutivos y repetido 3 veces por cada muestra, recogiendo los datos y reflejándolos en una única recta de calibrado en medio TSB (Figura 1): $y = 2,1503x + 8,6373$; $R^2 = 0,6973$.



Si siguiendo la misma metodología, se obtiene una recta de calibrado en solución salina (SS) (Figura 2): $y = 2,0626x + 8,4825$; $R^2 = 0,7025$.



Comprobamos cómo el crecimiento de *C. sakazakii* es un crecimiento exponencial que sigue una distribución lineal y no hay diferencias significativas con respecto de los dos medios utilizados, TSB y SS. Se observa que en la Figura 2, la recta tiene una R^2 mayor, esto puede ser debido a que el medio de SS tiene menor turbidez y la lectura en el espectrofotómetro es más clara.

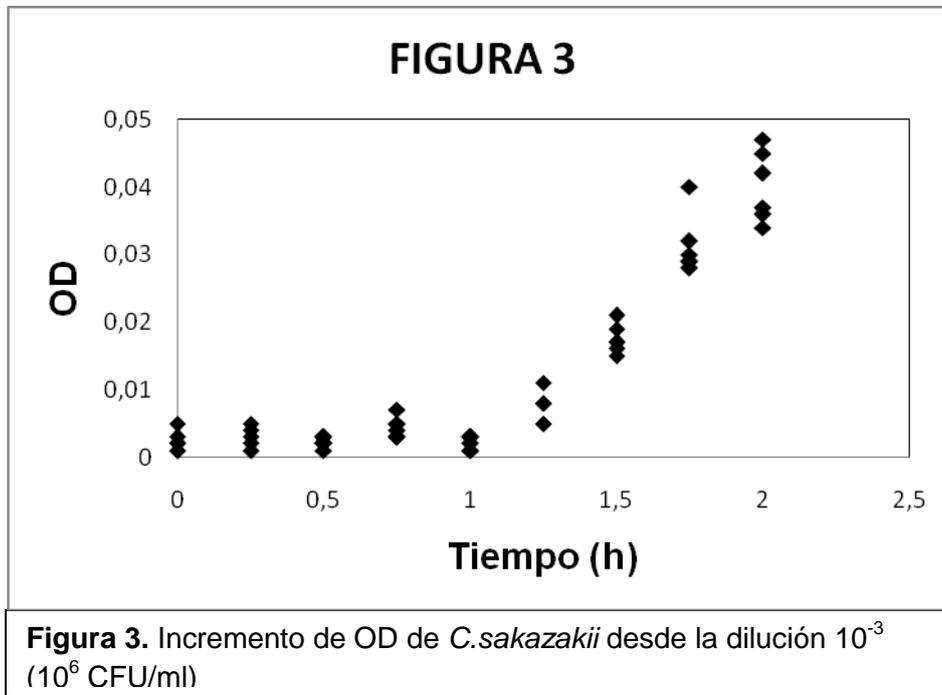
4.2.-Ensayo 2: Determinación de tiempo de detección

El objetivo es buscar el tiempo de detección y para ello las muestras utilizadas se han ido midiendo cada 15 min. El cálculo del tiempo de detección se ha dividido en 3 experimentos consecutivos.

El experimento comienza con la toma de las muestras de la dilución 10^{-6} y se mide su OD en el espectrofotómetro a tiempo 0 min; sucesivamente se van haciendo mediciones cada 15 min hasta que se detecta crecimiento en las mediciones de OD a 600 nm.

Para obtener la siguiente curva, el experimento se ha realizado en dos días consecutivos con muestras de *C. sakazakii* frescas y cada muestra se ha repetido 3 veces, con lo que conseguimos 6 valores de cada medición de 15 min, los cuales quedan reflejados en la siguiente recta (Figura 3).

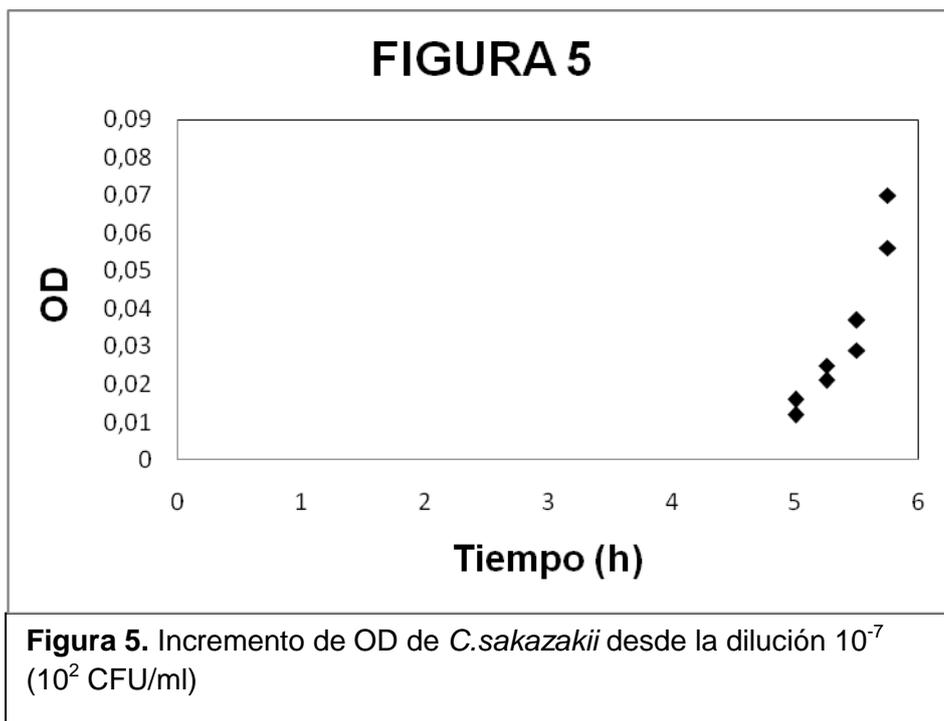
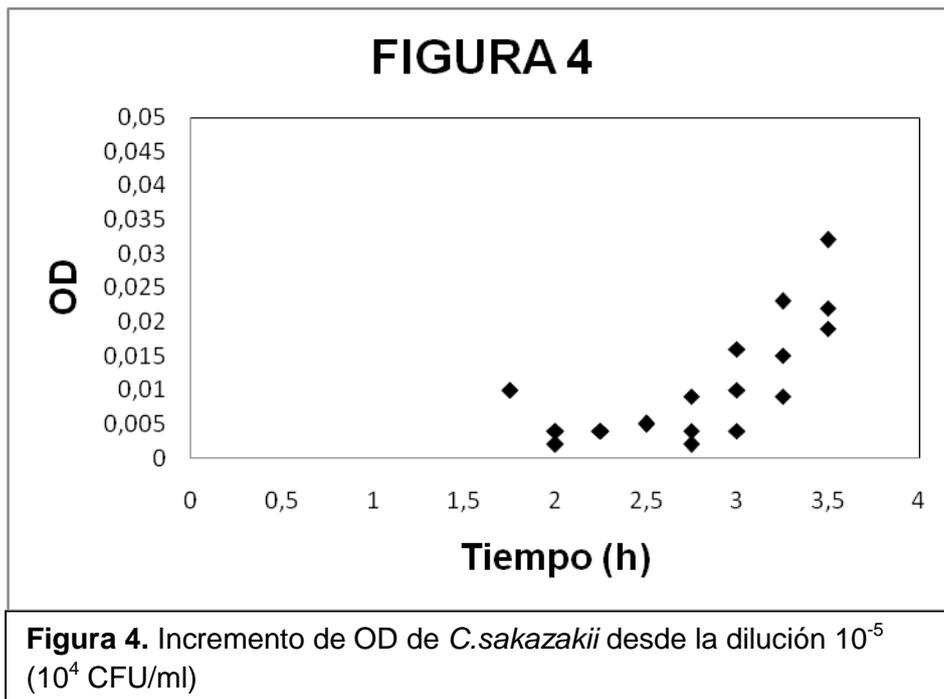
En la Figura 3, queda reflejado visualmente que el tiempo de detección por espectrofotometría se encuentra entre 1 y 1,5 h, por lo tanto, el tiempo de detección sería entorno a 1h 15 min.



Siguiendo la misma metodología, pero esta vez desde la dilución 10^{-5} , se registran los siguientes valores reflejados en la gráfica de crecimiento (Figura 4).

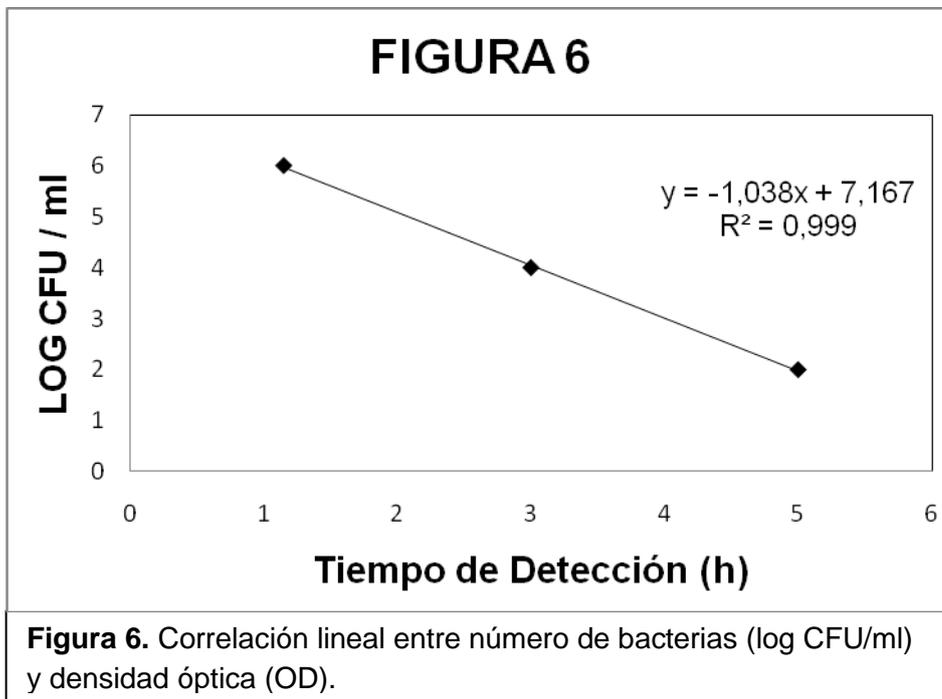
En la Figura 4, el tiempo de detección por el método de espectrofotometría es próximo a las 3 h.

Para finalizar el objetivo marcado, el tiempo de detección de *C. sakazakii*, se realiza un último experimento, siguiendo las indicaciones y metodología anterior, pero esta vez desde la dilución 10^{-7} (Figura 5).



A partir de los resultados mostrados en las Figuras 3, 4 y 5, se calcularon los puntos medios de detección entre los últimos valores de densidad óptica en su fase horizontal y los primeros puntos de densidad óptica en su fase de incremento.

En la Figura 6 se muestra la relación lineal entre los TD calculados y las poblaciones de *C. sakazakii*: $y = -1,0384x + 7,1672$; $R^2 = 0,9995$.



4.3.-Recuentos en placa de *C. sakazakii*.

Para la confirmación de las poblaciones microbianas se ha utilizado el recuento de colonias de *C.sakazakii* en medios de cultivo sólidos, concretamente en TSA, realizando un recuento de colonias en el ensayo 1 con la técnica de “en gota”, y en el ensayo 2 con la técnica “en gota” y con el asa de Digrafsky. Figura 7.

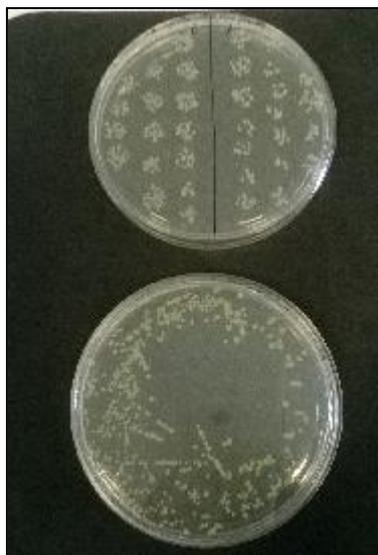


Figura 7. Foto de las diferentes siembras; técnica “en gota” (arriba) y siembra con asa de Digrafsky (abajo).

4.4.-Cálculo del tiempo de generación.

Desde la dilución 10⁻² a la dilución 10⁻⁴:

$$\Delta TD = TD_{10^2} - TD_{10^4} = [(300+285)/2] - [(180+165)/2] = 292,5 - 172,5 = 120 \text{ min.}$$

$$TG = 0,15 \times 120 = 18 \text{ min.}$$

Desde la dilución 10⁻⁴ a la dilución 10⁻⁶:

$$\Delta TD = TD_{10^4} - TD_{10^6} = [(180+165)/2] - [(75+60)/2] = 172,5 - 67,5 = 105 \text{ min.}$$

$$TG = 0,15 \times 105 = 15,75 \text{ min.}$$

El tiempo de generación lo obtenemos en min, obteniéndose una diferencia entre ambos de 2,25 min.

5.-CONCLUSIONES:

En el trabajo de investigación realizado tenemos dos objetivos principales, la relación lineal entre absorbancia y el número de bacterias de *C. sakazakii* y la estimación del tiempo de detección a partir de poblaciones bajas de bacterias.

Partiendo de la base de nuestros objetivos marcados y uniéndolos en un solo objetivo, podemos concluir que el *C. sakazakii* en condiciones óptimas de temperatura de 37°C, tiene un crecimiento exponencial según la recta de calibrado del ensayo 1, y una curva de crecimiento que comienza a partir de 1 h 15 min según los cálculos obtenidos en el ensayo 2.

Ambos ensayos quedan unidos en la Figura 6, representándose una recta de calibrado cuyos ejes son el tiempo de detección (h) y log CFU/ml. El resultado es una R² de 0,9995 con lo que la relación lineal obtenida puede ser utilizada para posteriores estudios con el fin de estimar la población de *C. sakazakii* a partir de los tiempos de detección que se obtengan tras la inoculación de concentraciones bacterianas problema.

A pesar de trabajar con el método de densidad óptica y hallar buenos resultados, también se han realizado siembras con la técnica "en gota" y con asa de Digrafsky en medio TSA para confirmar las poblaciones bacterianas estudiadas en los distintos estudios.

6.-REFERENCIAS

Block C. et al. 2002. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *European Journal of Microbiology and Infectious Disease*, 21:613–616.

Breeuwer P. et al. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology*, 95:967–973.

Flores J.P. 2011. Evaluación de riesgos microbianos en alimentos preparados en un hospital materno infantil. Programa de posgrado en alimentos del centro de la republica (PROPAC). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Santiago Querétaro. Venezuela.

Hamilton J.V., M.J. Lehane, H.R. Braig. 2003. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans* [letter to the editor]. *Emerging Infectious Diseases*, 9(10):1355–1356.

Kandhai C.M. et al. 2004. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households [research letters]. *Lancet*, 363:39–40.

Petrola M.E. 2012. Evaluación de algunos factores que afectan el desarrollo de *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles. Caracas, Venezuela. Marzo. Trabajo de Postgrado en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias.

Petrola M., A. Martínez, E. Tomé, T. Luigi, T. Rojas. 2013. Efecto de la temperatura de refrigeración y calentamiento de fórmulas lácteas infantiles en el crecimiento de *Cronobacter sakazakii*. *An Venez Nutr* 26(2): 106-111

Pina Perez MC. 2011. Aplicación de tecnologías no-térmicas de conservación, pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), y altas presiones hidrostáticas (APH), para el control de *Cronobacter sakazakii* en fórmula láctea infantil: desarrollo de modelos predictivos y valoración de la exposición. Primera edición, 2012. Editorial Universitat Politècnica de València.

WHO/FAO 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, meeting report. Geneva, World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations (Microbiological Risk Assessment Series 6).

Zijlstra W.G., Buursma A., Van Assendelft O.W. (eds) 2000. Spectrophotometry. En: Visible and near infrared absorption spectra of human and animal hemoglobin: determination and application. VSP BV, Zeist, The Netherlands. pp 17-24.

Simmons, B; Gelfand, M; Haas, M; Metts, L y Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 10(9):398-341.

7.-ANEXOS

7.1.-ENSAYO 1

7.1.1.-RESULTADOS CON TSB:

DILUCIONES SERIADAS EN TSB Y MEDIDA DE ABS A 600nm (longitud de onda)								
Repeticiones	Blanco	10-1	-2	-3	-4	-5	-6 PLACA	-7 PLACA
A	0	0,161	0,016	0,003	0	0	-	-
B	0	0,168	0,022	0,002	0	0	-	163
C	0	0,166	0,017	0,002	0,001	0	-	-

Medida de absorbancia de la muestra de *C. sakazakii*: 1,104

DILUCIONES SERIADAS EN TSB Y MEDIDA DE ABS A 600nm (longitud de onda)								
Repeticiones	Blanco	-1	-2	-3	-4	-5	-6 PLACA	-7 PLACA
A	0	0,147	0,023	0,007	0	0	-	-
B	0	0,141	0,021	0,003	0,001	0	-	-
C	0	0,161	0,025	0,004	0,002	0	-	-

Medida de absorbancia de la muestra de *C. sakazakii*: 0,939

DILUCIONES SERIADAS EN TSB Y MEDIDA DE ABS A 600nm (longitud de onda)								
Repeticiones	Blanco	-1	-2	-3	-4	-5	-6 PLACA	-7 PLACA
A	0	0,153	0,020	0,002	0	0	-	IC
B	0	0,0160	0,015	0,008	0	0	-	384
C	0	0,155	0,024	0,014	0,001	0	-	502

Medida de absorbancia de la muestra de *C. sakazakii*: 0,971

7.1.2.-RESULTADOS CON SS:

DILUCIONES SERIADAS EN TSB Y MEDIDA DE ABS A 600nm (longitud de onda)								
Repeticiones	Blanco	-1	-2	-3	-4	-5	-6 PLACA	-7 PLACA
A	0	0,177	0,030	0,003	0	0	IC	172
B	0	0,181	0,025	0,002	0,001	0	-	119
c	0	0,187	0,024	0,016	0	0	-	332

Medida de absorbancia de la muestra de *C. sakazakii*: 1,104

DILUCIONES SERIADAS EN TSB Y MEDIDA DE ABS A 600nm (longitud de onda)								
Repeticiones	Blanco	-1	-2	-3	-4	-5	-6 PLACA	-7 PLACA
A	0	0,140	0,018	0,003	0,001	0	-	56
B	0	0,150	0,019	0,003	0,002	0	-	206
c	0	0,136	0,015	0,001	0,001	0	-	61

Medida de absorbancia de la muestra de *C. sakazakii*: 0,939

DILUCIONES SERIADAS EN TSB Y MEDIDA DE ABS A 600nm (longitud de onda)								
Repeticiones	Blanco	-1	-2	-3	-4	-5	-6 PLACA	-7 PLACA
A	0	0,136	0,017	0,001	0,001	0	IC	183
B	0	0,143	0,019	0,001	0	0	-	137
c	0	0,144	0,017	0	0	0	-	398

Medida de absorbancia de la muestra de *C. sakazakii*: 0,971

7.2.-ENSAYO 2

7.2.1.-RESULTADOS EN TSB:

Medida de absorbancia de la muestra de <i>C. sakazakii</i> : 1.080												
Repeticiones	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	-6 PLACA GOTA	-7 PLACA GOTA	-7 PLACA DIGRALSKY
A	0.002	0.005	0.002	0.005	0.003	0.011	0.017	0.032	0.037	IC	IC	IC
B	0.003	0.002	0.002	0.005	0.002	0.005	0.017	0.029	0.034	IC	104	341
C	0.005	0.004	0.003	0.007	0.003	0.008	0.021	0.040	0.074	IC	IC	423

Medida de absorbancia de la muestra de <i>C. sakazakii</i> : 1.051												
Repeticiones	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	-6 PLACA GOTA	-7 PLACA GOTA	-7 PLACA DIGRALSKY
A	0.001	0.001	0.003	0.003	0.001	0.008	0.016	0.029	0.042	IC	183	175
B	0.001	0.003	0.002	0.003	0.003	0.008	0.019	0.030	0.045	IC	403	238
C	0.002	0.001	0.001	0.004	0.001	0.005	0.015	0.028	0.036	IC	101	90

Medida de absorbancia de la muestra de <i>C. sakazakii</i> : 1.061											
Repeticiones	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	-6 PLACA GOTA	-7 PLACA GOTA	-7 PLACA DIGRALSKY
A	0.001	0.004	0.004	0.005	0.009	0.016	0.023	0.032	IC	368	478
B	-	0.002	-	-	0.002	0.004	0.09	0.019	428	308	254
C	-	0.001	-	-	0.004	0.010	0.015	0.022	IC	380	466

7.3. FOTOS DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL



Foto 1. Siembra de *C. sakazakii* en TSB.



Foto 2. Preparación de placas de TSA



Foto 3. Diluciones seriadas en TSB.

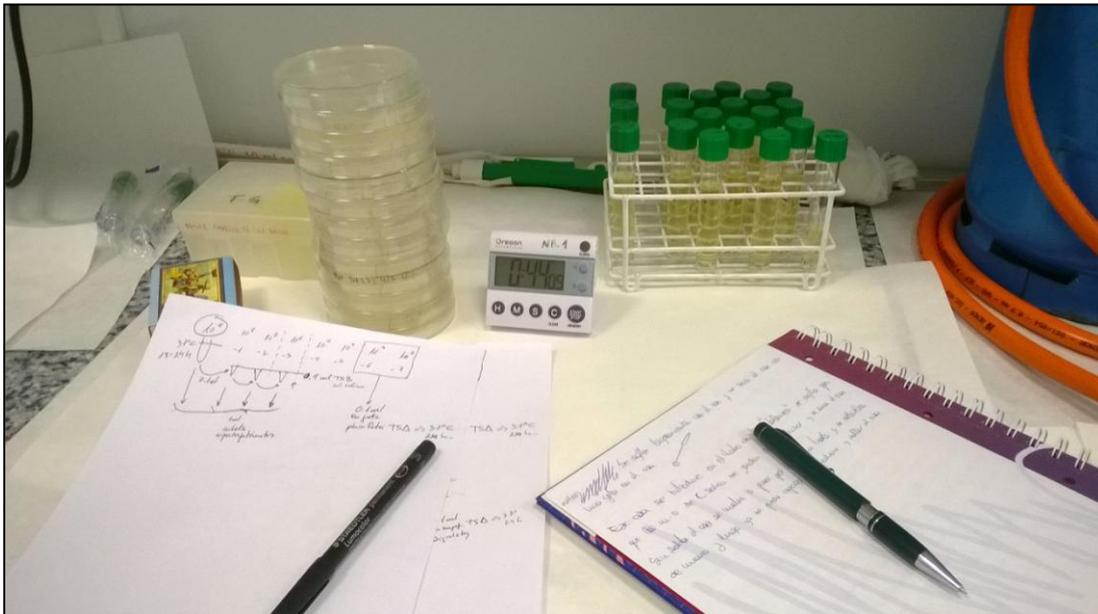


Foto 4. Diluciones seriadas y siembras en TSA de las diluciones del ensayo 1



Foto 5. Gradilla con diluciones seriadas

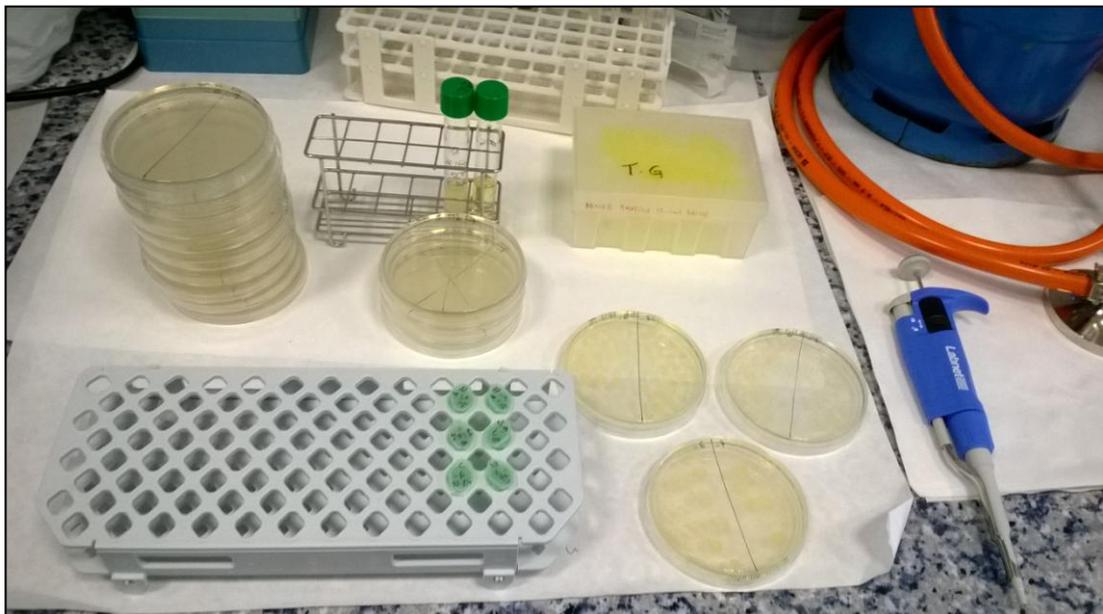


Foto 6. Siembra de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} con la técnica "en gota"



Foto 7. Mediciones en el espectrofotómetro de las diferentes diluciones seriadas

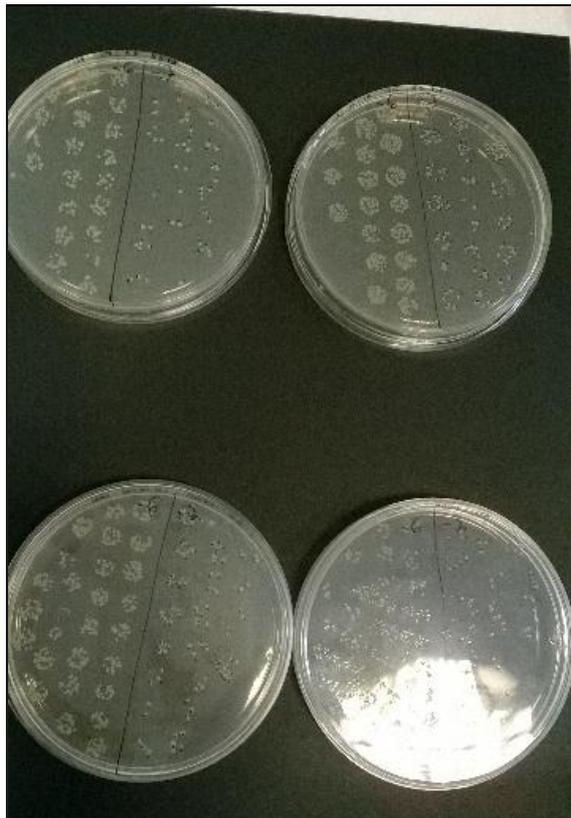


Foto 8. Lectura de la siembra en placa de TSA de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7}



Foto 9. Incubadora a 37°C donde se incuban las muestras durante 15 min hasta su medición en el espectrofotómetro (ensayo 2).

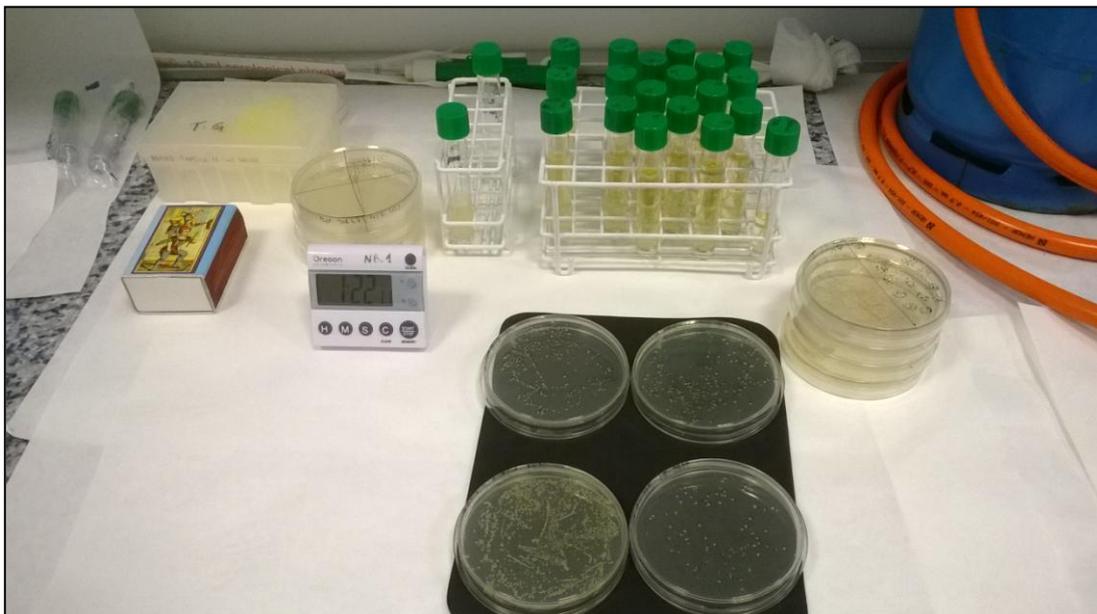


Foto 10. Diluciones seriadas y siembras en placa de TSA del ensayo 2.