

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA  
ESCUELA DE BIOLOGIA



**“Identificación de *Enterobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* en preparados en polvo para lactantes suministrados en el Hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán” de la red de salud pública de San Salvador, El Salvador”.**

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO POR:

DANIELA BEATRIZ FLORES JUÁREZ.

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**“Identificación de *Enterobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* en preparados en polvo para lactantes suministrados en el Hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán” de la red de salud pública de San Salvador, El Salvador”.**

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO POR:  
BR. DANIELA BEATRIZ FLORES JUÁREZ.

PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

JURADO: \_\_\_\_\_

M.SC. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA

JURADO: \_\_\_\_\_

M.SC. CORALIA DE LOS ÁNGELES GONZÁLEZ DE DÍAZ

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**“Identificación de *Enterobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* en preparados en polvo para lactantes suministrados en el Hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán” de la red de salud pública de San Salvador, El Salvador”.**

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO POR:

BR. DANIELA BEATRIZ FLORES JUÁREZ.

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

ASESORA: \_\_\_\_\_

LIC. ÁNGELA GUDELIA PORTILLO

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE DE 2014

## **AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

RECTOR:

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL:

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FISCAL:

LIC. FRANCISCO CRUZ LETONA

DECANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

M.Sc. MARTIN ENRIQUE GUERRA CÁCERES

SECRETARIO:

LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE BIOLOGIA:

LIC. RODOLFO FERNANDO MENJÍVAR

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, SEPTIEMBRE 2014.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi abuela Haydeé de Juárez “Mamá Te”, porque me inculcó el hábito de estudio, a mi abuelo Salvador Juárez “Papá Chamba”, por mostrarme el espíritu que conllevan las letras.

A mi madre, Claudia Juárez, que no me dejó caer en ningún momento durante todos estos años y que nunca conocí mujer más fuerte que ella.

A mi Padre, Danilo Flores, por enseñarme los misterios de la ciencia de una manera maravillosa.

A mi tía Iris Mejía y Lili Rubio, que en los últimos momentos siempre me ayudaron y empujaron hasta llegar al final; y mi tía Gabriela Juárez por siempre cuidarme al igual que el resto de mi familia.

Al personal del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud -CENSALUD- que me ayudaron, enseñaron y estuvieron pendientes de mi, durante la fase de laboratorio de esta tesis.

Al personal del Centro Hospitalario donde fue realizada esta investigación, quienes me permitieron y facilitaron la realización del mismo.

A mi asesora, Lic. Gudelia Portillo, que sin ella esta investigación no hubiera sido posible.

Al jurado calificador, que siempre me mostro su apoyo y enseñanza durante este proceso.

Y sobre todo a Dios por darme la fuerza y la sabiduría durante todos estos años y por haberme permitido llegar hasta acá a pesar de los momentos más difíciles, y que nunca me dejó olvidar que si una puerta se cierra, siempre habrán miles más que se abrirán.

DANIELA BEATRIZ FLORES JUÁREZ

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	No. de Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE ANEXOS.....	6
I. RESUMEN.....	7
III. MARCO TEÓRICO.....	11
4.1 CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	11
4.2 INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA.....	11
4.3 TÉCNICAS EN INOCUIDAD MICROBIOLÓGICAS.....	13
4.3.1 <i>Análisis de peligro y puntos críticos de control (HACCP)</i> .....	13
4.3.2 <i>Buenas prácticas de Manufactura (BPM)</i> .....	14
4.3.3 <i>Prácticas Operativas estandarizadas sanitarias (POES)</i> .....	15
4.4 MICROORGANISMOS PRESENTES EN PPL.....	15
4.4.1 <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	25
4.4.2 <i>Salmonella enterica</i> .....	28
4.5 MECANISMOS DE FABRICACIÓN EN PPL (FARBER Y FORSYTHE, 2008).....	29
4.6 TRATAMIENTOS TÉRMICOS.....	31
4.7 FORMAS DE RECONSTITUCIÓN DE LOS PPL.....	33
4.8 DIRECTRICES DE PREPARACIÓN (FAO/OMS, 2007).....	33
IV. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	37
A. OBJETIVO GENERAL.....	37
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
V. MARCO METODOLÓGICO.....	38
5.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	38
5.1.1 <i>Ubicación Geográfica</i> .....	38
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.2.1 <i>Fase de recolección de datos</i> .....	39
5.2.2 <i>Fase de Laboratorio</i> .....	41
5.2.3 <i>Diseño Estadístico</i> .....	45
VI. RESULTADOS.....	46
6.1 <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> .....	46
6.2 <i>SALMONELLA ENTERICA</i> .....	49
VII. DISCUSIÓN.....	52
VIII. CONCLUSIONES.....	55
IX. RECOMENDACIONES.....	57

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59
XI. ANEXOS.....	68

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Contenido</b>	<b>No. de página</b>
CUADRO I. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> , TOMADA DE FARBER, J. Y FORSYTHE, S. 2008. ....	25
CUADRO II. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> TOMADA DE MADIGAN, ET. AL 2009. ....	28
CUADRO III. CUADRO DE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LA FASE DE LABORATORIO PARA <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> .....	46
CUADRO IV. CUADRO DE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LA FASE DE LABORATORIO PARA <i>SALMONELLA ENTERICA</i> . ....	49
CUADRO V. CUADRO UTILIZADO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS DURANTE LA FASE DE LABORATORIO PARA <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> .....	87
CUADRO VI. CUADRO UTILIZADO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS DURANTE LA FASE DE LABORATORIO PARA <i>SALMONELLA ENTERICA</i> . ....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	No. de página
FIG. 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL CENTRO ASISTENCIAL EN DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO. IMAGEN TOMADA DE GOOGLE EARTH 2008. ....	38
FIG. 2. REPRESENTACIÓN DE LAS PUNTOS DE MUESTREO. ....	86
FIG. 3. MEDICIÓN Y SEPARACIÓN DE LAS CANTIDADES DE LECHE EN GRAMOS. ....	89
FIG. 4. SUSPENSIONES UNIFORMES EN AGUA DESTILADA ESTERILIZADA. ....	89
FIG. 5. 10ML DE SUSPENSIÓN AGREGADOS A 90ML DE CALDO DE ENRIQUECIMIENTO DE EE. ....	90
FIG. 6. 0.1ML DE SUSPENSIÓN AGREGADOS A 10ML DE CALDO RAPPAPORT Y 1ML AGREGADOS A 10ML DE CALDO DE TT. ....	90
FIG. 7. TOMA DE ASADA DE CADA ENRIQUECIMIENTO EE EN CAJAS PETRI CON AGAR VRBG. ....	91
FIG. 8. TOMA DE ASADA DE CALDO RAPPAPORT Y TT EN CAJAS PETRI CON AGAR XLD. ....	91
FIG. 9. SELECCIÓN DE CAJAS PETRI CON COLONIAS SOSPECHOSAS DE <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> . .....	91
FIG. 10. SELECCIÓN DE CAJAS PETRI CON COLONIAS SOSPECHOSAS DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> . ..	92
FIG. 11. SELECCIÓN DE CAJA PETRI CON CRECIMIENTO BACTERIANO EN TSA. ....	92
FIG. 12. REALIZACIÓN DE PRUEBA EN TSI. ....	92
FIG. 13. APLICACIÓN DE PRUEBA API® 20E (BIOMÉRIEUX). ....	93
FIG. 14. CAJA PETRI CON COLONIA SOSPECHOSA PARA <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> . ....	94
FIG. 15. CAJA PETRI CON COLONIA SOSPECHOSA PARA <i>SALMONELLA ENTERICA</i> . ....	94
FIG. 16. CAJAS PETRI EN AUSENCIA DE CRECIMIENTO DE COLONIAS SOSPECHOSAS PARA <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> . ....	94
FIG. 17. CAJA PETRI EN AUSENCIA DE CRECIMIENTO DE COLONIAS SOSPECHOSAS PARA <i>SALMONELLA ENTERICA</i> . ....	95
FIG. 18. CAJA PETRI CON CRECIMIENTO BACTERIANO EN TSA. ....	95
FIG. 19. PRUEBA DE API® 20E (BIOMÉRIEUX). ....	95

## ÍNDICE DE ANEXOS.

Contenido	No. de página
ANEXO 1. UTILIZACION DE PPL EN ENTORNOS ASISTENCIALES. ....	68
ANEXO 2. VIÑETA DE CONTROL. ....	85
ANEXO 3. PUNTOS DE MUESTREO. ....	86
ANEXO 4. CUADRO DE RECOLECCIÓN DE DATOS. ....	87
4.1 <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> . ....	87
4.2 <i>SALMONELLA ENTERICA</i> . ....	88
ANEXO 5. REFERENCIAS FOTOGRAFICAS DE LOS PROCEDIMIENTOS EFECTUADOS DURANTE LA FASE DE LABORATORIO PARA <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> Y <i>SALMONELLA ENTERICA</i> . ....	89
ANEXO 6. FOTOGRAFÍAS DE ALGUNOS DE LOS CRECIMIENTOS OBTENIDOS Y APLICACIÓN DE API® 20E (BIOMÉRIEUX). ....	94

## I. RESUMEN

Los Preparados en Polvo para Lactantes o PPL, son sustancias utilizadas para la sustitución parcial o total de la alimentación materna; generalmente son utilizadas por los hospitales en niños prematuros, neonatos inmunodeficientes, hijos de madres VIH-positivas, y/o con un peso menor a los 2.5 kg según lo reporta la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación como también la Organización Mundial para la Salud (FAO/OMS 2007).

De los microorganismos que existen en la leche y sus productos, existen algunos que son considerados importantes, ya que están clasificados como grupos que pueden desempeñar algún papel, ya sea en deteriorar la leche, la fabricación de diversos productos lácteos y en brotes de enfermedades cuyo origen puede remontarse a la leche y sus productos. Por tanto es necesario conocer la inocuidad alimentaria (INA, 2011) .

Dentro de los peligros biológicos existentes en los PPL se encuentran *E. sakazakii* y *Salmonella spp.* El Codex Alimentarius en 2004, reporta que *E. sakazakii* se encuentra con mayor frecuencia que *Salmonella spp.* en el entorno de la fabricación de las fórmulas; y de acuerdo con CAC/RCP en 2008, cuando se trata de productos deshidratados, como los PPL, no es posible utilizar la tecnología actual para producir PPL que contengan bajas concentraciones de microorganismos, es decir, estos productos no pueden ser esterilizados.

Para evitar posibles enfermedades y en ocasiones la muerte provocados por *E. sakazakii* o *S. enterica*, es necesario la implementación de Buenas Prácticas Higiénicas (BPH), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y la aplicación de Sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) en los centros hospitalarios, especialmente en países como el nuestro.

Siendo el Hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán” el hospital que alberga a la mayoría de paciente neonatos de nuestro país, se decidió

realizar análisis microbiológico para erradicación y/o control de las enfermedades producidas por *E. sakazakii* y *S. enterica*. Finalizado el estudio se concluyó, que a pesar que en los 4 puntos de control seleccionados durante el proceso de preparación de fórmulas en el centro hospitalario, no se encontró presencia de *E. sakazakii* y/o *S. enterica*, es necesario recalcar que existe la presencia de bacterias patógenas oportunistas, que pueden afectar a neonatos, y que suelen estar presentes en el ambiente de las unidades de cuidados intensivos y los lugares de reconstitución de los PPL, provocando infecciones graves en los neonatos de bajo peso, o inmunodeficientes. Por lo que es necesario elaborar los PPL con base a las directrices proporcionadas por la FAO/OMS en 2007.

## II. INTRODUCCIÓN

Dentro de los 262 municipios que pertenecen a El Salvador, el hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán”, es el hospital que alberga a la mayoría de pacientes, dada la cantidad de pacientes neonatos que se atienden en dicho centro hospitalario (entre los 1306 y 8720) un aproximado del 20% necesitan de cuidados especiales y de alimentación especial, por ejemplo, el uso de Preparados en Polvo o PPL.

Es conocido que los PPL son sustancias utilizadas para la sustitución parcial o total de la alimentación materna; generalmente son utilizadas por los hospitales en niños prematuros, neonatos inmunodeficientes, hijos de madres VIH-positivas, y/o con un peso menor a los 2.5 kg según lo reportan la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación como también la Organización Mundial para la Salud (FAO/OMS, 2007), debe recordarse que los PPL solo deben ser suministrados bajo una prescripción médica, ya que la lactancia materna, internacionalmente es conocida como la mejor fuente de nutrición (CAC/RAC, 2008).

A pesar que los PPL son productos deshidratados, no son productos que se encuentren totalmente estéril, por lo tanto no se garantiza que posea concentraciones bajas y aceptables de diversos microorganismos, especialmente de *Enterobacter sakazakii* y/o *Salmonella enterica*.

Para evitar posibles enfermedades y en ocasiones la muerte provocadas por *E. sakazakii* o *S. enterica*, es necesario la implementación de Buenas Prácticas Higiénicas (BPH), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y la aplicación de Sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) en los centros hospitalarios, especialmente en los de nuestro país. A consecuencia de la falta de información con la que cuentan los centros hospitalarios nacionales acerca de estos patógenos y de las posibles enfermedades generada por ellos, es necesario que se lleve a cabo un estudio de análisis microbiológico para el control de las enfermedades producidas por *E. sakazakii* y *S. enterica* -si se llegasen a encontrar-. Dicho

estudio es pionero en nuestro país, el cual contribuyó al aporte científico de las instituciones de salud pública salvadoreña; ya que es un estudio que está siendo exigido por la Organización Mundial para la Salud (OMS) a nivel mundial, sobre todo en países tropicales como el nuestro.

Se concluyó, que a pesar que en los análisis microbiológicos de los 4 puntos de control (PPL sin reconstituir, PPL reconstituido, PPL después de la esterilización y PPL después de 24 hrs. de refrigeración) seleccionados en el centro hospitalario realizados en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) desde octubre de 2013 hasta marzo 2014, no se encontró presencia de *E. sakazakii* y/o *S. enterica*, es necesario recalcar que existe la presencia de bacterias patógeno oportunistas, que afectan a neonatos, y que suelen estar presentes en las unidades de cuidados intensivos, dispensadores de aguas contaminados, ambiente, etc.; provocando infecciones graves en los neonatos de bajo peso, o inmunodeficientes. El estudio permitió identificar la inocuidad del alimento preparado.

### III. MARCO TEÓRICO.

#### 4.1 Contaminación Microbiológica.

Los microorganismos patógenos pueden pasar de un alimento a otro por contacto directo o bien a través de quienes los manipulan, de las superficies de contacto o del aire, es probable que sea necesario restringir o controlar el acceso a las áreas de elaboración, si el riesgo es elevado en las áreas de elaboración, se requerirá entonces de un vestuario especial –ropa protectora, limpia y el lavado de manos antes de ingresar a las instalaciones-. Las superficies, los utensilios, el equipo, los aparatos y los muebles se limpiarán cuidadosamente y, en caso necesario, se desinfectarán después de manipular o elaborar materias primas alimenticias (Codex Alimentarius, 2005).

#### 4.2 Inocuidad Microbiológica.

La inocuidad alimentaria se refiere a la garantía de que los alimentos no son responsables del daño a la persona consumidora cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan; por tanto deben estar libres de peligros físicos, químicos y peligros biológicos que puedan causar un efecto adverso a la salud (INA, 2011).

Dentro de los peligros biológicos existentes en los PPL se encuentran *E. sakazakii* y *Salmonella spp.*, por lo que el Codex Alimentarius en 2004, reporta que *E. sakazakii* se encuentra con mayor frecuencia que *Salmonella spp.* en el entorno de la fabricación de las fórmulas, que es una fuente potencial de contaminación después del tratamiento térmico, indicando que la detección de *Salmonella spp.* es rara en los PPL; y de acuerdo con CAC/RCP en 2008, cuando se trata de productos deshidratados, como los PPL, no es posible utilizar la tecnología actual para producir PPL que contengan bajas concentraciones de microorganismos, es

decir, estos productos no pueden ser esterilizados. Por lo tanto para conseguir su inocuidad microbiológica, se debe cumplir de manera rigurosa las Buenas Prácticas de Higiene en todo el proceso de fabricación y uso.

Según estudios realizados por la FAO/OMS en 2007, *E. sakazakii* y *S. enterica* no son capaces de multiplicarse en los PPL secos, se ha demostrado que *E. sakazakii* puede llegar a sobrevivir hasta un año o más en PPL secas. La PPL reconstituida, en cambio, ofrece un medio idóneo para la proliferación de organismos patógenos. Si el almacenamiento de PPL reconstituidas se encuentran a temperaturas superiores a 5°C se logrará un crecimiento de *S. enterica* y de *E. sakazakii*, especialmente si el almacenamiento es durante un periodo prolongado.

En 2007 la FAO/OMS logró identificar tres categorías de microorganismos con base a las pruebas de relación causal entre la presencia de los organismos en los PPL y la enfermedad de éstos:

- Microorganismos con claras pruebas de causalidad, específicamente, *S. enterica* y *E. sakazakii*.
- Microorganismos para los cuales la causalidad es posible, pero que no ha sido demostrada todavía, es decir, son causas comprobadas de enfermedad en lactantes y han sido encontrados en los preparados para lactantes, pero no se ha demostrado de manera convincente – ya sea epidemiológica o microbiológicamente – que el preparado contaminado sea el vehículo y la fuente de infección.
- Microorganismos en los cuales la causalidad es menos probable o no ha sido demostrada todavía, como aquéllos que, a pesar de causar enfermedad en lactantes, no han sido identificados en los preparados, o bien microorganismos que han sido identificados en los preparados para lactantes pero que no han sido implicados como agentes de dicha enfermedad en los lactantes, tales como: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Para CAC/RCP en 2008, *E. sakazakii* y *Salmonella* pueden introducirse en los preparados en polvo por cuatro vías:

1. A través de los ingredientes añadidos en las operaciones de mezclado en seco durante la fabricación del preparado.
2. Por contaminación del preparado a partir del ambiente de elaboración en las de secado o después de este.
3. Por contaminación del preparado tras la apertura del envase.
4. Durante la reconstitución del preparado que efectúa la persona que se ocupa del lactante previamente a su administración, o después de haberlo reconstituido.

Por lo tanto para producir alimentos inocuos y aptos para el consumo humano, según el CAC/RCP en 2008 se debe seguir ciertos procesos operacionales, como las técnicas en inocuidad microbiológicas.

#### **4.3 Técnicas en Inocuidad Microbiológicas.**

Para OIRSA en 2000, existen millones de enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos, etc., los cuales se encuentran en varios alimentos y que comprometen la salud de miles de personas alrededor del mundo, por lo que se hace indispensable la implementación de técnicas que ayuden a prevenir y/o eliminar dichos microorganismos.

##### **4.3.1 Análisis de peligro y puntos críticos de control (HACCP).**

Según la International HACCP Alliance en 2012, se conoce como HACCP al Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, y que funciona como un sistema para asegurar la producción de alimentos inocuos, por lo que es de carácter preventivo-no reactivo, por tanto no debe utilizarse para lograr objetivos de calidad, o que no sean la inocuidad del alimento. Dicho sistema se puede definir como la herramienta óptima de trabajo para facilitar y racionalizar las actividades necesarias para garantizar la seguridad en toda

la cadena de producción alimentaria. Es además una aproximación sistemática hacia la identificación, evaluación y control de la seguridad alimentaria. Su objetivo principal debe prevenir la posible ocurrencia de riesgos en los alimentos que puedan dañar la salud del consumidor (OIRSA 2000).

#### **4.3.2 Buenas prácticas de Manufactura (BPM).**

En 2000 para OIRSA las BPM, debe entenderse como el conjunto de procedimientos, condiciones y controles que se aplican en las plantas empacadoras para minimizar riesgos de contaminación de alimentos (frutas y vegetales), contribuyendo a la calidad, seguridad alimenticia y a la salud y satisfacción del consumidor. Es indispensable que las BPM se implementen en toda la cadena de producción hasta el consumo final; si existe una ausencia de BPM, los riesgos que podrían surgir son los siguientes:

- Riesgos microbiológicos
- Riesgos químicos
- Riesgos físicos.

Una implementación adecuada de las BPM debe involucran los siguientes elementos:

- Las instalaciones exteriores e interiores
- El transporte
- El almacenamiento
- La capacitación, salud e higiene del personal
- Las prácticas de procesamiento
- Los programas de limpieza y saneamiento
- El control de plagas.

Las BPM constituyen el prerrequisito más importante del HACCP y el de más amplia cobertura.

#### **4.3.3 Prácticas Operativas estandarizadas sanitarias (POES).**

De acuerdo con la AMNAT en 2011, las POES son todos aquellos procedimientos de saneamiento escritos que describen y explican cómo realizar una tarea para lograr un fin específico de la mejor manera posible. En un establecimiento en donde se elaboran alimentos se debe desarrollar e implementar las POES para la prevención de la contaminación directa o la adulteración de los alimentos que ahí se produzcan, fabriquen, elaboren y/o comercialicen. Existen varias actividades/ operaciones, además de las de limpieza y desinfección, que se llevan a cabo en un establecimiento elaborador de alimentos que resulta conveniente estandarizar y dejar constancia escrita de ello para evitar errores que pudieran atentar contra la inocuidad del producto final. Ejemplos: monitoreo del funcionamiento de termómetros, recetas de todos los alimentos que se elaboran, transporte de los alimentos, selección de materias primas, mantenimiento en caliente de comidas preparadas, etc.

#### **4.4 Microorganismos Presentes en PPL.**

Según Foster et al; en 1957 en la leche y sus productos pueden encontrarse una variedad de microorganismos, algunos de ellos son considerados propios de la flora normal de la leche y sus productos.

De los microorganismos que existen en la leche y sus productos, existen algunos que son considerados importantes, ya que están clasificados como grupos que pueden desempeñar algún papel, ya sea en deteriorar la leche, la fabricación de diversos productos lácteos y en brotes de enfermedades cuyo origen puede remontarse a la leche y sus productos.

La leche en polvo y sobre todo los PPL, contienen relativamente bajos números de microorganismos sobrevivientes. Los organismos resistentes al

calor (formadores de esporas y no formadores) y moho, son responsables del deterioro de la leche en polvo, sí al producto se le permite la absorción de humedad durante periodos prolongados de almacenamiento (Leatherhead Food International, 2009).

#### **4.4.1 *Serratia marcescens*.**

*Serratia marcescens* ha sido identificada como un bacteria Gram-negativa, que forma parte de las bacterias Enterobacteriaceae. Esta bacteria ha sido reconocida como un patógeno oportunista y agente de enfermedades nosocomiales por las últimas dos décadas, y que es capaz de crecer en condiciones extremas como desinfectantes, antisépticos y agua doblemente destilada (Hejazi y Falkiner, 1997). *Serratia* puede ser encontrada en agua, tierra, y también se encuentra asociada con plantas insectos y animales, y posee una temperatura de crecimiento de 37 °C, como lo menciona Mahlen en 2011.

La transmisión de este patógeno se da por la ingesta de alimentos contaminados y por el contacto directo. Las transmisiones nosocomiales pueden deberse al contacto con la mano del personal hospitalario y por otros pacientes (Public Health Agency of Canada, 2012c).

Las infecciones causadas por *Serratia* en neonatos son frecuentes (11-15% dentro de la unidad de cuidados intensivos para neonatos) y puede incluir infecciones en el torrente sanguíneo (42%), conjuntivitis (26%), neumonía (13%), infecciones en el tracto urinario (8%), meningitis (7%), infecciones de tipo quirúrgico, endocarditis y diversos tipos de heridas. Existen otro tipo de infecciones documentadas en infantes (otitis externa, enterocolitis, gastroenteritis, artritis séptica, e infecciones enteroperitoneales/abscesos), pero son poco comunes. También ha sido encontrado colonias de *S.marcescens* dentro el tracto umbilical en un 65%, debido probablemente a la solución salina. Los factores de riesgo incluyen el peso de nacimiento, el uso de ventilación mecánica, el tiempo de gestación (por debajo de 37

semanas tienen altas probabilidades de contaminación) y el rango de mortandad en neonatos es del 44% (Mahlen, 2011; Public Health Agency of Canada, 2012c).

La inactivación de *Serratia* puede lograrse por medio de UV, microondas, radiación gamma, y vapor a una temperatura de 121°C por lo menos durante 20 minutos, y en calor seco por 165-170°C por 2 horas (Public Health Agency of Canada, 2012c).

#### **4.4.2 *Salmonella* spp.**

Leatherhead Food International en 2009, menciona que han existido muchos casos significativos de salmonelosis asociados con la leche en polvo, y *Salmonella* ha llegado ser considerada como un serio potencial peligroso en estos productos.

Las especies de *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*) producen síntomas muy parecidos a los que produce la enterotoxina causada por *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, pero con *Salmonella* está implicada una exotoxina, que tarda aproximadamente de 12 a 30 horas para la aparición de los síntomas.

Estas bacterias suelen destruirse con una pasteurización debidamente realizada, aunque se han presentado casos en los cuales *Salmonella* ha podido crecer en temperaturas inferiores a los 4 °C y capaces de soportar temperaturas de hasta 48 °C, aunque su crecimiento óptimo se presenta en el rango de 35 a 37 °C (Leatherhead Food International, 2009).

#### **4.4.3 *Staphylococcus aureus*.**

La contaminación de leche en polvo por enterotoxinas producidas por *Staphylococcus* durante los años 50's fue un problema significativo, regularmente causado por el crecimiento y producción tóxica en la leche concentrada antes de la fase de secado de la leche. Mejoramientos en

cuanto a la temperatura e higiene antes de la fase de secado han ido eliminando este problema (Leatherhead Food International, 2009).

El crecimiento y producción de la toxina es mejor en presencia de oxígeno, pero puede crecer en ambientes anaeróbicos. Es conocido que *Staphylococcus* puede sobrevivir a temperaturas congelantes, pero su rango de temperatura óptimo de crecimiento se encuentra entre los 30-37 °C (Ash, 1997; Leatherhead Food International, 2009).

Según Ash en 1997, algo importante que destacar es el hecho que el crecimiento de *S. aureus* puede darse a una baja actividad hídrica ( $a_w$ ). Los organismos son resistentes a la fase de secado y pueden crecer y producir enterotoxinas en comidas a una  $a_w$  tan abajo como 0.85; lo que quiere decir que su habilidad para crecer a una  $a_w$  baja le da una ventaja competitiva en alimentos con  $a_w$  bajas. A pesar que la  $a_w$  de la leche en polvo (0.3-0.4) es muy baja para cualquier crecimiento microbiano, debe tenerse en cuenta las medidas higiénicas adecuadas.

La enterotoxina producida por *S. aureus* es responsable de severos dolores abdominales, diarrea, náuseas y vómitos (Albrecht, 2013).

#### **4.4.4 *Listeria monocytogenes*.**

Para Leatherhead Food International en 2009 no han sido reportados casos de listeriosis asociados con la leche en polvo, sin embargo la ubicuidad de este microorganismo dentro de las plantas lecheras y los casos de listeriosis vinculados con otros productos lácteos sugieren que la contaminación en leche en polvo es probable.

Se han reportado la destrucción de los microorganismos durante el secado y la esperanza de vida durante el almacenamiento (Marth y Steele, 2001). Aunque listeria puede sobrevivir a temperaturas menores a (-7°C), y crece mejor a temperaturas de -18 a 10°C, por lo que listeria puede ser transmitida

en alimentos listos para consumir que han sido propiamente refrigerados (Ramaswamy et al., 2007).

Según Ramaswamy et al., en 2007, el riesgo de listeriosis es más elevado en mujeres embarazadas y sus fetos, bebés prematuros, ancianos e individuos que presentan cuadro inmunodeficiencia. Las infecciones causadas por *L. Monocytogenes* son: gastroenteritis, meningoencefalitis, cerebritis, etc.

#### **4.4.5 *Bacillus spp.***

Por lo general este tipo de bacterias son relativamente grandes (3 a 9  $\mu$  de longitud), la mayoría son Gram-positivas, aunque hay pocas excepciones. Hay algunas bacterias pertenecientes a este género las cuales se encuentran en la leche en polvo (Foster et al; 1957).

*Bacillus licheniformis* ha sido aislada de alimentos contaminados, como leche cruda y alimentos para bebés. En Croacia *B. Licheniformis* fue la responsable de un brote, en la cual el factor causal fue el mantenimiento de la leche por dos 2 horas antes de su consumo, sin hervir. *B. licheniformis* es responsable de causar gastroenteritis alimentaria, también es conocida por causar septicemia, peritonitis, oftalmítis, y contaminación alimenticia, como también toxemia bovina y abortos. (Salkinoja-Salonen et al., 1999)

*Bacillus cereus* suele ser comúnmente un contaminante de la leche en polvo, suele sobrevivir por muchos meses en la leche en polvo, y se ha demostrado un rápido crecimiento en leche reconstituida a temperatura ambiente; esta especie forma esporas que resisten hasta temperaturas de 63°C aplicadas por espacio de 30 minutos, y ha demostrado la reproducción de toxinas a temperaturas de refrigeración, aunque su crecimiento óptimo se encuentra entre 28-35°C (Wong, 1988; Leatherhead Food International, 2009)

*B. cereus* además de causar enfermedades alimenticias, es capaz de causar mastitis, infecciones sistémicas, gangrena, meningitis en niños

inmunocomprometidos, es también asociado con causar diarrea y dolor abdominal. (Wong, 1988; Swift, 2010)

#### **4.4.6 *Clostridium spp.***

Foster et. al; en 1957, menciona a este grupo de bacterias como Gram-positivas en forma de bastoncillo, que producen olores desagradables y gas.

*Clostridium perfringens* puede ser encontrada en una diversidad de lugares, incluyendo; comida, agua y aire. Sus células vegetativas suelen tener una resistencia de 100°C por 60 minutos. *C. perfringens* es responsable de enfermedades como enteritis necrótica o gangrena gaseosa.

*C. perfringens* es un organismo que no esta ampliamente asociado en productos en polvo, y sobre todo con aquellos a base de leche, en los cuales ha sido responsables de echar a perder leche cruda, pasteurizada y aquella leche que ha sido procesada por Ultrapasteurización (UHT) (Marth y Steele, 2001).

#### **4.4.7 *Escherichia coli.***

Una reserva importante de *E. coli* son las vacas lecheras, por lo que este organismo puede estar presente en la leche cruda, usualmente por contaminación fecal. Sin embargo *E. coli* no es capaz de sobrevivir (y no hay evidencia) a la pasteurización. A pesar de esto, han existido brotes asociados a leche pasteurizada, uno de ellos fue en Escocia en 1994 infectando a mas de 100 personas (Leatherhead Food International, 2009).

*E. coli* es capaz de causar nauseas, vómitos, cólicos abdominales y diarrea en niños menores de dos años y es la principal causa de diarrea del viajero (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

Es de recalcar que Leatherhead Food International en 2009, menciona que *E. coli*, no ha sido informada que sea capaz de crecer en leche cruda o pasteurizada almacenada a 5 °C, pero podría crecer a temperaturas más elevadas. Por todo lo anterior se debe mantener un sumo cuidado en la

preparación de los PPL, y sobre todo, ya que estos son un producto no esterilizado por lo que pueden contener coliformes y otro tipo de bacterias en cantidades bajas, las especificaciones microbiológicas vigentes de Codex para los PPL muestran las cantidades que pueden existir en estos productos.

#### **4.4.8 *Citrobacter spp.***

Puerta-García y Mateos-Rodríguez en 2010 menciona que todos aquellos miembros del género *Citrobacter* se les denomina así debido a su capacidad de utilizar citrato como su única fuente de carbono.

Los miembros del género *Citrobacter* son muy reconocidos por ser patógenos oportunistas, los cuales crecen a temperaturas de 32 o 35 °C, y que pueden atacar a personas inmunodeficiencia y debilitadas (especialmente a niños) generalmente asociada a infecciones nosocomiales, debido a la colonización o procedimiento invasivo (cateterismo, biopsias o broscoscopia, etc.) (Marth y Steele, 2001; Mahon et al., 2010).

*Citrobacter* puede ser inactivada por rayos UV, microonda, radiación gamma, al vapor a una temperatura de 121°C por lo menos 20 min y por calor seco 165-170°C por dos horas (Public Health Agency of Canada, 2012a).

Usualmente se encuentran en el tracto urinario, y causar infecciones intraabdominales, infecciones de tejidos blandos, osteomielitis, dolores de cabeza, náuseas y vómitos (Marth y Steele, 2001; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

#### **4.4.9 *Enterobacter cloacae***

Mezzatesta et al; en 2012, hace referencia a que *E. cloacae* es una bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa, y está dispersa en la naturaleza.

Generalmente se encuentra dentro del tracto gastrointestinal de humanos y animales como también se puede encontrar en los desagües, y se encuentra asociada con brotes nosocomiales y son considerados como patógenos

oportunistas, esta especie está claramente asociada con infecciones en la zona pulmonar, torrente sanguíneo y es causante de infecciones humanas extraintestinales. Esta bacteria posee un crecimiento a una temperatura óptima de 22-37°C. (Farber y Forsythe, 2008; Public Health Agency of Canada, 2011).

*E. cloacae* es responsable de la mayoría de infecciones por *Enterobacter*, 65-75%, generalmente encontrada en las unidades de cuidados intensivos de los centros hospitalarios y son responsables del 8.6% de las infecciones nosocomiales de acuerdo con el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (Public Health Agency of Canada, 2011).

*E. cloacae* puede ser inactivada por vapor a una temperatura de 121°C por 15 a 30 min., y por calor seco a 160-170° C por 1-2 horas (Public Health Agency of Canada, 2011).

#### **4.4.10 *Providencia spp.***

*Providencia* es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, la cual se encuentra en múltiples reservorios animales como pulgas, perros, gatos, etc, también es comúnmente encontrada en tierra, agua y desagües, con un crecimiento a una temperatura óptima de 22-35°C. Es un patógeno oportunista también encontrada en el tracto urinario, sangre y esputo (Feyzioğlu et al., 2013). Aunque para Hawley et al; en 2012 existen casos en los cuales *Providencia spp.* está asociada con gastroenteritis y bacteriemia y según Mahon et al., en 2010 *Providencia* ataca a personas inmunodeficiencia, debilitados, y causante de infecciones nosocomiales, generalmente en personas con uso prolongado de catéter.

#### **4.4.11 *Pseudomona fluorescens***

*P. fluorescens* es una bacteria Gram-negativa, no fermentadora de lactosa, la cual puede sobrevivir y replicarse en reservorios húmedos, dado que puede crecer a temperaturas menores a los 4°C, aunque su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra en los 37°C; por lo que puede causar brotes nosocomiales (Wong et al; 2011).

Este tipo de bacterias son comúnmente encontradas en la leche, ya que son agentes versátiles de descomposición. Estas bacterias pueden proceder del suelo o del agua, generalmente de dispensadores de aguas contaminados (Foster et al; 1957).

Generalmente las *Pseudomonas* invaden el tejido del huésped causando infección y bacteriemia en huéspedes inmunocomprometidos; tales infecciones pueden ser endocarditis, osteomielitis, infecciones en el tracto urinario, infecciones gastrointestinales, meningitis y comúnmente septicemia. La esterilización e inactivación utilizando vapor debería ser a una temperatura de 121°C por 15 min o más, y por calor seco a 170-250° C por 30 minutos o más (Public Health Agency of Canada, 2012b).

Para Codex Alimentarius en 2004, existe una relación entre el valor demostrativo de una relación causal entre los PPL y los microorganismos o toxinas microbianas con respecto a las enfermedades en los neonatos se clasifican de la siguiente manera:

##### **a. *Microorganismos de Categoría “A”- Pruebas Claras de Causalidad.***

Los microorganismos en estudio –*E. sakazakii* y *S. enterica*- pertenecen a la categoría “A”, ya que causan enfermedades en los lactantes y que ya han sido encontrados en los PPL. Se reconoce que los PPL, tanto a nivel epidemiológico como microbiológico, son el vehículo y la fuente de infección en los lactantes.

Un punto importante que recalca el Codex Alimentarius en 2004, es que aunque existan diferencias en la ecología microbiana entre *S. enterica* y *E. sakazakii*, es muy probable que muchas estrategias de reducción para *E. sakazakii* sean también aplicables para otro grupo de enterobacterias (aunque estas enterobacterias sean más difíciles de detectar) y *S. enterica*.

***b. Microorganismos de Categoría “B”- Causalidad admisible, pero todavía no demostrada.***

Enfermedades en los lactantes como infecciones sistémicas, NEC y diarrea graves, pueden ser causadas por otro grupos de enterobacteriáceas que se agrupan en la categoría B, ya que estas se han encontrado en PPL, pero que no se ha demostrado de una manera absoluta y convincente que los preparados sean los contaminados. Estos microorganismos pueden ser: *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *C. freundii*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae*.

Estos microorganismos son posibles patógenos que pueden ser transmitidos mediante los PPL y que cada vez mas son de importancia como patógenos neonatales.

***c. Microorganismos de Categoría “C”- Causalidad menos admisible o todavía no demostrada.***

Los microorganismos pertenecientes a esta categoría, son los que causan enfermedades a los lactantes pero que no se han encontrado en los PPL o que no se ha demostrado que sean los causantes de tal enfermedad.

Estos microorganismos son: *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

A sabiendas que *E. sakazakii* y *S. enterica* se reconocen como aquellos microorganismos causantes de infecciones en los lactantes, se abordarán con mayor profundidad a continuación:

#### 4.4.1 *Enterobacter sakazakii*.

##### a. Clasificación.



Clasificación Científica	
Nombre científico:	<i>Enterobacter sakazakii</i>
Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Enterobacter</i>

Cuadro I. Clasificación científica de *E. sakazakii*, tomada de Farber, J. y Forsythe, S. 2008.

##### b. Descripción.

*Enterobacter sakazakii*, es una bacteria Gram-negativa, aerobia facultativo y móvil que no forma esporas, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, produce enterotoxinas, aerobactinas y hemaglutininas; sin embargo, se desconoce su mecanismo de patogenicidad.

Para 1980 la bacteria *E. sakazakii* era conocida como *Enterobacter cloacae*, el cambio de nombre se debe a las diferencias genéticas encontradas hoy en día.

Vanegas et al; en 2009, menciona que este microorganismo puede encontrarse en una amplia variedad de alimentos, aguas y ambientes, por lo que se considera como un organismo ambiental. Al ser una bacteria tan extendida, podemos encontrarla también en ambientes donde se manufacturan alimentos infantiles, tales como fábricas de alimentos, hospitales, instituciones, guarderías y hogares. Por consiguiente, el

organismo puede tener acceso a la línea de elaboración y al producto, ya que la tecnología actual no logra eliminarla completamente del entorno de fabricación (CAC/RCP, 2008).

El Código Alimenticio Centroamericano (CAC/RCP) en 2008, enfatiza que *E. Sakazakii* es un patógeno oportunista emergente de alto riesgo, actualmente todo el personal de salud, las empresas elaboradoras de productos lácteos desecados están en alerta debido a su vinculación a procesos infecciosos invasivos, si bien la incidencia de estos en los lactantes es baja, Simón et. al; en 2010, menciona que la bacteria posee una alta tasa de morbilidad y mortalidad entre el 40% y 80% y que dejan en algunos casos, importantes secuelas neurológicas teniendo la particularidad de estar relacionado directamente al consumo de fórmulas a base de leche en polvo, preparadas para niños lactantes, debido a su contaminación después del tratamiento térmico aunque cada vez es mayor el tipo de alimentos que se han identificado como vehículos de esta bacteria, ya que su alta resistencia térmica en comparación a otros organismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, le permite tener una alta preponderancia en los preparados en polvos (Codex Alimentarius, 2004).

Se conoce que *E. sakazakii* tiende a infectar al sistema nervioso central, y que ha sido asociado con una variedad de enfermedades, como por ejemplo: sepsis generalizadas, meningitis, cerebritis, enterocolitis necrosante, hidrocefalia, tetraplejia y un retraso en el desarrollo neuronal en los individuos que sobrevivieron a la enfermedad (Leyva et al; 2007). Los individuos con mayor probabilidades de contraer la infección son los lactantes inmunodeficientes y los recién nacidos (o 28 semanas), en particular los prematuros de bajo peso (o 2.500 g).

Para la trigésima sexta reunión realizada en Washington DC, Estados Unidos de América por la FAO/OMS (Codex Alimentarius, 2004), menciona una escasez en la información con respecto a la ecología microbiana de *E.*

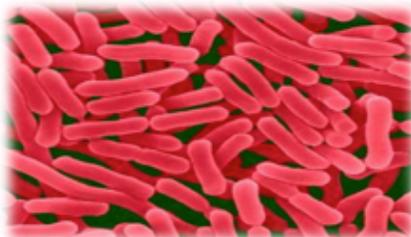
*sakazakii*, y que Muytjens y Kollee en 1990 reportaron que ellos no lograron aislar a *E. sakazakii* en la superficie del agua, lodo, madera en descomposición, grano, animales domésticos, ganado vacuno e incluso en la leche de vaca sin ésta ser pasteurizada; todo esto conllevó a determinar que el nicho ambiental exacto de *E. sakazakii* es desconocido hasta al momento.

A pesar de que actualmente no se conoce el reservorio de *E. sakazakii*, los preparados en polvo para lactantes se han establecido como la causa de infección más frecuente en Estados Unidos y Europa en el ámbito familiar y hospitalario, especialmente en las unidades de prematuros; posiblemente porque el estómago de los recién nacidos, en particular de los prematuros, es menos ácido que el de los adultos y esto sea un factor importante que contribuye a la supervivencia de la infección por *E. sakazakii* en los lactantes (Codex Alimentarius, 2004).

La contaminación de estos preparados por *E. sakazakii* puede tener lugar durante el proceso de fabricación en el momento de la adición de micronutrientes posterior a la pasteurización (Simón et al; 2010).

#### 4.4.2 *Salmonella enterica*.

##### a. Clasificación.



Clasificación Científica	
Nombre científico:	<i>Salmonella enterica</i>
Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Salmonella</i>

Cuadro II. Clasificación científica de *S. enterica* tomada de Madigan, et. al 2009.

##### b. Descripción.

Alonso en 1994, menciona que *Salmonella* es un patógeno humano antiguo que engloba a 6 subespecies con más de 2400 serotipos. *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia *Enterobacteriaceae*; y los miembros que pertenecen al género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, son anaerobios facultativos, no esporulados. Las únicas bacterias pertenecientes a este género que puede fermentar la lactosa son: *S. enterica subsp. arizonae* y *S. enterica subsp. diarizonae*, y son bien conocido por transmitirse por medio de los alimentos (Caffer y Terragno, 2001).

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial; en humanos es una de las enfermedades de transmisión alimentaria de gran importancia en salud pública (Caffer y Terragno, 2001;CAC/RCP, 2008). Las bacterias del género *Salmonella* pueden llegar a causar enfermedades como,

gastroenteritis aguda, con cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos. La deshidratación puede ser grave sobre todo en menores de 1 año, ancianos e inmunocomprometidos (Caffer y Terragno 2001). La gastroenteritis causada por *Salmonella* en el hombre ha sido usualmente asociada al agua, en el medio ambiente y en el alimento (Rodríguez et. al 2006). Se conoce que la morbilidad por salmonelosis es elevada, y que la mortalidad es baja, excepto, en niños de corta edad, ancianos e inmunocomprometidos; según Caffer en 2001 generalmente se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternales, geriátricos, restaurantes (Caffer y Terragno, 2001).

De acuerdo con el CAC/RCP en 2008, no está claro si la mayor incidencia de salmonelosis entre los lactantes es el resultado de una vulnerabilidad mayor, o si los lactantes tiene mayores probabilidades de recibir atención médica ó de que se les administren pruebas de coprocultivo cuando hay síntomas de salmonelosis, que de personas pertenecientes a otros grupos de edades.

Según Vanegas et. al; en 2009, la OMS/FAO conjunto con la Comisión Técnica de Peligros Biológicos de la European Food Safety Authority (EFSA) emitieron un dictamen (Regulación 1441/2007) sobre las enterobacterias como un indicador de la presencia de *E. sakazakii* y *Salmonella spp*, debido a los diferentes brotes reportados en recién nacidos a nivel mundial.

#### **4.5 Mecanismos de Fabricación en PPL (Farber y Forsythe, 2008).**

Para Farber y Forsythe en 2008, la producción de los preparados en polvos para lactantes al igual que otros productos en polvo (secos) se fabrican de acuerdo a uno de los 3 tipos de procesos:

##### **a. Procesos de mezcla húmeda.**

Durante este procesos los materiales sin procesar, como la leche cruda o el suero, son procesados por medio de los pasos como el desnatado, centrifugación y la estandarización. Al finalizar, estos materiales reciben un

tratamiento de calor, que dependiendo de la composición del producto pueden recibir dos, el primero que puede darse es la pasteurización (intercambiador de placas), que abarca los 71 a 74 °C por 15 a 25 segundos, y el segundo es a través de una inyección de vapor directo que abarca desde los 105 a 125 °C por lo menos 5 segundos. Luego del tratamiento, el calor se concentra por medio de la evaporación.

Algunos peligros microbiológicos que se le atribuyen a esta etapa es exclusivamente debido a la acumulación de formación de esporas, usualmente especies termófilas. Sin embargo esto puede evitarse definiendo momentos apropiados de ejecución y aplicando efectivos procedimientos de limpieza en el lugar.

Es conocido que los microorganismos vegetativos como *Salmonella* son fácilmente eliminados bajo estas condiciones de proceso. También se ha demostrado que las células de *E. sakazakii* no muestran una resistencia particular y son fácilmente eliminados en rangos de 60 a 70°C , a pesar que hace años fue sugerido que la alta resistencia termal de las cepas de *E. sakazakii* podría explicar la presencia en PPL.

En algunos casos, el tratamiento de calor no es aplicando antes de la evaporación, sino hasta el concentrado. En dichos casos, debe tomarse en cuenta el aumento de la resistencia al calor de los microorganismos debido a la mayor cantidad de sólidos totales (Farber y Forsythe, 2008).

#### **b. Procesos de mezcla en seco.**

El objetivo de este proceso es la eliminación de agua concentrada y obtener preparados para lactantes más perecederos con una humedad residual del 3%. La tecnología más aplicada para este proceso es el secado por pulverización en una torre de secado.

Durante el procedimiento de secado, puede existir una limitada reducción de ciertos microorganismos debido a la alta temperatura del aire. Sin embargo, debido al corto y no controlado tiempo de exposición y, en particular, a la

rápida caída de la actividad del agua, el efecto real es difícil de cuantificar, y por lo tanto este punto no es considerado un paso de eliminación controlada. El almacenamiento de las mezclas en seco, aun por periodos prolongados, no permiten ningún tipo de crecimiento debido a la baja actividad del agua pero tampoco lleva a un decrecimiento (Farber y Forsythe, 2008).

#### **c. Proceso Combinado.**

Para Farber y Forsythe en 2008, durante el este proceso la base de polvo, la cual es considerada un producto intermedio, es luego utilizada para manufactura o para diversos productos finales. Diferentes productos son añadidos a la base de polvo de acuerdo a la diferentes recetas de manera separada. Dependiendo de los productos y líneas de proceso, como los ingredientes procesados por separado, también pueden ser añadidos al concentrado líquido después del tratamiento de calor o puede ser introducido directamente dentro de la cámara de secado durante el secado.

#### **4.6 Tratamientos Térmicos.**

La pasteurización según DICA en 2009, es el proceso por el cual los alimentos líquidos son calentados para reducir los elementos patógenos que pueda existir, es decir que se busca la esterilización parcial de estos, alterando lo menos posible la estructura física y los componentes físicos de los alimentos líquidos.

A través de los años, se ha ido mejorando el proceso de pasteurización, beneficiando cada vez más a la población, al proveer alimentos más inocuos.

Marth y Steele en 2001 mencionan que existen tres maneras básicas de pasteurizar la leche, la ultrapasteurización o Ultra High Temperature (UHT), Ultrapasteurización instantánea o High Temperature Time (HTST) y Pasteurización lenta o VAT, las cuales difieren de sus principalmente en su propósito fundamental.

La pasteurización apunta a la eliminación de los patógenos no esporulados con una resistencia a la destrucción térmica. La ultrapasteurización agrega el objetivo de aumentar la vida útil del producto a través de una mayor reducción en el número de bacterias totales. El proceso de ultrapasteurización apunta a lograr la esterilización microbiana para crear un producto lácteo líquido no perecedero.

El proceso de Ultrapasteurización o Ultra High Temperature (UHT), consiste en someter el alimento a una temperatura de 138°C, durante el período de al menos 2 segundos. Al ser tan poco tiempo de exposición, permite una mínima degradación del alimento y de sus propiedades organolépticas (DICA, 2009). Para este proceso también se requiere de un paso adicional de empaquetado aséptico, en el cual la leche tratada se enfría y se empaqueta directamente dentro de contenedores esterilizados y bajo condiciones asépticas. La leche ya empaquetada puede ser almacenada hasta 6 meses a una temperatura de 25°C (Marth y Steele, 2001).

En el proceso de Ultrapasteurización instantánea o High Temperature Short Time (HTST), DICA en 2009 menciona que, el alimento debe ser sometido a una temperatura de 79°C, durante un período de 15 segundos, permitiendo así el procesamiento de lotes pequeños. La leche que ha sido sometida a este proceso puede ser almacenada por un periodo de 14 a 21 días requiriendo refrigeración a 4°C, o un período menor de almacenado.

Y en la Pasteurización lenta o VAT, el proceso consiste en calentar grandes volúmenes de líquido en un recipiente estanco a 63°C, durante 30 minutos, para luego dejar enfriar lentamente.

Según Marth y Steele en 2001, la efectividad de los tratamientos por calor dependen de 3 factores principales, la temperatura a la cual la leche es elevada, la duración de tiempo en la cual la leche es mantenida a esa temperatura, y la resistencia de los microorganismos en la leche a la destrucción térmica. La resistencia de los microorganismos a la destrucción

térmica depende de muchos factores, como la actividad hídrica en el producto, el pH, la cantidad de proteínas y partículas coloidales presentes, número y el estado fisiológico de los organismos en la población total, y la presencia de antibióticos termoestables o compuestos inhibidores en el producto.

#### **4.7 Formas de Reconstitución de los PPL.**

Debido al riesgo de contaminación que existe en la reconstitución de los PPL, se sugiere seguir las recomendaciones esenciales que se encuentran dadas en las Directrices formuladas y descritas por la FAO/OMS en 2007, para una preparación y uso adecuado de dichos preparados. Ya que así se evita la introducción de microorganismos no deseados, especialmente *S. enterica* y *E. sakazakii*.

Dichas instrucciones, para una correcta preparación se muestran con claridad, pero todavía son frecuentes los errores de reconstitución de los biberones. (Moreno 2000).

#### **4.8 Directrices de Preparación (FAO/OMS, 2007).**

Las directrices de preparación engloban muchos puntos, de los cuales se mencionaran los principales.

**4.8.1 El uso de las preparaciones,** dependerá de las necesidades medicas del o de los neonatos; y es recomendable que cuando el neonato se encuentre en un estado vulnerable se utilicen preparaciones líquidas para lactantes comercialmente estériles.

**4.8.2 Ciertos requisitos generales,** los cuales son necesarios para que la institución hospitalaria siga, por ejemplo, el personal encargado de las preparaciones de los PPL deben ser adiestrados en cuanto a las directrices e higiene en la preparación de alimentos, como también la creación de directrices, las cuales deben ser previamente analizadas y escritas, en donde estas deben abordar la preparación y

manipulación de PPL y una constante vigilancia de la aplicación de éstas, no olvidando que el lugar designado a la preparación y almacenamiento de PPL deberá ser una zona altamente libre de contaminación.

**4.8.3 La limpieza y esterilización del material de preparación y administración de PPL**, es un requerimiento indispensable que todo el material a emplear sea limpiado y esterilizado antes de usarlo, al igual que las manos utilizando agua y jabón. En los entornos asistenciales, se recomienda que exista una pila exclusiva para el lavado de manos.

En la limpieza del material es necesario utilizar agua jabonosa caliente y utilizar cepillos especiales y limpios cuando se utilicen biberones para la eliminación de restos de tomas anteriores. Al terminar dicho paso se procederá a la esterilización de los recipientes, si la esterilización es a través de máquina, se deberá seguir las indicaciones del fabricante, pero si esta se realiza por medio de ebullición se deberá realizar lo siguiente:

- a. Los utensilios se sumergirán por completo en un recipiente con agua, vigilando que no queden burbujas de aire.
- b. Se tapaná el recipiente con su debida tapa, y luego se dejará hervir el agua velando que no se evapore por completo.
- c. El recipiente solamente se abrirá cuando se necesite el material.

Recordando siempre la utilización de pinzas para la extracción del material, si no se cuenta con una, se deberá lavar las manos con agua y jabón, y para evitar el riesgo de una contaminación cruzada, es preferible que la extracción del material sea justo antes de utilizarlo.

**4.8.4 La preparación de tomas**, durante este proceso es más conveniente preparar las tomas cada vez y administrarlas de inmediato; ya que cuando se preparan muchos PPL a la vez se corre el riesgo de una

exposición a la contaminación en grandes recipientes abiertos, debido a una alta proliferación de bacterias nocivas, ya que el alimento tarda mucho tiempo más en enfriarse. Pero por razones prácticas muchas veces resulta necesario preparar las tomas con antelación.

**4.8.5 Preparación de tomas con antelación**, debido al riesgo de contaminación que conlleva este proceso es necesario el almacenamiento de las tomas hasta que sea el tiempo de la administración, por lo que se recomienda lo siguiente:

- a. Se introducirán las tomas previamente enfriadas en un frigorífico a una temperatura que no supere los 5°C, la cual se controlará todos los días.
- b. Las tomas podrán permanecer en el frigorífico no más de 24 horas. No se recomienda el almacenaje de grandes volúmenes de PPL reconstituidos dentro del frigorífico, ya que la refrigeración puede ser insuficiente y puede causar una proliferación de bacterias nocivas.

**4.8.6 El calentamiento de las tomas almacenadas**, se realiza al momento en que deban ser administradas las tomas, para ello es necesario únicamente extraer las tomas que serán utilizadas, éstas deberán ser recalentadas durante un máximo de 15 minutos en baño maría, y durante el procedimiento se debe agitar o mover de vez en cuando para cerciorarse que todo el contenido sea calentado de manera uniforme.

Recordar que la temperatura del alimento debe ser tomada y comprobada antes de suministrarla al neonato, y si una toma recalentada no fue suministrada se descartará todo el contenido.

Para la revisión completa de preparación, almacenamiento y suministro de los PPL reconstituidos, ver: *“Preparación, almacenamiento y manipulación en*

*condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes DIRECTRICES*". (FAO/OMS 2007) (ANEXO 1).

## IV. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

### a. Objetivo General.

- Evaluar la presencia de *Enterobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* en los preparados en polvo para lactantes suministrados en el Hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán” de la red de salud pública de San Salvador, El Salvador.

### b. Objetivos Específicos.

- Determinar la presencia de *Enterobacter sakazakii* en Preparados en Polvo para Lactantes en el Hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán” de la red de salud pública de San Salvador, El Salvador.
- Determinar la presencia de *Salmonella enterica* en Preparados en Polvo para Lactantes en el Hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán” de la red de salud pública de San Salvador, El Salvador.
- Identificar los puntos críticos establecidos en el Hospital “Dr. Raúl Argüello Escolán” para la producción de Preparados en Polvo para Lactantes.

## V. MARCO METODOLÓGICO.

### 5.1 Descripción del Área de Estudio.

#### 5.1.1 Ubicación Geográfica.

Según la Oficina de Planificación del Área Metropolitana de San Salvador (OPAMSS) en 2007, el departamento de San Salvador se encuentra en la zona central del país y posee una elevación entre los 600 y 1000 msnm. El Área Metropolitana de San Salvador posee una elevación de 650 msnm, y esta limita con los municipios de Nejapa, Mejicanos, Cuscatancingo y Ciudad Delgado al norte, al este con Soyapango y San Marcos, al sur con Panchimalco y también con San Marcos, y al oeste con Antiguo Cuscatlán y Santa Tecla.

El Hospital de Maternidad “Dr. Raúl Argüello Escolán” es en el marco de salud pública una institución de tercer nivel especializada en las enfermedades relacionadas con la mujer y neonatos con el fin de disminuir la morbimortalidad por patógenos prevenibles y así satisfacer la demanda de la población demandante (Transparencia Fiscal, 2013).

Dicha institución se encuentra sobre Final calle Arce y 25 avenida norte (13°42'3"N 89°12'15"E), dentro del área metropolitana de San Salvador, El Salvador.



Fig. 1. Ubicación geográfica del Centro asistencial en donde se realizó el estudio. Imagen tomada de Google Earth 2008.

## 5.2 Materiales y Métodos.

### 5.2.1 Fase de recolección de datos.

Utilizando el muestreo aleatorio simple, de un total de 1500 latas de PPL utilizadas en el día, se tomaron 2 muestra por cada uno de los 4 puntos de control, teniendo un total de 8 muestras, las cuales fueron debidamente rotuladas con una viñeta la cual se llenaron con los datos necesarios para su reconocimiento y posterior análisis (ANEXO 2). Para la selección de muestras se utilizó la siguiente fórmula aplicada para trabajos cualitativos (Hernández et. al 2006).:

$$n = \frac{n'}{1 + n'/N}$$

Las muestras llevaron un meticuloso monitoreo durante la preparación de los PPL reconstituidos utilizando las técnicas y protocolos dados por la FAO/OMS en 2007 y FDA en 2002b; obteniendo 64 muestras durante las 8 visitas de la fase de recolección de datos.

Los 4 puntos de control fueron seleccionados para la extracción de muestras, en donde pudo o no haberse determinado la presencia y/o ausencia de *E. Sakazakii* y/o *S. enterica*.

Dichos puntos de control fueron los siguientes (ANEXO 3):

1. PPL sin reconstituir
2. PPL reconstituido
3. Después de la esterilización.
4. Después de 24 horas de refrigeración.

En el primer punto de control, se procedió a la extracción de 2 latas de leches, debidamente rotuladas, asignándole a cada una un color diferente para su debida identificación.

Cada una de las latas contenía 136g en leche, de los cuales 111g fueron utilizados para *E. sakazakii* y los otros 25g restantes fueron utilizados para *S. enterica*.

Dichas latas fueron transportadas en bolsas estériles y colocadas en una hielera de manera aséptica.

En el segundo punto de control se utilizaron 2 frascos previamente esterilizados, los cuales fueron llenados con 3oz. de leche reconstituida. Los frascos fueron debidamente etiquetados e identificados con el color correspondiente a la lata previamente utilizada en el punto de control 1.

Los frascos fueron transportados en bolsas estériles y colocados en una hielera de manera aséptica.

Para el tercer punto de control, se utilizaron nuevamente 2 frascos previamente esterilizados los cuales eran llenados con 3oz. de leche reconstituida; los frascos eran introducidos a la autoclave para la debida esterilización de la leche, y al finalizar el proceso, estos se retiraron de manera cuidadosa.

Los frascos fueron debidamente etiquetados e identificados con el color correspondiente a la lata previamente utilizada en el punto de control 1.

Los frascos fueron transportados en bolsas estériles y colocados en una hielera de manera aséptica.

Para el cuarto punto de control, se utilizaron nuevamente 2 frascos previamente esterilizados los cuales se llenaron con 3oz. de leche reconstituida; los frascos se introdujeron a la autoclave para la debida esterilización de la leche, y al finalizar el proceso, estos se retiraban de manera cuidadosa. Posteriormente los frascos se trasladaron, por el personal de fabricación de fórmulas del hospital, a los frigoríficos de las 2 salas destinadas al cuidado de neonatos por un período de 24 horas.

Transcurrido el tiempo de refrigeración, los frascos eran retirados de los frigoríficos, tomando nota de la temperatura de los frigoríficos ubicados en las 2 salas de cuidado de neonatos.

Los frascos eran debidamente etiquetados e identificados con el color correspondiente a la lata previamente utilizada en el punto de control 1.

Los frascos se transportaron en bolsas estériles y colocados en una hielera de manera aséptica.

Al final de cada muestreo se obtenían 8 muestras, las cuales se transportaban en una hielera de manera aséptica, y con una temperatura de  $5\pm 1$  grados centígrados y luego se trasladaban al laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

#### **5.2.2 Fase de Laboratorio.**

El trabajo de laboratorio se llevó de manera simultánea a la toma de muestras. Fue realizado en las instalaciones del laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Las muestras recolectadas fueron analizadas mediante la técnica propuesta por el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) dadas por la FDA en 2002a y tomando en cuenta lo que exige el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 2009).

##### **5.2.2.1 Análisis Microbiológico de *E. Sakazakii*.**

Para la determinación de presencia/ausencia de *E. sakazakii* se utilizó el método del número más probable (The Most Probable Number Method MPN), separando 100g, 10g y 1g de los 111g recolectados en la fase de toma de datos.

La medición y separación de las cantidades de leche en gramos, se realizaron con utensilios previamente esterilizados y utilizando una balanza

analítica; como también la realización de una limpieza aséptica de la orilla de la lata.

Al haber separado las cantidades de leche en polvo, se procedió a agregar los 100g de leche a un frasco de Erlenmeyer de 1000ml que contenía 900ml de agua destilada y esterilizada precalentada a 45°C, dicha suspensión se agitó hasta quedar uniforme, luego se incubó por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para los otros 10g de leche en polvo, se procedió a agregarlos a un frasco de Erlenmeyer de 100ml que contenía 90ml de agua destilada y esterilizada precalentada a 45°C, dicha suspensión fue agitada hasta quedar uniforme, luego se incubó por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Y para los restantes 1g de leche en polvo, se procedió a agregarlos a un frasco de Erlenmeyer de 10ml que contenía 9ml de agua destilada y esterilizada precalentada a 45°C, dicha suspensión se agitó a hasta quedar uniforme, luego se incubó por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para las muestras en líquido, la extracción de la leche reconstituida de los frascos, fue realizada con pipetas de 10ml, previamente esterilizadas.

Se extrajeron de cada muestra líquida 100ml, 10ml y 1ml de leche, y se colocaron en frascos de Erlenmeyer de 1000ml, 100ml y 10ml con 900ml, 90ml y 9ml de agua destilada y esterilizada precalentada a 45°C respectivamente, dichas suspensiones fueron agitadas hasta obtener una mezcla uniforme. Posteriormente dichas mezclas se incubaron por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Al término de la incubación se removieron 10 ml de cada suspensión y se agregaron a 90 ml de caldo de enriquecimiento de Enterobacteriaceae (EE) en frascos estériles de rosca de 100ml, los cuales se incubaron durante  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Finalizado dicho periodo, se procedió a mezclar el contenido, para obtener suspensiones uniformes. Se procedió a tomar una asada de cada enriquecimiento EE, estriando con la técnica de agotamiento, en cajas Petri que contenían Agar Rojo-Violeta Bilis Glucosa (Agar VRBG). Al finalizar se incubaron las cajas Petri por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Las colonia positiva para *E. sakazakii* se presentan de color purpura rodeadas por un halo de un mismo color.

Si la muestra fue positiva o presentaban colonias sospechosas de *E. sakazakii* se seleccionaban al azar 5 cajas Petri, su contenido era estriado a cajas Petri que contenían Agar Triptona Soya (TSA). Estas cajas Petri eran incubadas a  $25^\circ\text{C}$  por 48-72 horas.

Para aquellas pruebas que presuntamente estaban contaminadas por *E. sakazakii* (las cuales presentaron una coloración amarilla en agar TSA) se les realizó la prueba de Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) y API® 20E (BioMérieux) para una confirmación certera de *E. sakazakii* (FDA 2002a).

#### **5.2.2.2 Análisis Microbiológico de *S. enterica*.**

Para la determinación de la presencia/ausencia de *S. enterica* en productos lácteos en polvo, se utilizaron 25g de leche en polvo de los 25g recolectados en la fase de toma de datos.

La medición y separación de las cantidades de leche en gramos, se realizaron con utensilios previamente esterilizados y utilizando una balanza analítica; como también la realización de una limpieza aséptica de la orilla de la lata.

Se agregaron a 225ml de caldo lactosado esterilizado, 25g de leche en polvo, los cuales iban siendo vertidos poco a poco en un frasco de Erlenmeyer de 250ml, a manera de facilitar la homogenización de la

suspensión evitando así la formación de grumos hasta quedar uniforme. Se dejó reposar la suspensión durante  $60 \pm 5$  min. a temperatura ambiente y se incubó por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2$  °C.

Para las muestras en líquido, la extracción de la leche reconstituida de los frascos, fue realizada con pipetas de 10ml, previamente esterilizadas.

Se extrajo de cada muestra líquida 25ml de leche, los cuales fueron depositados en frascos de Erlenmeyer de 250ml que contenían 225ml de caldo lactosado esterilizado, cada suspensión se agitó hasta quedar uniforme, se dejaron reposar durante  $60 \pm 5$  min. a temperatura ambiente y se incubaron por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2$ °C. Al término del proceso de incubación se realizó el aislamiento de *Salmonella*, para ello se agitó la muestra para homogenizarla, y se transfirieron 0.1ml a frascos esterilizados de rosca que contenían 10ml de caldo Rappaport, y 1ml a 10ml de caldo de Tetrionato (TT), posteriormente se incubaron los frascos por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2$ °C.

Finalizado el periodo de incubación, se mezcló el contenido de cada suspensión hasta quedar uniforme. Se procedió a tomar una asada de cada caldo -Rappaport y TT, estriando con la técnica de agotamiento, en cajas Petri que contenían Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). Al finalizar se incubaron las placas por  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2$ °C.

Las colonias positivas para *S. enterica* se presentan de color rosa con o sin centros negros.

Si la muestra fue positiva o presentaba colonias sospechosas de *S. enterica* se seleccionaban al azar 5 cajas Petri, su contenido era estriado a cajas Petri que contenían Agar Triptona Soya (TSA). Estas cajas Petri eran incubadas a 25°C por 48-72 horas.

Para aquellas pruebas que presuntamente estaban contaminadas por *S. enterica* (las cuales presentaron una coloración amarilla en agar TSA) se les realizó la prueba de Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) y API® 20E (BioMérieux) para una confirmación de *S. enterica* (FDA 2002a).

Para la referencia fotográfica de los procedimientos efectuados durante la fase de laboratorio para *E. sakazakii* y *S. enterica* consultar ANEXO 5.

### **5.2.3 Diseño Estadístico.**

Esta investigación se llevó a cabo con un enfoque cualitativo, el cual, según Hernández et. al; en 2006, se fundamenta más en un proceso inductivo y que, en la mayoría de estudios no existen hipótesis, pero que éstas puedan surgir o generarse durante el proceso de la investigación. Dicho enfoque se basa en métodos de recolección no estandarizados, por lo que el análisis no es estadístico.

Las metas de investigación para un trabajo cualitativo es el descubrir, comprender e interpretar los fenómenos obtenidos en el estudio. (Hernández et. al 2006). Basándose en este hecho, la meta de nuestro estudio correspondió a una investigación cualitativa, ya que consistió en determinar la presencia/ausencia de *E. sakazakii* y/o *S. enterica* en los PPL en los 4 puntos de muestreos previamente descritos.

Para la determinación de presencia/ausencia de los patógenos en estudio se contó la presencia de los microorganismos con el valor "1" y la ausencia con el valor "0", los cuales fueron incorporados a las tablas de datos que fueron preparadas para el desarrollo de este estudio. Posteriormente para el procesamiento de estos valores (los cuales se almacenaron en una computadora personal, la cual solo el investigador tuvo acceso) se empleó el uso del programa de computación para hojas de cálculo Microsoft Excel 2011.



PUNTO DE CONTROL 1 (PPL sin reconstituir).

Dentro de los resultados obtenidos para el punto de control 1 (PPL sin reconstituir), no hubo confirmación de presencia *E. sakazakii*; sin embargo se encontraron bacterias oportunistas del ambiente, según se muestra en el cuadro 3 (26 de 48 muestras presentaron crecimiento bacteriano), las cuales suelen tener mayor riesgo de crecimiento al encontrarse en habitaciones con una temperatura ambiente de 30-35°C (FAO/OMS, 2007), generalmente estas bacterias son encontradas en las unidades de cuidados intensivos dentro de los centros hospitalarios y que se asocian frecuentemente a infecciones nosocomiales (sobre todo en niños) e infecciones intra-abdominales, náuseas, diarrea, dolor abdominal, vómitos, osteomielitis, entre otros.

Estas fueron confirmadas con la utilización de la prueba de API® 20E (BioMérieux).

PUNTO DE CONTROL 2 (PPL reconstituido).

Para el punto de control 2, no se confirmó la presencia de *E. sakazakii* utilizando la prueba de API® 20E (BioMérieux); pero si se encontraron bacterias oportunistas del ambiente, como también del agua, desagües y dispensadores de agua contaminados, como lo muestra el cuadro 3 (35 muestras de 48). Generalmente son bacterias encontradas en la leche y en las unidades de cuidados intensivos dentro de los centros hospitalarios. Dichas bacterias se encuentran asociadas a infecciones gastrointestinales y del tracto urinario, meningitis, endocarditis, también a infecciones nosocomiales e infecciones extra-intestinales, como diarrea, dolor abdominal, entre otros.

PUNTO DE CONTROL 3 (PPL después de la esterilización).

En el punto de control 3, no se obtuvo confirmación de presencia de *E. sakazakii* utilizando la prueba de API® 20E (BioMérieux), pero si se confirmó

la presencia de bacterias oportunistas del ambiente como se muestra en el cuadro 3, del cual 22 muestra presentaron crecimiento microbiano; generalmente se encuentran en la leche y dentro de las unidades de cuidados intensivos para neonatos producto de la temperatura utilizada en el procedimiento. Estas bacterias están asociadas con infecciones en el torrente sanguíneo, en el tracto urinario y gastrointestinal, enterocolitis, meningitis, endocarditis, etc.

PUNTO DE CONTROL 4 (PPL después de 24 hrs. de refrigeración).

Dentro del punto de control 4, al igual que en los puntos de control anteriores, 23 muestras resultaron con crecimiento bacteriano, pero no existió presencia de *E. sakazakii*; dicho crecimiento bacteriano confirma la presencia de bacterias oportunistas del ambiente, desagües y dispensadores de aguas contaminados, estas pueden llegar del ambiente y por malas practicas en la elaboración de los preparados. Este tipo de bacterias están asociadas a infecciones nosocomiales e infecciones extra-intestinales, como diarrea, dolor abdominal, gastroenteritis, bacteriemia, meningitis, endocarditis, etc.

Estas bacterias también fueron confirmadas utilizando la prueba de API® 20E (BioMérieux).

Para la referencia fotográfica de algunos de los crecimientos obtenidos y aplicación de API® 20E (BioMérieux), consultar: ANEXO 6.

## 6.2 Salmonella enterica.

**Cuadro IV. Cuadro de resultados obtenidos durante la fase de laboratorio para presuntas pruebas positivas S. enterica.**

	Marca	PPL SIN RECONSTITUIR		PPL RECONSTITUIDO		DESPUES DE LA ESTERILIZACION		DESPUES DE 24 HRS DE REFRIGERACION		Temp.
		Tetrationato XLD	Rappaport	Tetrationato XLD	Rappaport	Tetrationato XLD	Rappaport	Tetrationato XLD	Rappaport	
Semana 1	VERDE	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	AZUL	1	1	0	1	1	0	1	1	4°C
Semana 2	VERDE	0	0	1	1	1	1	0	0	--
	AZUL	0	0	1	1	1	1	0	0	4°C
Semana 3	VERDE	0	0	0	0	0	1	0	0	--
	AZUL	0	0	0	0	0	0	0	0	4°C
Semana 4	VERDE	0	1	0	1	1	1	0	0	--
	AZUL	1	1	0	0	0	0	0	0	5°C
Semana 5	VERDE	0	0	1	1	1	1	1	0	--
	AZUL	0	1	0	1	0	0	0	0	5°C
Semana 6	VERDE	0	0	1	1	0	0	0	0	--
	AZUL	0	0	0	0	1	1	0	0	5°C
Semana 7	VERDE	1	1	0	1	1	1	1	1	4°C
	AZUL	0	1	1	1	0	0	0	0	--
Semana 8	VERDE	0	0	0	1	0	0	0	0	1°C
	AZUL	0	0	1	1	0	0	0	0	--

#### PUNTO DE CONTROL 1 (PPL sin reconstituir).

De las muestras pertenecientes al punto de control 1, se observó crecimiento bacteriano en agar XLD, en 11 muestras de 32 (Cuadro 4). Sin embargo, no presentaron crecimiento bacteriano en medio TSA, por lo que no fue posible aplicarles la prueba de API® 20E (BioMérieux).

#### PUNTO DE CONTROL 2 (PPL reconstituido).

En el punto de control 2 no se obtuvo confirmación de presencia de *S. enterica* utilizando la prueba de API® 20E (BioMérieux), pero sí se observó crecimiento bacteriano en 19 muestras como se muestra en el Cuadro 4. Dichas bacterias pueden deberse a la presencia de bacterias oportunistas del ambiente, del agua, desagües o dispensadores de aguas contaminadas. Usualmente estas bacterias suelen estar presentes en la leche y se asocian con infecciones del tracto urinario, gastrointestinales, meningitis, endocarditis y bacteriemia.

#### PUNTO DE CONTROL 3 (PPL después de la esterilización).

Dentro del punto de control 3, se observó el crecimiento bacteriano en 19 muestras (ver cuadro 4), pero no se confirmó la presencia de *S. enterica*. Sin embargo se encontraron bacterias oportunistas del ambiente positivo para *S. enterica* procedentes del agua utilizada en la reconstitución de los preparados. Dichas bacterias pueden ser incorporadas en el momento de la preparación que no se destruyen con la temperatura utilizada en el proceso de esterilización; dichas bacterias se encuentran asociadas a infecciones nosocomiales e infecciones extra-intestinales, como diarrea, dolor abdominal y bacteriemia entre otros.

Estas bacterias fueron confirmadas utilizando la prueba de API® 20E (BioMérieux)

PUNTO DE CONTROL 4 (PPL después de 24 hrs. de refrigeración).

En el punto de control 4, hubo ausencia de *S. enterica*; pero 7 muestras en este proceso presentaron crecimiento bacteriano como se muestra en el cuadro 4, posiblemente bacterias oportunistas del ambiente, eneralmente asociadas a la gastroenteritis y bacteriemia.

Sin embargo este fue el punto en el que se encontró menor cantidad de muestras con presencia de crecimiento bacteriano, lo cual indica que aún después de pasar por un proceso de esterilización y enfriamiento para eliminar los microorganismos, el alimento no es inocuo.

Todas las muestras que presentaron crecimiento bacteriano fueron analizadas utilizando API® 20E (BioMérieux) para la confirmación de los microorganismos en estudio.

Para la referencia fotográfica de algunos de los crecimientos obtenidos y aplicación de API® 20E (BioMérieux), consultar: ANEXO 6.

## VII. DISCUSIÓN.

Los PPL no son productos estériles (FAO/OMS, 2007), por lo que en 2007 en La Habana, Cuba se realizó un estudio en donde se confirmó la presencia de *E. sakazakii* en sólo el 1.7% de las muestras en polvo analizadas, también se hace mención de un estudio realizado en Islandia entre 1986 y 1989, en donde se aisló *E. sakazakii* en 5 de 7 lotes diferentes de PPL, demostrando que puede existir una infección intrínseca, es decir que la contaminación se dé en el proceso de fabricación (Leyva et al; 2008), a pesar que se encuentran estudios en donde se confirma la presencia de *E. sakazakii* en los PPL en polvo, en el análisis del punto de control 1 (PPL sin reconstituir) de este estudio, se observaron colonias sospechosas de *E. sakazakii* o *S. enterica*, siendo las bacterias presentes, oportunistas del ambiente contaminado dentro de la sala de preparación de los PPL, también estas bacterias oportunistas pueden proceder de la falta de limpieza aséptica de las latas que son ingresadas al área de preparación de fórmulas dentro del hospital, ya que todo material utilizado para la preparación de PPL debe estar limpio y esterilizado según lo dicta la FAO/OMS en 2007.

Para Farber y Forsythe en 2008 y para la Public Health Agency of Canada en 2011, estos patógenos son capaces de ocasionar infecciones intra-abdominales y extra-intestinales, causando náuseas, diarrea, vómitos, dolor abdominal, etc., y que éstos pueden crecer a temperaturas en un rango de 22-35°C, y son efectivamente eliminadas por vapor a temperaturas de 121°C por 20 minutos y por 15-30min., o en calor seco a 170°C por dos horas.

De igual manera para el punto de control 2 (PPL reconstituido) aparecieron colonias de bacterias sospechosas de *E. sakazakii* o *S. enterica*, siendo las bacterias presentes, bacterias oportunistas del ambiente, que según Foster et al; en 1957, pueden provenir de la misma leche (ya que son agentes de descomposición), del agua, desagües, dispensadores de aguas contaminados, y que para Mahon et al; en 2010 y la Public Health Agency of

Canada en 2011, están asociadas con infecciones en el tracto urinario, extra intestinales, causando dolores abdominales, diarrea, gastroenteritis, bacteriemia, meningitis, endocarditis e infecciones nosocomiales en personas con uso prolongado de catéter.

Estas bacterias pueden tener un crecimiento a temperaturas en un rango de 22-37°C, y son efectivamente erradicadas a temperaturas a vapor de 121°C de 15 a 30 minutos, mientras que por calor seco a una temperatura de 170-250°C por 30 minutos o más (Public Health Agency of Canada 2011 y 2012).

Las posibles causas de las apariciones de estas bacterias en esta fase de preparación de los PPL, puede deberse a la falta de limpieza del filtro de agua que se utiliza para la reconstitución de los PPL, a la falta de implementación del uso de desagüaderos secos para evitar la presencia de residuos de agua que puedan conducir a la multiplicación y a la propagación de microorganismos (CAC/RCP, 2008), y a que el agua no esta siendo calentada a una temperatura adecuada (70°C) para la reconstitución según lo dicta la FAO/OMS en 2007, también a la inadecuada limpieza de los instrumentos y materiales utilizados para la reconstitución, por ejemplo la falta de limpieza en el filtro de agua utilizado en la sala de preparación de PPL. En Bogotá, Colombia en 2006 se realizó un estudio en donde se identificó y asiló de los equipos, superficies y ambientes en donde se preparan los PPL, un 3.6% del total de muestras para *E. sakazakii*, concluyendo que la implementación de las prácticas higiénicas es indispensable y debe ser óptima en las salas de reconstitución de fórmulas (Vanegas et al; 2009).

Finalmente para los puntos de control 3 y 4 (PPL esterilizado y después de 24 hrs. de refrigeración, respectivamente), no hubo confirmación de presencia de *E. sakazakii* o *S. enterica*, aunque sí de bacterias oportunistas del ambiente, que para la Public Health Agency of Canada en 2011 y 2012c,

afectan a neonatos dentro de las unidades de cuidados intensivos, y según Mahon et al; en 2010 por el uso prolongado de catéter.

Para Farber y Forsythe en 2008, Foster et al; en 1957 y la Public Health Agency of Canada en 2011, estas bacterias usualmente provienen de la ingesta de alimentos contaminados, agua, dispensadores de aguas contaminados, y de ambientes contaminados. Asociadas con infecciones en el tracto urinario, el torrente sanguíneo e infecciones extra-intestinales, como diarrea, dolor abdominal, etc.; también pueden ocasionar enterocolitis, gastroenteritis, meningitis, endocarditis, entre otros.

Las posibles causas de los brotes bacterianos en estos puntos de control puede deberse a la utilización de agua contaminada y que no haya sido llevada a una temperatura de por lo menos 70°C para la reconstitución de fórmulas, a la falta de monitoreo de la temperatura a la que se encuentran los frigoríficos, los cuales deberían de permanecer a toda hora a una temperatura no mayor de 5°C según lo dictado por la FAO/OMS en 2007. También a la mala temperatura a la cual los PPL son sometidos para su esterilización, ya que estos son esterilizados a una temperatura de 85°C por 30 minutos, y según lo citado por la Public Health Agency of Canada en 2011 para una efectiva erradicación de este tipo de bacterias deberían de ser sometidos los biberones a temperaturas a vapor de 121°C de 15 a 30 minutos, mientras que por calor seco a una temperatura de 165-250°C por 30 minutos o más, o por el proceso de pasteurización más eficaz y conveniente al centro hospitalario, para evitar la desnaturalización de las proteínas del alimento (Codex Alimentarius, 2004; FAO/OMS, 2007)

Los resultados demuestran que cada uno de los puntos de muestreo seleccionados se deben de considerar como puntos de control, pero el punto 4 (PPL después de 24 hrs. de refrigeración) debe ser evaluado como punto crítico de control, dado que después de este proceso ya no hay otra medida de prevención para evitar suministrar un alimento contaminado.

## VIII. CONCLUSIONES.

- A pesar que en los 4 puntos de control seleccionados durante el proceso de preparación de fórmulas en el centro hospitalario, no se encontró presencia de *E. sakazakii* y/o *S. enterica*, sí se recalca que existe la presencia de bacterias patógeno oportunistas, que afectan a neonatos, y que suelen estar presentes el ambiente de preparación de fórmulas, probablemente a la falta de uso de desagües secos, la falta de limpieza de filtros de agua y aire, para evitar la multiplicación y propagación de microorganismos patógenos (CAC/RCP, 2008); provocando infecciones graves en los neonatos de bajo peso, o inmunodeficientes.
- La presencia de bacteria patógeno oportunistas encontradas dentro de los diferentes puntos de control en la preparación de fórmulas, puede deberse a la falta de seguimiento de las BPM y BPH establecidas por la FAO/OMS en 2007, provocando una proliferación innecesaria de bacterias (generalmente enterobacterias) patógeno oportunista en las áreas de reconstitución de fórmulas y de las unidades de cuidados de neonatos.
- La temperatura es un factor importante a la hora de la reconstitución de los PPL, ya que muchas de estas bacterias proliferan a temperaturas entre los 22-37°C, por lo que es imperativo mantener una regulación constante de la temperatura ambiental de la sala de preparación de fórmulas aún reconstituyendo el PPL con agua a temperatura de 70°C, y garantizar el buen funcionamiento e idónea temperatura de los frigorífico de almacenamiento de los biberones utilizados en las salas de cuidados de neonatos dentro del hospital (FAO/OMS, 2007).

- Los procesos de esterilización, refrigeración y el área en donde se reconstituyen los PPL, no son los adecuados, ya que probablemente el ambiente favorezca la proliferación microbiana dentro de los PPL sin reconstituir, los cuales pueden afectar la salud de los neonatos, y que ya no se pueda garantizar la inocuidad requerida para ser suministrados.
- Dentro de los cuatro puntos de control, el punto crítico identificado fue PPL después de las 24 hrs de refrigeración, el cual al ser controlado permitirá la inocuidad de los PPL.

## **IX. RECOMENDACIONES.**

- Es imprescindible la utilización de agua a 70°C para la reconstitución de los PPL, ya que según las Directrices establecidas por la FAO/OMS en 2007, este procedimiento disminuye la probabilidad de proliferación de aquellas bacterias patógenas especialmente *E. sakazakii* que podrían encontrarse en la leche en polvo.
- Revisar y estudiar la temperatura a la cual están siendo sometidos los PPL a esterilizar, ya que se observó que la temperatura a la cual eran sometidos era de 85°C por 30 minutos. Dado los resultados obtenidos no se obtiene un alimento libre de microorganismos.
- Someter los PPL a una pasteurización de 79°C por 15 segundos ó 138°C por 2 segundos, ó utilizar el método que más le convenga al centro hospitalario, y que también sea efectivo para la erradicación de microorganismos presentes, sin llegar a desnaturalizar las proteínas contenidas en el alimento.
- Llevar un control de la temperatura interna de los frigoríficos utilizados para el almacenamiento de los biberones dentro de las salas de cuidados de neonatos dentro del hospital, ya que durante el período de muestreo el frigorífico perteneciente a la sala de cuidados mínimos no contaba con un termómetro para la medición de temperatura.
- Se recomienda que los PPL ya esterilizados, sean enfriados inmediatamente con agua de grifo para luego ser transportadas y almacenada en los frigorífico sin correr el riesgo de proliferación de patógenos por aumento de temperatura, sobre todo en países tropicales como el nuestro.

- Limpiar de manera aséptica las latas de leche utilizada para la alimentación de los neonatos dentro del centro asistencial, de igual manera que estas sean colocadas dentro del área asignadas a la reconstitución de los PPL, ya que al encontrarse estas en otro lugar, el traslado a las cuales son sometidas puede ocasionar contaminación por los patógenos existentes en el ambiente y estos causar infecciones y enfermedades en neonatos, sobre todos aquellos inmunodeficientes y/o de bajo peso.
- Es imprescindible el mantenimiento y análisis microbiológicos de los dispensadores de aguas utilizados para la reconstitución de los PPL de forma regular, e implementar el uso desaguaderos en seco, ya que estos son unas de las vías por las cuales muchos microorganismos proliferan y pueden llegar a contaminar los PPL.
- La realización de estudios como este, para la detección temprana y oportuna de enterobacterias que puedan estar causando infecciones nosocomiales u otro tipo de enfermedades, y así garantizar la inocuidad de los alimentos suministrados y prevenir enfermedades en los neonatos dentro del centro hospitalario en estudio.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y tecnología medica. AMNAT. (2011). *Hygiene e Inocuidad de los Alimentos: Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES)*. Consultado: viernes 1 de junio 2012. Disponible en:< <http://www.anmat.gov.ar/principal.asp>>
- Aguirre, A., Pérez, A., Echániz, I., Hernando, Z., Arrate, J.K. (2007). *Sepsis Neonatal por Enterobacter sakazakii*. *An Pediatr*, 66(02), pp: 192-200. Bilbao, España.
- Albercht, J. (2013). *Staphylococcus aureus*. University of Nebraska-Lincoln. UNL Food Team. Lincoln, Nebraska, EE.UU.
- Alonso, M. (1994). Tesis: *Nuevo Marcador Epidemiológico en Salmonella enterica subespecie 1 serotipo Enteritidis*, pp: 205. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.
- Ash, M. (1997) *Microbial Pathogen Data Sheets: Staphylococcus aureus*. Ministry for Primary Industries. Nueva Zelanda.
- Caffer, M. y Terragno, R. (2001). *Manual de procedimientos para la caracterización de Salomonella*. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología. Buenos Aires, Argentina.
- California Childcare Health Program. CCHP. UCSF School of Nursing. (2009). *Lo que los proveedores de cuidado infantil deberían saber*

sobre...Salmonella. Consultado: viernes 16 de septiembre de 2011.  
Disponible en: < [www.ucsfchildcarehealth.org](http://www.ucsfchildcarehealth.org)>.

Codex Alimentarius (2004). *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactante (Informe de la reunión). Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias comisión del Codex Alimentarius, FAO. Roma, Italia.

Codex Alimentarius. (2005). *Higiene de los alimentos (textos básicos)* Volumen 1B. 3ra Edición. Secretaría Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias comisión del Codex Alimentarius, FAO. Roma, Italia.

Código Alimenticio Centroamericano. CAC/RCP. (2008). *Código de Practicas de Higiene para Los Preparados en Polvo para Lactantes y Niños Pequeños*. Consultado: viernes 16 de septiembre de 2011. Disponible en: <[www.codexalimentarius.net/download/standards/CXP\\_066s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/CXP_066s.pdf)>.

Farber, J y Forsythe, S (2008). *Emerging Issues in Food Safety: Enterobacter sakazakii*. ASM press., pp: 271. American Society for Microbiology, Washington, DC. EE.UU.

Feyzioğlu, B., Özdemir, M., Doğan, M. y Baysal, B. (2013). *Investigation of antibiotic resistance rates of Providencia stuartii isolated from various clinical samples. American Journal of Research Communication*, 2013, 1(11): 23- 34. San Antonio, Texas, EE.UU. Consultado: 2 de junio de 2014. Disponible en: <[http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2013/10/Feyzio%C4%9Flu\\_Vol111.pdf](http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2013/10/Feyzio%C4%9Flu_Vol111.pdf)>

Food and Drug Administration. FDA. (2002a). Wallance, H., Andrew and T. Hammack. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 5 “*Salmonella*”. Consultado: 28 de noviembre de 2011. Disponible en: <[www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm)>

Food and Drug Administration. FDA. (2002b). *Isolation and Enumeration of Enterobacter sakazakii from Dehydrated Powered Infant Formula*. Consultado: 28 de noviembre de 2011. Disponible en: <<http://www.fda.gov/Food/default.htm>>

Foster, E., Nelson, F., Speck, M., Doetsch, R., Olson, J. (1957). *Dairy Microbiology*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J, EE.UU.

Hawley, J. y Brown, E. (2012). *Providencia Infections*. Consultado: 3 de junio de 2014. Disponible en: <<http://emedicine.medscape.com/article/226541-overview#a0199>>

Hejazi, A. y Falkiner, F. (1997). *Serratia marcscens*. Department of Clinical Microbiology,(Trinity College, Dublin), Sir Patrick Dun Research Laboratory, St. James' Hospital, Dublin 8, Ireland. *Journal of Medical Microbiolgy Vol.46(1997), 903-912*. Consultado: 4 de junio de 2014. Disponible en: <<http://jmm.sgmjournals.org/content/46/11/903.full.pdf>>

Hernández, R., Fernández-Collado, C. y Baptista, P (2006). *Metodología de la investigación*. Cuarta edición, pp: 850. McGraw Hill Interamericana, México D.F., México.

Instituto Nacional de Aprendizaje. INA. (2011), *Curso Manipulación de Alimentos*. [Fascículo 1 de 4]. Costa Rica.

- International HACCP Alliance (2012), *Introducción al Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control*. pp: 57. College Station, Texas, EE.UU.
- Leatherhead Food International Ltd (2009). *Microbiology Handbook Dairy Products*. pp: 174. Biddles Ltd., King's Lynn, Reino Unido.
- Leis, R. y Tojo, R. (2010). *Guías Prácticas de Nutrición. Alimentación en Lactantes. An Esp Pediatr 2001; 54: 145-159*, pp: 147-150. Madrid, España.
- Leyva, V., Ruiz, H., Machín, M., Tejedor, R., Martino, T. y Ferrer, Y. (2008). *Primer estudio de Enterobacter sakazakii en alimentos en Cuba*. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Dpto. Microbiología de los Alimentos. Infanta 1158 e/ Llinás y Clavel. Centro Habana. La Habana, Cuba.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, J. y Clark, D. (2009). *Biología de los microorganismos*. Duodécima edición. pp: 1296. Pearson Educación, S.A., Madrid, España.
- Mahon, C., Lehman, D. y Manuselis, G. (2010). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Cuarta edición. pp: 1104. Saunders Elsevier Company. Maryland Heights, Missouri, EE.UU.
- Mahlen, S. (2011). *Serratia Infections: From Military Experiments to Current Practice*. Department of Pathology and Area Laboratory Services, Madigan Healthcare System, Tacoma, Washington, EE.UU. *Clinical Microbiology Reviews*. Rev.2011, 24(4):755, pp: 755-791. American Society for Microbiology (AMS). EE.UU.

- Marth, Elmer H., J. Steele. (2001). *Applied Dairy Microbiology*. Segunda Edición. pp: 759. Marcel Dekker, Inc. New York, NY, EE.UU.
- Mercadé, L. (2009). *Evaluación de las inestabilidades de terreno por asentamientos con urbanización deficitarias en el Área Metropolitana de San Salvador (El Salvador)*. Universitat Politècnica de Catalunya, pp: 19-35. Cataluña, España.
- Mezzatesta, M., Gona, F. y Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* Complex: Clinical Impact and Emerging Antibiotic Resistance. *Future Microbiology*. 2012;7(7):887-902. Londres, Reino Unido. Consultado: 2 de junio de 2014. Disponible en: <<http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb.12.61>>
- Moreno, J.M. (2000). *Guías Prácticas de Nutrición. Alimentación en Lactantes. An Esp Pediatr 2001; 54: 145-159*, pp: 145-147. Madrid, España.
- Oficina de Planificación del Área Metropolitana de San Salvador. OPAMSS. (2007) Consultado: 22 de Diciembre de 2011. Disponible en: <[www.opamss.org.sv/index.html](http://www.opamss.org.sv/index.html)>.
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. OIRSA. (2000). *Manual Técnico de inocuidad en vegetales.*, pp: 30. Honduras.
- Organización Mundial para La Salud. FAO/OMS. (2007). *Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes DIRECTRICES*. Ginebra, Suiza: Ediciones OMS.

Portal de Transparencia Fiscal. (2013). *Presupuestos Públicos Hospital Nacional de Maternidad "Dr. Raúl Argüello Escolán"* . Consultado: 19 de abril de 2013. Disponible en: <[http://www.transparenciafiscal.gob.sv/portal/page/portal/PTF/Presupuestos\\_Publicos/Presupuestos\\_votados/A%F1o%202013/Presupuestos/LP3203-13.pdf](http://www.transparenciafiscal.gob.sv/portal/page/portal/PTF/Presupuestos_Publicos/Presupuestos_votados/A%F1o%202013/Presupuestos/LP3203-13.pdf)>.

Public Health Agency of Canada (2011). *Pathogen Safety Data Sheet- Infectious Substances: Enterobacter*. Consultado: 2 de junio de 2014. Disponible en: < <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/enterobacter-eng.php>>

Public Health Agency of Canada (2012a). *Pathogen Safety Data Sheet- Infectious Substances: Citrobacter spp.* Consultado: 2 de junio de 2014. Disponible en: < <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/citrobacter-eng.php>>

Public Health Agency of Canada (2012b). *Pathogen Safety Data Sheet- Infectious Substances: Pseudomonas spp.* Consultado: 2 de junio de 2014. Disponible en: < <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/pseudomonas-spp-eng.php>>

Public Health Agency of Canada (2012c). *Pathogen Safety Data Sheet- Infectious Substances: Serratia spp.* Consultado: 4 de junio de 2014. Disponible en: < <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/serratia-spp-eng.php>>

Puerta-García, A. Y Mateos-Rodríguez F. (2010). *Enterobacterias*. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Unidad de Enfermedades

Infeciosas. Servicio de Medicina Interna. Elsevier, Medicine,2010:10(51):3426-31. Albacete, España.

Ramaswamy, V., Cresence, V., Rejitha, J., Lekshmi, M., Dharsana, K.S., Prasad, S. y Vijila, H. (2007). *Listeria-Review of Epidemiology and Pathogenesis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* Elsevier. Taiwan Society of Microbiology 2007; 40:4-13. Consultado: 2 de junio de 2014. Disponible en: <<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-microbiology-immunology-and-infection/>>

Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA. (2009). *Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos.* Consultado: jueves 6 de diciembre de 2012. Disponible en: <<http://lecc.com.sv/wp-content/uploads/2012/07/RTCA-Microbiol%C3%B3gia-alimentos-2009.pdf>>

Rodríguez, N., Icochea, E., Calle, S., Noé, N. (2006). Estudio de inocuidad de *Salmonella enterica*, subespecie enterica, serotipo enteriditis, var. Danysz, lisina negativa en pollos parrilleros. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud pública.* Rev. Inv. Vet. Perú 2006; 17(4): 33-38. Lima, Perú. Consultado: 22 de Diciembre de 2011. Disponible en: <[www.scielo.org.pe/pdf/rivp/v17n1/a06v17n1.pdf](http://www.scielo.org.pe/pdf/rivp/v17n1/a06v17n1.pdf)>

Salkinoja-Salonen, M., Vuorio, R., Andersson, M., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A. (1999). *Toxigenic Strains of Bacillus licheniformis Related to Food Poisoning.* Applied Environmental Microbiology. Octubre 1999; 65(10): 4637-4645. American Society for Microbiology (AMS), National Center for Biotechnology Information, U.S National Library of Medicine, MD,

Estados Unidos de Norte América. Consultado: 2 de abril de 2014.  
Disponibile en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91618/>>

Simón, M., Sabaté S., Osanz, A., Bartolomé, R. y Ferrer, M. (2010). *Investigación de un caso de infección neonatal por Enterobacter sakazakii asociada a un preparado en polvo para lactantes. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 28(10), pp: 713-715.*

Swift, B. (2010). *An Investigation of Gram-positive pathogens in Powdered foods*. Thesis submitted to the University of Nottingham for the degree of Master of Research, pp: 228, Nottingham, Inglaterra.

Vanegas, M., Rugeles, L. y Martínez, A. (2009). *Aislamiento e identificación de Enterobacter sakazakii en lactarios de Bogotá, D.C. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Revista Infectio, Asociación Colombiana de Infectología, pp: 36-42.*

Vaquerano, W., Cristales, O. y Palma, J. (2010). *Proyecto "Construcción del nuevo Hospital Nacional de Maternidad"*, pp: 236. San Salvador, El Salvador, C.A.

Wong, H. (1988). *Bacillus Cereus*. Department of Microbiology, Soochow University, China. Consultado: 2 de abril de 2014. Disponible en: <[microbiology.scu.edu.tw/wong/.../ppt/bacillus.pdf](http://microbiology.scu.edu.tw/wong/.../ppt/bacillus.pdf)>.

Wong, V., Levi, K., Baddal, B., Turton, J. y Boswell, T. (2011). *Spread of Pseudomonas fluorescens Due to Contaminated Drinking Water in a Bone Marrow Transplant Unit. Jornal of Clinical Microbiology. 2011;*

49(6):2093-2096. American Society for Microbiology, Washington, D.C.  
EE.UU.

Consultado: 3 de junio de 2014. Disponible en:  
<<http://jcm.asm.org/content/49/6/2093.full> >

## XI. ANEXOS

### ANEXO 1.

#### UTILIZACION DE PPL EN ENTORNOS ASISTENCIALES.

##### **Parte 2: Utilización de PPL en entornos asistenciales.**

Los PPL no son productos estériles y pueden estar contaminadas con organismos patógenos capaces de provocar graves enfermedades. La preparación y la manipulación correctas reducen el riesgo de enfermedad. Siempre que estén disponibles, en el caso de los lactantes más vulnerables deben utilizarse preparaciones líquidas para lactantes listas para usar y comercialmente estériles. Estas preparaciones no contienen microorganismos patógenos, por lo que no entrañan riesgo de infección. Sin embargo, no pueden utilizarse en todos los casos y tal vez sea necesario recurrir a los PPL.

Los PPL no son estériles y pueden contener bacterias nocivas. El PPL reconstituido es un medio idóneo para la proliferación de esos organismos patógenos. Aunque estén presentes en las preparaciones en polvo en concentraciones muy bajas, la preparación y manipulación inapropiadas de PPL reconstituidas ofrece condiciones ideales para la multiplicación de esos organismos, lo que aumenta en gran medida el riesgo de infección. Sin embargo, el riesgo de enfermedad puede reducirse si el PPL se prepara en condiciones higiénicas y se manipula correctamente.

Los entornos asistenciales comprenden no sólo los hospitales sino también los centros de atención de día, como las guarderías. Los hospitales, en especial las unidades de cuidados intensivos, que atienden a lactantes vulnerables son el lugar más expuesto a la infección por *E. sakazakii*, como se ha comentado anteriormente.

En los hospitales y centros de día muchas veces también hay que preparar

grandes lotes de PPL con antelación para usarlos más adelante; esta práctica puede aumentar el riesgo de infección por *E. sakazakii* si no se realiza correctamente.

Dado que los PPL no pueden fabricarse como productos estériles, existe un riesgo intrínseco de infección por bacterias como *E. sakazakii*. Las recomendaciones que se ofrecen a continuación exponen las mejores prácticas en la preparación, el almacenamiento y la manipulación de PPL en el ámbito institucional de atención con miras a reducir el riesgo de infección por *E. sakazakii*. También son apropiadas para reducir el riesgo de infección por *Salmonella*.

## **2.1 Recomendaciones**

### **2.1.1 Uso de preparaciones para lactantes**

1. Las preparaciones para lactantes se seleccionarán de acuerdo con las necesidades médicas del niño.
2. Cuando estén disponibles, se utilizarán preparaciones líquidas para lactantes comercialmente estériles para los niños especialmente vulnerables.

### **2.1.2 Requisitos generales**

**2.8.4** Cada institución dispondrá de directrices escritas sobre la preparación y la manipulación de PPL.

2. Después de lavar el material, se enjuagará debidamente con agua limpia.
3. Esterilización: si se utiliza un esterilizador comercial, se seguirán las instrucciones del fabricante.
4. Si se esteriliza el material por ebullición:
  - a. Se llenará un recipiente grande con agua y se sumergirá por completo todo el material velando por qué no queden burbujas de aire atrapadas en el interior.

- b. Se cubrirá el recipiente con una tapadera y se dejará hervir el agua fuertemente, cuidando de que no llegue a evaporarse por completo.
  - c. Se mantendrá el recipiente cubierto hasta que se necesite usar el material.
4. Se lavarán las manos concienzudamente con agua y jabón antes de extraer el material del esterilizador o el recipiente en el que ha hervido. Se recomienda utilizar pinzas esterilizadas para manipular el material de preparación y administración esterilizado.
5. Para impedir la recontaminación, lo mejor es extraer el material justo antes de utilizarlo. Si no se utiliza inmediatamente, habrá que cubrirlo y guardarlo en un lugar limpio. Los biberones pueden ensamblarse por completo para evitar que se contaminen una vez esterilizados el interior de la botella y el interior y el exterior de la tetina.

#### **2.1.4 Preparación de tomas a partir de PPL**

La práctica más conveniente es preparar las tomas cada vez y administrarlas de inmediato. En los hospitales y otros entornos asistenciales se prepara alimento para muchos lactantes. Lo ideal es que cada toma se prepare en un biberón distinto, pero en ciertas circunstancias todas las tomas se preparan de una vez en un recipiente grande y a continuación se distribuyen en biberones. Esta práctica entraña riesgos porque las PPL están más expuestas a la contaminación en grandes recipientes abiertos. Además, los grandes volúmenes de alimento preparado tardan mucho más tiempo en enfriarse, con lo que aumenta el potencial de proliferación de bacterias nocivas. Las recomendaciones que siguen indican las mejores prácticas para la preparación de alimento en recipientes individuales o en lotes para un consumo inmediato:

1. Se limpiará y desinfectará la superficie sobre la cual vaya a prepararse el alimento.
2. Se lavarán las manos con agua y jabón y se secarán con un paño limpio o

un paño de un solo uso.

3. Se hervirá un volumen suficiente de agua limpia. Si se utiliza un hervidor automático, habrá que esperar hasta que éste se desconecte; de lo contrario, habrá que asegurarse de que el agua hierva con fuerza. Nota: el agua embotellada no es estéril y debe hervirse antes de utilizarla. Nunca se usarán hornos microondas para preparar PPL, pues el calentamiento no es uniforme y puede dar lugar a “bolsas calientes” capaces de quemar la boca del bebé.

4. Cuidando de no quemarse, se verterá la cantidad apropiada de agua hervida, que se habrá dejado enfriar ligeramente, aunque no por debajo de 70°C, en una taza o un biberón limpio y esterilizado. La temperatura del agua se comprobará mediante un termómetro esterilizado.

a. Si se prepara un lote en un recipiente grande, éste habrá sido limpiado y esterilizado. No tendrá más de 1 litro de capacidad, estará fabricado con un material compatible con los alimentos y soportará líquidos calientes.

5. Se añadirá al agua la cantidad exacta de PPL con arreglo a las instrucciones de la etiqueta. Usar más o menos cantidad de polvo de la indicada puede hacer enfermar al lactante.

a. Si se usan biberones: se ensamblarán las piezas limpias y esterilizadas de los biberones de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agitarán o moverán suavemente hasta que el contenido esté perfectamente mezclado, cuidando de evitar las quemaduras.

b. Si se utilizan tazas: se mezclarán perfectamente los ingredientes removiendo con una cuchara limpia y esterilizada, cuidando de evitar las quemaduras.

**2.8.4** Se vigilará la aplicación de las directrices.

**2.8.4** El personal encargado de preparar los PPL estará plenamente

adiestrado en relación con las directrices y con los requisitos de higiene en la preparación de alimentos.

**2.8.4** Las PPL preparadas en entornos asistenciales tendrán una trazabilidad completa.

Se destinará una zona limpia exclusivamente a la preparación y el almacenamiento de PPL. En el nivel de los países se prepararán directrices complementarias sobre la distribución de la sala donde se preparen los PPL.

### **2.1.3 Limpieza y esterilización del material de preparación y administración de PPL**

Es sumamente importante que todo el material empleado para alimentar a los lactantes y para preparar las tomas haya sido concienzudamente limpiado y esterilizado antes de usarlo.

1. Siempre se lavarán las manos perfectamente con agua y jabón antes de limpiar y esterilizar el material de preparación y administración que vaya a utilizarse. En los entornos asistenciales, se recomienda disponer de una pila dedicada exclusivamente al lavado de manos.

2. Limpieza: se lavará concienzudamente en agua jabonosa caliente el material necesario para la preparación y la administración (tazas, biberones, tetinas y cucharas). Cuando se utilicen biberones, se utilizarán cepillos especiales limpios para frotar el interior y el exterior de los biberones y las tetinas a fin de eliminar los restos de la toma anterior.

c. Si se prepara un lote en un recipiente grande: se removerán los ingredientes con una cuchara limpia y esterilizada, asegurándose de que se mezclan debidamente. Se distribuirá el contenido inmediatamente en las tazas o los biberones, cuidando de evitar las quemaduras.

6. Se enfriarán rápidamente las tomas hasta la temperatura adecuada para su administración manteniéndolos bajo el chorro del grifo o colocándolos en

un recipiente de agua fría o agua con hielo. Se cuidará de que el nivel del agua esté por debajo del de la tapadera de la taza o el biberón.

7. Se secará el exterior de las tazas o los biberones con un paño limpio o un paño desechable y se rotulará cada uno con la siguiente información: tipo de PPL, nombre o número de identificación del niño, fecha y hora de preparación, y nombre de la persona que lo preparó.

8. Puesto que se utiliza agua muy caliente en la preparación, es indispensable comprobar la temperatura del contenido antes de alimentar a los bebés, a fin de evitar quemarles la boca. En caso necesario, se seguirá enfriando como en el paso 6.

9. Se desechará toda preparación reconstituida que no haya sido consumida en dos horas.

#### **2.1.5 Preparación de tomas con antelación**

Lo mejor es reconstituir la PPL para cada toma, ya que el PPL una vez preparada ofrece las condiciones ideales para el crecimiento de bacterias nocivas. Por razones prácticas, a veces es necesario preparar las tomas con antelación. En los entornos asistenciales, tal vez haya que preparar lotes de alimento para los lactantes y almacenarlos hasta que se necesitan. Las recomendaciones que siguen describen las prácticas más seguras en la preparación de PPL con antelación y en su conservación hasta el momento preciso. Si no se dispone de refrigeración, las tomas habrán de ser preparadas de nuevo cada vez y consumidas de inmediato; no se prepararán por adelantado para utilizarlas después.

1. Se seguirán los pasos 1 a 7 de la sección 2.1.4. Si se usan tazas, se preparará un lote de alimento en una jarra o un recipiente limpio y esterilizado de capacidad no superior a un litro y con tapadera. El PPL preparado podrá refrigerarse dentro del recipiente cubierto con su tapadera y distribuirse en tazas a medida que sea necesario.

2. Se introducirán las tomas previamente enfriadas en un frigorífico de uso

exclusivo. La temperatura del frigorífico no superará los 5°C y se controlará todos los días.

3. Las tomas podrán almacenarse en el frigorífico durante un máximo de 24 horas.

No se recomienda refrigerar y almacenar grandes volúmenes de PPL reconstituida, pues la refrigeración puede ser insuficiente y pueden proliferar bacterias nocivas.

#### **2.1.6 Calentamiento de las tomas almacenadas**

1. Sólo se extraerán las tomas del frigorífico inmediatamente antes de utilizarlas.

2. Se recalentarán durante un máximo de 15 minutos.

3. Se agitará o moverá de vez en cuando la toma en su recipiente cubierto durante el calentamiento para cerciorarse de que el contenido se calienta uniformemente. Nota: nunca se utilizarán hornos microondas para recalentar las tomas, ya que el calentamiento no es uniforme y puede haber “bolsas calientes” que quemen la boca del bebé.

4. Se comprobará la temperatura del alimento antes de comenzar a alimentar al bebé.

Se desechará toda toma recalentada que no se haya consumido en dos horas.

#### **2.1.7 Transporte de biberones**

En muchos entornos institucionales, los biberones se preparan en un lugar central desde el que luego se distribuyen a las distintas zonas en que se necesitan. El transporte de los biberones ya preparados supone un riesgo, ya que aumenta el tiempo transcurrido entre la preparación y el consumo, lo que da a las bacterias nocivas la oportunidad de multiplicarse. Las tomas que no vayan a ser administradas en las dos horas siguientes a su preparación

serán refrigeradas antes del transporte, transportadas en condiciones de refrigeración (o en ambiente fresco) y recalentadas en el destino. Las recomendaciones siguientes indican las prácticas más seguras en el transporte de tomas ya preparadas.

1. Si las tomas van a administrarse en las dos horas que siguen a la preparación:

a. Se prepararán las tomas de acuerdo con la sección 2.1.4.

b. Se transportarán y utilizarán de inmediato.

2. Si las tomas no van a administrarse en las dos horas que siguen a la preparación:

a. Se prepararán las tomas y se introducirán en el frigorífico según se indica en la sección 2.1.5.

b. Se velará por que las tomas estén frías antes de trasladarlas.

c. Las tomas sólo se extraerán del frigorífico inmediatamente antes de transportarlas.

d. Se transportarán las tomas frías hasta su destino (si el transporte dura más de 30 minutos, se recomienda la refrigeración o bolsas de conservación en frío).

e. Se recalentarán en el destino de acuerdo con lo recomendado en la sección 2.1.6.

f. Otra posibilidad es introducir las tomas transportadas bajo refrigeración o en bolsas de frío en un frigorífico en el destino y utilizarlas en un plazo máximo de 24 horas desde su preparación. Las tomas que hayan sido recalentadas y las que hayan sido parcialmente consumidas no deberán

meterse de nuevo en el frigorífico y se desecharán si no se consumen en un plazo de dos horas.

### **2.1.8 Tiempos de espera y de administración**

1. Se desecharán todas las tomas que no hayan sido consumidas en las dos horas siguientes a su preparación (a menos que se hayan conservado en el frigorífico).
2. Las tomas ya preparadas podrán conservarse en el frigorífico ( $\leq 5^{\circ}\text{C}$ ) durante un máximo de 24 horas.
3. Se desechará todo el alimento sobrante.
4. El tiempo de espera para la administración por sonda continua o en bolos no superará las dos horas a temperatura ambiente.
5. El alimento destinado a la administración por sonda continua o en bolos no se calentará durante la administración.

### **2.1.7 Transporte de biberones**

En muchos entornos institucionales, los biberones se preparan en un lugar central desde el que luego se distribuyen a las distintas zonas en que se necesitan. El transporte de los biberones ya preparados supone un riesgo, ya que aumenta el tiempo transcurrido entre la preparación y el consumo, lo que da a las bacterias nocivas la oportunidad de multiplicarse. Las tomas que no vayan a ser administradas en las dos horas siguientes a su preparación serán refrigeradas antes del transporte, transportadas en condiciones de refrigeración (o en ambiente fresco) y recalentadas en el destino. Las recomendaciones siguientes indican las prácticas más seguras en el transporte de tomas ya preparadas.

1. Si las tomas van a administrarse en las dos horas que siguen a la preparación:
  - c. Se prepararán las tomas de acuerdo con la sección 2.1.4.
  - d. Se transportarán y utilizarán de inmediato.

2. Si las tomas no van a administrarse en las dos horas que siguen a la preparación:

a. Se prepararán las tomas y se introducirán en el frigorífico según se indica en la sección 2.1.5.

b. Se velará por que las tomas estén frías antes de trasladarlas.

c. Las tomas sólo se extraerán del frigorífico inmediatamente antes de transportarlas.

d. Se transportarán las tomas frías hasta su destino (si el transporte dura más de 30 minutos, se recomienda la refrigeración o bolsas de conservación en frío).

e. Se recalentarán en el destino de acuerdo con lo recomendado en la sección 2.1.6.

f. Otra posibilidad es introducir las tomas transportadas bajo refrigeración o en bolsas de frío en un frigorífico en el destino y utilizarlas en un plazo máximo de 24 horas desde su preparación. Las tomas que hayan sido recalentadas y las que hayan sido parcialmente consumidas no deberán meterse de nuevo en el frigorífico y se desecharán si no se consumen en un plazo de dos horas.

### **2.1.8 Tiempos de espera y de administración**

1. Se desecharán todas las tomas que no hayan sido consumidas en las dos horas siguientes a su preparación (a menos que se hayan conservado en el frigorífico).

3. Las tomas ya preparadas podrán conservarse en el frigorífico ( $\leq 5^{\circ}\text{C}$ ) durante un máximo de 24 horas.

4. Se desechará todo el alimento sobrante.

5.El tiempo de espera para la administración por sonda continua o en bolos no superará las dos horas a temperatura ambiente.

6.El alimento destinado a la administración por sonda continua o en bolos no se calentará durante la administración.

## **2.2 Justificación de las recomendaciones**

### **2.2.1 Elección de la preparación para lactantes**

Las preparaciones para lactantes deben seleccionarse de acuerdo con las necesidades médicas del niño.

Siempre que sea posible, en los entornos asistenciales deben utilizarse preparaciones líquidas estériles, especialmente cuando se alimenta a lactantes muy expuestos. Esos alimentos no contienen bacterias nocivas. En los entornos sanitarios, como las unidades de cuidados intensivos para recién nacidos, se atiende a lactantes con máximo riesgo de infección por *E. sakazakii*, es decir, los recién nacidos y los menores de dos meses. Sin embargo, no siempre se dispone de preparación líquida para lactantes (por ejemplo, para los lactantes que tienen necesidades dietéticas especiales), y a veces se utilizan PPL en su lugar.

### **2.2.2 Requisitos generales**

La preparación de las tomas en instituciones como los hospitales debe controlarse cuidadosamente. Ello se debe a que tal vez sea necesario preparar grandes volúmenes de alimento, y a que los lactantes alimentados en estos entornos pueden estar particularmente expuestos a la infección.

Para ayudar a controlar la preparación de alimento a partir de PPL, debe disponerse de una zona exclusivamente dedicada a la preparación y el almacenamiento de las tomas, a fin de reducir el riesgo de contaminación cruzada con bacterias nocivas. Cada institución deberá disponer de directrices por escrito para la preparación y la manipulación de alimento preparado a partir de PPL y habrá de supervisar su aplicación. Con esto se asegura una manipulación uniforme y en condiciones higiénicas. Habrá que

capacitar plenamente al personal encargado de preparar las tomas, para que comprenda los riesgos que entrañan las PPL y sepan qué medidas adoptar para garantizar la reducción o el control de esos riesgos.

### **2.2.3 Buenas prácticas de higiene**

Se ha informado de que algunos brotes de *E. sakazakii* tienen como causa probable las malas prácticas de higiene (Forsythe, 2005). La persona que prepara la toma debe limpiar y desinfectar la superficie de preparación y lavarse previamente las manos con agua y jabón. Ello se debe a que las manos pueden transportar bacterias nocivas, que también pueden estar presentes en las superficies. El lavado de las manos y la limpieza y desinfección de la superficies reduce el riesgo de que se contaminen las tomas durante la preparación.

También deben lavarse las manos después de utilizar el excusado y después de cambiar pañales, pues en la orina y las heces de los lactantes se han encontrado bacterias nocivas, incluido *E. sakazakii* (Drudy et al., 2006). Esas bacterias pueden fácilmente pasar a las manos y contaminar las tomas durante su preparación.

### **2.2.4 Limpieza y esterilización del material de preparación y administración de las tomas**

Algunos brotes de infección por *E. sakazakii* se han atribuido al material utilizado para preparar las tomas (Gürtler et al., 2005). *E. sakazakii* está muy extendido en el medio ambiente y se ha demostrado que se fija y crece (formando “biopelículas”) en la superficies comúnmente utilizadas en el material para alimentar lactantes, como el látex, la silicona y el acero inoxidable. Así pues, es importante que todo el material utilizado para administrar y preparar alimentos para lactantes (tazas, biberones, anillas y tetinas) haya sido escrupulosamente limpiado y esterilizado antes de utilizarlo, ya que la formación de biopelículas en ese material puede dar lugar a focos de infección capaces de seguir contaminando las tomas (Iversen,

Lane y Forsythe, 2004).

### **2.2.5 Temperatura del agua utilizada para la reconstitución**

Según la evaluación del riesgo realizada por la FAO/OMS (FAO/OMS, 2006), el riesgo se reduce notablemente cuando los PPL se reconstituyen con agua a temperatura no inferior a 70 °C, ya que a esa temperatura se destruyen todos los *E. sakazakii* presentes en el polvo. Ese nivel de reducción del riesgo se mantiene incluso si se prolongan los tiempos de administración del alimento (hasta dos horas), e incluso si la temperatura ambiente de la habitación se eleva a 35°C. Por consiguiente, reconstituir las PPL con agua a más de 70 °C reduce de manera drástica el riesgo para todos los lactantes, incluso los que se alimentan lentamente y los lactantes en climas cálidos en los que no se disponga de refrigeración para el PPL preparado (por ejemplo, países en desarrollo).

Cuando se prepara el PPL con agua a menos de 70 °C, la temperatura no es suficiente para inactivar por completo los *E. sakazakii* presentes en el polvo. Esto preocupa por dos razones: a) basta un pequeño número de células para provocar enfermedad, por lo cual es importante que las células presentes en la PPL sean destruidas; y b) existe el potencial de que las células supervivientes se multipliquen en la PPL reconstituida. Este riesgo aumenta cuando la PPL reconstituida se mantiene durante largos períodos por encima de la temperatura de refrigeración.

Se ha expresado preocupación acerca del uso de agua muy caliente para reconstituir la PPL, pero el riesgo de infección por *E. sakazakii* sólo se reduce drásticamente cuando se utiliza agua a temperatura superior a 70 °C (véase el apéndice 3). Actualmente, las instrucciones en muchos productos de PPL indican que ésta debe reconstituirse con agua a una temperatura de unos 50 °C. Sin embargo, de acuerdo con la evaluación del riesgo realizada por la FAO/OMS, la reconstitución con agua a 50 °C suele producir el mayor

aumento del riesgo, a menos que el PPL reconstituido se consuma de inmediato. En ninguna circunstancia se reduce el riesgo cuando el PPL se reconstituye con agua a 50 °C. Las instrucciones de los fabricantes deben revisarse a la luz de las conclusiones de la evaluación del riesgo.

### **2.2.6 Volumen del recipiente para la preparación de lotes**

En los entornos institucionales a menudo se preparan varias tomas en un solo recipiente grande, en el que se mezclan para a continuación transferirlas a biberones o tazas. Hay pruebas incidentales que sugieren que se preparan grandes volúmenes que se dejan enfriar durante periodos prolongados en el recipiente en el que se han preparado (dentro o fuera del frigorífico).

La preparación en recipientes grandes aumenta el riesgo de infección por las siguientes razones:

- Hay más probabilidades de que se contaminen las tomas, y
- Los volúmenes grandes pueden tardar mucho tiempo en enfriarse, lo que significa que la preparación permanece durante mucho tiempo a una temperatura que favorece la proliferación de bacterias nocivas. Según la evaluación del riesgo realizada por la FAO/OMS, el uso de recipientes de gran tamaño (25 litros) para la preparación y el enfriamiento de tomas está asociado a un riesgo mayor, de resultados del enfriamiento más lento; por lo tanto, las tomas deben enfriarse en recipientes pequeños siempre que sea posible.

### **2.2.7 Tiempos de espera y de administración**

De acuerdo con la evaluación del riesgo realizada por la FAO/OMS para *E. sakazakii* en las PPL, la prolongación de los tiempos de administración suele estar asociada a un mayor riesgo, debido al posible crecimiento bacteriano. Ese riesgo aumenta cuando la temperatura ambiente es más cálida (30 °C y 35 °C). Sin embargo, cuando las PPL se reconstituyen con agua a 70 °C o más, el riesgo se reduce espectacularmente, y la reducción del riesgo se

mantiene durante dos horas hasta la administración. Esta conclusión tiene repercusiones

prácticas para la reducción del riesgo de infección por *E. sakazakii* en el caso de los lactantes que se alimentan lentamente y el de los que viven en climas cálidos en los que la temperatura ambiente de la habitación puede hallarse en torno a los 35 °C.

Se recomienda que la preparación reconstituida no se mantenga a temperatura ambiente durante más de dos horas, aunque se haya utilizado agua a temperatura no inferior a 70 °C para reconstituirla. Ello se debe a que la toma puede haber sido contaminada durante la preparación, o pueden haberse introducido bacterias nocivas en el recipiente o el biberón a partir de la boca del lactante. También es posible que el agua caliente (70 °C) pueda haber activado esporas de bacterias nocivas presentes en la preparación. Mantener las tomas preparadas por encima de la temperatura de refrigeración durante periodos prolongados ofrece la oportunidad para que se multipliquen esas bacterias.

### **2.2.8 Etiquetado de las tomas**

Las tomas ya preparadas deben etiquetarse, indicando los detalles de la PPL utilizada, el nombre del paciente, el nombre de la persona que la ha preparado y la hora y fecha de preparación. Como los entornos asistenciales tienen a su cargo muchos lactantes, las tomas suelen prepararse a granel. Un etiquetado apropiado garantizará la trazabilidad de todas las tomas.

### **2.2.9 Almacenamiento de las tomas preparadas**

Si las tomas no van a consumirse en un plazo de dos horas desde la preparación, deben refrigerarse inmediatamente después de la preparación y almacenarse en un frigorífico (a una temperatura máxima de 5 °C). La refrigeración a temperaturas inferiores a 5 °C impide o retrasa la proliferación de bacterias nocivas. La evaluación del riesgo realizada por la FAO/OMS

mostró un aumento del riesgo inferior a 1,3 veces cuando las tomas preparadas se refrigeraban debidamente.

Los alimentos almacenados en el frigorífico deben utilizarse en un plazo de 24 horas desde la preparación. Aunque se haya utilizado agua a más de 70 °C para reconstituir la PPL, cabe la posibilidad de que hayan sobrevivido bacterias capaces de proliferar a temperaturas de refrigeración, que pueden provocar que se estropeen las tomas. La calidad de las PPL reconstituidas también puede deteriorarse si el almacenamiento es prolongado. Si existe un riesgo mayor de contaminación microbiana debido a la zona o el entorno de preparación, los tiempos de almacenamiento deben reducirse; de lo contrario, habrá que preparar las tomas de nuevo cada vez y administrarse de inmediato.

El frigorífico debe ser capaz de llevar la preparación a una temperatura no superior a 5 °C en un plazo de una hora desde la preparación. La temperatura del frigorífico debe supervisarse cada día. Las tomas deben enfriarse rápidamente antes de colocarlas en el frigorífico, ya que si se introducen las tomas calientes aumentará la temperatura de éste. Las tomas pueden enfriarse rápidamente sumergiéndolas en un chorro de agua fría o en un recipiente con agua fría.

#### **2.2.10 Calentamiento de las tomas almacenadas**

Dada la posibilidad de proliferación de bacterias nocivas a temperaturas superiores a 5 °C, la PPL reconstituida almacenada sólo debe extraerse del frigorífico y volverse a calentar inmediatamente antes de la administración. No debe dejarse que las tomas se calienten durante más de 15 minutos, pues el recalentamiento durante largos períodos hace que la toma se mantenga a una temperatura ideal para la proliferación de bacterias nocivas. El mantenimiento de las tomas en calentadores de biberones durante largos períodos fue señalado como una de las causas probables de un brote de infección por *E. sakazakii* (Gürtler, Kornacki y Beuchat, 2005).

### **2.2.11 Transporte de las tomas preparadas**

En muchos entornos asistenciales, las tomas se preparan en una zona central desde la que luego se transportan a los distintos pabellones o zonas del establecimiento. El transporte de las tomas preparadas entraña un riesgo de infección, al aumentar el tiempo que transcurre entre la preparación y el consumo, lo que da la oportunidad para la multiplicación de bacterias nocivas.

Debido a ese potencial de multiplicación, las tomas que no sean consumidas en un plazo de dos horas desde su preparación deben enfriarse y refrigerarse rápidamente hasta que su temperatura se reduzca a no más de 5 °C. La toma enfriada puede a continuación ser transportada a su destino. En el destino, las tomas pueden recalentarse para la administración (sección 2.2.10). Otra posibilidad es volver a meter las tomas en un frigorífico y utilizarlas en un plazo de 24 horas desde su preparación.

Si el transporte dura más de 30 minutos, se recomienda que las tomas sean transportadas en condiciones de refrigeración con el fin de impedir que se calienten. Si no se dispone de transporte refrigerado, las tomas pueden transportarse en un recipiente refrigerado, por ejemplo una bolsa de conservación que contenga paquetes de hielo.

Tomado de: *Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes DIRECTRICES. 2007.* pp: 8-14.

**ANEXO 2.**

VIÑETA DE CONTROL.

VIÑETA DE CONTROL.

INVESTIGADOR: Daniela Flores Juárez .

FECHA: \_\_\_\_\_

PUNTO DE CONTROL: \_\_\_\_\_ MUESTRA No.: \_\_\_\_\_ TEMPERATURA: \_\_\_\_\_

ANALIZADA PARA: *E. sakazakii* \_\_\_\_\_ *S. enterica* \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES:

\_\_\_\_\_

### ANEXO 3.

### PUNTOS DE MUESTREO.



Fig. 2. Representación de los puntos de muestreo.

## ANEXO 4.

### CUADRO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

#### 4.1 *Enterobacter sakazakii*.

#### Cuadro V. Cuadro utilizado para la recolección de datos durante la fase de laboratorio para *E. sakazakii*.

	Muestreo: #			Fecha: --/--/--							
	Marca	PPL SIN RECONSTITUIR	PPL RECONSTITUIDO	DESPUES DE LA ESTERILIZACIÓN	DESPUES DE 24 HRS DE REFRIGERACIÓN						
Semana 1	VERDE AZUL	100g	10g	1g	100ml	10ml	1ml	100ml	10ml	1ml	Temp.
Semana 2	VERDE AZUL										
Semana 3	VERDE AZUL										
Semana 4	VERDE AZUL										
Semana 5	VERDE AZUL										
Semana 6	VERDE AZUL										
Semana 7	VERDE AZUL										
Semana 8	VERDE AZUL										

Observaciones:

**4.2 Salmonella enterica.**

**Cuadro VI. Cuadro utilizado para la recolección de datos durante la fase de laboratorio para S. enterica.**

Muestreo: #			Fecha: --/--/--						
	Marca	PPL SIN RECONSTITUIR		PPL RECONSTITUIDO		DESPUES DE LA ESTERILIZACIÓN		DESPUES DE 24 HRS DE REFRIGERACIÓN	
		Tetrationato	Rappaport	Tetrationato	Rappaport	Tetrationato	Rappaport	Tetrationato	Rappaport
Semana 1	VERD E								
	AZUL								
Semana 2	VERD E								
	AZUL								
Semana 3	VERD E								
	AZUL								
Semana 4	VERD E								
	AZUL								
Semana 5	VERD E								
	AZUL								
Semana 6	VERD E								
	AZUL								
Semana 7	VERD E								
	AZUL								
Semana 8	VERD E								
	AZUL								

Observaciones:

En donde: 0 = Ausencia 1 = Presencia

## ANEXO 5.

REFERENCIAS FOTOGRAFICAS DE LOS PROCEDIMIENTOS EFECTUADOS DURANTE LA FASE DE LABORATORIO PARA *E. SAKAZAKII* Y *S. ENTERICA*.



Fig. 3. Medición y Separación de las cantidades de leche en gramos.



Fig. 4. Suspensiones uniformes en agua destilada esterilizada.



Fig. 5. 10ml de suspensión agregados a 90ml de caldo de enriquecimiento de EE

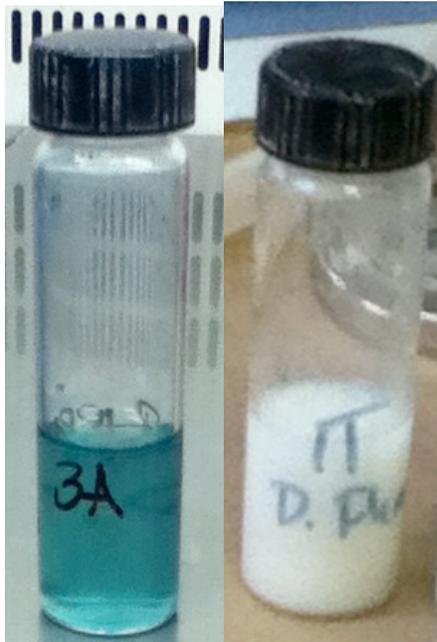


Fig. 6. 0.1ml de suspensión agregados a 10ml de caldo Rappaport y 1ml agregados a 10ml de caldo de TT.

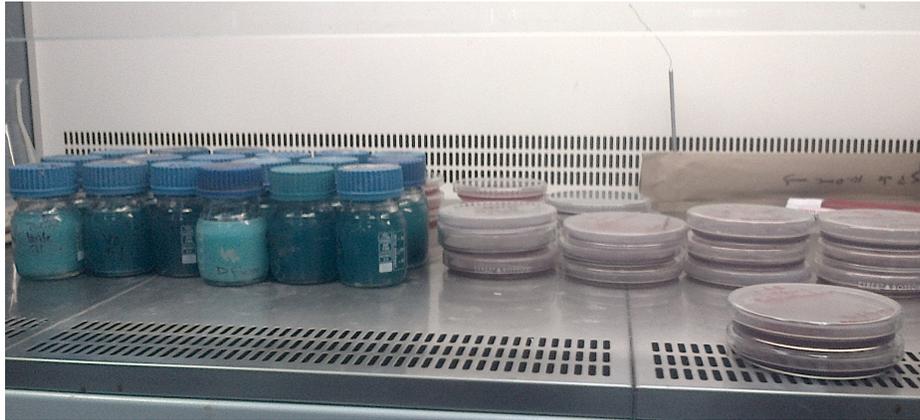


Fig. 7. Toma de asada de cada enriquecimiento EE en Cajas Petri con Agar VRBG.



Fig. 8. Toma de asada de caldo Rappaport y TT en Cajas Petri con Agar XLD.

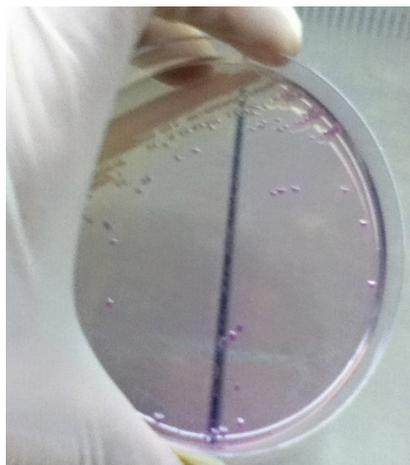
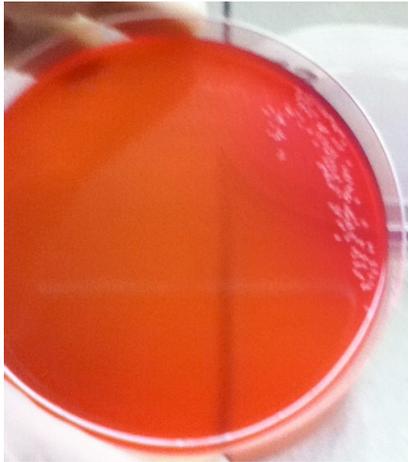
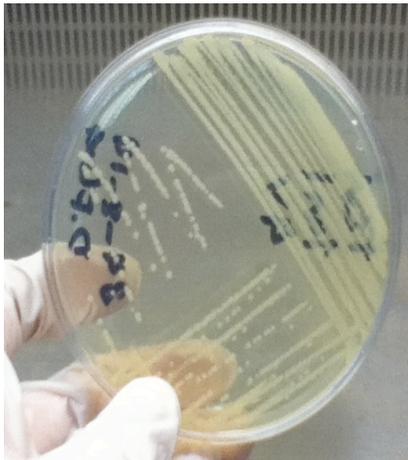


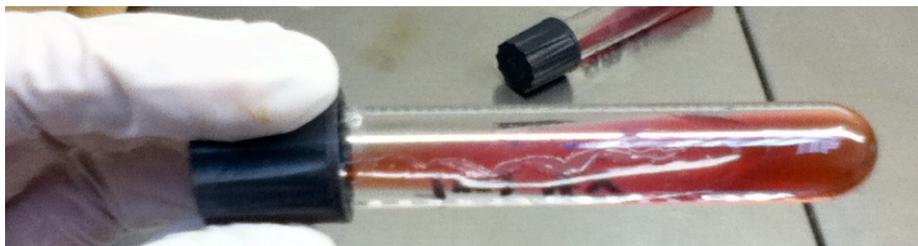
Fig. 9. Selección de Cajas Petri con colonias sospechosas de *E. sakazakii*.



**Fig. 10. Selección de Cajas Petri con colonias sospechosas de *S. enterica*.**



**Fig. 11. Selección de Caja Petri con crecimiento bacteriano en TSA.**



**Fig. 12. Realización de prueba en TSI.**



**Fig. 13. Aplicación de prueba API® 20E (BioMérieux).**

## ANEXO 6.

FOTOGRAFÍAS DE ALGUNOS DE LOS CRECIMIENTOS OBTENIDOS Y APLICACIÓN DE API® 20E (BIOMÉRIEUX).

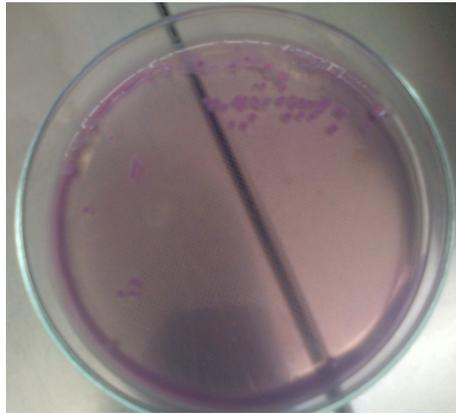


Fig. 14. Caja Petri con colonia sospechosa para *E. sakazakii*.



Fig. 15. Caja Petri con colonia sospechosa para *S. enterica*.

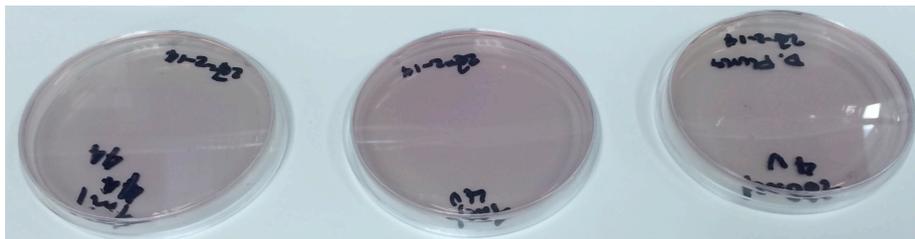


Fig. 16. Cajas Petri en ausencia de crecimiento de colonias sospechosas para *E. sakazakii*.



Fig. 17. Caja Petri en ausencia de crecimiento de colonias sospechosas para *S. enterica*.

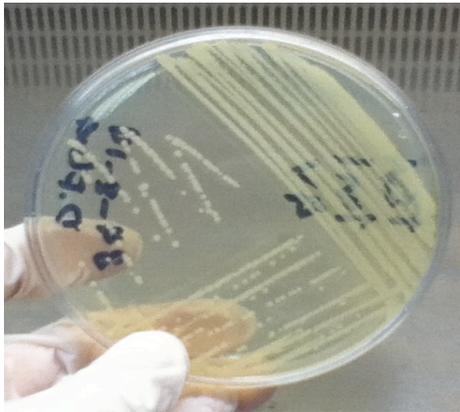


Fig. 18. Caja Petri con crecimiento bacteriano en TSA



Fig. 19. Prueba de API® 20E (BioMérieux).