

Trabajo Fin de Máster:

***CRONOBACTER SAKAZAKII UN PATÓGENO EMERGENTE EN
FÓRMULAS DE LACTANTES***

Cronobacter sakazakii an emergent pathogen in infant formula

Melissa Gelada Acosta



Tutora: Dra. Victoria de Zárate Machado
Área de conocimiento: Microbiología
Departamento: Microbiología
Curso 2022-23 (Julio)

Índice

<i>Resumen</i>	2
<i>Abstract</i>	2
1. Introducción	3
3. Material y métodos	3
4. Cronobacter sakazakii	3
5. C. sakazakii en fórmulas infantiles en polvo	5
6. Infección por C. sakazakii en lactantes	8
7. Normativa y métodos de análisis	11
8. Medidas de prevención y control	14
9. Conclusiones	15
10. Bibliografía	17

Resumen

Cronobacter sakazakii es un microorganismo patógeno de carácter emergente que puede contaminar la fórmula infantil en polvo destinada a lactantes. Las características bioquímicas y fisiológicas de esta bacteria, así como la manipulación del producto con unas medidas higiénicas deficientes, favorecen la vía de entrada al lactante, provocando en la mayor parte de los casos, enfermedades muy graves que pueden dar lugar a secuelas permanentes o incluso la muerte del bebé.

Por estos motivos, se ha establecido una normativa muy estricta relativa a la presencia de *C. sakazakii* en la fórmula infantil en polvo, así como medidas de control que eviten en la medida de lo posible que el producto se contamine en cualquiera de sus fases de producción y en el momento de su reconstitución, cuando el lactante va a ser alimentado.

Palabras clave: *Cronobacter sakazakii*, fórmula infantil en polvo, enterocolitis necrosante, meningitis.

Abstract

Cronobacter sakazakii is an emerging pathogen that can contaminate powdered infant formula intended for infants. The biochemical and physiological characteristics of this bacterium, as well as the handling of the product with deficient hygienic measures, favor the route of entry into the infant, causing in most cases very serious illnesses that can give rise to permanent sequelae or even the death of the baby.

For these reasons, very strict regulations have been established regarding the presence of *C. sakazakii* in powdered infant formula, as well as control measures that prevent, as far as possible, the product from being contaminated in any of its production phases and at the time of its reconstitution, when the infant is going to be fed.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, infant powdered formula, necrotizing enterocolitis, meningitis.

1. Introducción

Cronobacter sakazakii es una bacteria reconocida por la FAO-OMS como un microorganismo con un gran potencial de patogenicidad, ya que puede causar graves enfermedades en lactantes, prematuros e inmunodeprimidos. Desde que se describiera por primera vez su presencia en el año 1988 (Sulaiman *et al.*, 2021), la principal vía de contaminación de los lactantes con *C. sakazakii* han sido las fórmulas infantiles en polvo (FIP) que se utilizan en sustitución de la leche materna (Henry y Fouladkhah, 2019; Negrete *et al.*, 2022). Asimismo, debido al uso cada vez más generalizados de las FIP, la infección por *C. sakazakii* es un tema de preocupación creciente a nivel mundial (CDC, 2023).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión sobre *Cronobacter sakazakii* causante de infecciones en lactantes a través del consumo de FIP. En primer lugar, se describirán las principales características de la bacteria, sus rutas de acceso a las FIP y las condiciones de crecimiento en las mismas. A continuación, se tratará la infección que produce en lactantes, la normativa referente a su presencia en las FIP, así como los métodos de análisis para su detección. Finalmente, se abordarán las principales medidas para evitar la infección, tanto en el proceso de producción de las FIP como durante su administración al bebé.

3. Material y métodos

La búsqueda de referencias bibliográficas fue llevada a cabo, en su mayoría, a través de los motores de búsqueda *Web of Science* y *PubMed*. Las palabras clave utilizadas fueron *Cronobacter spp.* y *C. sakazakii* en combinación con diferentes palabras como *powdered infant formula*, *pathogenesis*, *characteristics*. La lectura de los artículos encontrados ofrecía nueva información a través de la cual buscar nuevas entradas. Se han excluido, en la medida de lo posible, publicaciones de hace más de 5 años. El resultado final fue un total de 39 artículos seleccionados para la elaboración del trabajo.

4. *Cronobacter sakazakii*

El género *Cronobacter* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se compone de 7 especies, *C. condimenti*, *C. dublinensis*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. sakazakii*, *C. turicensis* y *C. universalis* (Liu *et al.*, 2021). Se clasifican en 3 grupos, de acuerdo

con su relevancia clínica, distribuyéndose de la siguiente forma: Grupo 1, *C. sakazakii* y *C. malonaticus*; Grupo 2: *C. turicensis* y *C. universalis*; y Grupo 3: *C. dublinensis*, quedando *C. condimenti* y *C. muytjensii* excluidas de esta clasificación debido a su menor importancia clínica (Holy *et al.*, 2018).

Conforme a su inclusión en el Grupo 1, *C. sakazakii* y *C. malonaticus* son las que presentan una mayor preocupación (Henry y Fouladkhah, 2019) y entre ellas destaca *C. sakazakii*, ya que es la que se relaciona con la aparición de brotes derivados por la contaminación de las FIP (AESAN, 2023; Díaz *et al.*, 2022) y la que tiene mayor probabilidad de dar lugar a resistencias (Ke *et al.*, 2021).

C. sakazakii fue descrita en por primera vez en el año 1961 como *Enterobacter cloacae* pigmentado amarillo (Urmenyi *et al.*, 1961), y posteriormente, en 1980 se clasificó como una nueva especie, *Enterobacter sakazakii*, hasta que, en el año 2007, se propuso la reclasificación del género *Enterobacter*, al actual *Cronobacter* (Yan *et al.*, 2012; Henry y Fouladkhah, 2019).

Es un bacilo gram negativo, móvil, anaerobio facultativo, peritricamente flagelado y no formador de esporas (Henry y Fouladkhah, 2019; Pakbin *et al.*, 2022). Sus principales características bioquímicas se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales características bioquímicas de *C. sakazakii* (Castro, 2013).

PRUEBA	RESULTADO
Pigmentación amarilla	+
ADH	+
LDC	-
ODC	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
Desarrollo en KCN	+
Prueba de VP	+
Hidrólisis de esculina	+
Prueba de la ADNsa	positiva tras 7 días
Fermentación de adonitol	-
Fermentación de lactosa	+
Utilización de D-arabinosa	no determinado
Utilización de dulcitol	algunas cepas
Utilización de lactulosa	+
Utilización de malonato	algunas cepas
Utilización de melobiosa	+
Utilización de fenilacetato	-
Utilización de m-gluco-piranososa	-
Utilización de L-ramnosa	+
Utilización de D-sorbitol	-
Utilización de sacarosa	algunas cepas
Utilización de xilitol	-

Por otra parte, *C. sakazakii* tiene la capacidad de formar biofilms en diferentes superficies como acero inoxidable, vidrio, látex, silicio y policarbonato, uniéndose rápidamente a materiales hidrofóbicos, como el plástico y a materiales hidrofílicos (Odeyemi *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022). Para la formación de biofilms, es indispensable que la bacteria tenga movilidad y sea productora de exopolisacáridos (Odeyemi *et al.*, 2019).

En cuanto a la ecología, *C. sakazakii* es una bacteria ubicua que se puede encontrar en el suelo, ambientes hospitalarios, hogares y plantas de producción de alimentos (Díaz *et al.*, 2022; Henry y Fouladkhah., 2019), así como en el aparato digestivo de insectos (Chandrasekaran, *et al.*, 2018). A su vez, se ha aislado de productos alimenticios como verduras, carne, té, cereales, hierbas, especias y de las FIP (Zhang *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2021; Sulaiman *et al.*, 2021).

5. *C. sakazakii* en fórmulas infantiles en polvo

Las fórmulas infantiles son un alimento que se utiliza en sustitución de la leche materna. Sus componentes fundamentales son proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales, variando su composición en función de la etapa de desarrollo infantil a la que va dirigida (Saxena *et al.*, 2019). Las fórmulas pueden ser a base de leche de vaca o de cabra, de soja o sin lactosa y pueden presentarse en forma líquida o en polvo.

Durante la obtención de las fórmulas infantiles líquidas, se realizan diferentes tratamientos térmicos a temperaturas ultra elevadas (UHT) antes y después del envasado (Figura 1), lo que las convierte en alimentos estériles.

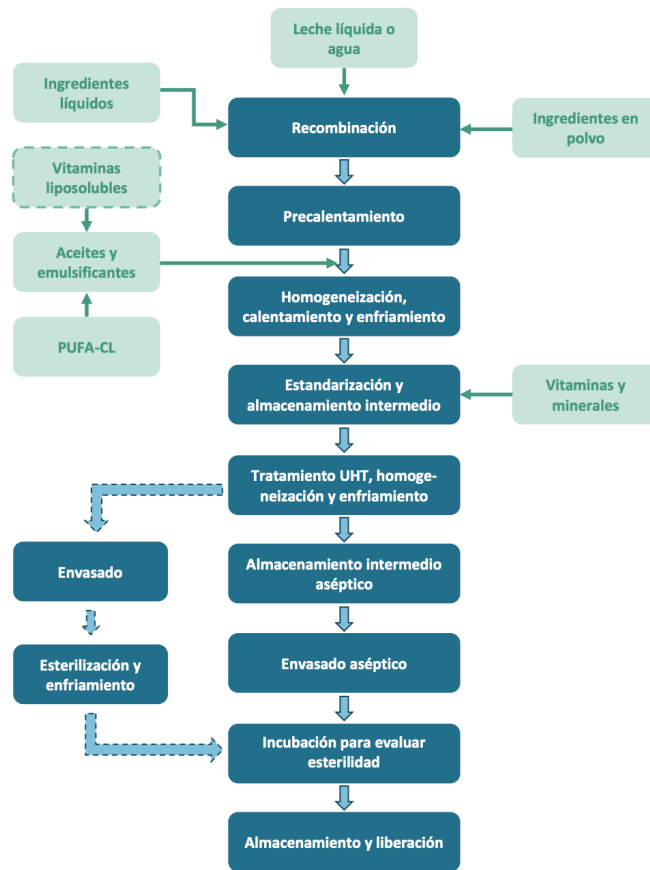


Figura 1. Esquema de producción fórmulas infantiles líquidas (Rodríguez, 2022).

En el caso de las fórmulas infantiles en polvo, se distinguen dos métodos de producción, uno de mezcla seca y otro de mezcla húmeda (Figura 2). En el caso de la mezcla húmeda, se asegura la calidad microbiológica del producto final, debido al tratamiento térmico que sufren, mientras que en el de la seca, que no lleva ese tratamiento, depende de la calidad de la materia prima (Rodríguez, 2022).

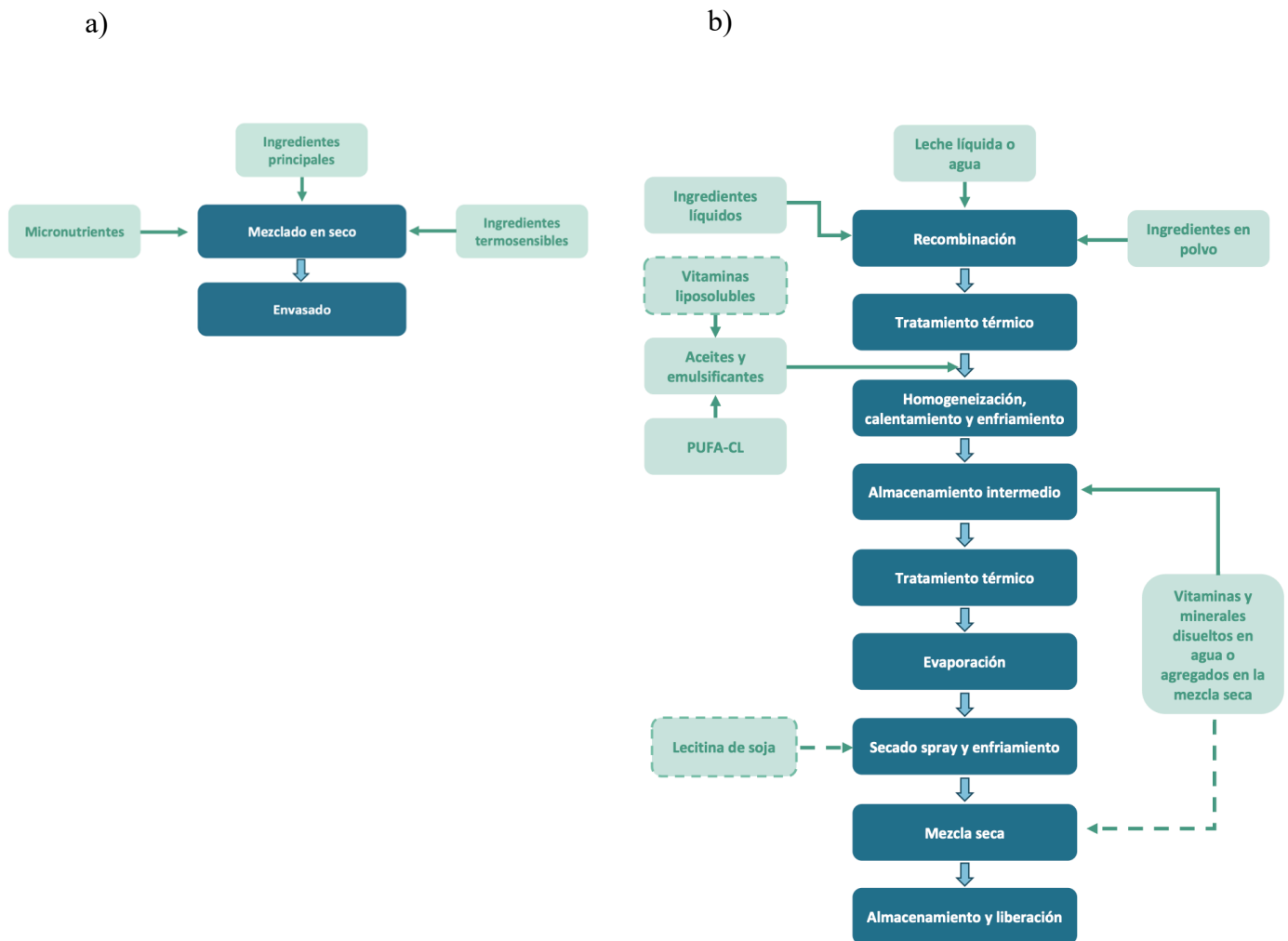


Figura 2. Esquema de producción fórmulas infantiles en polvo a) mezcla seca y b) mezcla húmeda (Rodríguez, 2022).

Por tanto, la FIP no es estéril y puede contaminarse con *C. sakazakii* en el propio proceso de producción, durante el secado, llenado y empaquetado (Wang *et al.*, 2022); mediante la adición de ingredientes contaminados; o a través de contacto con superficies contaminadas (Pakbin *et al.*, 2022; CDC, 2023). En los propios recipientes que contienen las FIP la capacidad de adherencia y formación de biofilm por parte de *C. sakazakii* (Wang *et al.*, 2022) se ve favorecida por la composición de las fórmulas infantiles (Holy *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022).

Otra vía de contaminación, durante la preparación y alimentación del bebé, ocurre cuando las medidas de higiene son deficientes (Negrete *et al.*, 2022), ya que la FIP puede contaminarse después de abrir el envase, por contaminación de tapas o cucharas que previamente han estado en contacto con superficies contaminadas o al mezclar la fórmula con agua o un recipiente contaminado (CDC, 2023).

Por último, también se han identificado ratas, moscas y cucarachas como transmisores de este microorganismo hacia las fórmulas para lactantes (Blackwood *et al.*, 2016).

Una vez en la PIF, *C. sakazakii* crece favorablemente en condiciones bajas de oxígeno y a temperaturas entre 6 y 45°C, multiplicándose de forma óptima entre 37 y 43°C (Henry y Fouladkhah, 2019, e incluso encontrarse células viables después de tratamientos térmicos superiores a 70°C (Losio *et al.*, 2018). *C. sakazakii* es considerado el microorganismo más resistente de la familia Enterobacteriaceae y se ha determinado que a 37°C, el tiempo de generación es de 40 minutos (Márquez *et al.*, 2019). A su vez, es capaz de sobrevivir en ambientes secos y con baja actividad de agua (Henry y Fouladkhah, 2019), así como de tolerar valores de estrés osmótico y desecación extremos en la FIP (Zhang *et al.*, 2020), donde puede sobrevivir hasta más de 2 años (Sulaiman *et al.*, 2021). El rango de pH más bajo al que puede crecer es de 3,5 a 5, valor que se encuentra dentro del rango de pH gástrico infantil (Zhang *et al.*, 2020).

6. Infección por *C. sakazakii* en lactantes

Durante los 3 primeros años de vida, la microbiota del bebé se encuentra en continua maduración y su composición se ve influenciada por diferentes aspectos como el tipo de parto, la dieta de la madre y del bebé, el ambiente, así como de factores genéticos (Ke *et al.*, 2021). Asimismo, el sistema inmunológico y la barrera epitelial inmaduros de los neonatos los expone a la invasión de microorganismos patógenos (Díaz *et al.*, 2022), por lo que su defensa se fundamenta principalmente en la respuesta inmunitaria innata (Chen *et al.*, 2020).

C. sakazakii es un patógeno que tiene numerosos factores de virulencia que le permiten adherirse, atravesar el intestino, diseminarse por el organismo del huésped e invadir diferentes órganos (Tabla 2).

Tabla 2. Factores de virulencia de *C. sakazakii*.

PROTEÍNA	GEN	FACTOR VIRULENCIA/RESISTENCIA	REFERENCIA
-	ompA	Facilita la unión e invasión de células endoteliales cerebrales y en líneas celulares colorrectales y neuronales.	Holy <i>et al.</i> , 2018; Blackwood <i>et al.</i> , 2016.
pGW1	-	Resistencia tetraciclina, estreptomina, cefalotina, azitromicina y/o gentamicina	Ji <i>et al.</i> , 2021; Pakbin <i>et al.</i> , 2022.
-	hfq	Patogénesis, comunicación y supervivencia.	Díaz <i>et al.</i> , 2022.
-	nanAKTR	Metabolización ácido siálico como fuente de carbono. Supervivencia en PPL.	Díaz <i>et al.</i> , 2022.
-	NlpD	Tolerancia a los macrófagos y a pH ácido.	Ji <i>et al.</i> , 2020.
	inv, sip, aut hly, fliC, cpa	Facilita la unión e invasión en líneas celulares colorrectales y neuronales.	Holy <i>et al.</i> , 2018.
	ckIR	Aumento de la resistencia al estrés oxidativo.	Jang <i>et al.</i> , 2020.
	FkpA	Potencia la infectividad de los macrófagos.	Jang <i>et al.</i> , 2020.
	ompW	Virulencia a nivel de ARNm	Xu <i>et al.</i> , 2021.
	slyB	Virulencia a nivel de ARNm	Xu <i>et al.</i> , 2021.
	blc	Virulencia a nivel de ARNm	Xu <i>et al.</i> , 2021.
	lolA	Virulencia a nivel de ARNm	Xu <i>et al.</i> , 2021.
	tolC	Virulencia a nivel de ARNm	Xu <i>et al.</i> , 2021.
	OmpW	Aumento de la resistencia al estrés oxidativo.	Xu <i>et al.</i> , 2021.
	rep	Invasión celular, evasión de la respuesta inmune, propagación sistémica y colonización tisular.	Negrete <i>et al.</i> , 2022.
	ptsH	Regulación metabolismo del carbono, virulencia y respuesta al estrés	Sun <i>et al.</i> , 2022.

La dosis infectiva de *C. sakazakii* es de 10^4 unidades formadoras de colonias (Zhang *et al.*, 2020). Tras pasar por el estómago, donde sobrevive hasta 5 horas en un rango de pH de entre 2,5 y 4,5, y el intestino delgado, *C. sakazakii* llega al intestino grueso. Allí, es capaz de evadir a las células inmunitarias, evitar la maduración de las células dendríticas e invadirlas para dispersarse, causando daños en el epitelio intestinal, y, en caso de pasar al torrente sanguíneo, dar lugar a sepsis (Díaz *et al.*, 2022; Ke *et al.*, 2021), atravesar la barrera hematoencefálica y sobrevivir en el líquido cefalorraquídeo (Holy *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019) (Figura 4).

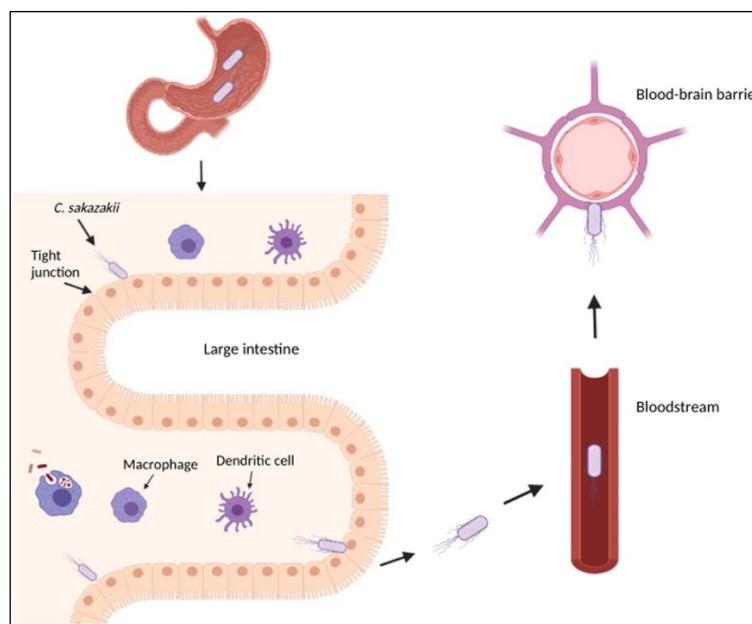


Figura 4. Patogénesis de *C. sakazakii* (Ke *et al.*, 2021)

En cuanto al cuadro clínico, los síntomas en lactantes suelen comenzar con llanto, fiebre, muy poca energía y apetito (Henry y Fouladkhah, 2019) y en los casos graves se originan complicaciones como enterocolitis necrosante, septicemia y meningitis tanto en bebés prematuros como a término (Pakbin *et al.*, 2022; Ji *et al.*, 2021), con una tasa de mortalidad de entre el 40 y el 80% (Díaz *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2020)

La enterocolitis necrosante se produce porque *C. sakazakii* induce lesiones en las células intestinales mediante piroptosis (Figura 5) por medio de la vía de señalización TLR4/MyD88, donde la expresión del gen NLRP3 da lugar a la activación de diferentes proteínas, entre ellas las caspasas, desencadenando una respuesta inflamatoria (Chen *et al.*, 2020).

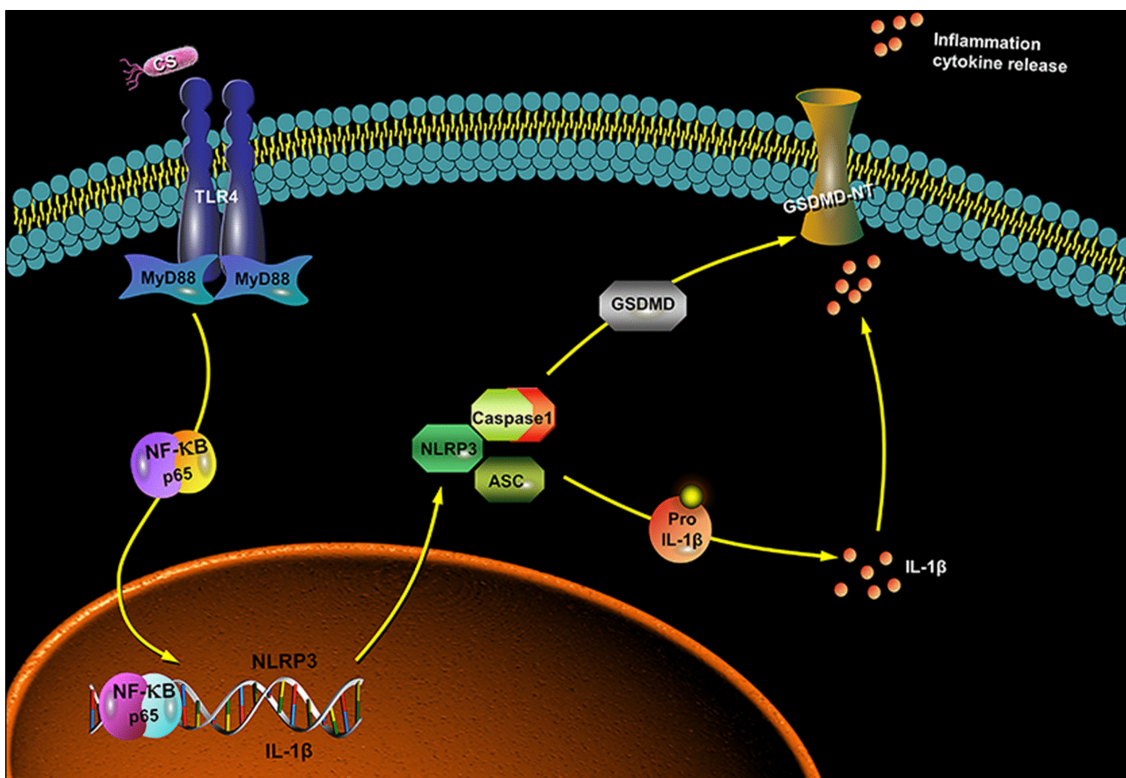


Figura 5. Mecanismo piroptosis y daño celular por infección de *C. sakazakii* (Chen *et al.*, 2020).

Asimismo, como en la mayoría de los casos la identificación de la enterocolitis necrosante se hace de forma tardía, se produce un aumento de las lesiones en el intestino y otros órganos (Chen *et al.*, 2020).

Como se comentó con anterioridad, *C. sakazakii* puede provocar meningitis y a su vez dar lugar a diferentes complicaciones como abscesos, quistes e infartos cerebrales, hidrocefalia y ventriculitis (Blackwood *et al.*, 2016). Padecer alguna de estas

enfermedades puede derivar en problemas como retraso mental y del desarrollo, así como deficiencias debilitantes y neurológicas en la edad adulta (Negrete *et al.*, 2022).

En cuanto al diagnóstico de *C. sakazakii* se lleva a cabo a través de analítica de sangre y del líquido cefalorraquídeo para realizar el recuento de leucocitos, diferentes pruebas cerebrales y determinación de la concentración de glucosa y proteínas, parámetros que se alteran con la infección (Henry y Fouladkhah, 2019). El tratamiento principal es antibiótico, y si bien *C. sakazakii* suele ser sensible a los antibióticos de primera generación que se usan habitualmente, están empezando a aparecer resistencias. (Pakbin *et al.*, 2022).

C. sakazakii tiene una incidencia mundial de entre un 3 y 30% en las FIP para lactantes (Pakbin *et al.*, 2022) y la mayor parte de los casos registrados a nivel mundial proceden de Estados Unidos, Reino Unido, Francia, Brasil, Filipinas, Bélgica, Israel, España, Hungría, Japón, México, China y Suiza (Henry y Fouladkhah, 2019). A su vez, se notifican alrededor de 2 a 4 casos anuales a los CDC, cifra que podría estar infra notificada al no existir obligatoriedad por parte de la mayor parte de los hospitales en notificar la infección (CDC, 2023).

El carácter emergente de *C. sakazakii* se ve influenciado por diversos motivos, como el coste más barato de este tipo de fórmulas en comparación con el formato líquido y estéril, la necesidad de alimentar de forma específica a lactantes con exigencias nutricionales determinadas o en el caso de que la lactancia materna no sea suficiente.

7. Normativa y métodos de análisis

En España, *C. sakazakii* no es una toxiinfección de declaración obligatoria, pero los casos deben de ser notificados a la Unión Europea (AESAN, 2023). El Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión Europea, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios y sus posteriores modificaciones, (CE) nº 1441/2007, CE 365/2010 y CE 229/2019 establecen lo siguiente para la presencia de *Cronobacter* spp. en FIP destinadas a lactantes (Tabla 3) y en el entorno de su preparación (Tabla 4).

Tabla 3. Normativa relativa a la presencia de *C. sakazakii* en los preparados deshidratados destinados a lactantes

ALIMENTOS	LEGISLACIÓN	MICROORGANISMO	OTROS LÍMITES/COMENTARIOS
Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses.	Reglamento CE 2073/2005 D.O.U.E. 22/12/2005 modificado por los Reglamentos CE 1441/2007 CE 365/2010 CE 229/2019	Enterobacterias n=10 c=0 Ausencia/10 g	Enterobacterias. Fase de aplicación del criterio final del proceso de fabricación. Si se detectan enterobacterias en cualquiera de las muestras de tal planta, se realizarán análisis en busca de <i>Cronobacter</i> spp.
		<i>Cronobacter</i> spp. n=30 c=0 No detectado /10 g	<i>Cronobacter</i> spp. Fase de aplicación del criterio: productos comercializados durante su vida útil.

Como se puede ver el plan de muestreo para *Cronobacter* spp es muy estricto (n=30; c=0, No detectado en 10 gramos) para las FIP comercializadas durante su vida útil. Además, al final del proceso de fabricación se analiza la presencia de enterobacterias. Si se detectan enterobacterias en cualquiera de las muestras de la planta, entonces se realizarán análisis en busca de *Cronobacter* spp. En cuanto a las superficies de zonas y equipos de producción de las FIP, se controlarán, como parte de su plan de muestreo para detectar la presencia de enterobacterias

Tabla 4. Normativa relativa a la presencia de *C. sakazakii* en superficies y equipos de producción de los preparados deshidratados destinados a lactantes.

SUPERFICIES	LEGISLACIÓN	ANALÍTICA	COMENTARIOS
Superficies de zonas y equipos de producción de alimentos deshidratados para lactantes.	Reglamento U.E. 2019/229 de 7 febrero.	Enterobacterias	Los explotadores de empresas alimentarias que fabriquen preparados deshidratados para lactantes o alimentos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses que presenten riesgo de <i>Cronobacter</i> spp (antes <i>Enterobacter sakazakii</i>) controlarán las zonas y el equipo de producción, como parte de su plan de muestreo, para detectar la presencia de enterobacteriáceas.

En 1988, Muytjens *et al.*, crearon el primer método de detección para *Cronobacter* spp. que dio lugar al método estándar de determinación mediante cultivo EN ISO 22964, con una duración aproximada de entre 3 a 7 días. En la actualidad, se utilizan otros métodos alternativos más rápidos, como la PCR cuantitativa (Liu *et al.*, 2021), así como estudios genómicos para determinar la persistencia y virulencia de determinadas cepas, con el inconveniente de la necesidad del diseño de cebadores específicos (Ji *et al.*, 2021; Negrete *et al.*, 2022). Por otro lado, otras pruebas rápidas como las inmunológicas requieren del uso de anticuerpos de *C. sakazakii*, y hay que prepararlos, ya que estos no están comercializados (Liu *et al.*, 2021; Ri *et al.*, 2021). Por

todo ello, se siguen desarrollando métodos para poder identificar de forma efectiva y rápida la presencia de este patógeno en la leche en fórmula (Tabla 5).

Tabla 5. Métodos en estudio para la detección de *C. sakazakii*.

MÉTODO ANÁLISIS	VENTAJAS	REFERENCIA
Tira de prueba inmunocromatográfica	Rápida	Gao <i>et al.</i> , 2021
Aptasensor	Detecta células viables.	Liu <i>et al.</i> , 2021
Aptámero de ssDNA	Más rapidez y precisión	Ri <i>et al.</i> , 2021
Biosensor electroquímico	Detección gen virulencia.	Cao <i>et al.</i> , 2022
Chip microfluídico	Resultados visibles a simple vista. Alta especificidad y sensibilidad, detecta células viables.	Chen <i>et al.</i> , 2023
Nuevo pretratamiento para MALDI-TOF MS	Rentable y precisa.	Song <i>et al.</i> , 2023

Entre los métodos de estudios expuestos destaca el llevado a cabo por Gao y colaboradores por medio del cual desarrollaron un sistema de detección específico para *C. sakazakii* con una tira inmunocromática que detecta la presencia de la bacteria de forma visual, en tan solo 12 minutos. Este método cumple con los requisitos de detección establecidos por la Comisión Europea.

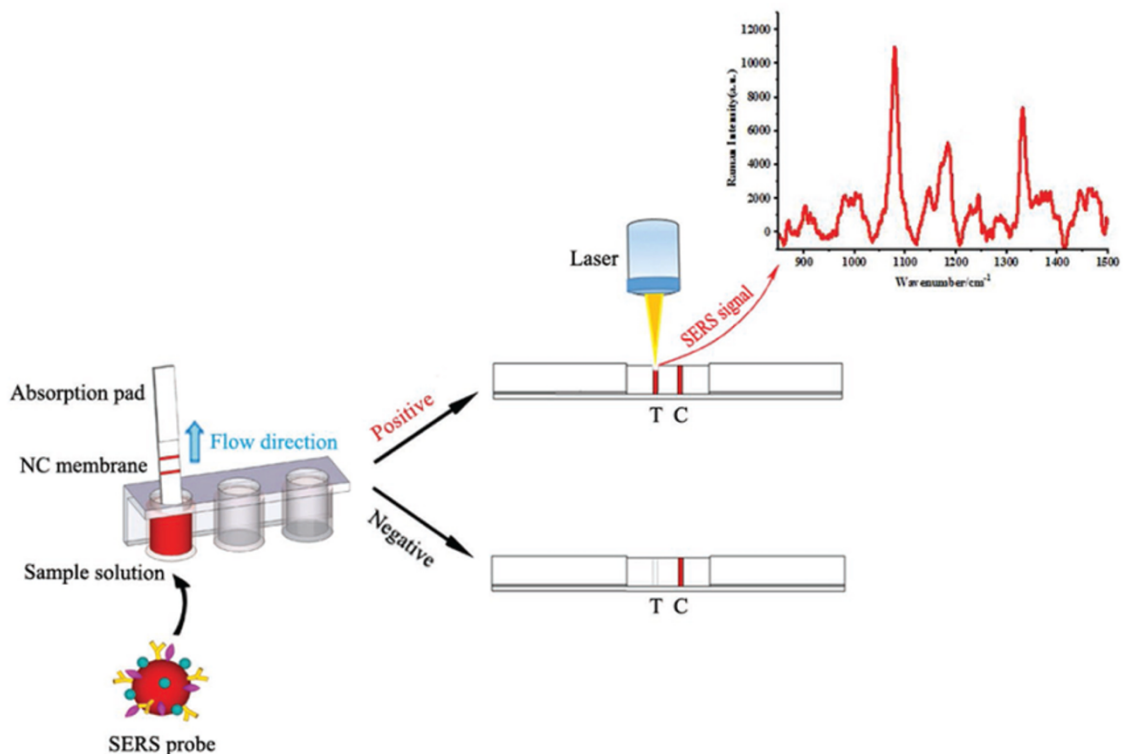


Figura 6. Montaje de la tira y procedimiento para la detección de *C. sakazakii*

8. Medidas de prevención y control

La principal medida de prevención de contaminación durante la fabricación de las FIP es el establecimiento de medidas higiénicas para el control de las materias primas y evitar la incorporación de contaminantes durante su producción. Por otro lado, estudios recientes apuntan a que antibacterianos naturales como algunos compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto de remolacha (Jiao *et al.*, 2023) y el uso de bacteriófagos dirigidos hacia *C. sakazakii* (Zhang *et al.*, 2023) podrían ser una buena forma de disminuir la contaminación por este microorganismo en diferentes etapas del proceso de producción. Asimismo, existen diferentes agentes químicos para la eliminación y prevención de la formación de biofilms en las superficies de los envases de las FIP, aunque la seguridad de este tipo de tratamientos químicos genera incertidumbre a los consumidores ya que entran en contacto con las FIP (Wang *et al.*, 2022).

En lo referente a medidas de prevención una vez el producto ha sido adquirido para su uso, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, así como la OMS, recomiendan que la fórmula infantil en polvo sea reconstituida con agua caliente a temperaturas por encima de los 70°-75°C para la eliminación total del microorganismo (Blackwood *et al.*, 2016; Losio *et al.* 2018; Ke, *et al.*, 2021).

Por otro lado, el CDC establece que para preparar y almacenar la FIP de forma segura han de llevarse a cabo una serie de pasos (Figura 7). Además de que debe utilizarse dentro de las 2 horas siguientes a su preparación si va a ser suministrada al bebé y dentro de las 24 horas tras su preparación si se refrigera.

PASO 1	Asegúrese de que la fórmula no haya vencido y de que el envase esté en buenas condiciones
PASO 2	Limpie superficies y lávese las manos con agua tibia y jabón antes de preparar los biberones. Use un biberón y una tetina limpios
PASO 3	Use agua de una fuente segura para mezclarla con la fórmula.
PASO 4	Use la cantidad exacta de agua y fórmula que figura en las instrucciones. Siempre mida primero el agua y luego agregue el polvo. No diluya la fórmula agregándole agua adicional
PASO 5	Agite el biberón para que la fórmula se mezcle. No la revuelva
PASO 6	No calentar la fórmula antes de alimentar al bebé. Si la calienta, coloque el biberón bajo agua corriente tibia o en un recipiente No permita que entre agua en el biberón o la tetina. Podría contaminar la fórmula preparada
PASO 7	Después de darle de comer, asegúrese de limpiar bien el biberón y la tetina antes del próximo uso

Figura 7. Etapas para la preparación, almacenado y administración de las FIP (CDC, 2023)

Hay que destacar que la OMS recomienda que la lactancia se prolongue hasta los 6 meses de edad, ya que sustituirla por leche de fórmula se relaciona no solo con un aumento en el riesgo de padecer infección por *C. sakazakii*, sino también con una microbiota intestinal alterada y poco diversa, lo cual a su vez puede aumentar la susceptibilidad a padecer enfermedades (Ke *et al.*, 2021). En este mismo estudio, Ke y colaboradores plantean un modelo de ecosistema microbiano intestinal infantil, donde destaca la importancia de la presencia de bacterias como *Bifidobacterium*, entre otras, que producen ácidos grasos de cadena corta como el acetato o lactato que parecen inhibir el crecimiento de *C. sakazakii*. Del mismo modo, se ha descrito que la cepa probiótica *Ligilactobacillus salivarius*, podría impedir el desarrollo de enterocolitis necrosante derivada de la infección por *C. sakazakii*, si bien son estudios llevados a cabo en ratones (Wang *et al.*, 2022).

Finalmente, en ambiente hospitalario se recomienda que los bebés sean alimentados con fórmulas infantiles líquidas, ya que estas son estériles (Losio *et al.*, 2018). Asimismo, el personal encargado de alimentar a los bebés debe tener conocimientos de cómo preparar y suministrar de forma correcta la FIP (Márquez *et al.*, 2019).

9. Conclusiones

1. *C. sakazakii* es un microorganismo ubicuo que puede contaminar fácilmente la fórmula infantil en polvo, que se utiliza en sustitución de la leche materna, y donde puede sobrevivir por periodos de tiempo superiores a los dos años.
2. El carácter emergente de *C. sakazakii* se ve influenciado por el elevado coste de la fórmula líquida, las necesidades nutricionales que pueda tener el lactante o la incapacidad de la madre para continuar con la lactancia.
3. La contaminación de la FIP tiene lugar durante el proceso de producción, principalmente por el método de producción, que no esteriliza el producto, y por las medidas de seguridad empleadas. Del mismo modo, durante la reconstitución del producto, cuando se va a alimentar al bebé, las FIP pueden contaminarse, al entrar en contacto con objetos o superficies en las que esté presente el microorganismo.
4. El consumo de FIP contaminadas con *C. sakazakii* puede producir en los lactantes enfermedades tan graves como la enterocolitis necrosante,

meningitis y/o sepsis, con el resultado de altas tasas de mortalidad o secuelas neurológicas de por vida.

5. Debido a la gravedad de la infección, la normativa establece que *C. sakazakii* debe estar ausente en los preparados deshidratados para lactantes y en las superficies de zonas y equipos utilizados para su producción.
6. Las principales medidas de prevención que se aplican en el proceso de producción de las FIP se basan en garantizar la higiene adecuada para evitar la contaminación tanto de las superficies como de las materias primas. A su vez, a la hora de suministrar el alimento reconstituido al lactante, el agua debe calentarse a más de 75°C; manipular el alimento después de lavarse las manos y sobre superficies limpias; y refrigerar durante un máximo de 24 horas la FIP reconstituida que no vaya a ser utilizada de inmediato.

10. Bibliografía

AESAN, 2023

https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/Cronobacter.htm

Blackwood, B.gr, y Hunter, C. (2016). *Cronobacter* spp. *Microbiology Spectrum*, 4 (2).

Cao, X., Liu, M., Lu, J., Lv, H, Han, J., et al. (2022). An ultrasensitive biosensor for virulence *ompA* gene of *Cronobacter sakazakii* based on boron doped carbon quantum dots-AuNPs nanozyme and exonuclease III-assisted target-recycling strategy, *Food Chemistry*, Volume 391, 2022, 133268, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133268>.

Castro, J., Gómez, C., y Rangel, E. (2013). *Cronobacter sakazakii*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

CDC, 2023 <https://www.cdc.gov/cronobacter/infection-and-infants.html>

Chandrasekaran, S., Burnham, C., Warner, B., Tarr, P., y Wylie, T. (2018). Carriage of *Cronobacter sakazakii* in the very preterm infant gut. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 67 (2), 269-274. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy062>

Chen, X., Ma, Y., Miao, S., Li, D., y Zhang, Y. (2023). Visual detection of *Cronobacter sakazakii* on a microfluidic chip fabricated by a 3D molding method. *Analyst*, 148 (4), 832-838.

Chen, Z., Zhang, Y., Lin, R., Meng, X., Zhao, W., et al. (2020). *Cronobacter sakazakii* induces necrotizing enterocolitis by regulating NLRP3 inflammasome expression via TLR4. *Journal of Medical Microbiology*, 69, 748-758.

Díaz, N., Martínez, V., Ortiz, S., y Martínez, J. (2022). La patogenicidad de *Cronobacter* a la luz de la genómica bacteriana. *Nutrición Hospitalaria*, 40 (3), 650-656.

Gao, S., Wu, J., Wang, H., Hu, S., y Meng, Li. (2021). Highly sensitive detection of *Cronobacter sakazakii* based on immunochromatography coupled with surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Dairy Science*, 104 (3), 2748-2757. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18915>

Henry, M., y Fouladkhah, A. (2019). Outbreak history, biofilm formation and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings. *Microorganisms*, 7 (3), 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030077>

Holy, O., Cruz, A., Xicohtencatl, J., Hochel, I., Parra, J., et al. (2018). Occurrence of virulence factors in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* originated from clinical samples. *Microbial Pathogenesis*, 127, 250-256.

Hu, L., Zhang, S., Xue, Y., Zhang, Y., Zhang, W., et al. (2022). Quantitative detection of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* using photosensitive nucleic acid dye PMA combined with isothermal amplification LAMP in raw milk. *Foods*, 11 (17), 2653. <https://doi.org/10.3390/foods11172653>

Jang, H., Gopinath, G., Eshwar, A., Srikumar, S., Nguyen, S et al. (2020). The secretion of toxins and other exoproteins of *Cronobacter*: role in virulence, adaptation and persistence. *Microorganisms*, 8 (2), 229. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020229>

Ji, X., Lu, P., Hu, Y., Xue, J., Wu, J., et al. (2021). Function characterization of endogenous plasmids in *Cronobacter sakazakii* and identification of p- coumaric acid as plasmid – curing agent. *Frontiers in Microbiology*, 12, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687243>

Ji, X., Lu, P., Xue, Y., Zhao, N., Zhang, Y., et al. (2020). The lipoprotein NlpD in *Cronobacter sakazakii* responds to acid stress and regulates macrophage resistance and virulence by maintaining membrane integrity. *Virulence*, 12 (1), 415-429.

Jiao, C., Gong, S., Shi, M., Guo, Jiang, Y., et al. (2023). Depletion of reactive oxygen species induced by beetroot (*Beta vulgaris*) extract leads to apoptosis-like death in *Cronobacter sakazakii*. *Research*, 106 (6), 3827-3837.

Ke, A., Parreira, V., Goodridge, L., y Farber, J. (2021). Current and future perspectives on the role of probiotics, prebiotics, and symbiotic in controlling pathogenic *Cronobacter* spp. in infants. *Frontiers in Microbiology*, 12, 755083. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.755083>

Ke, A., Parreira, V., Farber, J., y Goodridge, L. (2022). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* in an infant simulator of the human intestinal microbial ecosystem using a potential symbiotic. *Frontiers in Microbiology*, 13, 947624. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.947624>

Li, H., Zhao, Y., You, Q., Zeng, X., Xu, H., et al. (2022). Silver nanoparticles reduce the tolerance of *Cronobacter sakazakii* to environmental stress by inhibiting expression of related genes. *Research*, 105 (8), 6469-6482.

Liu, J., Xie, G., Xiong, Q., Mu, D., y Xu, H. (2021). A simple and sensitive aptasensor with rolling circle amplification for viable *Cronobacter sakazakii* detection in powdered infant formula. *Research*, 104 (12), 12365-12374.

Losio, M., Pavoni, E., Finazzi, G., Agostoni, C., Daminelli, P., et al. (2018). Preparation of powdered infant formula: could product's safety be improved? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 67 (4), 543-546.

Márquez, M., Hernández, A., Echevarría, J., y Tejada, O. (2019). Contaminación microbiológica en fórmulas infantiles en polvo en dos hospitales de Honduras. *Revista chilena de nutrición*, 46 (5), 571-578. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000500571>

Negrete, F., Ko, K., Jang, H., Hoffmann, M., Lehner, A., et al. (2022). Complete genome sequences and genomic characterization of five plasmids harbored by environmentally persistent *Cronobacter sakazakii* strains ST83 H322 and ST64 GK1025B obtained from powdered infant formula manufacturing facilities. *Gut pathogens*, 14 (23). <https://doi.org/10.1186/s13099-022-00500-5>

Odeyemi, O., y Abdullah, N. (2019). Antibiotic resistance, putative virulence factors and curli fimbriation among *Cronobacter* species. *Microbial Pathogenesis*, 136, 103665. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103665>

Pakbin, B., Brück, W., Allahyari, S., Rossen, John., y Mahmoudi, R. (2022). Antibiotic resistance and molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from powdered infant formula milk. *Foods*, *11* (8), 1093. <https://doi.org/10.3390/foods11081093>

Ri, H., Kim, M., y Chan, B. (2021). *Analyst*, *146*, 3534-3542.

Rodríguez, M. (2022). Fórmulas lácteas infantiles en polvo: efecto de la composición, el procesamiento y el almacenamiento sobre las propiedades tecnológicas y funcionales. Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata.

Saxena, J., Adhikari, B., Brkljaca, R., Hupperstz, T., Chandrapala, J., et al. (2019). Physicochemical properties and surface composition of infant formula powders. *Food Chemistry*, *297*, 124967. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124967>

Song, D., Su, Q., Jia, A., Fu, S., Ma, X., et al. (2023). A method to directly identify *Cronobacter sakazakii* in liquid medium by MALDI-TOF MS. *Foods*, *12* (10), 1981. <https://doi.org/10.3390/foods12101981>

Sulaiman, I., Tang, K., Segars, K., Miranda, N., Sulaiman, N., et al. (2021). Application of MALDI-TOF mass spectrometry, and DNA sequencing-based SLST and MLST analysis for the identification of *Cronobacter* spp. Isolated from environmental surveillance samples. *Archives of Microbiology*, *203*, 4813-4820.

Sun, Y., Li, J., Yang, Y., Yang, G., Shi, G., et al. (2022). The role of ptsH in stress adaptation and virulence in *Cronobacter sakazakii* BAA-894. *Foods*, *11*, (17), 2680. <https://doi.org/10.3390/foods11172680>

Urmenyi, A., Berne, M., White, A., y Lond, M. 1961. Neonatal death from pigmented coliform infection. *The Lancet*, *277* (7172), 313-315.

Wang, H., Li, Y., Li, Z., Ma, R., Bai, X., et al. (2022). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by *Litsea cubeba* essential oil and the antibacterial mechanism. *Foods*, *11* (23), 3900. <https://doi.org/10.3390/foods11233900>

Wang, M., Wang, Lu., Wu, P., Chen, T., Zhu, Y., et al. (2019). Genomic and experimental analysis reveal a novel factor contributing to the virulence of *Cronobacter sakazakii* strains associated with neonate infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *220* (2), 306-315.

Wang, W., Geng, M., Zhu, C., Huang, L., Zhang, Y., et al. (2022). Protective effects and mechanism of a novel probiotic strain *Ligilactobacillus salivarius* YL20 against *Cronobacter sakazakii* induced necrotizing enterocolitis in vitro and in vivo. *Nutrients*, *14* (18), 3827. <https://doi.org/10.3390/nu14183827>

Xu, Z., Liu, Z., Soteyome, T., Hua, J., Zhang, L., et al. (2021). Impact of pmrA on *Cronobacter sakazakii* planktonic and biofilm cells: A comprehensive transcriptomic study. *Food Microbiology*, *98*, 103785. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103785>

Yan, Q., Condell, O., Power, K., Butler, F., Tall, B., et al. (2012). *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *Journal of Applied Microbiology*, *113* (1), 1-15.

Zhang, S., Xiong, J., Lou, W., Ning, Z., Zhang, D., et al. (2020). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted infant formula using triglycerol monolaurate and its effect on the sensory properties of infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 320, 108518. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108518>

Zhang, S., Yuan, L., Mgomi, F., Chen, C., Wang, Y et al. (2023). Characterization and comparative genomic analysis of novel lytic bacteriophages targeting *Cronobacter sakazakii*. *Virus Research*, 329, 199102. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199102>

Zhang, Y., Xie, Y., Tang, J., Wang, S., Wang, L., et al. (2020). Thermal inactivation of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 in powdered infant formula milk using thermostatic radio frequency. *Food Control*, Volume 114, 2020, 107270, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107270>.