

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Determinación de *Cronobacter sakazakii* en leche en polvo expandida a granel en  
mercados de la Ciudad de Guatemala**

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN**

**PRESENTADO POR**

**Juan Rafael Menchú Rosal**

**Leslie María Ovalle Monterroso**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
QUÍMICOS BIÓLOGOS**

**Guatemala, agosto de 2018**

## **JUNTA DIRECTIVA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Bethancourt Herrera	Vocal V

## **DEDICATORIA**

### **A NUESTROS PADRES:**

Edwin Ovalle, Ana Monterroso por su amor, apoyo incondicional y paciencia.

Estela Rosal, Desiderio Menchú por su soporte, consejo, amor y ejemplo durante toda mi vida.

### **A NUESTROS HERMANOS:**

Diego Ovalle por su apoyo, ayuda, ejemplo e inspiración.

Claudia, Dalia, Edgar y David por el cuidado, cariño e inspiración para perseguir mis metas.

### **A NUESTROS FAMILIARES:**

Por acompañarnos durante este proceso.

### **A NUESTROS AMIGOS:**

Por todos los momentos compartidos durante estos años, las alegrías, tristezas, preocupaciones y triunfos.

### **A NUESTROS ASESORES:**

Por su guía y constante apoyo en el desarrollo de este trabajo de estudio.

### **A NUESTRO REVISOR:**

Por la paciencia, constancia y objetividad en la evaluación de este proyecto.

### **A LAMIR**

Por brindarnos la infraestructura y los materiales para el desarrollo de este trabajo.

### **A LAFYM**

Por el apoyo con los insumos y medios de cultivo necesarios para realizar este estudio.

# Índice

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Ámbito de la Investigación</b> .....	2
<b>3. Antecedentes</b> .....	3
3.1 <b>Inocuidad de la leche en polvo</b> .....	3
3.2 <b>Fuentes de contaminación de la leche en polvo</b> .....	6
3.3 <b><i>Cronobacter sakazakii</i></b> .....	7
3.3.1 <b>Características generales</b> .....	7
3.3.2 <b>Patogenia</b> .....	8
3.3.3 <b>Epidemiología</b> .....	9
3.3.4 <b>Diagnóstico de <i>C. sakazakii</i></b> .....	10
3.3.5 <b>Puntos de riesgo asociados a <i>Cronobacter sakazakii</i></b> .....	11
3.4 <b>Normas y reglamentos</b> .....	11
3.5 <b>Estudios realizados en leche en polvo</b> .....	12
<b>4. Justificación</b> .....	13
<b>5. Objetivos</b> .....	14
5.1 <b>Objetivo general</b> .....	14
5.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	14
<b>6. Hipótesis</b> .....	15
<b>7. Materiales y Métodos</b> .....	16
7.1 <b>Universo y muestra</b> .....	16
7.2 <b>Recursos</b> .....	16
7.3 <b>Materiales</b> .....	16
7.4 <b>Metodología</b> .....	17
<b>8. Resultados</b> .....	19
<b>9. Discusión de Resultados</b> .....	22
<b>10. Conclusiones</b> .....	24
<b>11. Recomendaciones</b> .....	25
<b>12. Referencias</b> .....	26
<b>13. Anexos</b> .....	29
<b>13.1 Anexo No. 1.</b> .....	30
<b>Lista de mercados en la Ciudad de Guatemala</b> .....	30

<b>13.2 Anexo No. 2.</b> .....	31
<b>Mapas de la ubicación de los mercados distribuido en las zonas capitalinas</b> .....	31
<b>Imagen No. 1 “Mercados en zona 1 y zona 5”</b> .....	31
<b>Imagen No. 2 “Mercados en zona 3”</b> .....	32
<b>Imagen No. 3 “Mercados en zona 6”</b> .....	32
<b>Imagen No. 4 “Mercados en zona 11”</b> .....	33
<b>Imagen No. 9 “Mercados en zona 19”</b> .....	35
<b>13.3 Anexo No. 3.</b> .....	36
<b>Imágenes del control positivo y las colonias sospechosas aisladas en agar cromogénico para <i>C. sakazakii</i>.</b> .....	36

## 1. Resumen

*Cronobacter sakazakii* es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia de Enterobacteriaceae, es móvil, anaerobio facultativo, no esporoformador que puede crecer en ambientes muy ácidos y en ambientes con muy poca actividad de agua; lo que lo hace adecuado para crecer en condiciones de estrés osmótico y desecado como las que se encuentran en productos lácteos como la leche en polvo, así como, en las prácticas de manufactura de diversidad de alimentos. Todas las especies de *Cronobacter* sp. se han asociado con infecciones clínicas en bebés y adultos y se consideran potencialmente patógenos. (Feeney, Kropp, O'Connor, & D Sleator, 2014).

En Guatemala, como en la mayoría de países no existen datos epidemiológicos sobre infecciones por *C. sakazakii* por la falta de un sistema activo de vigilancia. En un estudio realizado en el Reino Unido en 2004, se encontró *C. sakazakii* en muestras de leche en polvo y otros productos secos (Iversen, Lane, & Forsythe, 2004). En 1980, Farmer aisló también *C. sakazakii* de muestras de leche en polvo enlatada en Nueva York (Farmer, Asbury, Hickman, & Brenner, 1980).

El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de la contaminación por *C. sakazakii* en leche en polvo expandida a granel en mercados de la Ciudad de Guatemala. Se recolectaron 46 muestras de septiembre a noviembre del año 2017 en 23 mercados minoristas y satelitales de la Ciudad capital de Guatemala. Para la determinación de *C. sakazakii* se utilizó el método de detección del microorganismo en productos lácteos descrito por la norma ISO 22964:2006.

De las 46 muestras evaluadas, el 91.30% no presentó ningún crecimiento sospechoso de *C. sakazakii* en el agar cromogénico. El 8.7% restante que corresponde a las 4 muestras tomadas de los mercados satelitales Cantón y Unibús, sí presentaron crecimiento de colonias en el agar cromogénico y se identificó *Pantoea agglomerans* por medio de pruebas bioquímicas.

Se estableció la ausencia de *C. sakazakii* en el 100% de las muestras analizadas de leche expandida a granel en mercados de la Ciudad de Guatemala. Por la presencia de otra enterobacteria en las muestras con contaminación se recomienda evaluar todos los criterios descritos por el RTCA 67.04.50:08 para determinar la inocuidad de la leche en polvo expandida a granel y orientar a la identificación de debilidades en el proceso de manipulación y almacenamiento del producto.

## **2. Ámbito de la Investigación**

Este seminario de investigación no pertenece a un proyecto macro, surgió de la inquietud de conocer y generar datos sobre un problema poco investigado en Guatemala, asociado con la presencia de *Cronobacter sakazakii* específicamente en la leche de vaca en polvo no envasada.

### **2.1 Ámbito geográfico de la investigación**

La Ciudad de Guatemala es la ciudad más grande y la capital de la República de Guatemala, se encuentra en el área sur-central del país, con una población estimada de 2, 110,000 personas es la ciudad más poblada de Guatemala y de Centroamérica. Se divide en 22 zonas en su área urbana, que ocupan un diseño en forma de espiral que tiene su centro en la Zona 1.

En la ciudad capital hay en funcionamiento algunos mercados minoristas municipales, y mercados satélites. Los mercados minoristas municipales funcionan en un edificio establecido, mientras que los mercados satélites lo hacen en la vía pública. Todos los mercados cumplen con la función de comerciar productos de la canasta básica, entre otros (Municipalidad de Guatemala, 2013).

### **3. Antecedentes**

#### **3.1 Inocuidad de la leche en polvo**

Inocuidad es la garantía de no hacer daño como una responsabilidad compartida, que agrega valor tanto al producto como al consumidor para que sea sostenible en el tiempo. Todos los agricultores, fabricantes, manipuladores, y distribuidores de alimentos, tienen la responsabilidad de asegurar que los alimentos sean inocuos y aptos para el consumo humano (FAO & OMS, 1959).

La leche y sus derivados son productos ricos en múltiples nutrientes. La leche en polvo es fabricada removiendo el agua de la leche fresca con el objetivo de reducir la actividad de agua, y con esto el crecimiento de microorganismos. La leche en polvo se utiliza para producir múltiples productos lácteos, como el queso, helado, yogurt, y proteína en polvo. La ventaja de la utilización de leche en polvo contra la leche líquida es la preservación de la calidad, la utilización de menos almacenamiento, y con esto menos costos de transporte (Pal, M., Alemu, J., Mulu, S., Kara, O., Parmar, B., & Nayak, J., 2016).

Al tratarse de productos deshidratados, no es posible utilizar la tecnología actual para producir preparados en polvo que estén exentos de bajas concentraciones de microorganismos, es decir, estos productos no pueden ser esterilizados. Por consiguiente, su inocuidad microbiológica depende del cumplimiento riguroso de las buenas prácticas de higiene tanto durante la fabricación como durante el uso (CAC/RCP, 2008).

Desde la antigüedad, el secado es reconocido como el método de preservación por excelencia de múltiples alimentos, pues extingue el agua necesaria para el crecimiento de microorganismos. Los polvos lácteos no solo se utilizan para su reconstitución o recombinación, pero también para aplicaciones como ingrediente en algunos otros alimentos.

Los parámetros de calidad importantes para la leche en polvo, son la calidad microbiológica, características sensoriales, aparte de las características fisicoquímicas, que engloban la humedad, grasa, proteínas totales, nitrógeno, lactosa, acidez titulable, cenizas, y otros nutrientes como el calcio, bajo contenido de agua (máximo 5%).

La microbiota de la leche en polvo depende de muchos factores, incluyendo el número y tipo de bacterias presentes en la leche cruda, las temperaturas de precalentado, las condiciones del evaporador y secador, y la higiene de la planta de producción. Altos números de microorganismos en la leche

cruda pueden resultar en número igual de elevados en la leche en polvo. Una sanitización no adecuada del equipo utilizado puede llevar a intoxicaciones alimentarias (Pal, y otros, 2016).

La comisión del Codex Alimentarius recomienda que toda la leche que funciona como materia prima debe ser pasteurizada antes del secado, pero una pasteurización inadecuada puede facilitar la supervivencia de patógenos en el producto final. Se debe monitorear cada paso de la producción hasta la preparación de alimentos.

Según el código de prácticas de higiene para los preparados en polvos para lactantes y niños pequeños, los expertos FAO/OMS sobre la inocuidad microbiológica de los preparados en polvo para lactantes se estudiaron casos de enfermedades en lactantes relacionadas con el consumo de un preparado en polvo, ya sea epidemiológica o microbiológicamente. Se identificaron tres categorías de microorganismos con base en la solidez de las pruebas de una relación causal entre su presencia en los preparados para lactantes y la enfermedad de estos: A) microorganismos con claras pruebas de causalidad, específicamente, *Salmonella enterica* y *Cronobacter sakazakii*; B) 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, p. ej. *Enterobacteriaceae*; y C) microorganismos en los cuales la causalidad es menos probable o no ha sido demostrado todavía, como aquellos 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. perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (CAC/RCP, 2008).

Los productores, proveedores y distribuidores de alimentos están obligados por la ley asegurar la inocuidad de los alimentos sin considerar su origen o la identidad de los ingredientes de los mismos. Según la OMS el acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidad suficiente es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud. Los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer. Los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125000 defunciones en este grupo

de edad. La inocuidad de los alimentos afecta especialmente a los lactantes, los niños pequeños, los ancianos y enfermos.

La interrelación y la repercusión de un segmento de la cadena alimentaria sobre otro segmento son importantes para asegurar que se aborden las posibles lagunas en la cadena alimentaria por medio de la comunicación y la interacción entre los proveedores de ingredientes, el fabricante, el distribuidor y las personas encargadas del cuidado de los lactantes y niños. Aunque es principalmente responsabilidad del fabricante realizar el análisis de peligros dentro del contexto de la elaboración de un sistema de control basado en el APPCC o en otros sistemas equivalentes.

Para lograr una cadena eficaz con el propósito de reducir el riesgo, las distintas partes deberían prestar especial atención a las siguientes responsabilidades:

- Los productores y los fabricantes de la materia prima deberían asegurar que en el ámbito de la granja se empleen buenas prácticas agrícolas, buenas prácticas de higiene y buenas prácticas pecuarias. Esas prácticas deberían adaptarse, según corresponda, a toda necesidad particular relacionada con la inocuidad que especifique y comunique el fabricante.
- Los fabricantes de ingredientes y de materiales de envasado deberían utilizar buenas prácticas de fabricación y buenas prácticas de higiene, así como tener implantados sistemas APPCC. Asimismo, deberá aplicarse toda medida adicional comunicada por el fabricante de preparados en polvo y que sea necesaria para controlar los peligros presentes en estos productos.
- Los fabricantes de preparados para lactantes deben utilizar buenas prácticas de fabricación y buenas prácticas de higiene. Toda necesidad de medidas adicionales relacionadas con el control de los peligros en las fases iniciales de la cadena alimentaria debería comunicarse eficazmente a los proveedores a fin de que puedan adaptar sus operaciones para cumplir esas medidas. De igual manera, es posible que el fabricante tenga que aplicar controles o adaptar sus procesos de fabricación en función de la capacidad que tenga el proveedor de ingredientes para reducir al mínimo o prevenir los peligros relacionados con los ingredientes.
- Los fabricantes deberían proporcionar información exacta y comprensible para permitir que quienes actúan en puntos posteriores de la cadena alimentaria utilicen el producto debidamente. Ello incluye las medidas adicionales necesarias para controlar los peligros presentes en los preparados en polvo durante la reconstitución y después de esta.

- Los distribuidores, los transportadores y los vendedores al por menor deberían asegurar que preparados en los preparados en polvo que se hallan bajo su control sean manipulados y almacenados adecuadamente y según las indicaciones del fabricante.
- Los profesionales de la salud y los profesionales encargados del cuidado de lactantes y niños pequeños deberían impartir una capacitación efectiva en materia de higiene a los consumidores con el fin de asegurar que los preparados en polvo sean preparados, manipulados y almacenados de manera adecuada y siguiendo las indicaciones del fabricante (CAC/RCP, 2008).

### 3.2 Fuentes de contaminación de la leche en polvo

En países en vías de desarrollo, existe una carencia de alimentos en los niveles socioeconómicos bajos, y los productos lácteos se consideran como una solución parcial a este problema. Sin embargo, dichos productos son muy vulnerables a la contaminación por microorganismos patógenos. El número y la cantidad de microorganismos presentes en los alimentos se ve influido por muchos factores que incluyen el ambiente general del que se obtuvo el alimento, la calidad microbiológica del alimento en su estado procesado, las condiciones sanitarias en las que se procesó el alimento, y si el empaçado, manejado, y almacenado se da en las condiciones adecuadas para mantener la microbiota en un nivel bajo (Elhussein, 2007).

El conocimiento de los microorganismos y su evolución es imperativo para asegurar la inocuidad y calidad de los productos lácteos, incluyendo el desarrollo de métodos simples de detección para países en vías de desarrollo como Guatemala.

La contaminación después del proceso es un factor importante puesto que en el proceso de producción la materia prima es sujeta a temperaturas letales, que elimina las células de patógenos. Los brotes causados por el consumo de leche en polvo demuestran que existen fallos en los sistemas de prevención de contaminación, entre estos la presencia de agua que permita que los microorganismos se repliquen, o la presencia de áreas difíciles de mantener y limpiar, por ejemplo, de las torres de secado. Entre los patógenos de mayor interés en leche en polvo y fórmulas infantiles se incluye *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella* spp. Estos microorganismos pueden mantenerse viables en la leche en polvo por un gran período de tiempo, y continuar su crecimiento cuando el polvo se reconstituye y almacena a temperaturas favorables.

Hay muchas enfermedades infecciosas de diferentes etiologías que se pueden transmitir por la leche. La leche se puede contaminar por el ganado bovino con infecciones, mastitis, no es raro encontrar microorganismos como *Listeria*, *Salmonella*, y *Escherichia coli* patógenas en los ambientes en los que se cría al ganado (Elhussein, 2007).

Una concentración alta de microorganismos antes del secado combinada con una pasteurización inadecuada puede facilitar la supervivencia de patógenos en la leche en polvo. Se debe monitorear cada paso de la producción del alimento, desde el manejo de materias primas, hasta la preparación de los alimentos final. No hay muchos datos a nivel nacional e internacional sobre la calidad microbiológica de la leche en polvo, pero existe algunos reportes de la prevalencia de la contaminación bacteriana de la leche líquida que pueden ayudar a manejar los riesgos de contaminación de la leche en polvo.

### 3.3 *Cronobacter sakazakii*

#### 3.3.1 Características generales

*Cronobacter sakazakii* pertenece a la familia de Enterobacteriaceae es un bacilo Gram negativo, móvil, anaerobio facultativo, no esporoformador, con flagelos peritricos, oxidasa negativo, con un tamaño de 0.3-1 x 1 – 6 um. Produce un pigmento amarillo característico en cultivo, y crece en un rango de temperatura de 6-45°C con un rango óptimo de 37-43°C. Entre la familia de Enterobacteriaceae, *Cronobacter* spp. Son de los más termotolerantes (Motarjemi, Moy, & Todd, 2014).

Puede crecer en ambientes muy ácidos, hasta de pH 3, y en ambientes con muy poca actividad de agua, lo que lo hace adecuado para crecer en condiciones de estrés osmótico y desecado como las que se encuentran en productos lácteos como la leche en polvo, y en las prácticas de manufactura de diversidad de alimentos. La adaptación a estrés osmótico y desecado es mayor cuando se encuentra en la fase estacionaria debido a la acumulación intracelular de trehalosa (Heredia, Wesley, & García, 2009).

### 3.3.2 Patogenia

*Cronobacter sakazakii* (anteriormente llamada *Enterobacter sakazakii*) es un patógeno oportunista de mucha importancia en la industria de alimentos, se encuentra naturalmente en el ambiente y ocasiona enfermedad en su mayoría en grupos con vulnerabilidades, como los neonatos, en particular los que han nacido prematuramente o en otras condiciones que afectan a su sistema inmune, o los bebés nacidos de madres VIH-positivo, que tienen falta de lactancia materna. También los niños menores de un año, ancianos, y adultos con un sistema inmune comprometido presentan grupos de alto riesgo, pero menor mortalidad que los neonatos y lactantes (Farber & Forsythe, 2008). El estómago de los neonatos, particularmente de los que han nacido prematuramente es menos ácido que el de los adultos, lo cual es un factor que contribuye a la supervivencia de la bacteria. Se relaciona a la bacteria con casos esporádicos de pequeños brotes de sepsis, meningitis, cerebritis y enterocolitis necrotizante (FAO/OMS, 2004).

Todas las especies de *Cronobacter* sp. Se han asociado con infecciones clínicas en bebés y adultos y se consideran potencialmente patógenos. *Cronobacter sakazakii* puede invadir las células intestinales humanas, replicarse en macrófagos y atravesar la barrera hematoencefálica (Feeney, Kropp, O'Connor, & D Sleator, 2014).

Los bebés que son alimentados completa o parcialmente con alimentos de riesgo como la leche de vaca o fórmula presentan mayor susceptibilidad a infectarse con *C. sakazakii* debido a que estos productos no poseen los agentes antimicrobianos que posee la leche materna. Muchos estudios sugieren que los lactantes alimentados con leche materna tienen una prevalencia menor de infecciones gastrointestinales y respiratorias (Cunningham, Jelliffe, & Jelliffe, 1991).

Incluso los lactantes que reciben leche materna de donantes presentan menor incidencia de enterocolitis, y otras enfermedades gastrointestinales (Quigley & McGuire, 2014).

### 3.3.3 Epidemiología

En Guatemala, como en la mayoría de países no existe datos epidemiológicos sobre infecciones por *C. sakazakii* por la falta de un sistema activo de vigilancia.

Los brotes registrados a nivel mundial han sido notificados de forma pasiva y voluntaria, puesto que los únicos países con declaración obligatoria de infecciones por *Cronobacter* spp. son Brasil y Hungría, por lo que la denuncia de eventos que involucren a *C. sakazakii* ocurre de manera aislada y con escasa frecuencia, principalmente en países en vías de desarrollo (FAO/OMS, 2008).

En el Reino Unido y en Filipinas existe un sistema de vigilancia basado en los reportes de laboratorio que involucran el aislamiento de *C. sakazakii*, sin embargo, los datos de historia clínica y otros aspectos de importancia epidemiológica no son registrados.

Los primeros informes de infección causada por *Cronobacter* sp. se redactaron en 1958 en Inglaterra en el cual investigaron un caso de meningitis en una unidad de prematuros, donde encontraron la presencia de *C. sakazakii* en las heces y sangre del neonato y en las muestras de preparado en polvo de la cual se originó la infección como resultado de una inadecuada preparación y conservación del producto una vez reconstituido (Luján, Loredo, & Aguilar, 2014).

Existe un recopilatorio de información epidemiológica sobre *Cronobacter* spp. publicado por la FAO y la OMS, este indica que de 1961 a 2008 se han reportado 156 casos documentados de infecciones ocasionadas por *Cronobacter* spp. a nivel mundial, de estos al menos 29 han resultado en la muerte del paciente. La evidencia indica que los niños de corta edad son los más propensos a desarrollar una enfermedad grave que conlleve a la muerte.

En general, la cantidad de datos disponibles para tener una idea definitiva de la incidencia entre países y regiones, es muy limitada, y esto radica principalmente por 1) la dificultad de realizar un diagnóstico certero, 2) la disparidad en los alcances de los sistemas de vigilancia, 3) las diferencias en las metodologías aplicadas a la vigilancia epidemiológica. Al tratarse de un patógeno emergente, el desconocimiento del microorganismo puede representar un punto débil en el reporte de casos, sumado a la falta de herramientas en los laboratorios de los hospitales centinela en los sistemas de vigilancia epidemiológica para la detección precisa del microorganismo (Leotta, Pacheco, Epszteyns, Lirón, Stambullian, vecchiarelli & Stamboulian, 2011).

Las tasas de mortalidad de la infección por *C. sakazakii* se han reportado hasta del 50%, o más, y ha sido mayor en casos con cerebritis, o meningitis. También se ha reportado un crecimiento en la resistencia antimicrobiana a la terapia de primera línea para diagnósticos presuntivos de enfermedad por *Cronobacter sakazakii* (FAO/OMS, 2004).

Los bebés que son alimentados completa o parcialmente con alimentos de riesgo como la leche de vaca o fórmula presentan mayor susceptibilidad a infectarse con *C. sakazakii* debido a que estos productos no poseen los agentes antimicrobianos que posee la leche materna. Muchos estudios sugieren que los lactantes alimentados con leche materna tienen una prevalencia menor de infecciones gastrointestinales y respiratorias (Cunningham, Jelliffe, & Jelliffe, 1991). Incluso los lactantes que reciben leche materna de donantes presentan menor incidencia de enterocolitis, y otras enfermedades gastrointestinales (Quigley & McGuire, 2014).

Según la Encuesta Nacional de Salud Materno Infantil (ENSMI) 2014-2015 la probabilidad de morir durante el primer año de vida es de 28 por cada 1,000 nacidos vivos, sin embargo, de estos, 17 nacidos vivos, fallecen durante el primer mes de vida. El primer mes de vida es el período con más riesgo de contracción de una infección por *C. sakazakii* con consecuencias letales.

La encuesta revela que el 17.2 % de los niños y niñas de 0-1 mes de edad consumen otros tipos de leche aparte de la lactancia materna, entre estos incluida la leche en polvo (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Instituto Nacional de Estadística, Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia, 2017).

#### 3.3.4 Diagnóstico de *C. sakazakii*

En niños y bebés menores de dos meses, la bacteria entra a nivel sanguíneo y/o pueden llegar a las meninges y médula espinal causando inflamación y produciendo meningitis. Los síntomas por infección por *Cronobacter* empiezan con fiebre, llanto y poca energía, y en otros casos puede llegar a convulsionar. Los recién nacidos con meningitis pueden desarrollar problemas serios o duraderos (Lujan, Loredó, & Noe, 2014).

El diagnóstico se establece por medio del crecimiento de los bacilos gram negativos a partir de muestras de: sangre como hemocultivos, Líquido cefalorraquídeo (LCR) u otros sitios estériles. En el estudio de tres casos de meningitis neonatal causado por *C. sakazakii* en leche en polvo, en el cual se realizó cultivo y antibiograma de sangre y LCR de los cuales los tres fueron positivos para

*C. sakazakii* dos con hemocultivo positivos y tres con LCR positivos. En este estudio se comprobó que la formula infantil estaba contaminada con *C. sakazakii* de los neonatales (Gunnar, y otros, 1989).

### 3.3.5 Puntos de riesgo asociados a *Cronobacter sakazakii*

El reservorio natural de *C. sakazakii* no se conoce, pero se ha podido aislar de los intestinos de moscas hematófagas de sangre de ganado, lo cual podría ser un factor de contaminación para los productos lácteos. Se ha podido aislar de aguas superficiales, suelo, vegetales, y también en alimentos listos para consumir, y bebidas (Heredia, Wesley, & García, 2009) .

Se ha aislado también en instalaciones de producción de leche en polvo y en otras plantas de producción de alimentos y hogares, transmitiéndose a los alimentos, principalmente, a fórmulas en polvo infantiles y de leche en polvo (CRONOBACTER, 2013); Según la FAO un número creciente de informes se ha establecido que los preparados en polvo para lactantes son una fuente y un vehículo de la infección (Biering, y otros, 1989). Además, en las heces o la orina de lactantes asintomáticos se ha detectado la presencia de *C. sakazakii*; y se ha demostrado su presencia en las heces durante 18 semanas (Block, Minster, Simhon, Arad, & Shapiro, 2002).

## 3.4 Normas y reglamentos

La norma guatemalteca para la leche en polvo es la COGUANOR NGO 34 044 en la cual tiene como objetivo establecer los tipos y definir las características que deben reunir la leche de vaca, en polvo. Según esta norma este tipo de leche deberá cumplir con los requisitos microbiológicos indicados a continuación:

**Cuadro 1. Características microbiológicas de la leche en polvo según la NGO 34 044**

<b>Características</b>	<b>Leche en polvo</b>
<b>Microorganismos no patógenos por gramo en leche para consumo humano, máximo</b>	50,000 UFC/g
<b><i>Escherichia coli</i> en 0.1g, leche en polvo para consumo humano</b>	Negativo
<b>Coliformes por gramos: en leche para consumo humano.</b>	90 UFC/g

Fuente: Parámetros obtenidos de la NGO 34 044

Con respecto al RTCA la leche en polvo debe cumplir con lo establecido en el RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de Alimentos.

**Cuadro 2. Características microbiológicas de la leche en polvo según el RTCA 67.04.50:08**

<b>Parámetro</b>	<b>Tipo de riesgo</b>	<b>Límite máximo permitido</b>
<i>Salmonella ssp/25 g</i>	A	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	A	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	A	<3 NMP/g

Fuente: Parámetros obtenidos del Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08

### 3.5 Estudios realizados en leche en polvo

La leche lleva un proceso de pasteurización previo al tratamiento por secado, en este proceso se puede eliminar *C. sakazakii* que es más sensible al calor que otros patógenos como *L. monocytogenes*. Sin embargo, no se puede descartar como un patógeno que puede estar presente en la leche en polvo por la contaminación cruzada por contacto con superficies contaminadas como las de los equipos (Shaker, Osaili, Al-Omary, Jaradat, & Al-Zuby, 2007).

En un estudio realizado en el Reino Unido en 2004, se encontró *C. sakazakii* en muestras de leche en polvo, y otros productos secos (Iversen, Lane, & Forsythe, 2004). En 1980, Farmer aisló también *C. sakazakii* de muestras de leche en polvo enlatada en Nueva York (Farmer, Asbury, Hickman, & Brenner, 1980).

#### 4. Justificación

En 2004, la FAO y OMS convocaron a una reunión de expertos en el asunto, con el fin de informar a las autoridades en alimentos sobre medidas preventivas, y la importancia del microorganismo *Cronobacter sakazakii* dentro de la salud pública y el impacto negativo que puede tener en la misma debido a las condiciones de desnutrición y pobreza del país. Los consumidores acceden a los alimentos que sus ingresos les permiten. Existen ventas de leche en polvo formales e informales, estas últimas no reguladas.

La situación de pobreza general del país se refleja en múltiples carencias de la población general. A esto se suma una deficiente seguridad alimentaria, malnutrición, falta de educación nutricional, y niveles socioeconómicos bajos, lo cual podría significar infecciones en bebés de edad lactante, y es uno de los patógenos más importantes asociados a la leche en polvo, *C. sakazakii*.

En Guatemala existen limitaciones en el sistema de control en la seguridad alimentaria hay instancias para la auditoria, pero aún no tienen el impacto deseado por la población. Esto se refleja en las tasas altas de mortalidad por enfermedades diarreicas. Las infecciones por *C. sakazakii* no se reportan en su totalidad en la mayoría de países, y ello no es diferente en Guatemala, por lo que no hay información sobre estudios realizados y esto fortalece la importancia de la realización de este estudio. La lactancia materna se ve afectada en los países en vías de desarrollo como Guatemala por muchos factores tales como la falta de educación, malnutrición, ausencia de las madres, por lo que se recurre en niños de edad lactante a la alimentación complementaria con fórmula infantil en algunos casos, o según estudios que indican que la leche de vaca en polvo también se utiliza como alimentación complementaria a pesar de que no es recomendada para la alimentación de lactantes. Por lo que se considera conveniente determinar la frecuencia de contaminación por *C. sakazakii* de leche en polvo expendida a granel en mercados de la ciudad de Guatemala y así realizar un estudio como primer paso para dar a conocer la importancia de este tema.

Este estudio proveerá de datos pioneros en la región que pueden llegar a poner en marcha un sistema de vigilancia más estricto que abarque la mejora a través de la capacitación en la manipulación de alimentos expendidos a granel, teniendo bajo control las fuentes de contaminación. Los resultados generados por este estudio pueden también incentivar al diagnóstico clínico y reporte de datos para estadística sobre este microorganismo, así como reafirmar la importancia de una educación nutricional y los problemas que influyen en ella en los sectores diversos en los que se consume la leche de vaca en polvo en rangos de edad que abarcan desde la edad lactante.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Determinar la frecuencia de contaminación de leche en polvo expandida a granel en mercados de la ciudad de Guatemala.

### **5.2 Objetivos específicos**

- 5.2.1 Determinar la presencia de *Cronobacter sakazakii* en muestras de leche en polvo expandida a granel en mercados minoristas de la ciudad de Guatemala.
- 5.2.2 Determinar presencia de *Cronobacter sakazakii* en leche en polvo expandida a granel en mercados satelitales.
- 5.2.3 Establecer la frecuencia de contaminación por *Cronobacter sakazakii* en la leche en polvo.

## **6. Hipótesis**

Este estudio no presenta hipótesis por ser de tipo descriptivo.

## **7. Materiales y Métodos**

### **7.1 Universo y muestra**

El universo está constituido por leche de vaca en polvo distribuida a granel en distintos mercados de la Ciudad de Guatemala. Se analizaron 46 muestras por conveniencia obtenidas de 23 diferentes mercados de la Ciudad de Guatemala.

### **7.2 Recursos**

#### **7.2.1 Humanos**

Asesores: Dra. Karin Herrera Aguilar, M.Sc. Sergio Lickes (LAMIR).

Estudiantes: Br. Leslie Ovalle, Br. Rafael Menchú.

#### **7.2.2 Institucionales**

Laboratorio Microbiológico de Referencia, LAMIR

### **7.3 Materiales**

#### **7.3.1 Medios de cultivo**

- Agua peptonada tamponada
- Caldo Lauril Sulfato con Vancomicina
- Agar cromogénico para *Cronobacter sakazakii*
- Agar Trypticase Soya
- Agar LIA
- Agar MIO
- Agar Arginina
- Medio básico
- Agar Citrato según Simmons

#### **7.3.2 Reactivos**

- D-Sorbitol
- L-Ramnosa
- D-Sacarosa
- D-Melibiosa
- Tiras para la determinación de oxidasa

### 7.3.3 Insumos

- Placas de Petri de poliestireno de 90mm de diámetro
- Fósforos

### 7.3.4 Cristalería

- Erlenmeyers de 250ml
- Tubos de ensayo con tapadera y rosca

### 7.3.5 Cepas de referencia

- *Cronobacter sakazakii* ATCC® 29544
- *Escherichia coli* ATCC® 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

### 7.3.6 Equipo

- Balanza de precisión
- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Mechero de Bunsen
- Pinzas
- Incubadora a 37°C
- Incubadora a 44°C
- Asa en argolla
- Cucharas estériles

## 7.4 Metodología

### Muestreo

Para la obtención de muestras se compraron de 2 a 4 onzas de leche en cada mercado sin pedir consentimiento de cada comerciante los días de lunes a sábado. Durante el mes de septiembre a noviembre del año 2017 se realizó el muestreo a cada mercado en diferentes días.

## **Método estándar de la norma ISO/TS 22964:2006**

### **7.4.1 Preparación de la muestra**

Se preparó la dilución primaria agregando 10 g de muestra a 90 ml de Agua Peptonada Bufferada. Se dejó dispersar la muestra en el líquido sin agitar. (International Organization for Standardization, 2006).

### **7.4.2 Pre enriquecimiento en medio líquido no selectivo**

Se incubó el Agua Peptonada inoculada a 37°C por 16-20h.

### **7.4.3 Enriquecimiento en medio líquido selectivo**

Se transfirió 0.1 mL del cultivo líquido obtenido a 10 mL de caldo Lauril Sulfato con Vancomicina (mLST/Vancomicina). Se incubó a 44°C por 22-26h.

### **7.4.4 Aislamiento de colonias presuntivas de *Cronobacter sakazakii***

7.4.4.1 Después de la incubación en el medio mLST/Vancomicina se inoculó 10 uL de medio líquido sobre la superficie de la placa de agar cromogénico para *C. sakazakii*. Se incubó la placa a 44°C  $\pm$  1 °C por 24  $\pm$  2hrs. Después de la incubación se examinó el agar cromogénico identificando colonias presuntivas de *C. sakazakii*.

NOTA: las colonias típicas son pequeñas de 1-3mm color verde o verde azulado. Colonias no presuntivas son color violeta o transparente.

### **7.4.5 Confirmación**

#### **7.4.5.1 Producción de pigmento amarillo**

Se seleccionó por cultivo sospechoso una colonia presuntiva observada en el agar cromogénico y se estrió en una placa de agar Tripticasa Soya. Se incubó a 25°C por 44-48h buscando colonias con coloración amarillenta para realizar una caracterización bioquímica.

#### **7.4.5.2 Caracterización bioquímica**

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas a las colonias sospechosas: B-galactosidasa, L-arginina, L-lisina, L-ornitina, Citrato, Urea, L-triptófano, Indol, Voges Proskauer, Gelatina, D-glucosa, D-manitol, Inositol, D-sorbitol, L-ramnosa, D-sacarosa, D-melibiosa, Amigdalina, Arabinosa y para la correcta identificación se utilizó el Software de Identificación Bacteriana Avanzada (ABIS por sus siglas en inglés).

## 8. Resultados

Se realizó un muestreo aleatorio en 23 mercados minoristas y satelitales del municipio de Guatemala (ver Tabla No.1) para determinar la presencia y frecuencia de *C. sakazakii* en la leche en polvo de venta a granel.

**Tabla No. 1. Identificación numérica de mercados minoristas y satelitales muestreados aleatoriamente en el municipio de Guatemala.**

<b>Mercado</b>	<b>Número</b>	<b>Mercado</b>	<b>Número</b>
<b>Central</b>	1	<b>Satélite El Sauce</b>	13
<b>La Terminal</b>	2	<b>Satélite Trinidad</b>	14
<b>Sur Dos</b>	3	<b>Satélite Unibus</b>	15
<b>La Presidenta</b>	4	<b>La Reformita</b>	16
<b>Satélite 27 calle</b>	5	<b>Satélite Cantón</b>	17
<b>Colón</b>	6	<b>Satélite el Tierrero</b>	18
<b>Satélite Gerona</b>	7	<b>Satélite la Chácara</b>	19
<b>Cervantes</b>	8	<b>Roosevelt</b>	20
<b>La Palmita</b>	9	<b>Satélite 12 avenida</b>	21
<b>La Villa</b>	10	<b>Santa Fe</b>	22
<b>El Granero</b>	11	<b>Satélite La Verbena</b>	23
<b>El Gallito</b>	12		

Fuente: Municipalidad de Guatemala 2013, listado de mercados minoristas y satelitales de la ciudad de Guatemala

De las muestras de los 23 mercados evaluados, las muestras del mercado Satélite Unibus (ver Anexo No.3, Imagen 11) y del mercado Satélite Cantón (ver Anexo No.3, Imagen 12) presentaron un crecimiento sospechoso (ver Tabla No. 2) en el agar cromogénico para *C. sakazakii*, el cual fue similar al presentado por la cepa control en el mismo medio (ver Anexo No.3, Imagen 10).

**Tabla No. 2. Presencia de colonias sospechosas en las muestras de leche en polvo expandida a granel en los 23 mercados minoristas y satelitales de la Ciudad de Guatemala.**

Mercados	Muestras <sup>a</sup>		Mercados	Muestras <sup>a</sup>	
	A	B		A	B
1	-	-	13	-	-
2	-	-	14	-	-
3	-	-	15 <sup>b</sup>	+	+
4	-	-	16	-	-
5	-	-	17 <sup>b</sup>	+	+
6	-	-	18	-	-
7	-	-	19	-	-
8	-	-	20	-	-
9	-	-	21	-	-
10	-	-	22	-	-
11	-	-	23	-	-
12	-	-			

**Nota.** Simbología: “-“denota no crecimiento de colonias sospechosas, “+“: denota crecimiento de colonias sospechosas. Se tomó como colonias sospechosas aquellas que crecieron en el agar cromogénico para *C. sakazakii* y presentaron una coloración azul-verdosa.

<sup>a</sup> Se tomaron dos muestras por mercado.

<sup>b</sup> Las dos muestras de estos mercados fueron tomadas del único proveedor de leche en polvo a granel en cada mercado.

Fuente: Datos experimentales obtenidos del cultivo en agar cromogénico para *C. sakazakii*

Las colonias sospechosas se sometieron a pruebas de identificación bioquímica como se describe en la Tabla No.3 y de la lectura en el sistema ABIS (Advanced Bacterial Identification Software) se identificó *Pantoea agglomerans* de las cuatro muestras analizadas.

**Tabla No. 3 Identificación bioquímica de colonias sospechosas aisladas de las muestras**

Muestra	O.	A.	L.	OD.	Cit.	H <sub>2</sub> S	URE	TD	IN	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RH	SA	MEL	AMY	ARA	Resultado
15 A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>P. agglomerans</i>
15 B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>P. agglomerans</i>
17 A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	<i>P. agglomerans</i>
17 B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	<i>P. agglomerans</i>
<b>Control positivo</b>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>

**Nota.** O: B-galactosidasa, A: L-arginina, L: L-lisina OD: L-ornitina C: Citrato, U: Urea, T: L-triptófano, I: Indol, VP: Voges Proskauer, GEL: Gelatina, GLU: D-glucosa, MAN: D-manitol, INO: Inositol, SOR: D-sorbitol, RH: L-ramnosa, SA: D-sacarosa, MEL: D-melibiosa, AMY: Amigdalina, ARA: Arabinosa.

Fuente: Datos obtenidos de la interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas y leídas con el Software de Identificación Bacteriana Avanzada (ABIS).

## 9. Discusión de Resultados

Al realizar el estudio se encontró poca información sobre los microorganismos contaminantes de los preparados en polvo lácteos para lactantes en los países en desarrollo y también acerca de la vigilancia epidemiológica sobre la carga de morbilidad y mortalidad para estos países derivada del consumo de este tipo de preparados contaminados. Sin embargo, aun cuando no se hayan realizado estudios sobre si el producto utilizado en los países en desarrollo está contaminado, no se puede descartar el riesgo potencial de contaminación, inclusive en Guatemala, ya que durante todo el estudio se observó un desconocimiento de *C. sakazakii*, frecuencia, protocolos rutinarios de identificación en centros hospitalarios y fuente de contaminación. En los informes proporcionados por la OMS, 2002, de diferentes países en desarrollo se ha puesto de manifiesto que algunos lotes de preparados de leche en polvo presentaron contaminación por *C. sakazakii*.

De las 46 muestras de leche en polvo que se obtuvo de los 23 mercados minoristas y satelitales del municipio de Guatemala, el 91.30% de las muestras no presentó crecimiento de ningún tipo de microorganismos en el agar cromogénico, por lo que se contó solo con el 8.7% restante de las muestras para determinar la frecuencia y presencia de *C. sakazakii* como agente de contaminación de la leche en polvo expandida a granel en mercados de la ciudad de Guatemala.

En la Tabla No. 2 de resultados se observa que el 8.7% de las muestras analizadas presentaron crecimiento bacteriano similar a la cepa de *C. sakazakii* ATCC® 29544 utilizada como control en el agar cromogénico para *C. sakazakii*. Al realizar las pruebas bioquímicas descritas en la Tabla No.3, se logró identificar a *Pantoea agglomerans* la cual es una enterobacteria sin importancia para esta investigación, pero al ser comúnmente aislada de suelo, plantas, e insectos y el analito ser dispensado sin envase, su presencia podría ser un indicador de contaminación cruzada relacionada a las prácticas de almacenamiento y manipulación del alimento (Cruz, Cazacu, & Allen, 2007). Por lo tanto, se puede sugerir la presencia de *P. agglomerans* como un punto de partida para realizar investigaciones futuras sobre la contaminación de la leche en polvo expandida a granel.

No se aisló *C. sakazakii* en el 100% de las 46 muestras de los 23 mercados minoristas y satelitales, dicho resultado puede constituir un indicador de Buenas Prácticas de Manufactura de la leche en polvo, ya que se ha aislado *C. sakazakii* de leche que ha sido sometida a procesos de Ultra Alta Temperatura para eliminación bacteriana (Iversen & Forsythe, 2003).

*C. sakazakii* se ha aislado de diferentes tipos de alimentos como pan, lechuga, queso, vegetales, y carne (Iversen & Forsythe, 2003), por lo que su ausencia en el 100% de las muestras analizadas de

leche en polvo dispensada a granel puede indicar una prevención adecuada de la contaminación cruzada en mercados, que son puntos de comercio de los alimentos descritos anteriormente, entre otros. También se ha aislado *C. sakazakii* de moscas y ratas, (Iversen & Forsythe, 2003) por lo que su ausencia en el 100% de las muestras puede también indicar un adecuado manejo de las plagas o buen almacenamiento del producto.

Para concluir, los datos obtenidos del estudio sugieren una tasa de morbilidad y mortalidad casi nula por infecciones de *C. sakazakii* adquiridas por el consumo de leche en polvo expandida a granel. En el estudio realizado por Muytjens, Roelofs-Willemse, y Jaspar en 1988 se encontró *C. sakazakii* en un pequeño porcentaje de muestras de leche en polvo proveniente de 35 países en una concentración menor al criterio para coliformes de 3 UFC/g; La FAO recomienda esta concentración para fórmulas infantiles en polvo de buena calidad; y se concluyó que aunque las concentraciones encontradas cumplieron con el criterio de la FAO, puede ocurrir multiplicación durante el proceso de preparado o almacenamiento, por lo que la ausencia del microorganismo incide en tasas de infección casi nulas.

Los criterios que según el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08 califican a un alimento de este tipo como de calidad microbiológica aceptable no fueron analizados, lo cual constituye una limitante para el estudio. Estos criterios pueden ampliar el panorama para inferir en la calidad de las prácticas de manejo y almacenamiento de la leche en polvo dispensada a granel.

Se recomienda evaluar la presencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, y cuantificar *Staphylococcus aureus* para asegurar la inocuidad microbiológica de la leche en polvo dispensada a granel según los parámetros obligatorios establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08.

## 10. Conclusiones

1. En 100% de las leches en polvo vendidas a granel en los mercados minoristas y satelitales de la ciudad de Guatemala no se encontró presencia de *C. sakazakii*.
2. El 91.30% de las muestras analizadas no presentaron crecimiento de ningún tipo de bacteria en el agar cromogénico.

## 11. Recomendaciones

1. Investigar la presencia de *C. sakazakii* en otro tipo de alimentos.
2. Evaluar las prácticas de almacenamiento y despacho de la leche en polvo a granel para determinar posibles causas de contaminación cruzada con otros microorganismos que amenacen la inocuidad del producto.
3. Evaluar los criterios microbiológicos especificados en el RTCA 67.04.50:08 para determinar la aceptabilidad del producto.

## 12. Referencias

- Biering, g., Clark, N., Karlsson, C., Jonsdottir, K., Ludvigsson, P., & Steingrimsson, O. (1989). Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(9), 2054 - 2056.
- Block, C., Minster, N., Simhon, A., Arad, A., & Shapiro, M. (2002). Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21, 613-616.
- CAC/RCP. (2008). *CODIGO DE PRACTICAS DE HIGIENE PARA LOS PREPARADOS EN POLVO PARA LACTANTES Y NIÑOS PEQUEÑOS*.
- CRONOBACTER. (2013). ELIKA.
- Cruz, A. T., Cazacu, A. C., & Allen, C. H. (2007). *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease ▽. *Journal of Clinical Microbiology*, 45-46.
- Cunningham, A., Jelliffe, D., & Jelliffe, E. (1991). Breast-feeding and health in the 1980s: a global epidemiologic review. *Journal of Pediatrics*, 659-66.
- Elhussein, R. (2007). *Bacterial Contamination of Powder Milk*. Khartoum: University of Khartoum.
- Obtenido de:  
<http://khartoumspace.uofk.edu/bitstream/handle/123456789/8932/BACTERIAL%20CONTAMINATION.pdf?sequence=1>
- FAO, & OMS. (16 de Enero de 1959). Reglamento General de Alimentos y Resoluciones Generales.
- FAO/OMS. (2004). *Enterobacter sakazakii y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes*. Roma: FAO/OMS.
- FAO/OMS. (2008). *Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formulae*. Roma: FAO/OMS.
- Farber, J., & Forsythe, S. (2008). The Neonatal Intestinal Microbial Flora, Immunity, and Infections. En J. Farber, & S. Forsythe, *Emerging issues in food safety: Enterobacter sakazakii* (págs. 61-100). Washington: ASM Press.
- Farmer, J., Asbury, M., Hickman, F., & Brenner, d. (1980). *Enterobacter sakazakii*: A New Species of "Enterobacteriaceae" Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 569-584.
- Feeney, A., Kropp, K., O'Connor, R., & D Sleator, R. (2014). *Cronobacter sakazakii*: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. *Gut Microbes*, 711-718.
- Gunnar, B., Sigfus, K., Clark, N., Jonsdottir, K., Ludvigsson, P., & Steingrimsson, O. (12 de Mayo de 1989). Three Cases of Neonatal Meningitis Caused by *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(9), 2054-2056.

- Hamilton, J., Lehane, M., & Braig, H. (2003). *Isolation of Enterobacter sakazakii from midgut of Stomoxys calcitrans*. *Emerg. Infect. Dis.*
- Heredia, N., Wesley, I., & García, S. (2009). *Microbiologically Safe Foods*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- International Organization for Standardization. (2006). *Milk and milk products — Detection of Enterobacter sakazakii (ISO/TS 22964)*. Suiza: ISO.
- Iversen, C., & Forsythe, S. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science & Technology*(14), 443–454.
- Iversen, C., Lane, M., & Forsythe, S. (2004). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, 18, 378-382.
- Leotta, G., Pacheco, S., Epszteyn, S., Lirón, J., Stambullian, J., Vecchiarelli, C., Y Stamboulian, D. (2011). *Cronobacter sakazakii EN FORMULAS LACTEAS INFANTILES*. Buenos Aires: FUNCEI.
- Luján, G., Loredó, A., & Aguilar, C. (2014). *Cronobacter sakazakii: Un Patógeno Emergente Transmitido por Alimentos*. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(12), 24-29.
- Lujan, G., Loredó, A., & Noe, C. (2014). *Cronobacter sakazakii: Un patogeno emergente transmitido por alimentos*. *Acta Química Mexicana*, 6(12), 24-29.
- Madariaga, A. (1981). *Prácticas alimentarias en niños menores de dos años que asisten al Centro de Salud del el municipio de El Paraíso, El Paraíso Honduras*. Guatemala: USAC.
- Maps, G. (7 de Diciembre de 2015). *Google Maps*. Obtenido de <https://www.google.com/maps/search/mercados+de+guatemala/@14.626882,-90.5618152,13z/data=!3m1!4b1>
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Instituto Nacional de Estadística, Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia. (2017). *Informe Final VI Encuesta Nacional de Salud Materno Infantil 2014-2015*. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- Motarjemi, Y., Moy, G., & Todd, E. (2014). *Encyclopedia of Food Safety* (pág. 424). Boston: Elsevier.
- Municipalidad. (2013). *Mi Muni*. Obtenido de Mercados Municipales: <http://mu.muniguate.com/index.php/component/content/article/3-mercados/177-mercadosmunicipales>
- Municipalidad de Guatemala. (2013). *Mercados Municipales*. Obtenido de Muni Guate: <http://mu.muniguate.com/index.php/component/content/article/3-mercados/177-mercadosmunicipales>

Muytjens, H., Roelofs-Willemse, H., & Jaspar, G. (1988). Quality of Powdered Substitutes for Breast Milk with Regard to Members of the Family Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 743-746.

Organización Panamericana de la Salud. (s.f.). *Seguridad Alimentaria y Nutricional*. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud: Guatemala:  
[http://www.paho.org/gut/index.php?option=com\\_content&view=article&id=184:seguridad-alimentaria-y-nutricional&Itemid=254](http://www.paho.org/gut/index.php?option=com_content&view=article&id=184:seguridad-alimentaria-y-nutricional&Itemid=254)

Pal, M., Alemu, J., Mulu, S., Karanfil, O., Parmar, B., & Nayak, J. (2016). Microbial and Hygienic aspects of Dry Milk Powder. *Beverage & Food World*, 43(7), 28-31.

Quigley, M., & McGuire, W. (2014). *Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants*. York: John Wiley & Sons. doi:10.1002/14651858.CD002971.pub3

SALUD, O. D. (2004). *FAO.ORG*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-y5502s.pdf>

Shaker, R., Osaili, T., Al-Omary, W., Jaradat, Z., & Al-Zuby, M. (2007). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*, 18, 1241-1245.

### **13. Anexos**

### 13.1 Anexo No. 1.

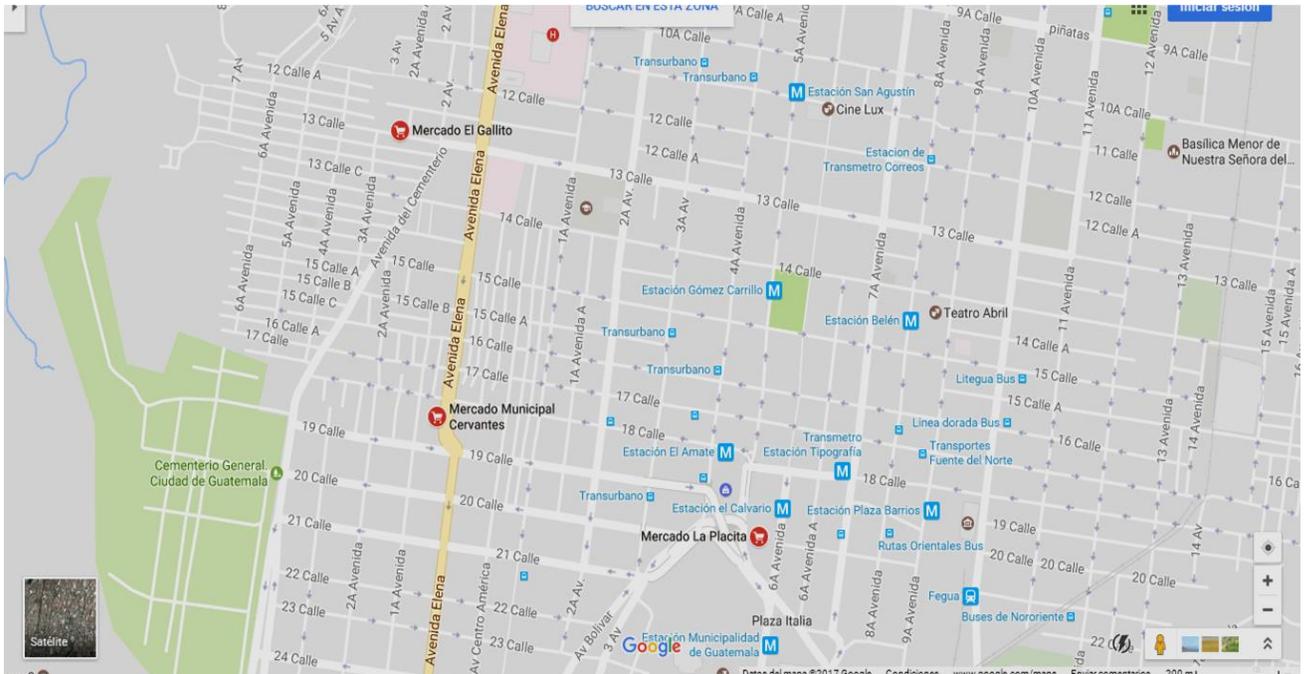
#### Lista de mercados en la Ciudad de Guatemala

<b>Mercado</b>	<b>Ubicación</b>
<b>Central</b>	9ª. av. entre 7ª. y 8ª. Calle zona 1
<b>La Terminal</b>	0 av. Entre 7ª. y 8ª. Calle zona 4
<b>Sur Dos</b>	6ª. Av entre 19 y 21 calle, zona 1
<b>La Presidenta</b>	2ª. Av. Entre 21 y 22 calle, zona 1
<b>Satélite 27 calle</b>	Av. Elena entre 27 y 28 calle, zona 3
<b>Colón</b>	13 av. Entre 7ª. Y 6ª. Calle, zona 1
<b>Satélite Gerona</b>	16 av. Entre 15 y 15 calle “A”, zona 1
<b>Parroquia</b>	Calle Martí y 11 av. zona 6
<b>Satélite 3 de mayo</b>	10ª. Calle y 15 av. “A”, zona 6
<b>Satélite La Maya</b>	Manzana 12, calle principal, zona 18
<b>Cervantes</b>	Avenida Elena y 18 calle, zona 3
<b>La Palmita</b>	16 av. Entre 26 y 27 calle, zona 5
<b>Satélite Santa Ana</b>	33 avenida, zona 5
<b>La Villa</b>	14 av. entre 18 y 19 calle zona 10
<b>Satélite Cantón 21</b>	17 av. Y 4ª. Calle, zona 14
<b>El Granero</b>	28 calle final vía 1, zona 4
<b>San Martin de Porres</b>	18 av. entre 1ª. Y 1ª. Calle “A” zona 6
<b>Satélite Kennedy</b>	3ª. Y 4ª. Calle, zona 18
<b>La Florida</b>	12 av. Y 5ª. Calle, zona 19
<b>Satélite La florida</b>	2ª. Calle entre 7ª. Y 8ª. Avenida zona 19
<b>El Gallito</b>	13 calle entre 2ª. Y 3ª. Avenida zona 3
<b>Satélite El Sauce</b>	1ª. av. y 3ª. Calle zona 1
<b>Satélite Trinidad</b>	5ª. Av. Y 14 calle zona 3
<b>Satélite Unibus</b>	6ª. Av. Y 12 calle “B”, zona 3
<b>San José Mercantil</b>	5ª. Calle y 12 av. Quinta Samayoa zona 7
<b>Candelaria</b>	5ª. Av. Y 25 calle, proyecto 4-3, zona 6
<b>La Reformita</b>	11 av. Entre 22 y 23 calle, zona 12
<b>La Asunción</b>	35av. Y 18 calle zona 5
<b>Satélite el Tierrero</b>	21 calle entre 29 31 y 32 av. zona 5
<b>Satélite la Chácara</b>	20 calle entre 44 45 y 46 av. Zona 5
<b>Flores</b>	Avenida el cementerio y 18 calle zona 3
<b>Satélite Candelaria</b>	2ª. Av. De la 32 a 35 calle, zona 8
<b>Roosevelt</b>	12 av. Y 11 calle, zona 11
<b>Satélite 12 avenida</b>	12 av. entre 4ª. y 5ª. calle zona 11
<b>Santa Fe</b>	11 av. y 2ª. calle Santa Fe, zona 13
<b>Bethania</b>	11av. y 27 calle, zona 7
<b>Satélite Landivar</b>	6ª. av. y 9ª. calle landivar, zona 7
<b>Satélite La Verbena</b>	20 calle Final y Avenida el cementerio zona 3

Fuente: (Municipalidad, 2013)

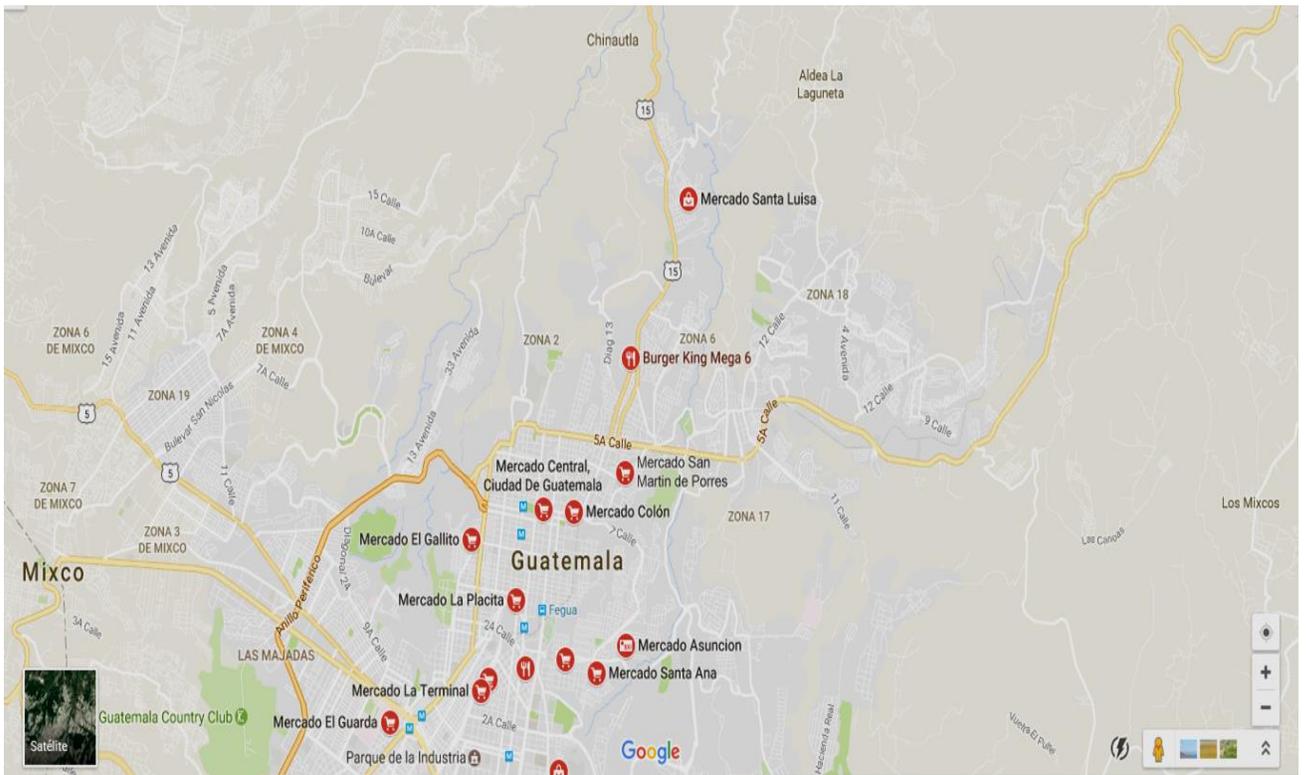


**Imagen No. 2 “Mercados en zona 3”**



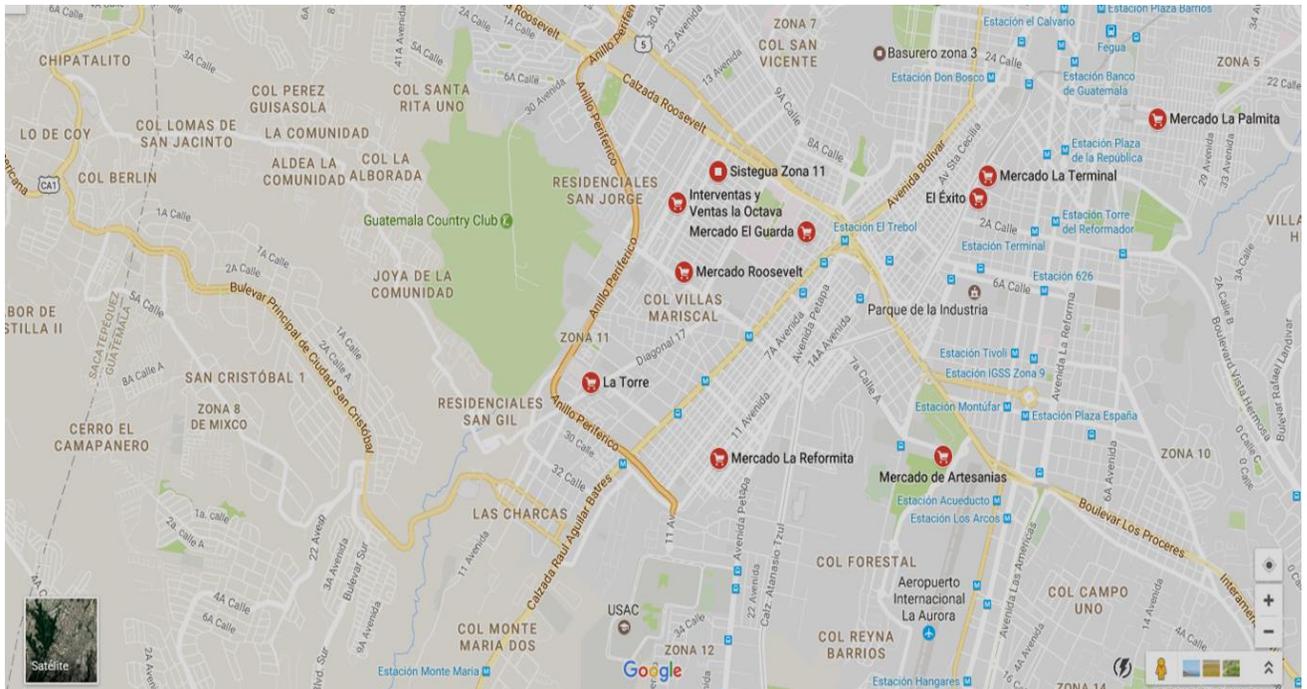
Fuente: Imagen de Google Maps (Maps, 2015).

**Imagen No. 3 “Mercados en zona 6”**



Fuente: Imagen de Google Maps (Maps, 2015).

**Imagen No. 4 “Mercados en zona 11”**



Fuente: Imagen de Google Maps (Maps, 2015).

**Imagen No. 5 “Mercados en zona 7”**

Fuente: Imagen de Google Maps (Maps, 2015).

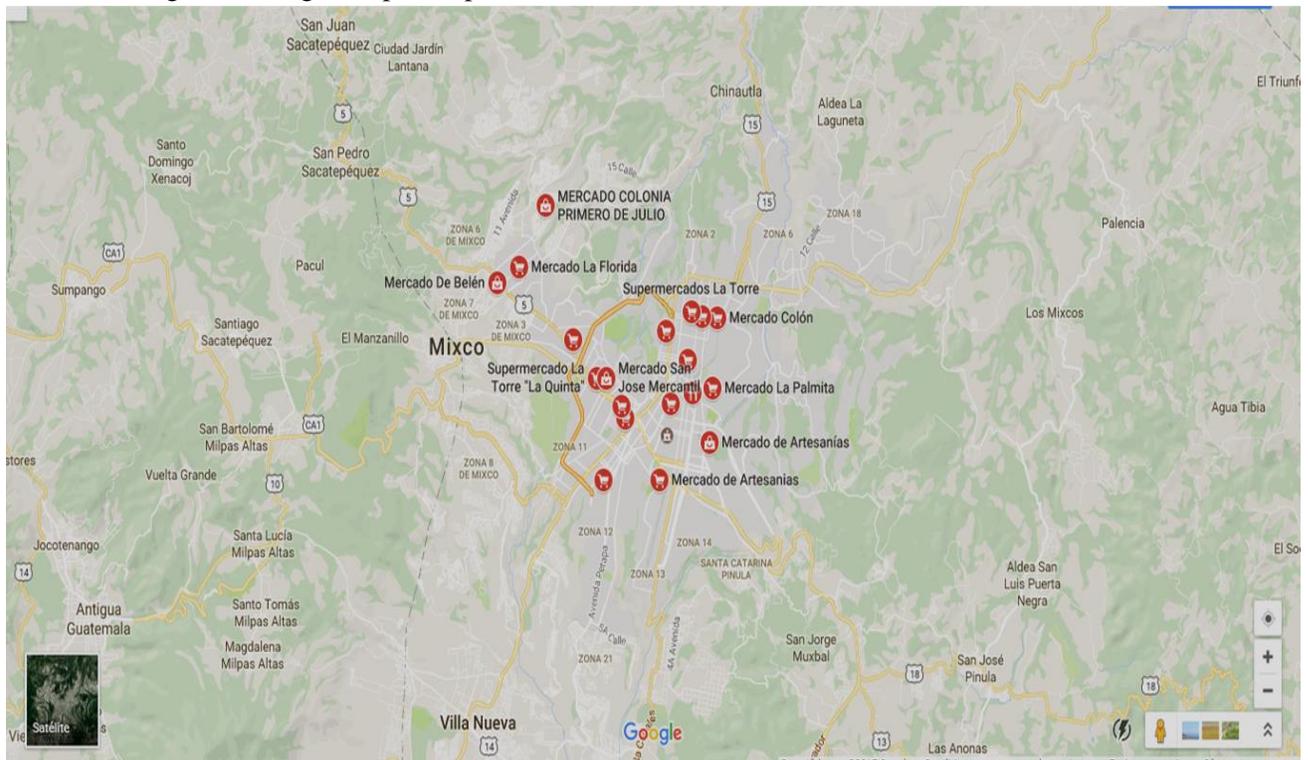
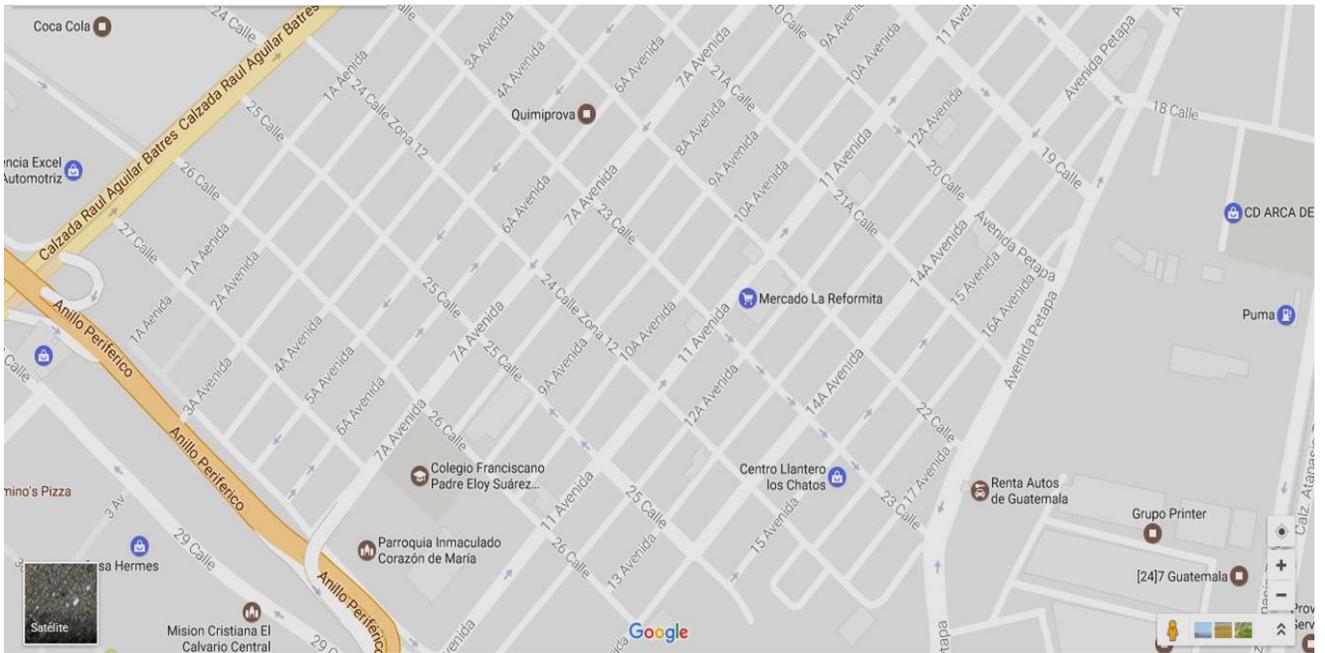
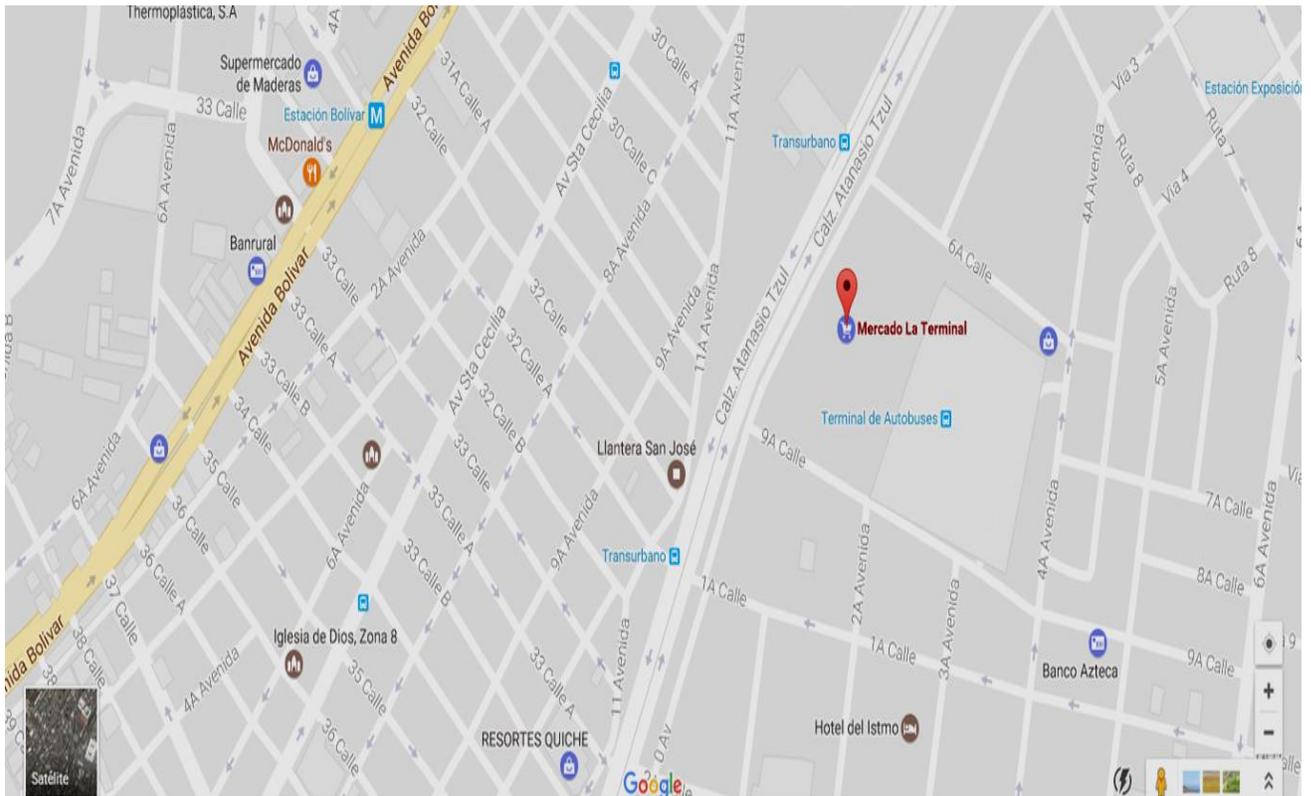


Imagen No. 6 “Mercados en zona 12”

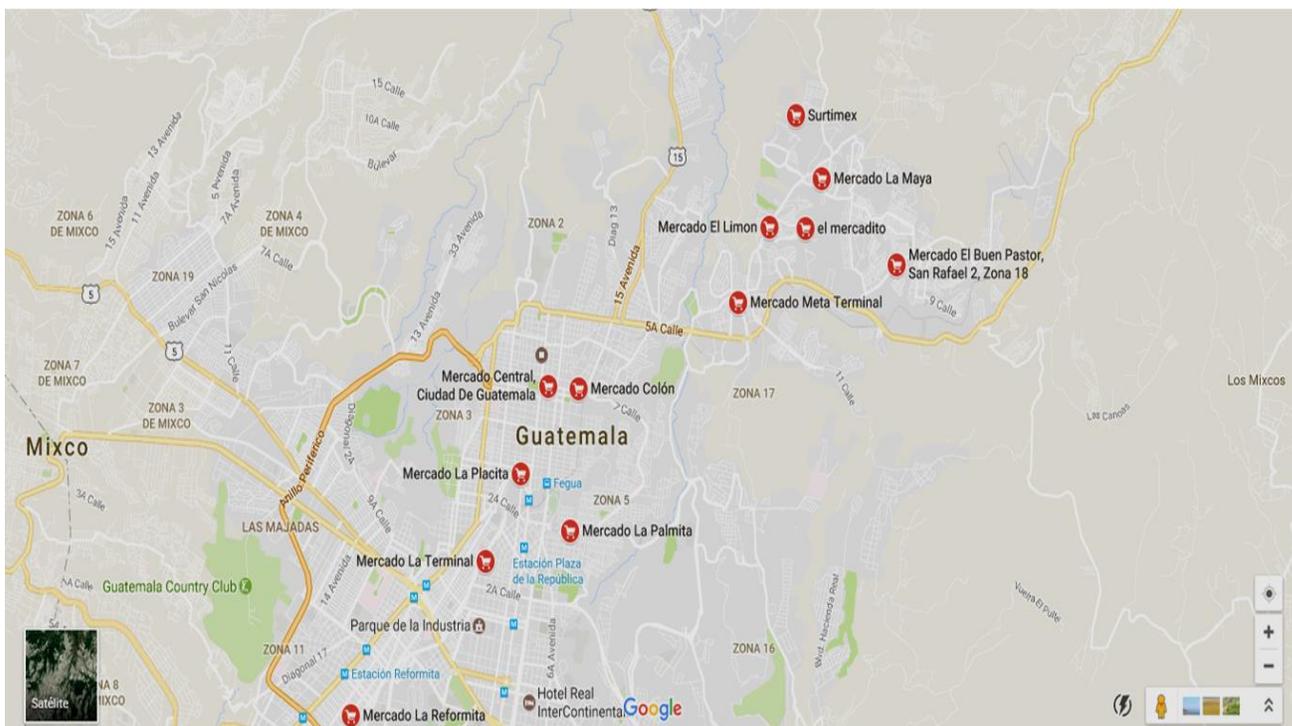


Fuente: Imagen de Google Maps (Maps, 2015). Imagen No. 7 “Mercados en zona 4”



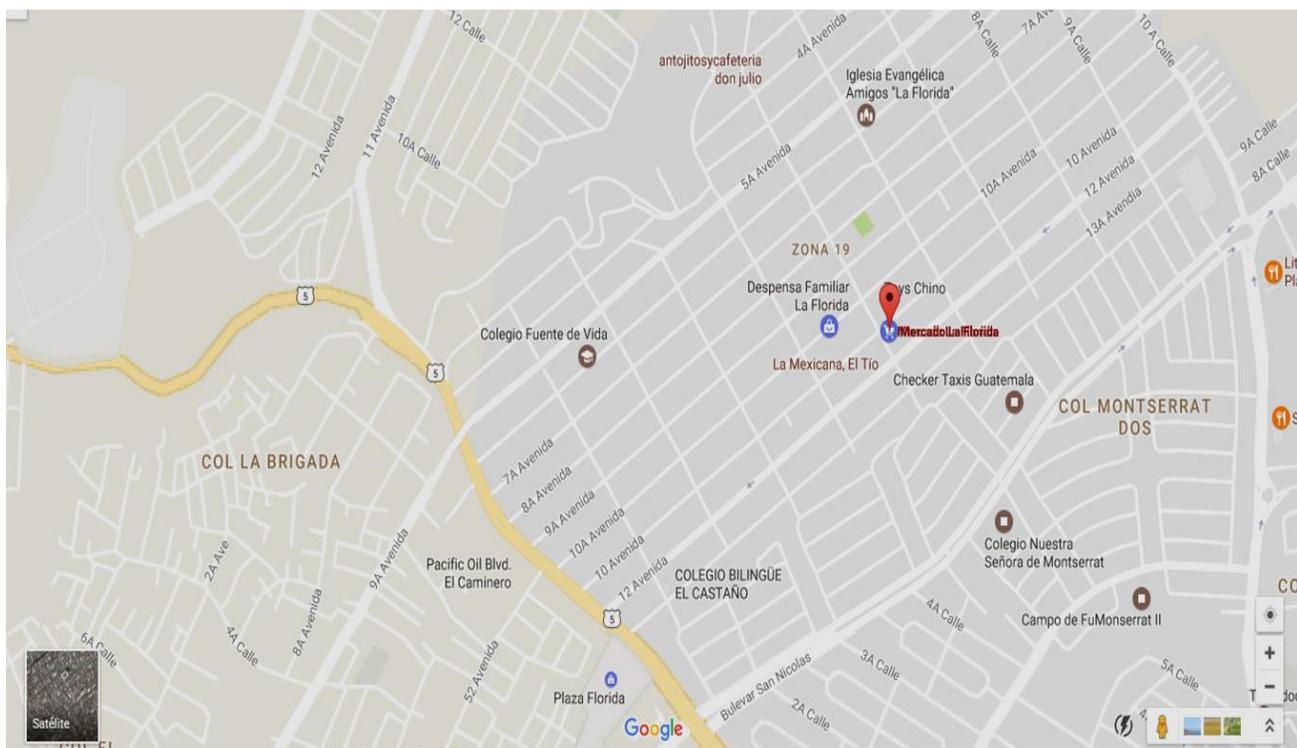
Fuente: Imagen de Google Maps (Maps, 2015).

**Imagen No. 8 “Mercados en zona 18”**



Fuente: Imagen de Google Maps (Maps, 2015).

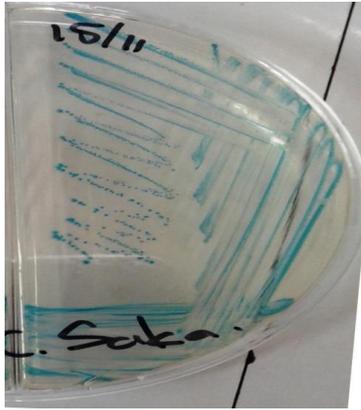
**Imagen No. 9 “Mercados en zona 19”**



Fuente: Imagen de Google Maps (Maps, 2015).

### 13.3 Anexo No. 3.

Imágenes del control positivo y las colonias sospechosas aisladas en agar cromogénico para *C. sakazakii*.



**Imagen 10.** Cepa ATCC® 29544 de *Cronobacter sakazakii*



**Imagen 11.** Muestra del mercado satelital # 15



**Imagen 12.** Muestra del mercado satelital # 17

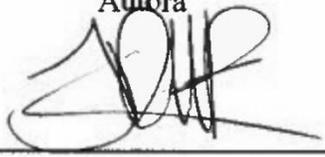
Fuente: Fotografías obtenidas durante el proceso de lectura de todas las muestras comparadas con la cepa ATCC® 29544 en el medio cromogénico para *C. sakazakii* a los 23 mercados minoristas y satelitales de la Ciudad de Guatemala en el Laboratorio Microbiológico de referencia -LAMIR- USAC.



---

Br. Leslie María Ovalle Monterroso

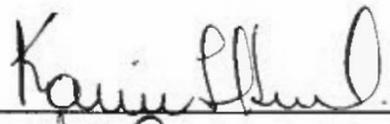
Autora



---

Br. Juan Rafael Menchú Rosal

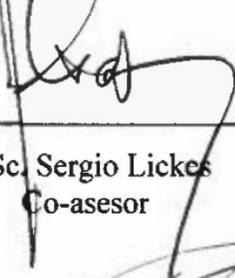
Autor



---

Dra. Karin Herrera

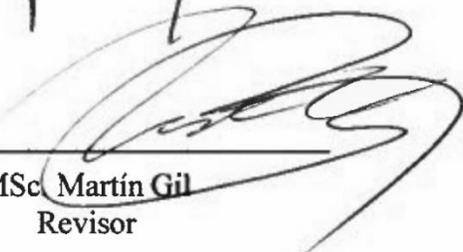
Asesora



---

MSc. Sergio Lickes

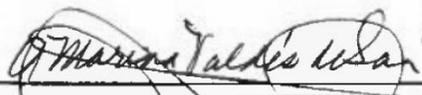
Co-asesor



---

MSc. Martín Gil

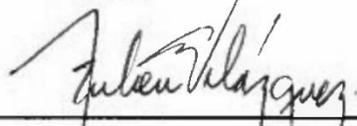
Revisor



---

MSc. Alba Marina Valdés de García

Directora de Escuela



---

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

Decano