

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS A VIRULENCIA EN ESPECIES DE *Cronobacter*
AISLADAS EN DIFERENTES AMBIENTES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Ariadna del Carmen Cruz Córdova

Directora de Tesis: Dra. Irma Aurora Rosas Pérez

México, D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Aerobiología de la Facultad de Medicina y del Centro de Ciencias de la Atmósfera, en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez y la coasesoría de la Dra. Bertha González Pedrajo y del Dr. Carlos Alberto Eslava Campos, en el programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas.

El trabajo contó con el apoyo financiero de la Dirección General Asuntos del Personal Académico-UNAM (DGAPA) a través del proyecto de investigación: Búsqueda de factores de virulencia en cepas de *Enterobacter sakazakii* aisladas de diferentes ambientes (PAPIIT-IN217307).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el periodo 2006-2009 (103948).

A mis padres y hermano

***Por siempre hacer florecer
mi espíritu.***

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial:

Somos la memoria que tenemos y la responsabilidad que asumimos, sin memoria no existimos y sin responsabilidad quizá no merezcamos existir.

José Saramago.

Dra. Irma Aurora Rosas Pérez

Dra. Bertha González Pedrajo

Dr. Carlos Alberto Esclava Campos

Muy respetuosamente a los miembros del jurado:

Dra. Yolanda López Vidal

Dra. Irma Aurora Rosas Pérez

Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann

Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes

Dr. Georges Dreyfus Cortés

A Servando

Por todos los días que siempre me diste tu mano y un abrazo para continuar. Por tu sinceridad y por ser un pilar en mi vida.

A mis amigos

Delia, Eva, Eli, Gil, Jorge y Roberto porque siempre estuvieron ahí, en los momentos de aprendizaje.

A todos aquellos que me enseñaron que el conocimiento es para compartirse:

Carlos Amabile, Miriam Bobadilla, Araceli, Eva Salinas, Leticia Martínez, Norma Esponisa, Teresa Ballado, Javier de la Mora, Elizabeth Fernández y Tomás Hernández.



ÍNDICE



	Página
Índice.....	I
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	VI
Abreviaturas.....	VIII
Resumen.....	1
I. Introducción.....	4
1. Taxonomía.....	5
2. Aislamiento e identificación microbiológica.....	7
3. Detección y caracterización molecular.....	9
4. Reservorios.....	12
5. Características asociadas a su supervivencia en la fórmula infantil en polvo.....	13
6. Importancia clínica.....	14
7. Medidas de control.....	19
II. Antecedentes.....	20
III. Justificación.....	27
IV. Hipótesis.....	29
V. Objetivo general.....	31
VI. Objetivos particulares.....	33
VII. Material y Métodos.....	35
1. Población.....	36
2. Caracterización fenotípica de <i>Cronobacter</i> spp. en aislados mexicanos.....	38
2.1 Biotipos.....	38
2.2 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.....	38
3. Identificación mediante métodos moleculares.....	39
3.1 Gen <i>ompA</i> (Proteína A de membrana externa).....	39
3.2 Secuenciación del gen ARNr 16S.....	39
4. Identidad clonal en los aislados de <i>Cronobacter</i> spp. por PFGE.....	40
5. Caracterización <i>in vitro</i> de las propiedades asociadas a virulencia en las especies de <i>Cronobacter</i>	41



5.1 Ensayo cualitativo y cuantitativo de adherencia en células HEp-2 (células de carcinoma humano laríngeo).....	41
5.2 Ensayo cualitativo y cuantitativo de invasión en células HEp-2 (células de carcinoma humano laríngeo).....	42
5.3 Ensayo para la producción de toxinas en células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde Africano).....	43
6. Formación de Biofilm.....	44
7. Búsqueda de genes asociados a virulencia en el genoma de <i>Cronobacter sakazakii</i> BAA-894.....	44
8. Análisis estadístico.....	46
VIII. Resultados	47
1. Caracterización fenotípica de <i>Cronobacter</i> spp.....	48
1.1 Identificación bioquímica (biotipos).....	48
1.2 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.....	50
2. Identificación mediante métodos moleculares.....	50
2.1 Detección del gen de <i>ompA</i> mediante PCR.....	50
2.2 Secuenciación del gen ARNr 16S.....	50
3. Identidad clonal.....	51
4. Características asociadas a virulencia.....	53
4.1 Capacidad de adherencia en células HEp-2(células de carcinoma humano laríngeo).....	53
4.2 Capacidad de invasión en células HEp-2 (células de carcinoma humano laríngeo).....	55
4.3 Efecto citopático en células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde Africano).....	56
5. Capacidad de formación de biopelículas en placas de poliestireno.....	57
6. Identificación y detección de genes putativos de virulencia en aislados de <i>Cronobacter</i> spp.....	58
IX. Discusión	65
X. Conclusión	75
XI. Perspectivas	77
XII. Referencias	80



ÍNDICE DE FIGURAS



Número	Figura	Página
1	Método básico para la detección e identificación de <i>Cronobacter</i> spp. a partir de muestras de fórmula infantil en polvo.	8
2	Incidencia de casos como porcentaje del total de infecciones aisladas por <i>Cronobacter</i> spp.	15
3	Proceso infeccioso de <i>Cronobacter</i> spp., tras la ingestión de fórmula infantil en polvo contaminada.	26
4	Grupos representativos de los patrones de PFGE entre las especies de <i>Cronobacter</i> .	52
5	Adherencia cualitativa de las especies de <i>Cronobacter</i> en células HEp-2.	53
6	Adherencia cuantitativa de las 43 especies de <i>Cronobacter</i> .	54
7	Capacidad de invasión a células HEp-2 por especies de <i>Cronobacter</i> .	55
8	Frecuencia relativa de invasión entre los 43 aislados de <i>Cronobacter</i> spp.	56
9	Efecto de los filtrados de los cultivos de <i>Cronobacter</i> spp. en las células Vero.	57
10	Identificación de la producción y cuantificación de biopelículas en los 43 aislados de <i>Cronobacter</i> spp.	58
11	Alineamientos de la secuencia proteica de <i>C. sakazakii</i> ESA_03485, correspondiente a la proteína de sideróforo, con las secuencias proteicas de otros patógenos.	59
12	Alineamientos de la secuencia proteica de <i>C. sakazakii</i> ESA_00432 con las secuencias proteicas identificadas como hemolisina tipo III en el genoma de otros patógenos.	60
13	Alineamientos de la secuencia proteica de <i>C. sakazakii</i> pESA3p05434, correspondiente a un activador de plasminógeno putativo, con las secuencias proteicas identificadas como activadores del plasminógeno en el genoma de otros patógenos.	61
14	Alineamientos de la secuencias proteica de <i>C. sakazakii</i> pESA3p05434, correspondiente a un activador de plasminógeno putativo, con las cadenas que constituyen a la proteína activadora del plasminógeno en <i>Yersinia pestis</i> .	62



ÍNDICE DE TABLAS



Número	Tabla	Página
1	Clasificación de la enterocolitis necrotizante según Walsh y Kliegman.	17
2	Descripción de las fuentes de aislamiento y origen geográfico de los aislados de <i>Cronobacter</i> spp. identificados y analizados en este estudio.	37
3	Secuencia del iniciador, condiciones de la PCR, blancos y tamaño del amplificado esperado para la detección de los genes potenciales de virulencia en las diferentes especies de <i>Cronobacter</i> .	46
4	Identificación fenotípica con base en los biotipos de los aislados mexicanos.	48
5	Perfiles bioquímicos identificados en los aislados de <i>Cronobacter</i> spp., proporcionados por la Dra. Iversen.	49
6	Especies y biotipos identificados en los aislados mexicanos de <i>Cronobacter</i> spp. mediante pruebas bioquímicas y secuenciación del ARNr 16S.	51
7	Características asociadas a virulencia en las especies de <i>Cronobacter</i> .	64



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr 16S	Ácido ribonucleico ribosomal 16S
AFLP	Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos Amplificados
ATCC	Colección de cultivos americanos
BHI	Infusión cerebro corazón
BLAST	Herramienta local básica de alineamientos
BMEC	Células endoteliales microvasculares de cerebro
CHO	Células de ovario de hámster Chino
CSE	Chromocult® <i>Enterobacter sakazakii</i>
DFI	Agar Druggan-Forsythe-Iversen
EE	Caldo de enriquecimiento <i>Enterobacteriaceae</i>
ESE	Caldo <i>Enterobacter sakazakii</i>
ESIA	Agar de aislamiento <i>Enterobacter sakazakii</i>
ESPM	Medio cromogénico <i>Enterobacter sakazakii</i>
ESSB	Caldo selectivo <i>Enterobacter sakazakii</i>
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IPTG	Isopropil β-galactopiránosido
ITS	Regiones espaciadoras internas
LB	Medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MEM	Medio mínimo esencial en base de sales de Earle's
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófagos-2
mLST	Caldo lauril sulfato modificado
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica
NMP	Número Más Probable
OmpA	Proteína de membrana externa A
PBS	Solución reguladora de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-kinase
PFGE	Electroforesis en campo pulsado
PIF	Formula infantil en polvo
RAPD	Amplificación al azar de ADN polimórfico
SFB	Suero fetal bovino
TSA	Agar de soya tripticaseína
Vero	Células de riñón del mono verde Africano
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VNTR	Elementos de ADN repetidos en tandem
VRBG	Agar glucosa bilis rojo violeta
Y-1	Células de tumor adenocortical
α-glucosidasa	Alfa glucosidasa



RESUMEN



Cronobacter spp. (*Enterobacter sakazakii*), son un grupo de bacterias Gram negativas, consideradas como patógenos oportunistas transmitidos por alimentos, y que además son causa rara de infecciones en neonatos, asociadas a una alta mortalidad. Sin embargo, el mecanismo de patogenicidad de este microorganismo no es del todo claro. En el presente trabajo se analizaron 43 aislados de *Cronobacter*, provenientes de diferentes muestras (ambiente, alimentos y humanas). Se identificaron cuatro grupos principales mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE), encontrándose un total de 32 pulsotipos de ADN. El 86% de los aislados de *Cronobacter* fueron capaces de adherirse a la línea celular HEp-2; y el 35% de los aislados fueron invasivos, siendo *C. sakazakii* el más eficiente en cuanto a invasión. El 16% de filtrados libres de bacterias de los aislados de *Cronobacter* spp. ocasionaron daño citopático en la línea celular Vero, después de 48h de incubación. En lo que respecta a su capacidad de formar biopelículas, el 26% de los aislados de *Cronobacter* mostraron esta habilidad, principalmente aquellos que no provenían de muestras humanas, tales como *C. dublinensis* y *C. malonaticus*. Tres genes putativos de virulencia [*sip* (proteína del sideroforo), *hly* (la hemolisina tipo III), y *cpa* (activador del plasminógeno)], fueron identificados a través de un análisis bioinformático y detectados mediante PCR. El gen *sip* fue el más frecuente, detectándose en el 60% (26/43) de los aislados, seguido del gene *hly* en el 37% (16/43) y del gen *cpa* en el 28% (12/43). Resultó interesante observar que los tres genes fueron detectados principalmente en los aislados identificados como *C. sakazakii*. Los datos obtenidos en este estudio muestran que las especies de *Cronobacter* poseen diferentes atributos patogénicos.



Cronobacter spp. (*Enterobacter sakazakii*) includes Gram-negative opportunistic foodborne pathogens known as rare but important causes of life-threatening neonatal infections. However, the pathogenic mechanism is not yet clear. In this study 43 isolates of *Cronobacter*, from different sources (environmental, food and human), were analyzed. A total of four clusters were identified and 32 DNA pulsotypes were observed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). In addition, 86% *Cronobacter* isolates were able to adhere to HEp-2 cells; and 35% were invasive, *C. sakazakii* isolates being the most efficient. Sixteen percent of cell free filtrates of *Cronobacter* isolates showed cytophatic effect on Vero cells after 48 h of incubation. Twenty-six percent of *Cronobacter* isolates were able to form biopelículas, mainly those from non human sources, such as *C. dublinensis* and *C. malonaticus*. Three putative virulence genes [*sip* (siderophore interacting protein), *hly* (type III hemolysin), and *cpa* (plasminogen activator)] were identified by bioinformatic analysis, and then detected by PCR. The *sip* gene was the most frequently detected 60% (26/43) followed by the *hly* gene 37% (16/43) and the *cpa* gene 28% (12/43). The three genes were identified primarily in *C. sakazakii*. Our data show that *Cronobacter* species harbor different virulence traits.



I. INTRODUCCIÓN



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

La información que ha continuación se presenta ha permitido caracterizar a *Cronobacter* spp. como una bacteria de vida libre, ubicua con gran plasticidad tanto metabólica como estructural. Una vez internalizada en el organismo humano, ha desarrollado diferentes mecanismos de supervivencia, causando así diversos padecimientos que han dejado registro en la morbilidad y mortalidad en neonatos principalmente.

1. Taxonomía

El género *Cronobacter* spp. se caracteriza por ser un grupo de bacterias Gram negativas que miden 3 μm x 1 μm , móviles por flagelos peritricos, no formadoras de esporas, anaerobias facultativas y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria fue descrita originalmente como *Enterobacter cloacae* productora de pigmento amarillo, hasta que fue reclasificada en 1980 como una nueva especie, *Enterobacter sakazakii*. El análisis del porcentaje de hibridación ADN-ADN, en *E. sakazakii* mostró una relación del 53-54% con dos géneros distintos: *Enterobacter* y *Citrobacter*. Sin embargo, al ser propuesta como una nueva especie y estar más relacionada fenotípicamente y genotípicamente con *Enterobacter cloacae*, ésta fue incluida en el género *Enterobacter*. Además, esta nueva especie sintetiza la enzima α -glucosidasa, produce un pigmento amarillo, no fermenta el sorbitol y es sensible a ampicilina y cefalotina, mismas características que permitían diferenciarla de *E. cloacae* y otras enterobacterias (Farmer et al. 1980).

E. sakazakii se constituyó originalmete con 16 biotipos (Farmer et al. 1980), aunque recientemente se propuso un biotipo más (Iversen et al. 2006), lo anterior hace referencia a la existencia de distintos biogrupos, sugiriendo que este microorganismo esta formado por diferentes especies. Dada la complejidad de esta especie Iversen et al. (2007a, 2008a), realizaron un estudio polifacético de una colección de cepas de *Enterobacter sakazakii*, demostrando que este microorganismo esta formado por al menos cinco especies, las cuales deberían ser reclasificadas a un nuevo género, *Cronobacter* [Gr. N. *Cronos* Titán de la mitología; N.L. masc.n. *bacter* bacilo; N.L. masc. n. *Cronobacter* un bacilo que causa infección en neonatos]. Este género es propuesto con base en: el polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), “fingerprint”, ribotipificación, caracterización de la secuencia completa del gen 16S rARN, hibridación ADN-ADN, y perfiles fenotípicos en donde se identifican a cada uno de los biotipos descritos originalemnete para este microorganismo Iversen et al. (2007a, 2008a).



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Este género consta de cinco especies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter turicensis* y una genomoespecie (Iversen et al. 2007a, 2008a).

El género *Cronobacter* se caracteriza por reducir los nitratos, utilizar el citrato como fuente única de carbono, hidrolizar la esculina y arginina y dar positivo a la prueba de descarboxilación de la L-ornitina. Produce ácido a partir de D-glucosa, sacarosa, rafinosa, melobiosa, celobiosa, D-manitol, D-manosa, D-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, trealosa y maltosa (Farmer et al. 1980; Farmer et al.1985; Iversen et al. 2008).

Generalmente es positivo a la producción de acetoina (Voges-Proskauer) y negativo a la prueba de rojo de metilo. Metaboliza el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido mediante la enzima α -glucosidasa. La producción de indol es variable. No utiliza el D-sorbitol como fuente de carbono y produce pigmento amarillo en el medio de cultivo agar soya tripticaseína, el cual es más notorio a 25°C que a 36°C (Farmer et al. 1980; Farmer et al.1985; Iversen et al. 2008).

La especie tipo es *Cronobacter sakazakii* y cada una de las especies propuestas en este nuevo género se describen a continuación según Iversen et al. (2008):

- 1) *Cronobacter sakazakii*: comprende los biotipos 1-4, 7, 8, 11 y 13 previamente descritos por Farmer et al. (1980). La cepa tipo ATCC 29544, fue aislada originalmente de la garganta de un niño, es positiva a mioinositol y metil- α -D-glucopiranosido y negativa a malonato, indol y dulcitol.
- 2) *Cronobacter malonaticus*: comprende los biotipos 5, 9 y 14 descritos previamente por Farmer et al. (1980). es positiva a la utilización del malonato y metil- α -D-glucopiranosido y negativa a indol y dulcitol. La cepa tipo es la CDC 1058-77, aislada de un absceso cerebral.
- 3) *Cronobacter muytjensii*: pertenece al biotipo 15, descrito originalmente por Farmer et al. (1980). La cepa tipo es la ATCC 51329 depositada por bioMérieux, es indol, malonato y dulcitol positiva, pero es negativa a palatinosa y metil- α -D-glucopiranosido.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

- 4) *Cronobacter dublinensis*: se encuentra dentro de los biotipos 6, 10 y 12 descritos por Farmer et al. (1980). La cepa tipo es la CFS237, muestra ambiental proveniente de una fabrica de leche en polvo. Es dulcitol negativa y positiva para metil- α -D-glucopiranosido e indol. Dentro de esta especie se encuentran tres subespecies: *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis*, biotipo 12 malonato positivo; *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis*, biotipo 10, inositol negativo y *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi*, biotipo 6, inositol positivo y malonato negativo.

- 5) *Cronobacter turicensis*: derivada del biotipo 16 descrito por Iversen et al. (2006). La cepa tipo es la LGM 23827, aislada de un hemocultivo de un neonato con meningitis en Suiza en el 2005. Es indol negativo y malonato, dulcitol, inositol y metil- α -D-glucopiranosido positivos.

- 6) *Cronobacter* genomoespecies 1: no hay una diferencia fenotípica de esta bacteria con lo descrito para el biotipo 16, por lo que se designa como una nueva genomoespecie. La cepa tipo es la NCTC 9529 aislada de agua.

2. Aislamiento e identificación microbiológica.

Una característica útil en la identificación de *Cronobacter* spp. es la enzima α -glucosidasa, que le permite diferenciarla de otras enterobacterias y fue propuesta por Muytjens et al. (1984), como una prueba para su identificación. Actualmente, se sabe que la especie *C. muytjensii* no cuenta con esta enzima, pero filogenéticamente se encuentra relacionada con las otras especies (Iversen et al. 2008).

La mayoría de los métodos empleados para el aislamiento de *Cronobacter* spp., están referidos a la vigilancia sanitaria de la FIP (fórmula infantil en polvo), reglamentada por los organismos como la FDA (Food and Drug Administration), OMS (Organización Mundial de la Salud) y la Comisión del Codex Alimentarius (FAO y OMS, 2008; FAO y OMS: Comisión del Códex Alimentarius, 2004). El esquema básico para el aislamiento de *Cronobacter* spp. se muestra a continuación (**Figura 1**).



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

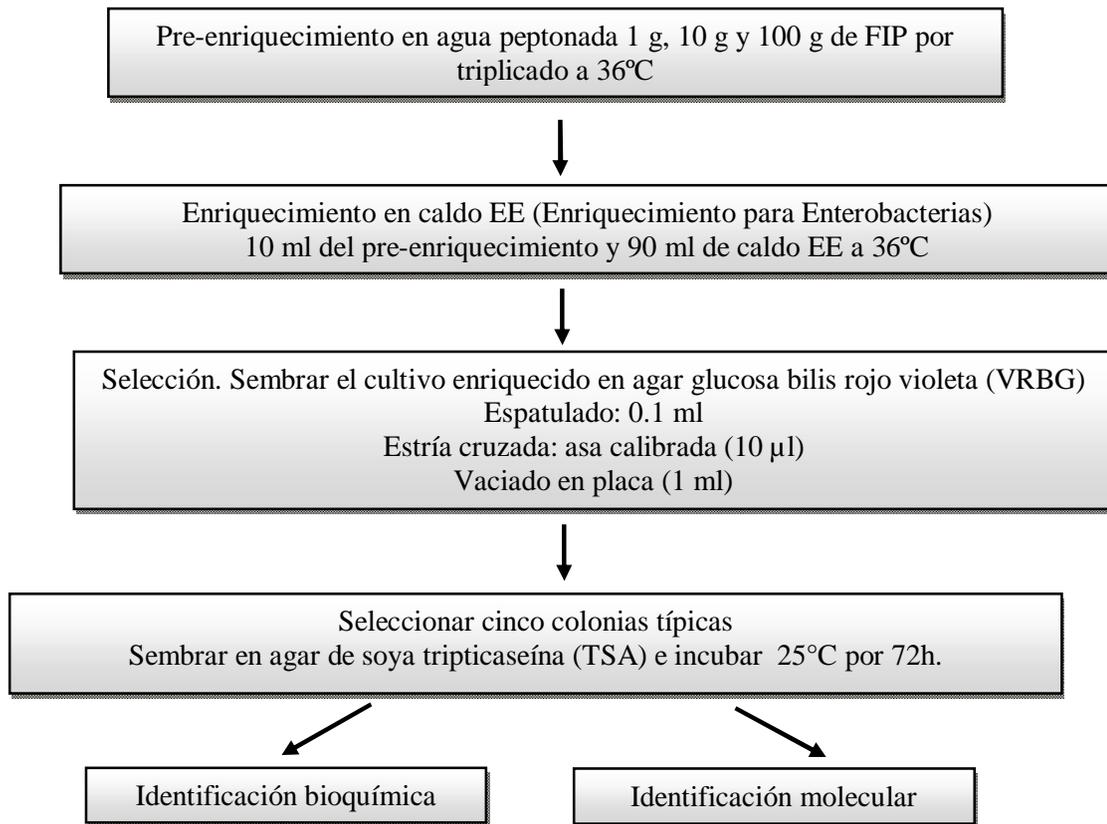


Figura 1. Método básico para la detección e identificación de *Cronobacter* spp. a partir de muestras de fórmula infantil en polvo. Tomado de Forsythe 2005.

Dada la ubicuidad de la bacteria, diversos medios de cultivo se han implementado para su aislamiento e identificación, basados en la incorporación de un sustrato cromogénico al medio. El agar DFI (Druggan-Forsythe-Iversen) se diseñó bajo el principio de una reacción que pone de manifiesto a la enzima α -glucosidasa, al metabolizar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido ($X\alpha$ Glc). *Cronobacter* spp. hidrolizan este sustrato en un pigmento índigo, produciendo colonias verde-azules en el medio. A diferencia del VRBG, permite la identificación y diferenciación de *Cronobacter* spp. aun cuando la microbiota acompañante se encuentre en mayor proporción (Iversen et al. 2004a).

Otro medio de cultivo utilizado es el ESPM (*Enterobacter sakazakii* medio cromogénico), en donde las colonias características son de color azul-negro (Restaino et al. 2006). También se han descrito medios de cultivo que contienen sustratos fluorógenos en lugar de cromógenos, el problema con los primeros es que la fluorescencia resultante se difunde en el medio y esto complica la selección de colonias (Oh y Kang, 2004; Tortollero, 2004).



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Actualmente, los métodos para el aislamiento de este microorganismo, consisten en el enriquecimiento selectivo de la muestra ambiental en mLST (caldo de lauril sulfato triptona suplementado con el 0.5 M de NaCl y vancomicina) a 45°C por 24 h, seguido de la siembra en agar triptona con sales biliares, al exponer a la luz el medio se producen colonias amarillas (Guillaume-Gentil et al. 2005). Otro método es el ISO (DTS 22964) que consiste en el enriquecimiento en ESSB (caldo selectivo *Enterobacter sakazakii*) a 44°C, para posteriormente sembrar en agar cromogénico ESIA (agar de aislamiento *Enterobacter sakazakii*).

Los diferentes procedimientos descritos hasta la fecha para el aislamiento e identificación de *Cronobacter* spp. fueron comparados y los resultados mostraron que con base a los métodos de enriquecimiento el 100% de las cepas evaluadas crecieron en ESE, mientras que en EE, mLST y ESSB sólo se recuperó el 94-98% de la población, debido a la presencia de inhibidores en estos medios. En lo que respecta a los medios de cultivo para su identificación se encontró, que la producción de pigmento amarillo tiene un 87% de sensibilidad, 71% de especificidad y 74% de exactitud, mientras que los medios DFI y CSE (Chromocult® *Enterobacter sakazakii*) mostraron el 100% de sensibilidad, 98% de especificidad y 98% de exactitud (Iversen y Forsythe, 2007; Mareè et al. 2008). La aplicación de diferentes medios de enriquecimiento y de aislamiento ha permitido la recuperación de *Cronobacter* spp. de diversos ambientes, con lo que se pretende tener un mejor conocimiento del hábitat de este microorganismo.

3. Detección y caracterización molecular.

Con el objetivo de facilitar la detección rápida de *Cronobacter* spp. recientemente, un número mayor de métodos moleculares se han implementado, incluyendo a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR tiempo real y otros métodos de hibridación. Dentro de los métodos de PCR utilizados para la identificación de *Cronobacter* spp. se emplean secuencias del ARNr 16S, α -glucosidasa y de la proteína de membrana externa (OmpA) (Lehner et al. 2004, 2006; Seo y Brackett, 2005; Marlony y Wagner, 2005; Iversen et al. 2006; Mohan Nair y Venkitanarayanan, 2006; Hassan et al. 2007; Witthuhn et al. 2007).

Las regiones espaciadoras internas (ITS) son utilizadas para el diseño de iniciadores específicos que permiten identificar a nivel de especie, es considerada una herramienta útil para la taxonomía bacteriológica. Liu



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

et al. (2006a, 2006b) propusieron el manejo de estos blancos acoplados a la PCR tiempo real, lo que dio una sensibilidad de detección de 1.3 UFC/100g de FIP y de 1.1 UFC/100g de FIP cuando se acoplan sondas TaqMan, respectivamente. Mientras que Derzelle y Dilasser (2006), reportaron una alta sensibilidad (10^2 UFC/ml de muestra) de acuerdo a la ISO-IDF, cuando el ITS se empleó como blanco para la identificación de *Cronobacter* spp. Además de estos blancos, también se han utilizado genes constitutivos como *dnaG* y *gluA* para su identificación (Iversen et al. 2007b).

El ERIC (consensos intergénicos repetidos de enterobacterias)-PCR es otro método usado para la tipificación e identificación de las bacterias. Después de obtener los patrones de bandeo generados por esta región mediante PCR, la banda predominante fue seleccionada, clonada y secuenciada, obteniéndose un 90% de identidad con *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894, y un 73% de identidad con un gen de oligopeptidasa de algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae*, partiendo de esta secuencia se diseñaron iniciadores específicos que permitieron la detección de *Cronobacter* spp. en diferentes muestras, mediante PCR (Ye et al. 2008).

Actualmente, se utilizan técnicas que permiten la detección y localización de secuencias específicas de ADN sobre cromosomas, células o tejidos, como la de FISH (hibridación fluorescente *in situ*), considerado como un método rápido para la detección de *Cronobacter* spp. en la FIP utilizando una sonda ácido nucleico-péptido (análogo de un ADN sintético), y siendo hasta el momento el único método que logra detectar 1 UFC/10g de *Cronobacter* spp. en la FIP, después de 8 h de enriquecimiento (Almeida et al. 2009).

Para facilitar la investigación epidemiológica, es recomendable que todos los aislados de *Cronobacter* spp. sean estudiados fenotípicamente y genotípicamente. Diversos métodos se han utilizado para estudiar la diversidad bacteriana o el seguimiento de la fuente de contaminación en un brote hospitalario, en particular técnicas moleculares, entre estas: ribotipificación, PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado) RAP-PCR (amplificación al azar de ADN polimórfico), MLVA (análisis de la variación de múltiples-locus) y BOX-PCR (secuencias repetidas intercaladas en el genoma). Estas técnicas han sido aplicadas exitosamente en la caracterización de *Cronobacter* spp.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

La técnica de PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado) es considerada el estándar de oro para la tipificación molecular de diversas bacterias incluyendo *Cronobacter* spp. Nazarowec-White y Farber (1999), realizaron el primer estudio de tipificación molecular en *Cronobacter* spp. para determinar si existía una relación entre los aislados que se asociaron a casos clínicos y los aislados obtenidos de fórmulas en polvo (Canadá). La tipificación molecular constó de tres técnicas: ribotipificación, RAPD y PFGE. Los resultados mostraron que ambos métodos: RAPD y PFGE permiten un alto grado de discriminación.

En un estudio realizado por Mullane et al. (2007b), para identificar la persistencia clonal y las rutas de diseminación durante el procesamiento industrial de la PIF, se demostró la prevalencia de algunos aislados en los puntos intermedios y finales del producto, y en algunas muestras tomadas del entorno de la industria. Señalando que las condiciones ambientales sirven como una ruta de contaminación de este producto y sugieren que la principal ruta de diseminación son los aerosoles, hipótesis que fue corroborada un año más tarde (Mullane et al. 2008a).

En un brote ocurrido en Francia en la Unidad de cuidados intensivos de neonatos en el período de marzo a junio de 1994, se obtuvieron 31 aislados de *Cronobacter* spp. Éstos fueron analizados mediante PFGE para establecer la identidad clonal de los aislados, biotipificación y perfiles de resistencia a antibióticos. A pesar de encontrar diversidad genética entre los aislados en estudio, sólo tres pulstipos de una fuente no definida fueron identificados, desafortunadamente por el tiempo transcurrido entre el brote y el análisis de estos aislados no se pudo determinar la fuente de contaminación (Caubilla-Barron et al. 2007a).

Poudry et al. (2007, 2008), proponen la utilización del BOX-PCR para determinar la monoclonalidad o policlonalidad de los aislados de *Cronobacter* spp., estableciendo que al igual que el PFGE, el BOX-PCR tiene un grado de discriminación similar, por lo que se propone la utilización de este método por su bajo costo y la obtención de resultados en menor tiempo, comparado con PFGE.

El análisis de múltiples-locus de variable número de repeticiones en tándem (MLVA), es un método de tipificación que involucra la amplificación y análisis de regiones polimórficas VNTR (elementos de ADN repetidos en tandem). Mullane et al. (2008b), describen por primera vez este método para la genotipificación de una colección de *Enterobacter sakazakii* comparado con el estándar de oro PFGE. El índice



Simpson calculado para ambos métodos fue similar; sin embargo; PFGE logra identificar más subtipos, por lo que concluyen que MLVA tiene menor poder discriminatorio que el PFGE.

Se ha observado que la secuenciación del genoma de los patógenos conduce a una reducción significativa en el tiempo y los costos, además de que proporciona información importante de la bacteria. Kuhnert et al. (2009) describen la similitud del genoma de una colección de *Cronobacter* spp. con base en el análisis de la secuencia de los genes *recN*, *thdF* y *rpoA*. El-Sharoud et al. (2009) utilizaron la secuencia de el gen *recN* para una especiación en una colección de cepas de *Cronobacter* obtenidas de la fórmula infantil en polvo y derivados lácteos. La caracterización de *Cronobacter* spp. mediante estos métodos permitió una mejor identificación de esta bacteria.

Cronobacter spp. es un género recientemente clasificado aunque los métodos moleculares descritos hasta la fecha para esta bacteria, son en general, más rápidos en comparación con los métodos microbiológicos convencionales (basados en la identificación fenotípica), estos requieren de equipos especializados y capacitación de los operadores, lo anterior disuade a algunos sectores para la implementación de estos protocolos. Sin embargo, en el ambiente clínico, los protocolos de diagnóstico rápido son esenciales.

4. Reservorios

El reservorio primario de *Cronobacter* spp. no ha sido definido aún, pero se han aislado del intestino de la mosca de la fruta mexicana (Kuzina et al. 2001), del intestino de la larva de *Stomoxys calcitrans* (Hamilton et al. 2003), siendo un vector importante por tener la capacidad de propagar a *Cronobacter* spp. (Mramba et al. 2007). Un estudio reciente realizado por Schmid et al. (2009), demostró la habilidad de *Cronobacter* spp. para colonizar las raíces de las plantas, produciendo factores benéficos para el crecimiento de las plantas, como la habilidad de convertir fosfatos insolubles a una forma accesible para las plantas, sugiriendo que el hábitat de *Cronobacter* spp. pudieran ser las plantas (Schmid et al. 2009).

Cronobacter spp. han sido aislados de una gran variedad de alimentos incluyendo la leche, carne, agua, vegetales, arroz, pan, té, hierbas, especias, fórmula infantil en polvo (FIP), aguas termales y residuales (Farber,



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

2004; Iversen y Fosythe, 2004; De los Angles-Mosso et al. 1994; Dudley et al. 1980; Edelson -Mammel et al. 2005; Gurtler et al. 2005; Beauchamp et al. 2006; Friedemann 2007; Mullane et al. 2007a).

Dada la relevancia que ha tomado *Cronobacter* spp. en los últimos años, se han realizado diversos estudios enfocados a su aislamiento e identificación, encontrándose *Cronobacter* spp. en hogares, instalaciones ganaderas y en instalaciones de producción de FIP (Kandhai et al. 2004; Kilonzo-Nthenge et al. 2008). Mullane et al. (2008a) realizaron un muestreo en diferentes lugares en las instalaciones de producción de la FIP e identificaron tres diferentes poblaciones clonales.

O'Brien et al. (2009a) analizaron 8 bebidas infantiles, encontrando a *Cronobacter* spp. en dos de las bebidas a base de cereal en concentraciones de 0.003 y 0.013 en número más probable (NMP) por gramo de muestra. De forma interesante, ambos productos contenían extracto de malta y cacao que son adicionados como saborizantes.

Un estudio realizado por Baumgartner et al. (2009) identificó a *Cronobacter* spp. en el 61% de germinados y en el 27% en especias secas. Es posible que las materias primas puedan ser una fuente importante, que conduzca a la entrada de *Cronobacter* spp. en la cadena alimentaria.

5. Características asociadas a su supervivencia en la fórmula infantil en polvo.

Comercialmente la fórmula infantil en polvo no es un producto estéril y *Cronobacter* spp. son capaces de sobrevivir el proceso de desecación hasta por 2.5 años (Edelson- Mammel et al. 2005). Los niveles en los que se encontró a *Cronobacter* spp. en muestras de FIP oscilaron frecuentemente entre 0.36 a 0.66 UFC/100g, demostrando que una vez hidratado el alimento, la bacteria se reproducía con un tiempo de generación de 40 min a 23°C y 4-98 h a 10°C; mientras que a temperaturas de 4°C y 47°C, no se aisló a la bacteria (Nazarowec-White y Farber, 1997), sin embargo; la alta resistencia al estrés osmótico en *Cronobacter* spp., contribuyena a su persistencia en las fabricas de producción de FIP en comapración con otras enterobacterias.

Durante la producción de la FIP, hay células bacterianas que son dañadas, y por lo tanto, más sensibles a las sales biliares y a algunos colorantes usados en un medio de cultivo selectivo; sin embargo, bajo condiciones



favorables de crecimiento, como las utilizadas para reconstituir la fórmula en polvo, las bacterias se pueden recuperar ya que los componentes de la FIP las protegen del estrés osmótico (Gardiner et al. 2000).

Caubilla Barron y Forsythe (2007b), muestrearon dos tipos de fórmulas una en polvo y otra a base de soya, en diferentes períodos, y una vez más encontraron que *Cronobacter* spp. fueron capaces de sobrevivir hasta 2.5 años en estos productos, además demostraron que fue resistente a la desecación en un amplio intervalo de disponibilidad de agua (0.25 a 0.86) y temperatura (4 a 30°C) (Gurtler y Beuchat, 2007).

Otro mecanismo importante de protección a la desecación en *Cronobacter* spp. es a través de la trealosa ya que estabiliza la membrana fosfolipídica y las proteínas. En fase estacionaria la concentración de trealosa se ve incrementada más de cinco veces, comparada con la fase exponencial de la bacteria (Breeuwer et. al. 2003).

Originalmente se pensó que *Cronobacter* además de ser resistente a la desecación, también podía ser termoresistente, ya que algunos aislados mostraban una temperatura máxima de crecimiento entre 41°C y 45°C; sin embargo, su valor de D (el tiempo necesario para que el número de sobrevivientes caiga al 10% del valor inicial) (0.38 a 0.60 min) indica que no es una bacteria termoresistente, lo que concuerda con lo encontrado por Osaili et al. 2009, que demostraron que *Cronobacter* spp. no sobreviven a temperaturas de pasteurización (72°C a 138°C).

6. Importancia clínica.

La epidemiología de *Cronobacter* spp. es poco entendida porque la infección es rara, además de no reportarse rutinariamente en muchos países. La incidencia de esta bacteria parece diferir por grupo demográfico y estado de salud, neonatos pretérmino o menores de 28 días y personas inmunocomprometidas parecen ser los principales grupos vulnerables a infecciones invasivas por esta bacteria. *Cronobacter* spp. ha sido identificado como el agente etiológico de meningitis neonatal, septicemia y enterocolitis necrotizante (**Figura 2**) (Arseni et al. 1987; Biering et al. 1989; Gallagher y Ball 1991; Bar-Oz et al. 2001; Caubilla-Barron et al. 2007a; Mullane et al. 2007a; Giovannini et al. 2008), además se ha aislado de infecciones en tracto urinario y quemaduras, éstas principalmente en adultos y adolescentes, también se encontró asociado con otros microorganismos en casos de neumonía, conjuntivitis, vaginitis y apendicitis (**Figura 2**) (Lai 2001).



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Mientras que *E. cloacae*, especie con la que se le asocio originalmente, es agente etiológico de diversas infecciones como, bacteremia, infecciones en tracto respiratorio bajo, piel y tejidos suaves, infecciones en vias urinarias, endocarditis, infección intra-abdominal, artritis séptica, osteomielitis e infecciones oftálmicas, además de poseer resistencia intrínseca a ampicilina y cefalosporinas (Keller et al. 1998; Musil et al. 2010). Sin embargo, comparado con otras enterobacterias que están involucradas en infecciones extraintestinales no se han encontrado diferencias en la sintomatología clínica que generan, pero si en los factores de virulencia, por lo que el definir que factores de virulencia están involucrados en la patogénesis de *Cronobacter* spp., permitirá establecer marcadores importantes para la detección oportuna de este microorganismo.

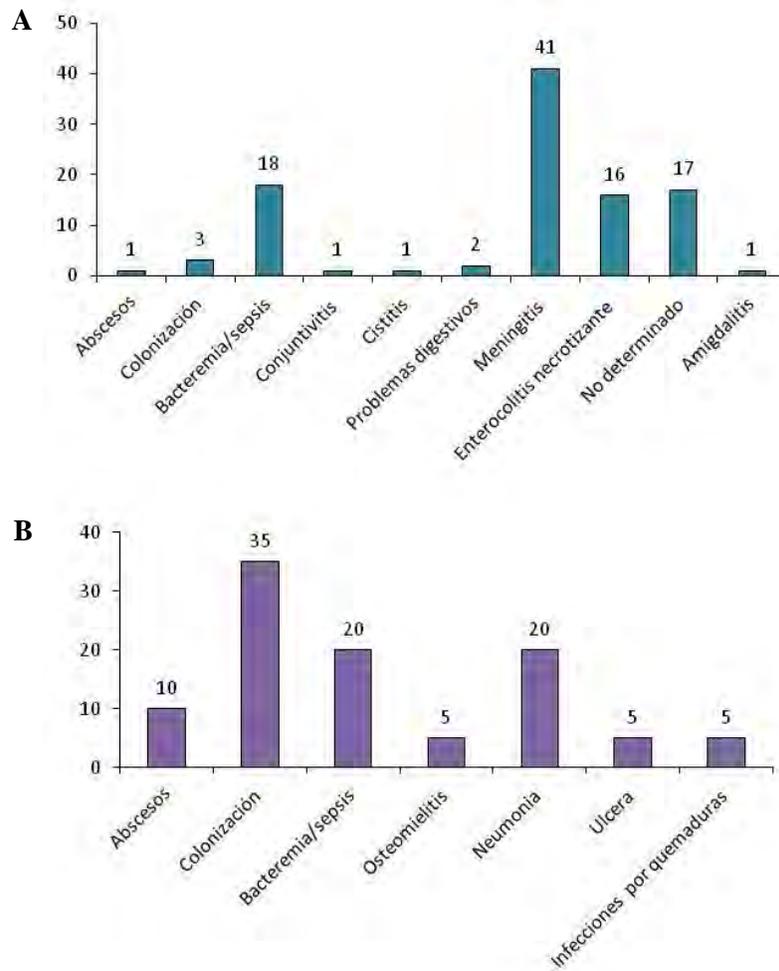


Figura 2. Incidencia de casos como porcentaje del total de infecciones por *Cronobacter* spp. (A) en infantes y (B) en adultos. Tomado de Healy et al. 2010.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

La meningitis es la inflamación de las meninges y la mayoría de los patógenos asociados a esta infección son transmitidos por vía respiratoria. Se trata de una infección localizada, el patógeno coloniza la mucosa (vía respiratoria alta o tracto gastrointestinal), posteriormente invade el espacio intravascular, se multiplica y esto da origen a la bacteremia. En patógenos como *Escherichia coli* se demostró que los determinantes asociados a esta infección son el LPS, proteínas de membrana externa y la cápsula, (Kim 2003). La meningitis generalmente se complica con ventriculitis, abscesos e infartos cerebrales.

El primer caso descrito de infección por *Cronobacter* (entonces *E. sakazaki*) fue en 1958 en un brote de meningitis que ocurrió en Inglaterra, con la muerte de dos recién nacidas, publicado en 1961 por Urmenyi y Franklin. Una de las niñas nació en tiempo y a los 10 días presentó la enfermedad; la segunda fue prematura ambas desarrollaron septicemia y meningitis, el microorganismo no se identificó en muestras ambientales. La mayoría de los casos que se describieron posteriormente se asociaron principalmente a meningitis.

Monroe et al. (1979) fueron los primeros en identificar un caso de bacteremia en ausencia de meningitis en un varón de siete días de nacido. Se sabía que el agente etiológico de estos cuadros clínicos era una bacteria cuya característica principal era la producción de pigmento amarillo, aún se desconocía su forma de transmisión.

Muytjens et al. (1983), describieron por primera vez una vía de transmisión de este microorganismo, encontrando una relación entre ocho casos clínicos de neonatos y la ingestión de la FIP. A partir de esta fecha se considero que la vía de transmisión más importante de este patógeno es la FIP contaminada (Biering et al. 1989; Simmons et al. 1989; Lai 2001; van Acker et al. 2001; Weir 2002). Es por ello que diversos autores han realizado estudios dirigidos a determinar la prevalencia y concentración de *Cronobacter* spp. en la FIP; sin embargo, las concentraciones reportadas son bajas en un intervalo que va de 0.22 a 1.61 UFC/100g de muestra (Muytjens et al. 1988; Clark et al. 1990; Nazarowec-White y Farber, 1997; Iversen et al. 2004b).

Recientemente se identificaron en Nuevo México dos casos de infección en infantes asociados a *Cronobacter* spp. (una niña de siete días y un niño de siete meses) (CDC, 2009). Basados en los datos reportados por el CDC, se estima que aproximadamente seis nuevos casos de infección por *Cronobacter* spp. ocurren cada año en el mundo. Sin embargo, este estimado no toma en cuenta el número de falsos negativos que pueden ocurrir con los aislados de *Cronobacter* spp.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Es importante mencionar que *Cronobacter* spp. también se asocian a enterocolitis necrotizante (ECN), aunque con baja frecuencia. La ECN es una enfermedad del tracto gastrointestinal y se caracteriza por presentar síntomas como apnea, bradicardia, inestabilidad en temperatura, coagulación intravascular, shock séptico, distensión abdominal y neumatosis intestinal. La colonización bacteriana del tracto gastrointestinal es un prerrequisito para el desarrollo de la ECN. A nivel intestinal los niveles de producción de moco, ácido gástrico, las enzimas proteolíticas para la degradación de toxinas, quimiotaxis, fagocitosis y la actividad bactericida del suero exhiben menores niveles en neonatos pretérmino y término, que en infantes (mayores de 4 semanas) (Evans y Rutter 1996).

El primer caso que se describió como ENC asociado a *Cronobacter* spp. fue en 1998 en Bélgica, en 6 neonatos en la unidad de cuidados intensivos. La bacteria fue aislada a partir del aspirado estomacal, raspado anal y hemocultivos, la presencia de ésta se asoció a la alimentación de los neonatos vía oral con la misma FIP. La incidencia del ECN por *Cronobacter* es de 0.3-2.4 por cada 1,000 recién nacidos y de 1-5% en cuidados intensivos de neonatos (vanAcker et al. 2001; Himelrigh et al. 2002). Para su identificación clínica se clasifica el ECN en tres estados: sospechoso, definitivo y grave (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de la enterocolitis necrotizante según Walsh y Kliegman.

Estado	Signos sistémicos	Signos digestivos	Radiología
I Sospecha	Apnea, bradicardia, letargia y alteración de la temperatura	Residuos, distensión, vómito, sangre en heces	Negativa
II Definitivo	Igual que la sospechosa, más acidosis y trombopenia	Ileon hipersensibilidad, peritonitis, distensión, eritema	Dilatación de ileo, neumatosis
III Avanzado	Apnea, hipotensión, bradicardia, acidosis, neutropenia		Ascitis, neumoperitoneo

Fernández y De Las Cuevas Terán 2006.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Si bien *Cronobacter* spp. es considerado como un agente etiológico raro, su importancia clínica radica en la alta tasa de mortalidad a la que se le asocia, la cual varía del 20 hasta el 50%. La mayoría de los niños que sobreviven al cuadro clínico de meningitis desarrollan en el 94% de los casos daños neurológicos irreversibles, resultando en cuadriplejía, obstrucción en movimiento o daño en sistema visual o auditivo. Estas secuelas son atribuidas principalmente a los infartos cerebrales. De los casos reportados hasta la fecha la mayoría se asociaron al sexo femenino en el 54% (21/39) de los casos invasivos, el 69% (29/42) a un origen intrahospitalarios y la mayoría de éstos afectaron a neonatos prematuros 55% (21/38) (Farber y Forsythe 2008).

Aunque el grupo de mayor riesgo son los neonatos prematuros, hay 12 casos descritos en la literatura asociado a adultos, cinco de estos casos presentaron bacteremia, en todos los casos se identificaron en personas mayores de 70 años, dos de éstos se asociaron a casos intrahospitalarios, en uno no se sabe el origen y el otro caso es una retención urinaria que terminó en urosepsis. Los siete casos restantes no se han asociado a bacteremia pero sí a otros tipos de infecciones, dos a neumonía, dos a infecciones de tejido y uno a diabetes asociado a osteomielitis en el pie, estos pacientes tenían en común la presencia de alguna enfermedad degenerativa o tumores malignos. Los dos casos restantes se vincularon a vaginitis e infección de tejido suave (Lai 2001; Reina et al. 1989; Jimenez y Jimenez 1982; Gosney 2008).

En comparación con otras Enterobacterias, *Cronobacter* spp. es más susceptible a algunos antibióticos: aminoglucósidos, amino-, ureido- y carboxi-penicilinas (Muytjens et al. 1989; Stock y Wiedemann 2002). Algunos aislados han adquirido mecanismos de resistencia a estos antibióticos, principalmente por elementos transponibles. Por tal motivo, en infecciones causadas por *Cronobacter* spp. se recomienda un tratamiento con cefalosporinas de tercera generación en combinación con un aminoglucósido o trimetoprim sulfametoxazol (Stock y Wiedemann 2002; Drudy et al. 2006).



7. Medidas de control

Los Miembros de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han expresado su preocupación con respecto al nivel de inocuidad de los alimentos tanto a nivel nacional como internacional. La creciente incidencia de enfermedades transmitidas por los alimentos durante los últimos decenios, parece estar relacionada en algunos países con un aumento de las enfermedades causadas por microorganismos presentes en estos productos.

Esta preocupación se ha expresado públicamente en reuniones de los órganos rectores de ambas organizaciones y en la Comisión del Códex Alimentarius. *Cronobacter* spp. es una bacteria que ha tomado relevancia en los últimos 10 años por la población a la que afecta; sin embargo, las medidas preventivas en la manipulación y producción de la fórmula en polvo pueden evitar que este microorganismo siga causando infecciones. Al menos cuatro puntos deben de ser cubiertos al momento de preparar la fórmula infantil en polvo:

1. El personal encargado de reconstituir la fórmula infantil en polvo debe de hacerlo en condiciones asépticas, en un área designada especialmente para este proceso.
2. La FIP debe ser mezclada con agua estéril y pesada no medida.
3. La FIP se debe almacenar a 4°C inmediatamente después de la preparación, si no se usa en las próximas 24 h se debe desechar.
4. La administración de esta fórmula vía enteral en neonatos en unidades de cuidados intensivos no debe de exceder de 4 h después de su preparación, así mismo, los tubos y jeringas utilizados deben ser reemplazados cada 4 h.



II. ANTECEDENTES



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Cronobacter spp. son patógenos oportunistas emergentes, por lo que sólo causan la enfermedad cuando el hospedante se encuentra inmunocomprometido, generalmente se les asocia a infecciones intrahospitalarias. Los mecanismos de patogenicidad con los que cuenta esta bacteria no han sido del todo caracterizados. Pagotto et al. (2003), fueron los primeros en analizar la capacidad para producir enterotoxinas en 18 aislados (ocho ambientales, nueve clínicos y uno tipo), para ello emplearon un ensayo biológico, inoculando vía oral e intraperitoneal a ratones lechones con diferentes UFC de la bacteria. La inoculación intraperitoneal fue letal para todos los ratones a una dosis de 10^8 UFC/ratón y sólo en un aislado clínico y uno ambiental se asociaron a muerte por inoculación vía oral. Aunque demostraron la presencia de enterotoxinas termoestables no se encontró una asociación con la vía de inoculación y el origen de los aislados analizados, ni tampoco lograron aislar esta proteína para caracterizarla bioquímica y biológicamente. También evaluaron el efecto que tienen los filtrados obtenidos a partir del sobrenadante de los cultivos bacterianos de 18 h en tres líneas celulares (Y-1, Vero y CHO). Los resultados mostraron que sólo cuatro de los filtrados (tres clínicos y un ambiental) fueron tóxicos para las tres líneas celulares.

Un factor de virulencia esencial para la mayoría de los patógenos es la adherencia específica a un cultivo celular, Mange et al. (2006), evaluaron esta capacidad de adherencia en 50 aislados de *Cronobacter* spp., observando dos patrones de adherencia: difuso y en agregados, en el 58% de los aislados, dichos patrones no están relacionados con una fimbria específica, ya que no observaron ninguna estructura al analizar los aislados por microscopía electrónica. De acuerdo con los resultados obtenidos concluyen que el proceso de adherencia en *Cronobacter* spp. está mediado principalmente por adhesinas de tipo afimbrial.

Townsend et al. (2007a), investigaron la capacidad de *Cronobacter* spp. de invadir una línea de células endoteliales de cerebro y caracterizaron histológicamente el efecto de la respuesta inmunológica en el cerebro al inocular a la bacteria vía intracraneal. Los aislados fueron capaces de invadir las células endoteliales del cerebro, y de sobrevivir en macrófagos hasta por 96 h, esto se atribuyó a la presencia del gen *sodA* (superóxido dismutasa), el cual podría estar relacionado con la protección de la bacteria al estrés oxidante. En los cerebros de las ratas a los seis y nueve días posteriores a la inoculación, se observaron patrones de inflamación crónica y sepsis.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Otro factor involucrado en la patogénesis de la bacteria, fue descrito por Townsend et al. (2007b); al demostrar que con niveles altos de endotoxina en la fórmula infantil en polvo, se puede alterar la integridad intestinal del neonato, facilitando la translocación de la bacteria y de esta manera contribuir a la infección local y sistémica. Sin embargo es importante recordar que *Cronobacter* spp. no se encuentra en altas concentraciones en la FIP, pero si las condiciones de la FIP, no son las adecuadas esta puede aumentar su concentración y de esta manera alcanzar los niveles de endotoxina, necesarios para alterar la integridad intestinal del neonato o bien en patógenos como *E. coli* se ha demostrado que el LPS de la bacteria favorece el desarrollo de bacteremia (Kim 2003).

El análisis de cuatro pulsotipos de *Cronobacter* spp. asociados a casos clínicos de enterocolitis necrotizante, meningitis y septicemia, mostró que eran capaces de invadir células endoteliales de cerebro; y que a diferencia de su estudio realizado un año atrás (Townsend et al. 2007a), estos aislados clínicos sólo persisten por 48 h en macrófagos, lo cual hace referencia a la diversidad en el comportamiento de virulencia de los aislados de *Cronobacter*, (Townsend et al. 2008).

El mecanismo asociado a la patogénesis de *Cronobacter* spp. particularmente en relación con la meningitis neonatal, no ha sido del todo definido. Originalmente se especuló que una de las posibles rutas de infección es la translocación de la bacteria en sangre, al líquido cefalorraquídeo, vía plexo coroideo, seguido de la invasión de la bacteria dentro de la materia cerebral rica en nutrientes (Iversen y Forsythe, 2004).

Singamsetty et al. (2008), demostraron que *C. muytjensii* (ES 51329) fue capaz de invadir HBMEC (células endoteliales microvasculares de cerebro humano), aunque su replicación en estas células no fue muy eficiente. También evidenciaron por primera vez que se requiere de la expresión de una proteína de membrana externa A (OmpA⁺) para observar el fenotipo invasivo y que además el fenómeno de invasión fue dependiente de la reorganización de microtúbulos. Para comprobar dicho efecto construyeron mutantes deletéreas en el gen *ompA* (OmpA⁻) y encontraron que estas clonas disminuían su capacidad invasiva hasta siete veces.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

La expresión de OmpA es necesaria para la colonización del tracto gastrointestinal y la sobrevivencia en vía periférica para causar meningitis en ratas neonatas. La mortalidad en ratas neonatas fue mayor en aquellas infectadas con OmpA⁺ que con OmpA⁻, indicando que OmpA⁺ parece tener una ventaja selectiva *in vivo* sobre la clona de *C. muytjensii* (ES 51329) OmpA⁻. El análisis histopatológico del cerebro mostró que la clona OmpA⁺ causa severas manifestaciones patológicas en el cerebro de las ratas neonatas, destacando hemorragia, daño cortical, gliosis e inflamación, mientras que en presencia de la clona OmpA⁻ no se observan estos daños. La clona de *C. muytjensii* (ES 51329) OmpA⁺ favorece el reclutamiento de neutrófilos en el cerebro e intestino, lo que ocasiona una inflamación severa generando pleocitosis del líquido cefalorraquídeo, característico en la patogénesis de meningitis. Este reclutamiento correlaciona con el incremento de los niveles de MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófagos-2), que es una citocina homóloga a IL-8 en humanos y que se ha relacionado con migración transepitelial de neutrófilos (Mittal et al. 2009)

Mohan Nair et al. (2009) demostraron que la proteína de la membrana externa A es uno de los factores determinantes que contribuyen a la invasión de *C. sakazakii* en células humanas BMEC (células endoteliales microvasculares de cerebro) *in vitro* y puede tener un papel determinante en la patogenia de la meningitis neonatal causada por esta bacteria. Actualmente, se sabe que en *C. sakazakii* las proteínas OmpX (proteína de membrana externa X) y OmpA son críticas para la invasión celular y diseminación a órganos como el hígado y el bazo.

Recientemente, Li et al. (2010), evidenciaron que la infección por *C. sakazakii* (ATCC 29544), induce el rearreglo de filamentos de actina en HBMEC, debido a que activa la señalización de PI3K/Akt (Fosfatidilinositol-3-kinase), esta activación es indispensable para que *C. sakazakii* entre e invada.

Hunter et al. (2008a, 2008b), estudiaron en un modelo biológico de ratas cría y en células epiteliales, la capacidad de *Cronobacter* spp. para ocasionar daños histológicos en los intestinos de las ratas idénticos a los descritos en la ECN. Al inocular en la fórmula en polvo *Cronobacter* spp., la cual se administró vía oral en las ratas crías, se encontró que a una concentración de 10⁷ UFC/ml, se registró una mortalidad del 95% al cuarto día, mientras que a 10⁵ UFC/ml se generaron síntomas semejantes a los descritos para la ECN grado III.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

La bacteria fue capaz de adherirse a las células epiteliales IEC-6, además de inducir apoptosis en enterocitos, los cuales son factores determinantes en la patogénesis de la enterocolitis necrotizante (Hunter et al. 2008a, 2008b).

El mecanismo por el cual *Cronobacter* spp. induce apoptosis en las células endoteliales fue descrito por Hunter et al. (2009), al estudiar el efecto de óxido nítrico (NO) en dichas células. NO es un mediador de enterocolitis necrotizante y marcador de inflamación intestinal. En este estudio se demostró que *Cronobacter* spp. fue capaz de estimular la producción de NO en células IEC-6 y su sobre-expresión promovió el daño intestinal y la falla de la barrera intestinal, probablemente por la apoptosis de los enterocitos. La supresión de la producción de NO en *Cronobacter* spp. usando RNA de interferencia para NOS inducible (iNOS) inhibió la inducción de apoptosis.

Es importante mencionar que el proceso de adherencia de *Cronobacter* spp. a superficies bióticas y abióticas contribuye a la formación de biopelículas, favoreciendo de esta manera la supervivencia y el aumento de la resistencia a los tratamientos antimicrobianos. Los nutrientes disponibles y la temperatura son factores importantes que afectan la formación de biopelículas en *Cronobacter* spp. (Zogaj et al. 2003; Kim et al. 2006; 2007b, 2008; Grimm et al. 2008). Iversen et al. (2004) investigaron la formación de biopelículas en diferentes superficies que son comúnmente usadas en la preparación de la FIP y encontraron aislados adheridos a la silicona, látex, policarbonato y acero inoxidable, aparentemente esta adherencia fue más fuerte en aquellas bacterias que producían cápsulas de exopolisacárido. Por otro lado, se demostró la influencia de los componentes de la leche descremada en la formación de biopelículas por *Cronobacter* spp. y se propuso que la caseína y otras proteínas del suero son más importantes que la lactosa, además se encontró que los compuestos del nitrógeno son un factor determinante en la formación de biopelículas por *Cronobacter* spp. comparado con los hidratos de carbono (Dancer et al. 2009).



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Considerando los diferentes componentes relacionados con la virulencia de la bacteria, se elaboró un modelo (**Figura 3**), para proponer los eventos que contribuyen a la patogénesis de *Cronobacter* spp. Una vez que el recién nacido ingiere la bacteria a través de la FIP (que puede ser por sonda nazo-gástrica), ésta llega a tracto digestivo bajo, se adhiere a las células epiteliales e induce apoptosis en los enterocitos, lo que produce un incremento en los niveles de NO y favorece la expresión de citocinas como IL-6, IL-8 e IL-10. El proceso inflamatorio desencadenado, contribuye al desequilibrio de la barrera intestinal, esto aunado a la alteración por la inmadurez intestinal de neonatos pretérmino y término.

De manera consecuente la bacteria con ayuda del LPS, cápsula o quizá por la producción de toxinas se transloca al endotelio vascular, en torrente sanguíneo la bacteria puede sobrevivir por su capacidad de resistencia al suero, posteriormente es fagocitada y por efecto de *sodA* persiste en macrófagos los cuales pueden transportar a la bacteria por torrente sanguíneo hasta la barrera hematoencefálica en donde podrá atravesarla por la presencia de OmpA y Omp X (vía rearrreglos de microtúbulos) con ayuda del sistema de secreción tipo III. Por su parte el falgelo junto con otras proteínas como el Cpa, y algunos otros factores que no han sido descritos, estarían jugando un papel importante en el desencadenamiento de procesos inflamatorios que contribuirían a la invasión del cerebro y al daño neuronal. Sin embargo, es importante señalar que el hospedante participa de manera importante en la regulación de esta patogénesis, ya que los mecanismos de virulencia de la bacteria se ven favorecidos por el sistema inmunológico deficiente del paciente.

A pesar de que el número de casos de infección por *Cronobacter* spp. es bajo, es importante considerar los cuadros clínicos a los que esta bacteria se asocia y que en el caso de la meningitis, aunque el tratamiento resulta exitoso, las secuelas que deja en los neonatos son devastadoras. La prevención es definida por la ONU como la adopción de medidas encaminadas a impedir que se produzcan deficiencias físicas, mentales y sensoriales (prevención primaria) o a impedir que las deficiencias, cuando se han producido, tengan consecuencias físicas, psicológicas y sociales negativas. El realizar estudios encaminados al conocimiento de nuevas bacterias que pueden ser potencialmente patógenas y que son consideradas emergentes, permite establecer programas de acción específicos e inmediatos en caso de que se presente un problema de salud asociado a estas bacterias, de aquí la importancia del trabajo que a continuación se describe.

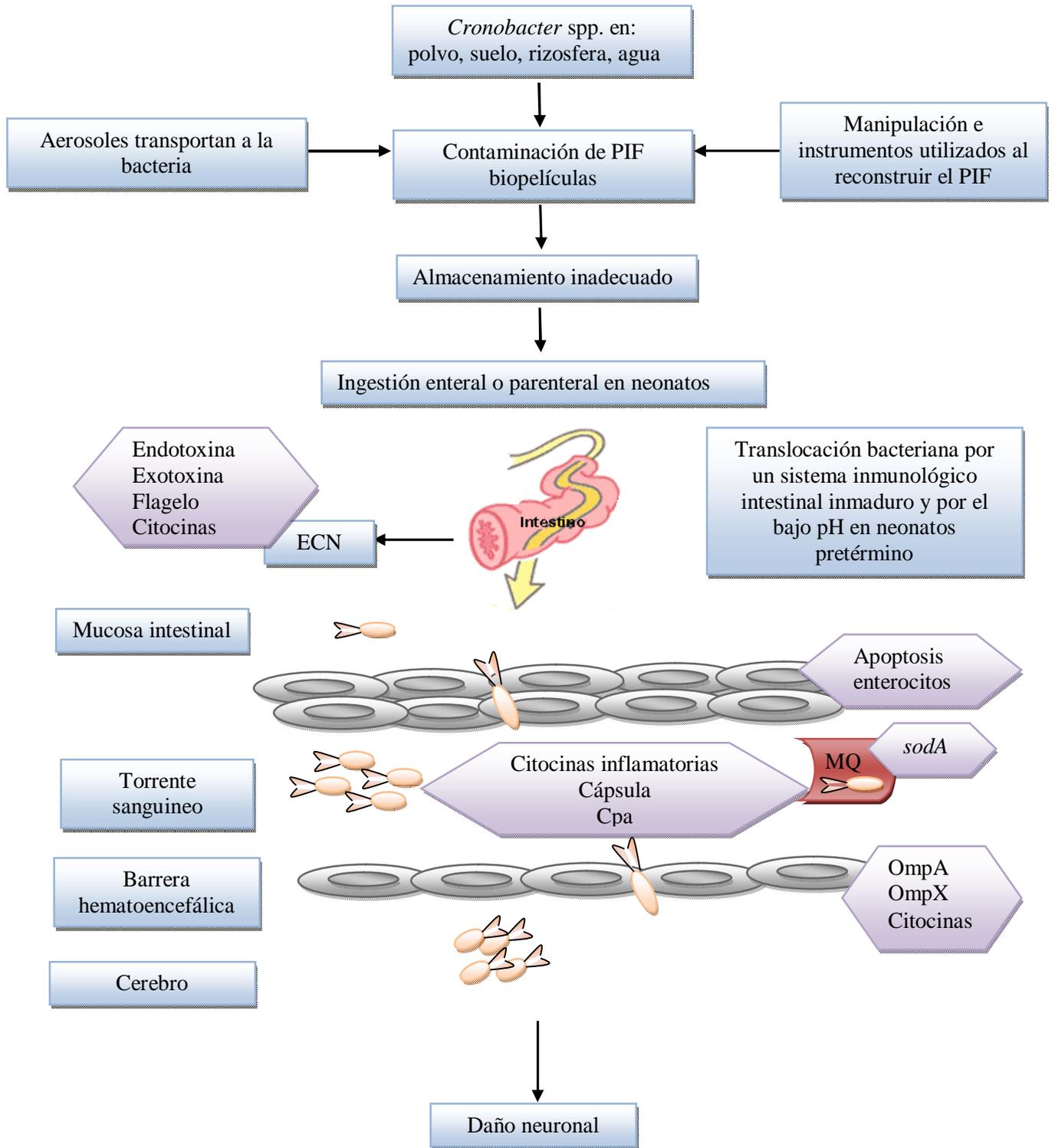


Figura 3. Proceso infeccioso de *Cronobacter* spp. en neonatos, tras la ingestión de fórmula en polvo contaminada.



III. JUSTIFICACIÓN



Cronobacter spp. es un patógeno oportunista emergente que se ha asociado a casos esporádicos de meningitis, septicemia y enterocolitis necrotizante, principalmente en neonatos y en menor proporción en adultos mayores inmunocomprometidos. El mecanismo de patogenicidad de la bacteria con el que causa los daños mencionados en los diferentes cuadros clínicos, no está del todo claro. Además, de acuerdo con los datos reportados por el CDC, se estima que aproximadamente seis nuevos casos de infección por *Cronobacter* spp. ocurren cada año en el mundo. Sin embargo, en este reporte no se considera el número de falsos negativos que pueden ocurrir entre los aislados de *Cronobacter* spp. En México, hasta la fecha, no se tiene información en referencia a su importancia clínica y epidemiológica; se han aislado de muestras de alimentos, de diferentes ambientes y de dos casos clínicos. Por lo tanto, la caracterización fenotípica y genotípica con base en sus atributos de virulencia, permitirá establecer si dichas características están asociadas a una especie en particular, a la fuente de aislamiento o al origen de la bacteria. Lo anterior es importante para redireccionar la identificación de este microorganismo en alimentos u otros vehículos que puedan servirle como vía de transmisión.



IV. HIPÓTESIS



En México, no hay estudios relacionados con la caracterización de *Cronobacter* spp.; sin embargo, se han aislado de diversos ambientes y de dos casos clínicos. El presente estudio es pionero, en cuanto a la caracterización de factores putativos de virulencia, los cuales hasta la fecha no han sido del todo identificados. La relación fenotípica y genotípica que guarda esta bacteria con otras enterobacterias, permitirá dirigir la búsqueda de factores de virulencia descritos en otros patógenos, que pudieran estar involucrados en la patogénesis de esta bacteria y de esta manera se podrán implementar medidas preventivas adecuadas para su identificación y tratamiento oportunos. Debido a lo anterior se plantea la siguiente hipótesis:

Cronobacter spp. se han asociado a cuadros clínicos graves, por lo que es muy probable que los aislados de diferentes ambientes y que las distintas especies que conforman este género, presenten fenotipos y/o genes potenciales de virulencia que podrían contribuir en la patogénesis de la bacteria.



V. OBJETIVO GENERAL



Identificar y comparar características fenotípicas y genotípicas asociadas a virulencia en las diferentes especies de *Cronobacter*, a partir de una colección de aislados de diferentes ambientes y orígenes geográficos.



VI. OBJETIVOS PARTICULARES



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

1. Caracterizar fenotípicamente la colección de los aislados de *Cronobacter* spp. de diferentes ambientes (alimentos, polvo, agua y cuadros clínicos):
 - a. Pruebas bioquímica (biotipos).
 - b. Sensibilidad a antibióticos por el método de Kirby Bauer.
2. Identificar las diferentes especies de *Cronobacter* spp. mediante métodos moleculares:
 - a. Gen de la proteína de membrana externa (*ompA*) mediante PCR.
 - b. Secuenciación del gen 16S ARN ribosomal.
3. Establecer la identidad clonal de los aislados de *Cronobacter* spp. mediante electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE)
4. Identificar características de virulencia *in vitro* en las diferentes especies de *Cronobacter*:
 - a. Capacidad de adherencia en células HEp-2 (células de carcinoma humano laríngeo).
 - b. Capacidad de invasión en células HEp-2 (células de carcinoma humano laríngeo)
 - c. Producción de toxinas en células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde Africano).
5. Evaluar la capacidad de formar biopelículas en las especies de *Cronobacter*.
6. Identificar y detectar en los aislados de *Cronobacter* spp. genes potenciales de virulencia a través de:
 - a. Realizar la búsqueda de factores de virulencia descritos en otros microorganismos patógenos, en el genoma de *Cronobacter sakazakii* BAA-894, mediante un análisis bioinformático.
 - b. Diseñar iniciadores para detectar el gen o genes en los aislados en estudio mediante PCR.



VII.- MATERIAL Y MÉTODOS



1. Población microbiana.

Se trabajo con una colección de 43 aislados, 15 de origen mexicano e identificados como *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) y 28 aislados de diferentes países; los cuales fueron proporcionados por la Dra. Iversen (Nestlé Research Center, Lausanne, Suiza) que corresponden a las siguientes especies previamente identificadas y clasificadas: 15 aislados de *Cronobacter sakazakii* [601 (ATCC 29544), 602 (ATCC 12868), 75 (ATCC 29004), 823 (ATCC BAA894), 604, 736, 796, 824, 826, 827, 828, 830, 899, 900, 901]; seis de *Cronobacter dublinensis* [464, 515, 791, 798, 799, CFS2237]; tres de *Cronobacter malonaticus*: [825, 829, 902]; dos de *Cronobacter muytjensii* [603 (ATCC 51329), 793]; uno de *Cronobacter turicensis* [23827] y uno de *Cronobacter* genomospecies 1: [797], provenientes de diferentes fuentes de aislamiento (ambientales, humanos, alimentos y algunos de origen desconocido) (**Tabla 2**).



Tabla 2. Descripción de las fuentes de aislamientos y origen geográfico de los aislados de *Cronobacter* spp. identificados y analizados en este estudio.

Número de aislado	Fuente de aislamiento	Origen	Número de aislado	Fuente de aislamiento	Origen
169 ^a	Polvo extramuros	México	736 ^c	Leche en polvo	UK
242 ^a	Polvo extramuros	México	750 ^e	Desconocido	Desconocido
245 ^a	Polvo extramuros	México	791 ^e	Hemocultivo	USA
249 ^a	Polvo extramuros	México	793 ^c	LCR	USA
293 ^a	Polvo extramuros	México	796 ^c	Pus abdominal	UK
315 ^a	Polvo extramuros	México	797 ^e	Agua	UK
784 ^b	Germinados de alfalfa	México	798 ^e	Desconocido	UK
131 ^b	Germinados de alfalfa	México	799 ^e	Productos lácteos	UK
731 ^b	Germinados de alfalfa	México	823 ^e	Clínica	USA
958 ^b	Germinados de alfalfa	México	824 ^e	LCR	USA
970 ^b	Germinados de alfalfa	México	825 ^e	Absceso cerebral	USA
13 ^a	Agua de Xochimilco	México	826 ^c	Desconocido	USA
79 ^c	Leche de soya	México	827 ^e	Espujo	USA
757 ^d	Orina	México	828 ^e	Espujo	USA
767 ^d	Orina	México	829 ^c	Hemocultivo	USA
464 ^e	Fórmula láctea	Zimbabwe	830 ^c	Desconocido	USA
515 ^c	Agua	Suiza	899 ^c	Clínica	USA
601 ^c	Garganta	Desconocido	900 ^e	Clínica	USA
602 ^c	Desconocido	Desconocido	901 ^e	Clínica	USA
603 ^c	Desconocido	Francia	902 ^e	Hemocultivo	USA
604 ^c	Clínica	Canadá	CFS2237 ^e	Formula láctea	Irlanda
			23827 ^e	Meningitis	Suiza

^aUniversidad Nacional Autónoma de México, Microbiología Ambiental (aislados de polvo intramuros y agua de riego del lago de Xochimilco); ^bInstituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (aislados de germinados de alfalfa); ^cUniversidad de Puebla (aislado de leche de soya); ^dInstituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (aislados de orina); ^eCenter of Agriculture, Food Safety School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine; Veterinary, Sciences Centre University College, Dublin Belfield (el resto de los aislados); UK: Reino Unido; USA: Estados Unidos de Norte América. LCR: Líquido cefalorraquídeo.



2. Caracterización fenotípica de *Cronobacter* spp. en los aislados mexicanos.

2.1 Biotipos.

Todos los aislados fueron sembrados en agar Druggan–Forsythe–Iversen (DFI) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) para observar la producción de colonias azules-verdes y en agar soya tripticaseína (TSA) (Bioxon, México, D.F.) para la producción de pigmento amarillo. En la población microbiana de estudio, tanto los aislados mexicanos como las especies de las cepas proporcionadas por la Dra. Iversen, se identificaron y ratificaron de acuerdo a las pruebas bioquímicas convencionales descritas previamente por Iversen et al. (2008).

La característica de movilidad fue determinada a 37°C, con el medio de movilidad (triptona 10 g /l, NaCl 5 g /l, agar 5 g/l, pH 7.2 ± 0.2). La producción de ácido a partir de diferentes hidratos de carbono (D-myo-inositol, dulcitol y metil- α -D-glucopiranosido) fue evaluada con la base púrpura de bromocresol (10 g/l peptona, 1 g /l extracto de levadura, 5 g /l NaCl, 0.018 g/l púrpura de bromocresol) con la adición de la solución de carbohidratos filtrados en una membrana de 0.22 (concentración final de 0.5%). La producción de gas a partir de glucosa y metil- α -D-glucopyranosido fue determinada con tubos de Durham. La utilización de citrato como única fuente de carbono se observó en agar citrato de Simmons (85463, Fluka) y la utilización de malonato en caldo de malonato sodico (M8802, Sigma, CA). La prueba de rojo de metilo se realizó por la adición del indicador (0.1 g rojo de metilo en 300 ml 95% etanol) sobre cultivos de 48 h en 5 ml de caldo rojo de metilo Voges-Proskauer (MR-VP; 39484, Fluka). La prueba de Voges-Proskauer se determinó con la adición de los reactivos VP1 y VP2 (bioMérieux) a cultivos crecidos por 24 h en caldo MR-VP. La producción de indol se observó por la adición del reactivo de Erlich (70542 bioMérieux) en cultivos crecidos por 24 h en agua peptonada (CM0009 Oxoid Ltd). La producción de nitratos se midió al adicionar los reactivos NIT1 y NIT2 (bioMérieux) a cultivos crecidos en caldo nitratos (72548 Fluka).

2.2 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

A todos los aislados de *Cronobacter* spp. se les realizó la susceptibilidad a antibióticos por la prueba de difusión de disco en placa, siguiendo los lineamientos de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2007).



Se evaluaron un total de 12 antibióticos: ampicilina (10 µg), amoxicilina/clavulanato (20/10 µg), cefazolina (30 µg), ceftazidima (30 µg), gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), tetraciclina (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), compuestos de sulfonamidas (300 µg) y trimetoprim (5 µg) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). En los ensayos de susceptibilidad se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como controles.

3. Identificación mediante métodos moleculares.

3.1 Gen *ompA* (Proteína A de membrana externa).

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ADN bacteriano total, utilizando los siguientes iniciadores: *ompA*-F: (5' GGATTTAACCGTGAACCTTTTCC 3') y *ompA*-R: (5' CGCCAGCGATGTTAGAAGA 3'), descritos por Manoj et al. (2006), en un volumen final de 25 µL: en solución amortiguadora 1x (Tris-HCl, pH 8.3), 2.5 mM de MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 µM de cada iniciador, 50 ng del DNA y 1 Unidad de Taq DNA polimerasa (INVITROGEN). La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos y 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Un producto de 469 pb indicó la presencia del gen *ompA* (Manoj et al. 2006).

3.2 Secuenciación del gen ARNr 16S.

Para corroborar la identificación fenotípica en los aislados mexicanos, se extrajo el ADN de todos los aislados crecidos durante toda la noche con el equipo comercial DNeasy[®]Blood y Tissue (QUIAGEN, Hilden, GE). Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo los iniciadores: P0-F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y P6-R (5'GTACGGCTACCTTGTTACGA 3') (Iversen et al. 2007), bajo las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 5 min, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, un ciclo final a 72°C por 10 min, para obtener un fragmento de



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

aproximadamente 1,500 bp, que correspondía al ARNr 16S. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp, PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster, CA).

Los productos amplificados se purificaron con QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN), posteriormente fueron clonados en el sistema pGEM easy vector (Promega, Madison, WI), se transformaron en *Escherichia coli* Top10 y el cultivo bacteriano se inoculó en medio LB (Luria Bertani) con ampicilina (100 µg/ml) e IPTG (Isopropil β-galactopiránosido), (Sigma, GE). Se seleccionaron las colonias transformadas (blancas) y se purificaron con QIAprepSpin Miniprep kit (QIAGEN), finalmente se confirmó la presencia del fragmento clonado con una reacción de digestión con enzima *Eco* RI (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Los fragmentos fueron secuenciados en MACROGEN (Rockville, MD, USA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en el GenBank usando el programa BLAST de National Center for Biotechnology Information (NCBI), para identificar la especie a la que pertenecía cada aislado.

4. Identidad clonal en los aislados del género *Cronobacter* spp. por PFGE.

Todos los aislados de *Cronobacter* spp. fueron tipificados por PFGE. Brevemente: se inoculó una colonia de cada uno de los aislados de *Cronobacter* spp. en 5 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). A partir de un cultivo de toda la noche (0.6-0.8 a 610 nm) se cosechó 1.5 ml de la suspensión bacteriana y se centrifugó a temperatura ambiente (16,000 xg/ 5min). El paquete celular se lavó con 400 µl de solución amortiguadora PIV (Tris-HCl 1 mol/l, NaCl 1 mol/l, pH 7.6). Posteriormente, se resuspendió el paquete celular en 150 µl de solución amortiguadora PIV y se adicionaron 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (BioRad, Hercules, California, USA). Después alícuotas de 100 µl de la suspensión se colocaron en los moldes para formar los bloques. Estos bloques se trataron con 500 µl de solución de lisis pH 7.6 (Tris 1 mol/l, NaCl 1 mol/l, EDTA 1 mmol/l, desoxicolato de sodio 0.2%, lauril sarcocinato de sodio 0.5% y 50 µg de ribonucleasa A), y se incubaron toda la noche a 50°C en baño seco. Posteriormente, los bloques se trataron con 500 µl de solución ESP (EDTA 0.4 mol/l, lauril sarcocinato de sodio 0.1% y 0.5 mg/ml de pepsina K, pH 9-9.5), se incubaron a 50°C toda la noche. Al día siguiente los bloques se lavaron 6 veces con 400 µl de TE 1×/PMFS (Tris 5 mmol/l, EDTA 5 mmol/l, pH 7.5, phenil-methylsulphonylfluorhidre 1 mmol/l). Finalmente, los bloques se lavaron tres veces con TE 0.1×, después se



equilibraron con 300 μ l de solución amortiguadora 1 \times a temperatura ambiente y se digirió con 50 U de la enzima *Xba*I (Invitrogen, Carlsbad, CA), por toda la noche a 37°C.

Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis (CHEF IIDR, BioRad Laboratories, Hercules, California, USA) en un gel de agarosa al 1% (w/v) (BioRad, Hercules, California, USA) en TBE 0.5 \times a 14°C por 19 h, a 6.0 v/cm con pulsos de 5.5 s a 54.2 s. Posteriormente, se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/ml). Se utilizó como marcador de peso ADN de lambda para PFGE (New England Biolabs, Hertfordshire, Inglaterra, UK). El dendograma fue creado con un software GelCompare II, coeficiente DICE y UPGMA (unweighed pair group method with arithmetic means) y tolerancia del 5% (Nazarowec-White y Farber, 1999; Mullane et al. 2007b).

5. Caracterización *in vitro* de las propiedades asociadas a virulencia en las especies de *Cronobacter*.

5.1 Ensayo cualitativo y cuantitativo de adherencia en células HEP-2 (células de carcinoma humano laríngeo).

La línea celular HEP-2 fue cultivada en medio MEM (Medio mínimo esencial en base de sales de Earle's) suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% (SFB) (Gibco, USA), en botellas de T75cm² (Sarstedt, Numbrecht, GE) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, a una concentración de 2.5 \times 10⁶ células/ml. Para el ensayo de infección se utilizó tripsina al 0.25% (in vitro, Mexico, D.F.) y se crecieron las células en placas de 24 pozos para cultivo celular (Sarstedt). Las células se lavaron con un amortiguador salino de fosfatos (PBS). Posterior al lavado 900 μ l de MEM sin SFB y 100 μ l de un cultivo bacteriano en fase media logarítmica (10⁸ células/ml) crecido en triptona al 1% fueron adicionados en cada pozo. La placa se incubó a 37°C por 3 h en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Para el ensayo cualitativo, se colocaron cubreobjetos redondos (NUNC, Roschester, NY, USA), en la base de cada pozo, se infectaron las células como se describió anteriormente y terminado el período de incubación se retiró el medio, se lavó con PBS 1x estéril y se fijo con metanol al 70% (Sigma, GE) por 1 min, finalmente las células se tiñeron con Giemsa al 10% (Sigma, GE) y los pozos se lavaron con agua para eliminar



el exceso de colorante. Los cubreobjetos se montaron con resina en portaobjetos de vidrio y se observaron con aceite de inmersión en un microscopio de luz visible.

Para la prueba cuantitativa el ensayo de infección fue semejante al descrito en la prueba cualitativa, a diferencia de que las células fueron adheridas directamente en cada pozo de la placa. Posterior al lavado con PBS se adicionó 1 ml de Triton X-100 0.1% (v/v) en PBS 1x por 10 min (Amresco, OH, USA), finalmente se realizaron diluciones seriadas en placas con agar TSA para obtener el número de unidades formadoras de colonias (UFC) (Xicohtencatl-Cortes et al. 2007). Los controles utilizados para ambos ensayos fueron: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) O127:H6 (E-2348), *Escherichia coli* enteroagregativa O42 (EAEC), *Escherichia coli* adherente difusa 82525 (DAEC) (Cravioto et al. 1979).

5.2 Ensayo cualitativo y cuantitativo de invasión en células HEp-2 (células de carcinoma humano laríngeo).

La línea celular HEp-2 fue cultivada en medio MEM suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% (SFB) (Gibco, USA), en botellas de T75cm² (Sarstedt, Numbrecht, GE) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, a una concentración de 2.5x10⁶ cel/ml. Para el ensayo de infección se utilizó tripsina al 0.25% (in vitro, Mexico, D.F.) y se crecieron las células en placas de 24 pozos para cultivo celular (Sarstedt).

La incubación se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ por 24 h. Previo al ensayo de invasividad, las células se lavaron con un amortiguador de fosfatos (PBS). Posterior al lavado, 900 µl de MEM sin suero y alícuotas de 100 µl de un cultivo bacteriano en fase media logarítmica (10⁸ células/ml) crecido en triptona al 1% fueron adicionados. La placa se incubó a 37°C por 3 h en una atmósfera de CO₂ al 5%. Después del período de incubación se lavó nuevamente con PBS estéril, se colocó 1 ml de medio MEM adicionado con: lisozima 300 µg/ml (inVitro, Mexico, D.F) y gentamicina 100 µg/ml (inVitro, Mexico, D.F) y se incubó a 37°C por 3 h más en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Para la prueba cualitativa se utilizaron cubreobjetos redondos (NUNC, Roschester, NY, USA), colocados en la base de cada pozo, después de la incubación se retiró el medio y se lavó con PBS estéril, se fijó con metanol al 70% (Sigma, GE) por 1 min, finalmente las células se tiñeron con Giemsa al 10%, al término de la tinción se lavó el exceso de colorante con agua (Sigma, GE). Los cubreobjetos fueron montados con resina en



portaobjetos de vidrio y se observaron con aceite de inmersión en un microscopio de luz visible. Una prueba positiva se consideró cuando al menos el 1% de las células presentaba cinco bacterias en el citoplasma (Rosario et al. 2005).

El análisis cuantitativo se realizó bajo el mismo procedimiento de infección que en la prueba cualitativa. Sin embargo, en este estudio los cubreobjetos redondos no se colocaron en la base de cada pozo de la placa, posterior a la adición de lisozima (300 $\mu\text{g/ml}$) y gentamicina (100 $\mu\text{g/ml}$), se procedieron a lavar los pozos con PBS 1x y se adicionó 1 ml de 0.1% (v/v) Triton X-100 en PBS por 10 min (Amresco, OH, USA), finalmente se realizaron diluciones seriadas en placas con agar TSA para obtener el número de unidades formadoras de colonias (UFC) (Xicohtencatl-Cortes et al. 2009). Las cepas de *E. coli* 1192 y *E. coli* K-12 HB101 fueron utilizados como controles positivos y negativos, respectivamente, en ambos ensayos.

5.3 Ensayo para la producción de toxinas en células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde Africano).

La línea celular Vero fue cultivada en medio MEM suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% (SFB) (Gibco, USA), en botellas de T75cm² (Sarstedt, Numbrecht, GE) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, con una confluencia de 2.5x10⁶ cel/ml. Para el ensayo de infección se utilizó tripsina al 0.25% (inVitro, Mexico, D.F.) y se crecieron las células en placas de 96 pozos para cultivo celular (Sarstedt).

Obtención de las toxinas: Los aislados fueron sembrados en tubos con 5 mL de MEM (inVitro, Mexico, D.F.) se incubaron a 37°C por 24 h en agitación a 200 rpm. Las bacterias de cada uno de los aislados se centrifugaron a 8,000 xg por 10 min y los sobrenadantes se recolectaron y colocaron en hielo. Cada uno de los sobrenadantes fue filtrado con una membrana Millipore de 0.22 μm y se dividió en dos alícuotas: la primera se congeló hasta su uso y la segunda se sometió a un tratamiento térmico (65°C/20 min), finalmente, todos los sobrenadantes se congelaron hasta su uso.

En lo que respecta al ensayo de infección los sobrenadantes, se colocaron en hielo y medio MEM 2x suplementado con SFB 5%, se realizan diluciones dobles de cada filtrado. Finalmente, se adicionaron 100 μL de cada una de las diluciones realizadas por triplicado a cada uno de los pozos de la microplaca, que contenían las células Vero. La microplaca se incubó a 37°C por 48 h en atmósfera de CO₂ al 5%. Al término de la incubación



el medio fue desechado, y los pozos se lavaron con PBS 1x estéril, después se fijó con metanol al 70%, se tiñó con Giemsa por 10 min. En este ensayo se utilizaron como control de toxinas termoestable y termolábil *Escherichia coli* enterotoxigénica O78:H11 (ETEC) y para la producción de verotoxinas se utilizó *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 ATCC 4076 (EHEC). *E. coli* K-12 HB101 se utilizó como control negativo (Pagotto et al. 2003).

6. Formación de biopelículas.

Los aislados de *Cronobacter* spp. se crecieron en TSA (Oxoid, Basingstoke, England) durante toda la noche y la formación de biopelículas fue determinada en placas de 48 pozos (Falcon, USA). Se adicionaron en cada pozo 900 μ l MEM suplementado con glucosa al 2%, posteriormente se inocularon 100 μ L de la suspensión bacteriana ajustada al 0.5 del nefelometro de MacFarland (1.5×10^8 UFC/ml) en cada pozo con medio. Las placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C. Las biopelículas fueron fijadas con metanol absoluto y teñidos con cristal violeta al 1%, finalmente el cristal violeta fue solubilizado en 1 ml de etanol al 70%. La formación de biopelículas se cuantificó con un espectrofotómetro a 580 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado (Peeters et al. 2008).

7. Búsqueda de genes asociados a virulencia descritos en el genoma de *Cronobacter sakazakii* BAA-894.

Las secuencias nucleotídicas y proteicas asociadas a virulencia en otras bacterias Gram negativas, y que se encuentran disponibles en la Base de Datos de Factores de virulencia (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>), fueron buscadas en el genoma de *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 (NCBI número de acceso CP.000783.1 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbialextree.html>). Aquellas secuencias proteicas que tuvieron una identidad ≥ 60 u 80% y un contexto genómico semejante, fueron consideradas para el diseño y síntesis de iniciadores a través del programa Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd).



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Los iniciadores fueron sintetizados en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) (**Tabla 3**). La amplificación de cada uno de los genes potenciales se realizó con ADN total extraído de cada uno de los aislados de *Cronobacter* spp. con el equipo comercial DNeasy[®]Blood y Tissue (QUIAGEN, Hilden, GE) en un volumen final de 25 μ L: en solución amortiguadora 1 \times (Tris-HCl, pH 8.3), 1.5 mmol/l de MgCl₂, 200 μ mol/l dNTPs, 0.5 μ mol/l de cada primer, 50 ng del DNA y 1 Unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

Las condiciones para la amplificación de los genes blanco se describen en la tabla 3. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp, PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster, CA). Los productos de reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% para después ser teñidos con bromuro de etidio (10 μ g/ml) y visualizados con luz UV.

Con la finalidad de corroborar que los productos amplificados correspondían al gen blanco se seleccionaron algunos productos de PCR de aislados de *Cronobacter* spp. de cada uno de los orígenes analizados, se purificaron con QIAquick PCR purification Kit (QUIAGEN), se secuenciaron y las secuencias fueron comparadas con las disponibles en el GenBank usando el programa BLAST del NCBI. Durante el análisis, se utilizó *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA894 como control positivo y otros microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella dysenteriae* y *Enterobacter cloacae*, se utilizaron como controles negativos. Así también, el ARNr 16S de todos los aislados se utilizó como control interno.



Tabla 3. Secuencia del iniciador, condiciones de la PCR, blancos y tamaño del amplificado esperado para la detección de los genes potenciales de virulencia en las diferentes especies de *Cronobacter*.

Gen	Secuencia 5'-3'	Blanco	Condiciones de la PCR
<i>cpa</i> F	CTAGGGCGATGATAGCTGCCTCCG	ESA_pESA03005434 6001-7016 (1,015 pb)	94 °C-3 min 30 ciclos: 94 °C-30s; 62 °C-30s; 72 °C-1 min
<i>cpa</i> R	CTAGGGGGAACAGCCACGAGGAAA		Elongación final 72 °C-10 min
<i>hly</i> F	CTAGGGTAACGGACTGTCACAGAT	ESA_00432 409290- 410170 (880 pb)	94 °C-3 min 30 ciclos: 94 °C-30s; 52 °C-30s; 72 °C-1 min
<i>hly</i> R	CTAGGAAGAAGCGTAAGCGTCTGA		Elongación final 72 °C-10 min
<i>sip</i> F	CTAGGCAAAAGAATCGACAAAGGG	ESA_03485 c3431208-3432142 (934 pb)	94 °C-3 min 30 ciclos: 94 °C-30s; 57 °C-30s; 72 °C-1 min
<i>sip</i> R	CTAGGTTGTTGTCTTTATCCGTTT		Elongación final 72 °C-10 min

(*cpa*) gen activador del plasminógeno; (*hly*) gen de la hemolisina y (*sip*) gen de la proteína del sideroforo.

F:Forward; R: Reverse.

8. Análisis estadístico.

Las pruebas de Games-Howell o Sheffé fueron aplicadas como pruebas de comparación múltiple cuando heterocedasticidad (heterogenidad de las varianzas de las variables dependientes en ambos grupos) u homocedasticidad (homogenidad de las varianzas de las variables dependientes en ambos grupos) fueron detectadas, respectivamente, después del análisis de varianza (ANOVA).



VIII. RESULTADOS



1. Caracterización fenotípica de *Cronobacter* spp.

1.1 Identificación bioquímica (biotipos).

En los aislados mexicanos se identificaron cuatro de las cinco especies descritas para *Cronobacter*, representadas en los biotipos 1, 2, 5, 6, 12 y 15 (**Tabla 4**) descritos previamente por Iversen et al. (2007). La mayoría de las especies de *Cronobacter* spp. fueron capaces de incorporar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido (X α Glc), cuando se crecieron en agar DFI. Dicho resultado, pone de manifiesto a la enzima α -glucosidasa, produciendo colonias verde-azules en el medio, con excepción de los aislados identificados como *C. muytjensii*. Los 15 aislados mexicanos desarrollaron colonias de color amarillo en TSA, a diferencia de los aislados controles en los que en cuatro de éstos no se observó dicha producción. La ratificación de cada una de los aislados proporcionados por la Dra Iversen, se realizó como control interno (**Tabla 5**).

Tabla 4. Identificación fenotípica con base en los biotipos de los aislados mexicanos.

No de aislado	Especie	VP	MR	NO ₂	Orn	Mot	Ino	Dul	Ind	Malo	Gas	AMG	Biotipo
731	<i>C. sakazakii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	1
79	<i>C. sakazakii</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	2
857	<i>C. sakazakii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	1
867	<i>C. sakazakii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	1
242	<i>C. malonaticus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	5
245	<i>C. malonaticus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	5
315	<i>C. malonaticus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	5
249	<i>C. dublinensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	6
293	<i>C. dublinensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	6
784	<i>C. dublinensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	6
958	<i>C. dublinensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	6
970	<i>C. dublinensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	6
131	<i>C. dublinensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12
13	<i>C. dublinensis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12
169	<i>C. muytjensii</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	15

VP: Producción de acetoina, MR; Rojo de metilo; NO₂; Producción de nitritos; Orn: Ornitina; Mot: Movilidad; Ino; Inositol; Dul:

Dulcitol; Ind: Indol; Malo: Malonato; Gas: producción de gas y AMG: producción de ácido a partir de α -metil-D-glucosidasa.



Tabla 5. Perfiles bioquímicos identificados en los aislados de *Cronobacter* spp., proporcionados por la Dra Iversen.

No de Aislado	Especie	Pigmento	VP	MR	Orn	Mot	Ino	Dul	Ind	Malo	Gas	AMG	Biotipo
464	<i>C. dublinensis</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	12
515	<i>C. dublinensis</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	6
797	<i>C. genomospecies</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	16
CFS237	<i>C. dublinensis</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	12
736	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	1
601	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	4
604	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	1
791	<i>C. dublinensis</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	12
793	<i>C. muytjensii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	15
796	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	1
823	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	1
824	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	3
825	<i>C. malonaticus</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	9
827	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	7
828	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	1
829	<i>C. malonaticus</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	9
901	<i>C. sakazakii</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	1
902	<i>C. malonaticus</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	9
23827	<i>C. turicensis</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	16
602	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	3
603	<i>C. muytjensii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	15
750	<i>C. sakazakii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	13
798	<i>C. dublinensis</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	12
799	<i>C. dublinensis</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	12
826	<i>C. malonaticus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	13
830	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	3
899	<i>C. sakazakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	7
900	<i>C. sakazakii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	13

VP: Producción de acetoina, MR: Rojo de metilo; Nit: Nitratos; Orn: Ornitina; Mot: Movilidad; Ino; Inositol; Dul: Dulcitol;

Ind: Indol; Malo: Malonato; producción de gas; AMG: producción de ácido a partir de α -metil-D-glucosidasa.



1.2 Prueba de la susceptibilidad a los antibióticos evaluados.

Los resultados de susceptibilidad en los aislados de *Cronobacter* spp. evaluados por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, mostraron que el 28% (12/43) de los aislados fueron resistentes a cefazolina, encontrándose en: *C. sakazakii* (aislados: 784, 824 y 827), *C. malonaticus* (aislado 315), *C. dublinensis* (aislados: 515, 464, 791 y 799), *C. muytjensii* (aislados: 169 y 793) y *C. turicensis* (aislado 3032). Solamente se observó la resistencia a dos antibióticos (cefazolina y ampicilina) en un aislado de *C. malonaticus* (aislado 242).

2. Identificación mediante métodos moleculares.

2.2 Detección del gen *ompA* mediante PCR.

El 98% (42/43) de los aislados previamente identificados como *Cronobacter* spp. amplificaron un producto de 469 pb que correspondía al gen *ompA*, la única especie en la cual no se detectó este gen fue en *C. turicensis* ATCC 23827. Para verificar la especificidad en la detección de *Cronobacter* se trabajó con el ADN genómico de *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* K12, *Shigella flexnerii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*, ninguna de éstas mostró el amplificado esperado para dicho gen.

2.2 Secuenciación del gen ARNr 16S.

La secuenciación del ARNr 16S, sólo se realizó en los aislados mexicanos, con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica (biotipos) y se encontró una correlación del 100% en las especies identificadas con las secuencias obtenidas a partir del ARNr 16S, respecto a las identificadas mediante pruebas bioquímicas. Los porcentajes de identidad que se encontraron en cada una de las secuencias analizadas oscilaron entre el 91 y 99% (**Tabla 6**).



Tabla 6. Especies y biotipos identificados en los aislados Mexicanos de *Cronobacter* spp. mediante pruebas bioquímicas y secuenciación del ARNr 16S.

Aislado	Especie	Biotipo	Identidad encontrada por la secuenciación del 16S rRNA
245	<i>C. sakazakii</i>	1	<i>C. sakazakii</i> HDTL-01 (99%)
731	<i>C. sakazakii</i>	1	<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544 (99%)
79	<i>C. sakazakii</i>	2	<i>C. sakazakii</i> E328 (99%)
857	<i>C. sakazakii</i>	1	<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA-894 (99%)
867	<i>C. sakazakii</i>	1	<i>C. sakazakii</i> ATCC BAA-894 (99%)
242	<i>C. malonaticus</i>	5	<i>C. malonaticus</i> E825 (99%)
315	<i>C. malonaticus</i>	5	<i>C. malonaticus</i> E755 (99%)
249	<i>C. dublinensis</i>	6	<i>C. dublinensis</i> E798 (99%)
293	<i>C. dublinensis</i>	6	<i>C. dublinensis</i> E791 (91%)
784	<i>C. dublinensis</i>	6	<i>C. dublinensis</i> E798 (99%)
958	<i>C. dublinensis</i>	6	<i>C. dublinensis</i> E798 (99%)
970	<i>C. dublinensis</i>	6	<i>C. dublinensis</i> E798 (99%)
131	<i>C. dublinensis</i>	12	<i>C. dublinensis</i> E798 (99%)
13	<i>C. dublinensis</i>	12	<i>C. dublinensis</i> E798 (99%)
169	<i>C. muytjensii</i>	15	<i>C. muytjensii</i> E603 (99%)

3. Identidad clonal

La macrorestricción del ADN genómico de las especies de *Cronobacter* con la enzima *XbaI* mostró patrones de 6 a 15 fragmentos de ADN, con un rango de 48.5 a 630.5 Kb. De acuerdo al programa GelCompar II los aislados se agruparon con base en su patrón de bandeo en 32 pulsotipos. Cuatro grupos fueron observados por PFGE, el grupo A incluyó 15 pulsotipos de *C. sakazakii*, el grupo B albergó cinco pulsotipos de *C. malonaticus*, el grupo C se formó con ocho pulsotipos de *C. dublinensis* y el grupo D constó de dos pulsotipos de *C. muytjensii* (**Figura 4**). Los dos pulsotipos restantes correspondieron a *C. turicensis* y *C. genomospecies* (**Tabla 7**). Los resultados obtenidos mostraron que las especies de *Cronobacter* spp. son un grupo heterogéneo, independientemente de la fuente de aislamiento y el origen geográfico.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

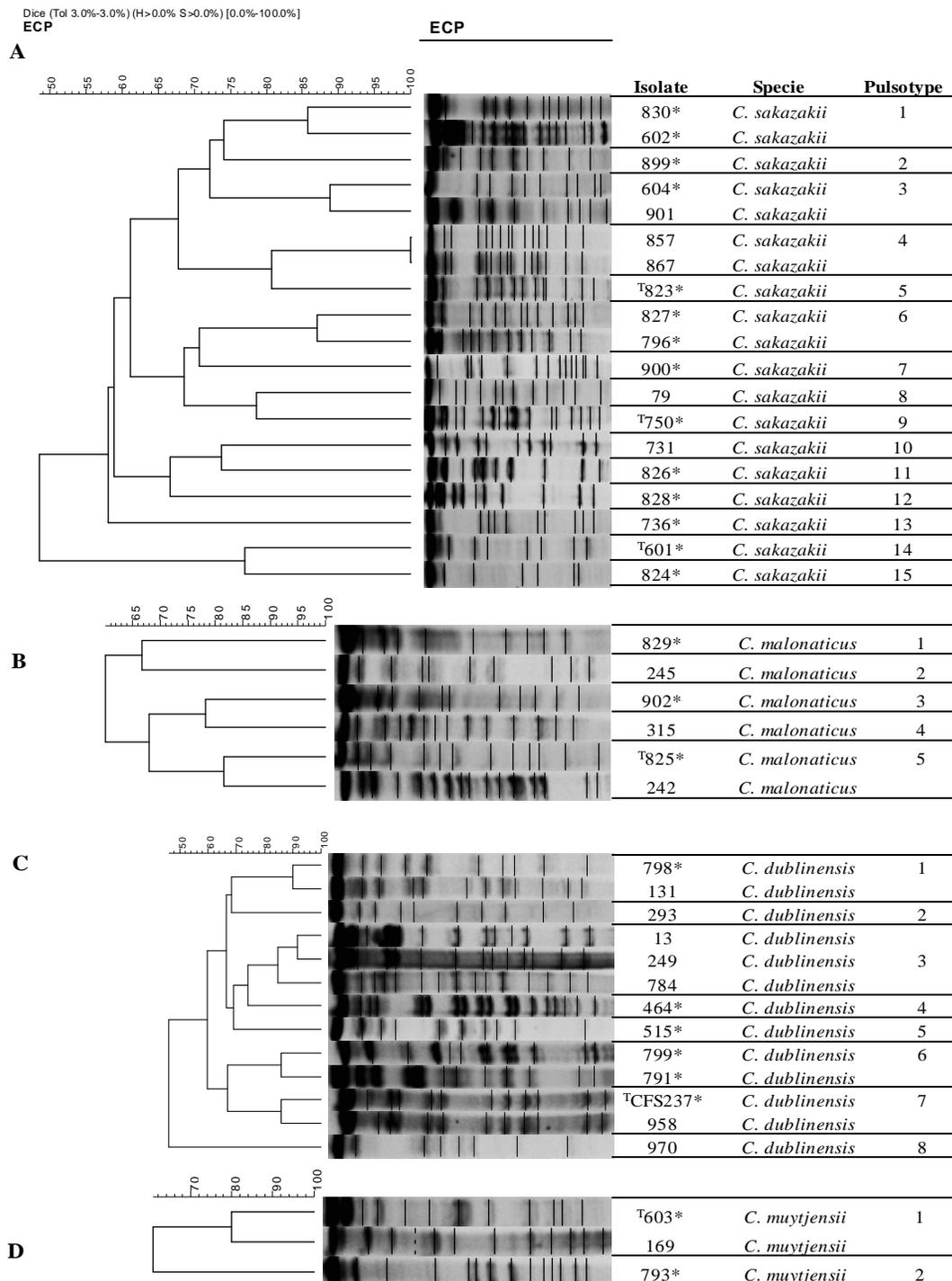


Figura 4. Grupo representativos de los patrones de PFGE en las especies de *Cronobacter*. El dendrograma fue obtenido por el análisis con el coeficiente de similitud DICE y UPGMA. (A) Grupo de *C. sakazakii*, (B) grupo de *C. malonaticus*, (C) grupo de *C. dublinensis* y (D) grupo de *C. muytjensii*. *Aislados donados por Ph.D. Iversen. T: Cepa tipo.



4. Características asociadas a virulencia.

4.1 Capacidad de adherencia en células HEp-2 (células de carcinoma humano laríngeo).

Para evaluar la capacidad de adherencia de las diferentes especies de *Cronobacter* en células HEp-2 se utilizaron ensayos cualitativos y cuantitativos. El 86% (37/43) de los aislados de *Cronobacter* mostraron adherencia a células HEp-2, observándose patrones descritos en *E. coli* como adherencia agregativa, difusa y en algunos aislados se identificaron patrones mixtos de adherencia (**Figura 5**). Para este tipo de ensayo se utilizaron como controles positivos EPEC O127:H6 (E-2348) adherencia tipo localizada, EAEC O42 adherencia agregativa y DAEC 82525 adherencia difusa. *E. coli* K-12 HB101 se utilizó como control negativo.

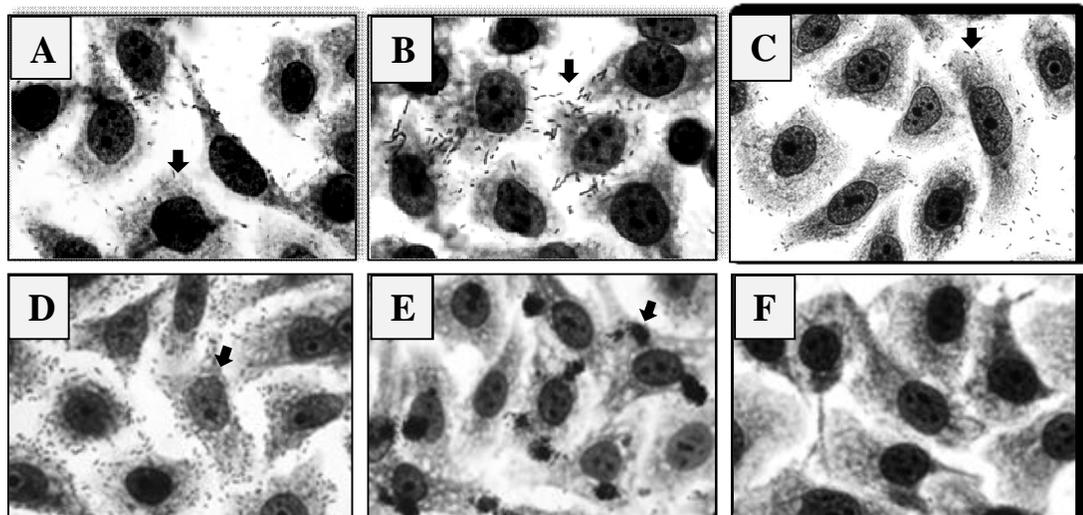


Figura 5. Adherencia cualitativa de las especies de *Cronobacter* en células HEp-2. Las micrografías de microscopia de luz, muestran algunas de las especies de *Cronobacter* spp. que fueron capaces de adherirse a la línea celular HEp-2 después de tres horas de incubación a 37°C. (A) *C. sakazakii* (823), (B), *C. malonaticus* (829), (C) *C. dublinensis* (798), (D) EAEC 042, (E) EPEC O127:H6 (E-2348) y (F) células HEp-2 sin infectar. Las flechas indican las bacterias que están adheridas a las células HEp-2. Aumento total 100x.



El ensayo cuantitativo de adherencia mostró que los aislados de *Cronobacter* spp. en células HEp-2 fueron capaces de adherirse en diferentes niveles que van desde 20×10^4 hasta 403×10^4 UFC/ml; de los 37 aislados de *Cronobacter* spp. con capacidad de adherirse a esta línea celular 11 mostraron valores de adherencia mayores a los que se encontró en la cepa de referencia *E. coli* O42 (EAEC) 137×10^4 UFC/ml (**Figura 6**). Resultó de interés que los aislados de *Cronobacter* spp. con altos valores de adherencia provenían principalmente de muestras humanas. Sin embargo, cuando la capacidad de adherencia fue comparada entre las especies no se encontraron diferencias significativas (Shaffe $p > 0.05$).

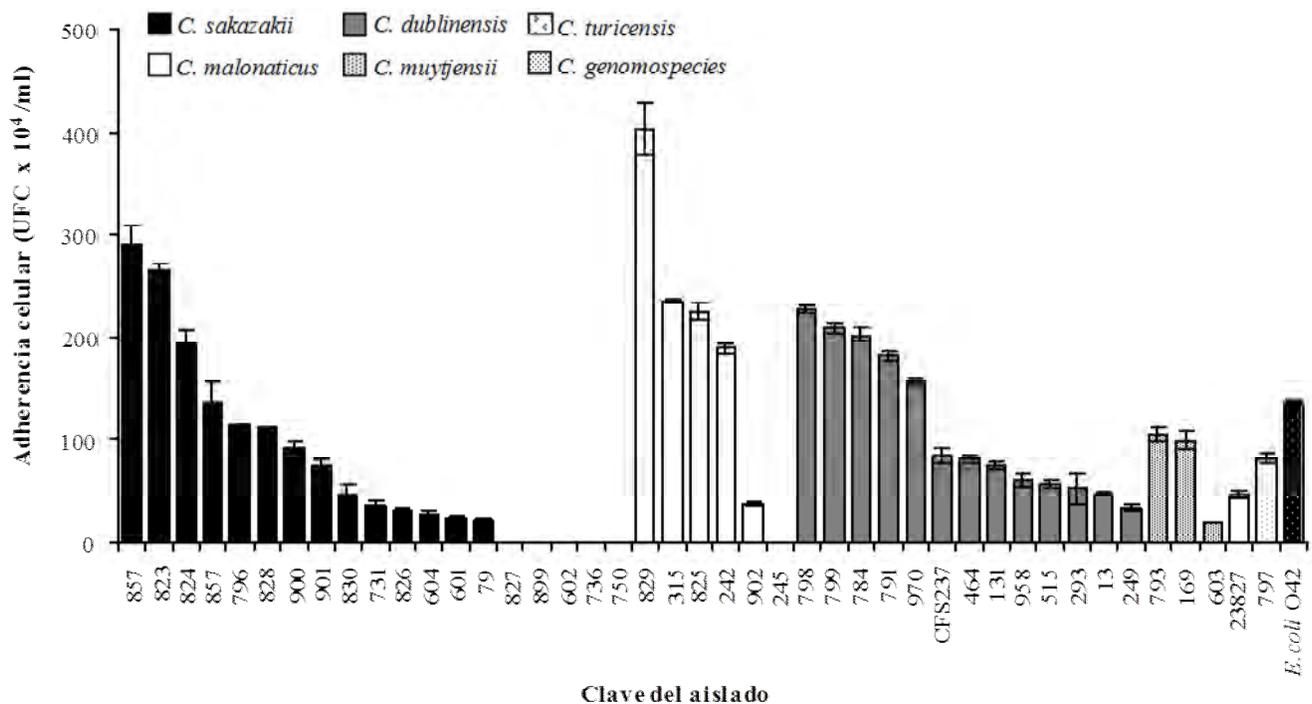


Figura 6. Adherencia cuantitativa de las 43 especies de *Cronobacter* spp. La capacidad de adherencia entre las especies de *Cronobacter* se representó por diferentes valores de UFC/ml, siendo el aislados 829, el que mostró el valor más alto de adherencia y que se aisló de un hemocultivo. Los datos fueron expresados con base en el promedio obtenido de los triplicados. Las barras de error representan la desviación estándar.



4.2 Capacidad de invasión en células HEp-2 (células de carcinoma humano laríngeo).

Se diseñaron ensayos de protección de gentamicina para evaluar cualitativamente y cuantitativamente, la capacidad de las especies de *Cronobacter* spp. para invadir la línea celular HEp-2. Los resultados del ensayo cualitativo mostraron que *C. sakazakii*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii* y *C. malonaticus* fueron capaces de invadir la línea celular HEp-2 (**Figura 7**).

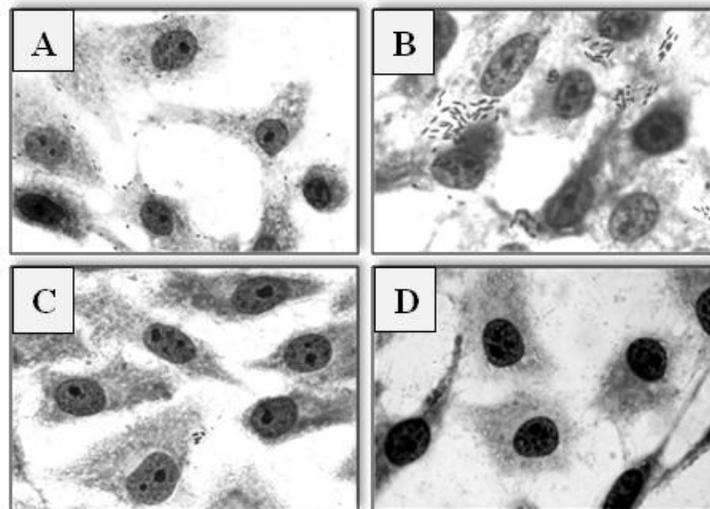


Figura 7. Capacidad de invasión a células HEp-2 por las especies de *Cronobacter*. Micrografías de microscopia de luz después de 3 h del proceso de infección en la línea HEp-2. (A) *C. sakazakii* (823), (B) *C. sakazakii* (601), (C) *E. coli* 1192 (control positivo) y (D) células HEp-2 sin infectar. Las flechas indican a las bacterias que penetraron al citoplasma de la célula HEp-2. Aumento total 100x.

El análisis cuantitativo mostró que el 35% (5/43) de los aislados fueron invasivos, de éstos, siete se identificaron como *C. sakazakii*, cuatro correspondieron a *C. malonaticus*, tres a *C. dublinensis* y un aislado a *C. muytjensii* (**Figura 8**). Las frecuencias relativas de invasión fueron determinadas al contar el número de bacterias viables en presencia del antibiótico entre el número de bacterias viables en ausencia del antibiótico. Diferentes niveles de frecuencia relativa de invasión se observaron en *C. sakazakii* (0.028 - 0.30%), *C. muytjensii* (0.19%), *C. malonaticus* (0.018 - 0.046%) y *C. dublinensis* (0.008 - 0.049%). *E. coli* 1192 se utilizó como control positivo (0.55%) (**Figura 8**).



De acuerdo con los valores obtenidos en la frecuencia relativa de invasión, *C. sakazakii* fue aparentemente la especie que mostró mayor eficiencia en el proceso de invasión a las células HEP-2, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre las especies (Sheffe, $p > 0.05$).

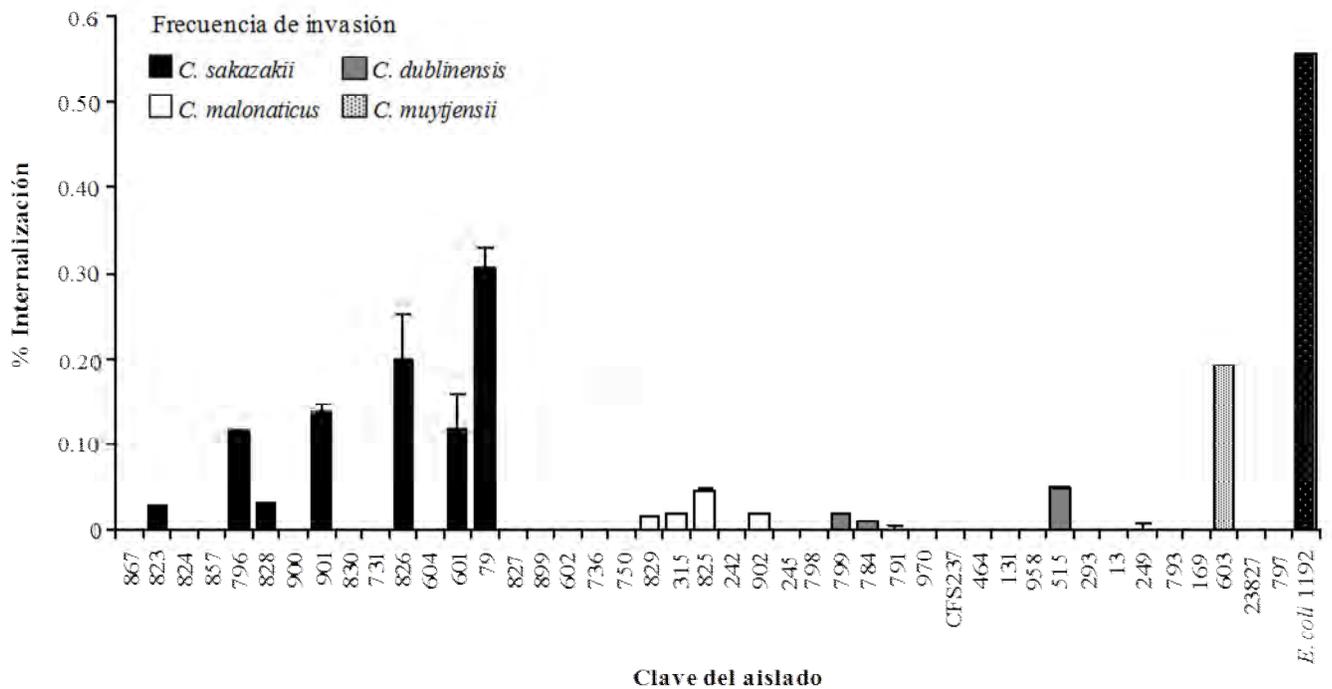


Figura 8. Frecuencias relativas de invasión en los 43 aislados de *Cronobacter* spp. Diferentes niveles de frecuencia de invasión se observarán en los aislados en estudio, siendo *C. sakazakii* (79) aislada de leche de soya la que mostró mayor eficiencia de invasión. Los datos fueron expresados con base en el promedio obtenido de los triplicados. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.3 Efecto citopático en células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde Africano).

El 16% (7/43) de los aislados originaron efecto citopático en la línea celular en estudio, encontrándose un mayor efecto en los filtrados que no fueron sometidos al tratamiento térmico, sugiriendo la presencia de una toxina termolábil, con excepción de dos aislados en donde el efecto citopático se identificó en ambos filtrados (tratado y no tratado), asociándose a la presencia de una toxina termoestable (**Figura 9**).



Las especies que mostraron efectos en la línea celular en estudio correspondieron a *C. sakazakii* (aislados 857 y 867), *C. malonaticus* (aislados 242 y 245), *C. muytjensii* (aislado 169), *C. dublinensis* (aislado 13) y *C. genomoespecies* (aislado 797), el origen de estos aislados corresponden a muestras de origen humanas y ambientales.

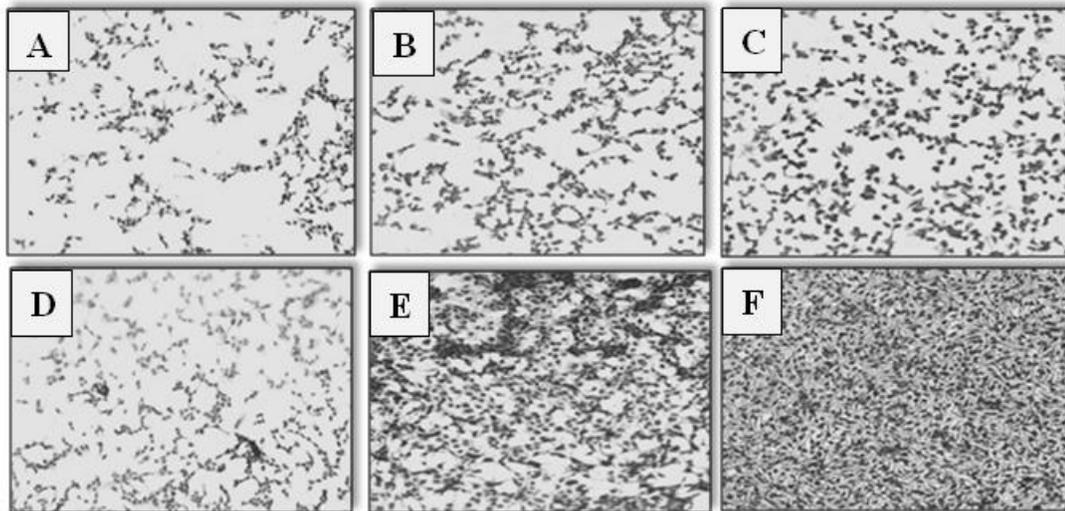


Figura 9. Efecto de los filtrados de los cultivos de *Cronobacter* spp. en las células Vero. Micrografías de microscopia de luz después de 48 h de infectar las células Vero con el sobrenadante filtrado de los cultivos de las diferentes especies de *Cronobacter*. (A) *C. sakazakii* (857), (B) *C. muytjensii* (169), (C) *C. malonaticus* (242), (D) ETEC O127:H6, (E) EHEC O157:H7, (F) células Vero sin infectar. Tinción Giemsa. Aumento total 40x.

5. Capacidad de formación de biopelículas en placas de poliestireno.

El 26% (11/43) de los aislados de *Cronobacter* fueron capaces de formar biopelículas en superficies abióticas. De éstos, cuatro (36%) correspondieron a *C. malonaticus* y en el mismo porcentaje (36%) se encontró en los aislados identificados como *C. dublinensis*. Un dato interesante de estos resultados fue el que un aislado identificado como *C. malonaticus* (315) presentó hiperadherencia al poliestireno, mostrando valores dos veces por arriba del control positivo. *E. coli* K-12 y enteroagregativa *E. coli* O42 que fueron utilizadas como controles negativo y positivo, respectivamente (**Figura 10**). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la capacidad de formar biopelículas entre las diferentes especies (Games-Howell, $p > 0.05$).

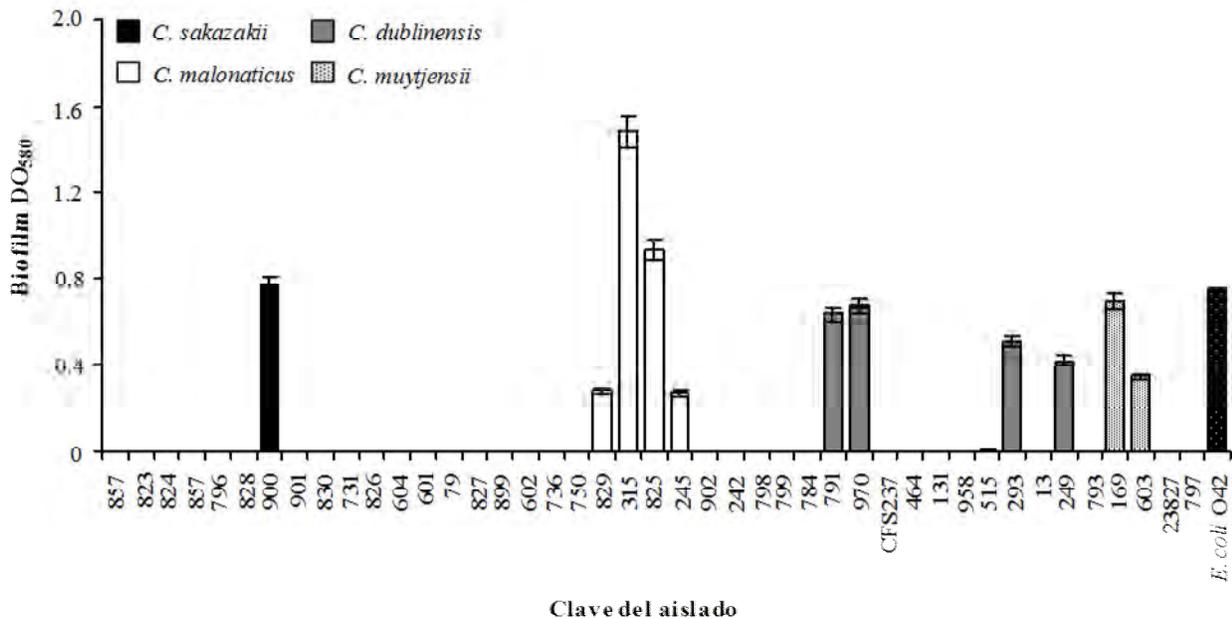


Figura 10. Identificación de la producción y cuantificación de biopelículas en los 43 aislados de *Cronobacter* spp., mediante la retención de cristal violeta, lecturas obtenidas a 580 nm. Los datos fueron expresados con base en el promedio obtenido de los triplicados. Las barras de error representan la desviación estándar.

6. Identificación y detección de genes putativos de virulencia en los aislados de *Cronobacter* spp.

El genoma de *C. sakazakii* ATCC BAA-894 (aislado 823) fue estudiado mediante un análisis bioinformático, para la búsqueda de genes putativos de virulencia que pudieran estar involucrados en la patogénesis de la bacteria. Se identificaron tres genes potenciales de virulencia con base en su contexto genómico y la identidad que guardaron con relación a la secuencia proteica descrita en otras bacterias patógenas. El primer producto que se identificó, codifica para el gen ESA_03485, mostró un 67% de identidad con proteína de sideroforo (Sip) de *E. coli* O127:H6 (**Figura 11**); el segundo producto, codifica para el gen ESA_00432, mostró un 90 % de identidad con hemolisina tipo III (Hly) de *E. coli* O157:H7 (**Figura 12**); el tercer producto que codifica para el gen ESA_pESA3p05434, mostró un 67% de identidad con el activador de plasminógeno (Cpa) de *Yersinia pestis* (**Figura 13**) y en el mismo porcentaje con las cadenas que constituyen esta proteína en *Yersinia pestis* (**Figura 14**).

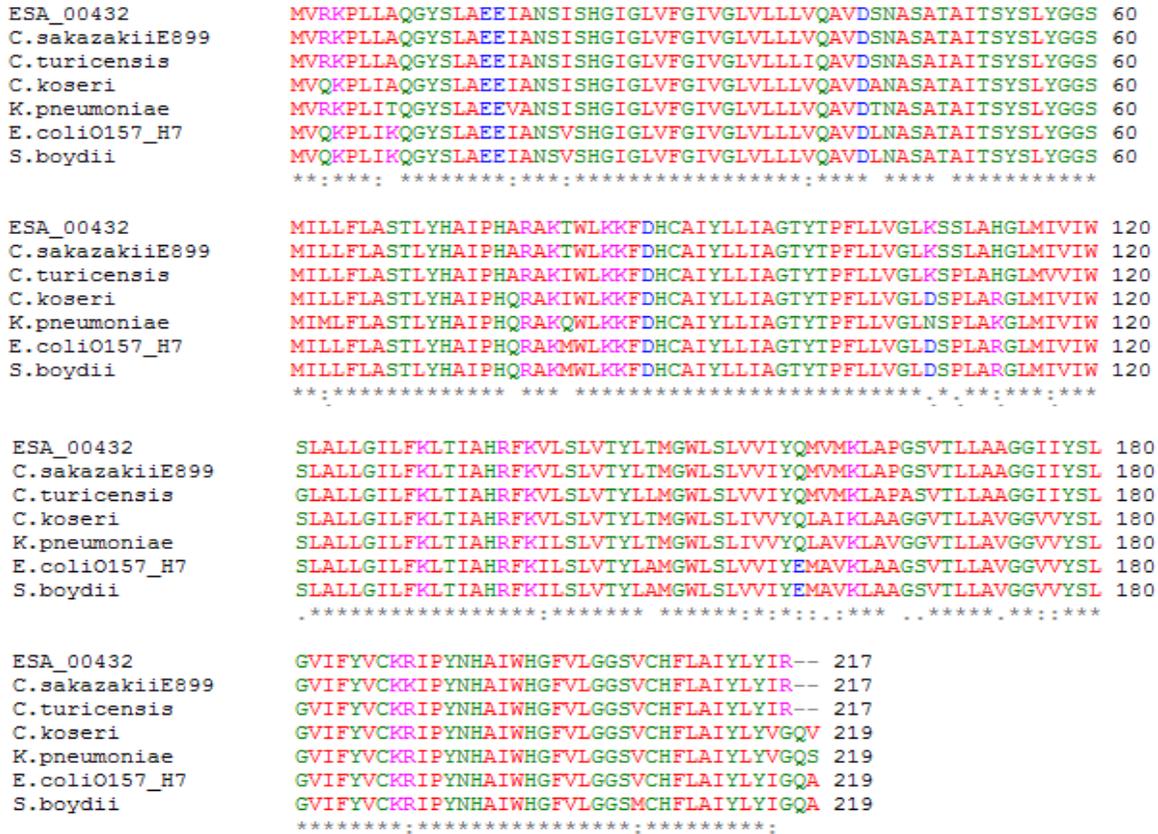


Figura 12. Alineamientos de la secuencia proteica de *C. sakazakii* ESA_00432 con las secuencias proteicas identificadas como hemolisina tipo III en el genoma de otros patógenos. Se encontró identidad con la secuencias de *C. sakazakii* E899 (99%), *Cronobacter turicensis* (96%), *Citrobacter kroseri* (90%), *Klebsiella pneumoniae* (89%), *E. coli* O157:H7 (90%) y *Shigella boydii* (90%). Análisis realizado con el programa ClustalW2. (*): Aminoácidos idénticos; (.): indica conservación en el grupo pero con propiedades débilmente similares y (:): indica conservación en el grupo pero con propiedades fuertemente similares.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Los genes de virulencia identificados fueron detectados mediante PCR en toda la colección de aislados de *Cronobacter* spp. El gen *sip* se detectó en el 60% (26/43) de los aislados, seguido del gen *hly* en el 37% (16/43) y del gen *cpa* en el 28% (12/43). El análisis de los resultados con base en las especies de *Cronobacter*, demostró que los tres genes fueron identificados en el 42% (8/19) de los aislados de *C. sakazakii* y son principalmente provenientes de muestras humanas y sólo en un aislado de *C. muytjensii*. De forma interesante, *C. dublinensis* aparentemente presenta sólo el gen *sip* 23% (3/13) (**Tabla 7**). El gen *cpa* se detectó sólo en dos especies de *Cronobacter* (*C. sakazakii* y *C. muytjensii*), mientras que el gen *hly* se detectó en tres especies (*C. sakazakii*, *C. malonaticus* y *C. muytjensii*). En ambos casos, los aislados provenían principalmente de muestras humanas (**Tabla 7**).

La secuenciación de algunos de los productos de PCR de las especies de *Cronobacter*, mostró que los amplificados (934 bp, 1,015 bp y 880 bp) poseían un 97% de identidad con los genes ESA_03485, ESA_pESA3p05434 y ESA_00432. La especificidad de los iniciadores se corroboró utilizando el ADN genómico de bacterias como *Escherichia coli* K12, *Shigella* spp., *Methylobacterium* y *Escherichia coli* enteroinvasiva.

La habilidad para adherirse a la línea celular HEp-2 fue similar en las especies de *Cronobacter*, a diferencia de la invasividad en la cual sólo algunas especies mostraron esta característica (**Tabla 7**). El efecto citotóxico que se observó en la línea celular Vero, al parecer no está relacionado con la especie y es indistinta del origen de aislamiento; sin embargo, resultado de interés que los aislados que mostraron la producción de toxinas no fueran invasivos. Algunos aislados de *C. sakazakii* fueron positivos a los tres genes putativos de virulencia. Se observó una asociación entre la adherencia, invasión y los tres genes putativos de virulencia en cuatro de los aislados de *C. sakazakii* (9%), tres de estos provenían de muestras humanas y uno de alimentos (leche de soya), también se encontró dicha asociación entre las características evaluadas en un aislado de *C. muytjensii* (2%) proveniente de muestra humana (**Tabla 7**).



Tabla 7. Características asociadas a virulencia en las especies de *Cronobacter*.

Aislado	Especie	Fuente	Adh	Inv	Citox	Bplc	sip	hly	cpa	Grupo
823	<i>C. sakazakii</i> ^T	Clínica	+	+	-	-	+	+	+	A
901	<i>C. sakazakii</i>	Clínica	+	+	-	-	+	+	+	A
79	<i>C. sakazakii</i>	Leche de soya	+	+	-	-	+	+	+	A
828	<i>C. sakazakii</i>	Espuito	+	+	-	-	+	+	+	A
857	<i>C. sakazakii</i>	Urocultivo	+	-	+	-	+	+	+	A
867	<i>C. sakazakii</i>	Uricultivo	+	-	+	-	+	+	+	A
827	<i>C. sakazakii</i>	Espuito	-	-	-	-	+	+	+	A
899	<i>C. sakazakii</i>	Clínica	-	-	-	-	+	+	+	A
900	<i>C. sakazakii</i>	Hemocultivo	+	-	-	+	+	+	-	A
731	<i>C. sakazakii</i>	Germinado de alfalfa	+	-	-	-	+	+	-	A
830	<i>C. sakazakii</i>	Desconocido	+	-	-	-	+	+	-	A
824	<i>C. sakazakii</i>	Fluido espinal	+	-	-	-	+	+	-	A
604	<i>C. sakazakii</i>	Clínica	+	-	-	-	+	-	+	A
602	<i>C. sakazakii</i>	Desconocido	-	-	-	-	+	+	-	A
796	<i>C. sakazakii</i>	Pus abdominal	+	+	-	-	+	-	-	A
601	<i>C. sakazakii</i> ^T	Garganta	+	+	-	-	+	-	-	A
736	<i>C. sakazakii</i>	Fórmula láctea	-	-	-	-	-	-	+	A
750	<i>C. sakazakii</i> ^T	Desconocido	-	-	-	-	-	+	-	A
826	<i>C. sakazakii</i>	Desconocido	+	+	-	-	-	-	-	A
829	<i>C. malonaticus</i>	Hemocultivo	+	+	-	+	+	-	-	B
315	<i>C. malonaticus</i>	Polvo extramuro	+	+	-	+	+	-	-	B
825	<i>C. malonaticus</i> ^T	Acceso cerebral	+	+	-	+	-	+	-	B
902	<i>C. malonaticus</i>	Hemocultivo	+	+	-	-	+	-	-	B
242	<i>C. malonaticus</i>	Polvo extramuro	+	-	+	-	+	-	-	B
245	<i>C. malonaticus</i>	Polvo extramuro	-	-	+	+	-	-	-	B
131	<i>C. dublinensis</i>	Germinado de alfalfa	+	-	-	-	+	-	-	C
970	<i>C. dublinensis</i>	Germinado de alfalfa	+	-	-	+	+	-	-	C
958	<i>C. dublinensis</i>	Germinado de alfalfa	+	-	-	-	+	-	-	C
249	<i>C. dublinensis</i>	Polvo extramuro	+	-	-	+	-	-	-	C
293	<i>C. dublinensis</i>	Polvo extramuro	+	-	-	+	-	-	-	C
515	<i>C. dublinensis</i>	Agua	+	+	-	-	-	-	-	C
798	<i>C. dublinensis</i>	Desconocido	+	-	-	-	-	-	-	C
799	<i>C. dublinensis</i>	Producto lácteo	+	+	-	-	-	-	-	C
784	<i>C. dublinensis</i>	Germinado de alfalfa	+	+	-	-	-	-	-	C
791	<i>C. dublinensis</i>	Hemocultivo	+	-	-	+	-	-	-	C
CFS237	<i>C. dublinensis</i> ^T	Leche en polvo	+	-	-	-	-	-	-	C
464	<i>C. dublinensis</i>	Leche en polvo	+	-	-	-	-	-	-	C
13	<i>C. dublinensis</i>	Agua de riego	+	-	+	-	-	-	-	C
603	<i>C. muytjensii</i> ^T	Desconocido	+	+	-	+	+	+	+	D
169	<i>C. muytjensii</i>	Polvo extramuros	+	-	+	+	+	-	-	D
793	<i>C. muytjensii</i>	Médula espinal	+	-	-	-	-	+	+	D
3032	<i>C. turicensis</i> ^T	Meningitis	+	-	-	-	-	-	-	-
797	<i>C. genomospecies</i> ^T	Agua	+	-	+	-	+	-	-	-

(+): Positivo; (-): negativo. Adh: Adherencia; Inv: Invasión; Citox: Citotoxicidad; Bplc: Biopelículas. Genes

putativos de virulencia: proteína del sideróforo (*sip*), hemolisina (*hly*) y activador del plasminógeno (*cpa*). 823:

C. sakazakii ATCC BA824. ^T: Cepas tipo.



IX. DISCUSIÓN



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

En los últimos 10 años *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) un patógeno oportunista emergente ha tomado relevancia en cuanto a la susceptibilidad de infección en neonatos y en menor proporción en adultos inmunocomprometidos (Healy et al. 2010). Su importancia en México no se ha reportado; sin embargo, *Cronobacter* spp. está presente en una colección de aislados de diferentes fuentes como lo son: alimentos (germinados de alfalfa y leche de soya), ambientales (polvo extramuros y agua de riego del lago de Xochimilco) y casos clínicos (dos muestras de orina).

A pesar de que este género se encuentra formado por cinco especies, solamente *C. sakazakii* y *C. turicensis* se han asociado a muertes en neoatos. Sin embargo, de acuerdo a estudios previos todas las especies de *Cronobacter* son consideradas como patógenos potenciales *in vivo* (Kucerova et al. 2010). El daño y los mecanismos de patogenicidad entre las especies de *Cronobacter* no son del todo entendidos. Al buscar explicar la patogénesis de la bacteria se intenta contribuir a un mejor entendimiento de la misma. En este estudio se identificaron características fenotípicas y genotípicas asociadas a virulencia en *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii* y en menor frecuencia en *C. dublinensis*.

En los aislados mexicanos se identificaron, con base en sus biotipos y en la secuenciación del gen 16S rARN, a *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. dublinensis* y *C. muytjensii*. De los ocho biotipos descritos para la especie de *C. sakazakii*, sólo se identificaron los biotipos 1 y 2, los cuales se han aislado principalmente de alimentos y de muestras humanas (Iversen et al. 2006; Iversen et al. 2008). El biotipo 5 identificado en los aislados de *C. malonaticus* es el biotipo representativo de esta especie. Mientras que en *C. muytjensii* el biotipo 15 y en *C. dublinensis* los biotipos 6 y 12 se han aislado de casos clínicos y de muestras ambientales (Iversen et al. 2007a).

La prevalencia de *Cronobacter* spp. en aislamientos clínicos en México es baja, y resulta interesante que los dos aislados fueron causas de daño severo en pacientes adultos inmunocomprometidos en infección en vías urinarias, datos que concuerdan con un caso en India, en una mujer adulta de 63 años con infección en vías urinarias de la cual se aisló a *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*), debido a que la cepa que se recuperó mostró sensibilidad a todos los antibióticos evaluados, los autores sugieren que la fuente de contaminación puede ser ambiental (Bhat et al. 2009).



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Desafortunadamente en México *Cronobacter* spp. no es un microorganismo que se busque intencionalmente y en muchas ocasiones ha sido clasificado como *Enterobacter cloacae*. Lo cual hace referencia a la importancia de realizar estudios que permitan identificar y caracterizar este microorganismo que puede representar un problema de salud en nuestro país en un futuro cercano.

Hasta la fecha la identificación fenotípica de esta bacteria sigue siendo un problema por lo que se propone la secuenciación del gen 16S rARN para diferenciar a las especies de *Cronobacter* (Jaradat et al. 2009). En los aislados mexicanos se corroboraron las especies identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales con la secuenciación del ARNr 16S, ambos métodos correlacionaron. Sin embargo, debido a la complejidad en la diferenciación entre las especies, se ha propuesto realizar MLTS (Tipificación de secuencias de múltiples-locus) para discriminar entre dos especies altamente relacionadas; *C. sakazakii* y *C. malonaticus* (Baldwin et al. 2009). Por estas razones es conveniente el diseño de estudios polifásicos que permitan la diferenciación entre las especies de *Cronobacter* fenotípicamente y genotípicamente.

Cronobacter spp. se caracteriza por mostrar sensibilidad a tetraciclina, aminoglucósidos, cloranfenicol, quinolonas y β -lactámicos. Molloy et al. (2009) analizaron 33 muestras positivas para *Cronobacter* spp. provenientes de diferentes ambientes de una granja de productos animales y encontraron que el 51% (17/33) fueron resistentes a cefalotina. Contrario a lo reportado por Kim et al. (2009), en donde analizaron 113 aislamientos de *Cronobacter* spp. provenientes de alimentos de origen coreano y determinaron que el 5.3% (6/113) de los aislados mostraron resistencia a cefalotina y el 43% (49/113) a ampicilina, estos datos concuerdan con lo reportado por otros autores como Muijtjens y van der Ros-van de Repe (1986) y Nazarowec-White y Farber (1999). En este estudio se encontró que el 28% de los aislados de *Cronobacter* spp. fueron resistentes a cefazolina (cefalosporina de primera generación) y 0.2% a ampicilina.

El incremento en la resistencia a estos antibióticos ha permitido que se implemente el uso de cefalosporinas de tercera generación para el tratamiento de estas infecciones (Gurtler et al. 2005). Aún cuando la resistencia a los antibióticos en general no es alta en este grupo de bacterias, si existe la posibilidad de adquisición de material genético que les permita ser resistentes a otros antibióticos, sobre todo por la diversidad de ambientes de los que se les ha aislado *Cronobacter* spp.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Por otra parte, diversas técnicas han sido consideradas para la tipificación molecular como herramientas útiles para entender la ecología microbiana. La electroforesis en campo pulsado (PFGE) es un método bien establecido y ampliamente considerado como el “estándar de oro” para la tipificación molecular de patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos, incluyendo en este grupo a *Cronobacter* spp. (Tenover et al. 1995; Nazarowec-White y Farber 1999). Nuestra colección de especies de *Cronobacter* fue genéticamente heterogénea, lo cual correlaciona con lo reportado por otros grupos (Caubilla-Barron et al. 2007a; Proudly et al. 2008; Baldwin et al. 2009; Healy et al. 2010). Un punto importante al respecto, es que a pesar de los diversos estudios realizados en relación al hábitat de la bacteria, no se ha logrado establecer hasta el momento una asociación entre las especies de *Cronobacter* y su origen (Nazarowec-White y Farber, 1999; Townsend et al. 2008; Miled-Bennour et al. 2010). Dada la diversidad genética y fenotípica de la bacteria, para tipificar las colecciones de cepas de *Cronobacter* se ha propuesto el uso de MLST-repetidos en tandem que son definidas como pequeñas secuencias repetidas, altamente polimórficas y que se encuentran dispersas en los genomas bacterianos (Healy et al. 2010).

Debido a la diversidad de ambientes de los que ha sido aislada la bacteria y su potencial como microorganismo oportunista, es importante conocer el mecanismo de patogenicidad con el que cuenta *Cronobacter* spp. En primer lugar el proceso de adherencia es uno de los eventos más importantes en la patogénesis bacteriana, ya que le permite a la bacteria comenzar a colonizar y si las condiciones del hospedante son las adecuadas para el patógeno entonces puede invadir y ocasionar la enfermedad (Pizarro-Cerda y Cossart, 2006).

Se ha descrito que *Cronobacter* spp. fueron capaces de adherirse a las líneas celulares HEp-2 y Caco-2; sin embargo, el mecanismo de unión a las células de mamíferos no es del todo claro (Mange et al. 2006). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que todas las especies de *Cronobacter* fueron capaces de adherirse a la línea celular HEp-2, y se encontraron diferentes patrones de adherencia: difusa, agregativa y una mezcla de ambos. Si bien sólo se analizó el fenotipo de adherencia, la búsqueda de las adhesinas que puedan estar asociadas a este proceso, contribuirá a tener un mejor entendimiento de la patogénesis de la bacteria.



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

Una bacteria es capaz de invadir al hospedante si ha completado con éxito la adherencia y multiplicación inicial, y tiene la capacidad de producir sustancias extracelulares que faciliten la invasión. La capacidad de invadir células de mamíferos en patógenos intracelulares (*Brucella*, *Salmonella* spp., *Shigella flexneri* y *Yersinia enterocolitica*) y no intracelulares (*E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* uropatógena), es una propiedad que está asociada con la patogénesis bacteriana (Gorvel y Moreno, 2002; Pizarro-Cerda y Cossart, 2006; Nicholson et al. 2009; Xicohtencatl-Cortes et al. 2009).

En el presente trabajo las especies de *Cronobacter* aisladas a partir de muestras humanas fueron capaces de invadir la línea celular epitelial HEP-2 a tasas comparadas con lo reportado por otros autores usando la misma línea celular (Townsend et al. 2008). *C. sakazakii* fue la especie que mostró los valores más altos de frecuencia relativas de invasión, lo cual se asoció a una alta capacidad de invasión. En algunos aislados de *C. sakazakii* y *C. muytjensii* se observó una relación entre el fenotipo invasivo y la presencia del gen *cpa*, el cual se describió recientemente participa en la patogénesis de la bacteria (Franco et al. 2011b).

Diversas moléculas de naturaleza proteica participan en la invasión. Mohan y Venkitanarayanan (2007), describieron la primera proteína asociada a invasión. La proteína OmpA fue capaz de unirse a fibronectina, facilitando la invasión a células endoteliales de cerebro. En otros estudios Mittal et al. (2009) demostraron que ratas recién nacidas infectadas con *E. sakazakii* 51329 (*C. muytjensii*), que estaban expresando esta proteína, desarrollaron meningitis. Así mismo, las bacterias que se encontraban expresando OmpA son capaces de cruzar exitosamente la barrera intestinal y multiplicarse en la barrera hematoencefálica, en contraste con el grupo de ratas que fueron infectadas con bacterias que no expresaban esta proteína. Estudios por Kim et al. (2010), evidenciaron que la expresión de OmpA y OmpX en *C. sakazakii* es indispensable para la adherencia apical y basolateral en la invasión de las células de mamíferos, y estos resultados sugieren que el receptor para la invasina de esta bacteria se encuentra no sólo en la parte apical si no, también en la basolateral.

Recientemente, Yan et al. (2011), detectaron *ompA* en el 65% de los aislados de *C. sakazakii*, dado este porcentaje, el gen fue descartado para establecerlo como biomarcador, debido a la variabilidad en la secuencia que se observó. En nuestro análisis el gen que codifica para la proteína OmpA fue detectado mediante PCR en el 98% de los aislados, siendo *C. turicensis* el único aislado que no amplificó dicho gen. Era de esperarse que



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

todos los aislados con este gen fueran capaces de invadir la línea celular en estudio; sin embargo, el método utilizado sólo permite detectar el gen y no así su expresión. Por lo que es muy importante realizar ensayos de expresión; así como, la implementación del análisis en diferentes líneas celulares que nos evidencien de forma preliminar los receptores que pudieran estar involucrados en el proceso de invasión.

Otras moléculas que participan activamente en la patogénesis de diferentes patógenos, son las toxinas. La toxinas son proteínas solubles secretadas por la bacteria durante su crecimiento exponencial, de alta actividad biológica (causando un efecto citotóxico) en sitios alejados del punto original de invasión y crecimiento del patógeno. La capacidad de un microorganismo para producir éstas y la potencia de ellas son factores muy importantes en la producción de una enfermedad (Schmitt et al. 1999).

Pagotto et al. (2003), evaluaron la producción de enterotoxinas y observaron que en tres líneas celulares (CHO, Vero y Y-1), al infectarlas con filtrados sometidos a tratamiento térmico y sin tratamiento, fueron tóxicos para las células. Estos datos correlacionan con lo obtenido en este estudio en el cual se encontró el efecto de una toxina termoestable en la línea celular Vero. Al igual que en el caso de la invasividad, el efecto citopático, observado en la línea celular en estudio, y atribuido a la producción de toxinas, no se observó diferencia entre los aislados clínicos y los ambientales. También resultó de interés la identificación de una proteína secretada en el aislado mexicano de *C. muytjensii*, que sólo fue capaz de ocasionar daño en la línea celular cuando se sometió a un tratamiento térmico, esto se ha descrito anteriormente pero en toxinas descritas principalmente para *Clostridium*, lo cual indica un mecanismo de patogenidad diferente en dicha especie.

La persistencia de *Cronobacter* spp. en diferentes ambientes es atribuida a su habilidad para formar biopelículas. *Cronobacter* spp. produce un material viscoso capsular, que le permite la formación de una biopelícula en el equipo utilizado para preparar alimentos y superficies de contacto. Esta biopelícula puede proveer protección a *Cronobacter* spp., permitiéndole a éste sobrevivir en ambientes con estrés osmóticos, térmicos y de tensión (Hunter et al. 2008; Amalaradjou y Venkitanarayanan, 2011). Los genes involucrados en la formación de la biopelícula fueron caracterizados recientemente por Hartmann et al. (2010), los cuales incluyen, al operon de la sintasa de celulosa y otros asociados con la biosíntesis y estructura del flagelo. En este estudio se encontró que el 26% de las especies de *Cronobacter* fueron capaces de formar biopelículas,



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

principalmente *C. dublinensis* y *C. malonaticus*, aislados de muestras humanas y no humanas. La formación de biopelículas en los microorganismos patógenos, involucra diversos factores asociados a la producción de exopolisacárido, curli y flagelo (Donlan y Costerton 2002). La formación de biopelículas también se ha asociado a la resistencia a la terapia antimicrobiana y al incremento de la virulencia; sin embargo, no se ha sido demostrado en *Cronobacter* spp. (Hurrell et al. 2009a, 2009b).

La identificación de nuevos factores de virulencia en bacterias patógenas nos permite entender su patogénesis y su interacción con el hospedante (Wu et al. 2008). En esta era, las secuencias de los genomas de diversas bacterias patógenas han sido descritos; los estudios en los patogenómas permiten comparar secuencias de patógenos en los que han sido identificados factores de virulencia específicos o compartidos (Yang et al. 2010).

Al respecto, el análisis comparativo entre el genoma de *C. sakazakii* BAA- 894 (Kucerova et al. 2010), cepa aisladas de leche en polvo, en un brote en Tennessee NICU y los patogenómas de otras bacterias permitieron la identificación de tres genes putativos de virulencia (*sip*, *hly*, y *cpa*) en *Cronobacter* spp. Los tres genes fueron detectados mediante PCR en muestras de origen humano principalmente, y en menor frecuencia en muestras de origen no humanas.

El gen putativo que codifica para la proteína de sideróforos (*sip*) se encontró distribuido aleatoriamente en aislados de origen humano, ambientales y de alimentos en las cinco especies descritas para el género, más no se mantuvo distribuido entre las mismas especies. Los sideróforos son producidos por varias bacterias y algunas plantas para poder tener acceso al hierro del hospedante y se ha descrito que contribuyen a la virulencia de algunos patógenos. El hierro es un factor importante en la patogénesis bacteriana. Como parte de la respuesta inmune, el hospedante limita la cantidad de hierro disponible, uniéndolo a proteínas para que de esta manera no este disponible para el crecimiento de la bacteria (Faraldo-Gomez y Sansom, 2003). En condiciones limitantes de nutrientes, las bacterias producen moléculas de unión a hierro, de alta afinidad, denominadas sideróforos, los cuales participan en la patogénesis de la bacteria y les ayudan a persistir en diferentes ambientes.

La proteína Sip se caracteriza por tener un dominio de ferredoxina-reductasa (FNR) con sitios de unión a FAD y NAD(P), capaz de transferir electrones de la forma reducida de la ferredoxina a FAD y de



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

convertir NADP^+ a NADPH . Además se ha demostrado que FNR es capaz de aceptar y donar una variedad de electrones, lo cual contribuye a su participación en una amplia variedad de funciones fisiológicas, incluyendo la asimilación de nitrógeno, metabolismo de ácidos grasos, actividad de oxigenasa y la asimilación de metano en varios microorganismos (Miethke y Marahiel 2007).

La hemolisina tipo III fue detectada sólo en *C. sakazakii*, *C. malonaticus* y *C. muytjensii* aislados de muestras de origen humano, y al igual que *sip* no se mantuvo distribuido entre las mismas especies. La hemolisina tipo III es una proteína integral de membrana externa y es considerada factor de virulencia en varios patógenos (*Bacillus cereus*, *Vibrio vulnificus* y *E. coli*). Se ha demostrado que la hemolisina tipo III actúa como una hemolisina oligomérica formadora de poro en la membrana celular de eucariontes (Baida y Kuzmin 1996; Chen et al. 2006).

El gen activador del plasminógeno (*cpa*) fue detectado principalmente en dos especies *C. muytjensii* y *C. sakazakii* aisladas de muestras de origen humano. El activador del plasminógeno pertenece a la familia Ompina que son serin proteasas. En *Yersinia pestis* el activador del plasminógeno (Pla) es una aspartil proteasa de superficie que induce fibrinólisis y degrada la matriz extracelular y las membranas basales, se ha propuesto que esta disrupción le impide al hospedante contener a la bacteria en sitios de infección, promoviendo la diseminación de *Yersinia pestis* a pulmón (Sebbone et al. 2006; Kim et al. 2007a). El *pla* se encuentra localizado en un plásmido de 9.5- kb pPCP1, mientras que en *Cronobacter sakazakii* ATCC-BAA894 este gen (*cpa*) se encuentra localizado en un plásmido de 131 kb pESA3.

Recientemente, Franco et al. (2011b) demostraron que la expresión de Cpa, en *C. sakazakii* BAA-894, incrementa la resistencia a suero en comparación con la mutante deletada en el gen *cpa*. La sobre-expresión de la proteína recombinante Cpa en *C. sakazakii* produjo una rápida activación del plasminógeno y la inactivación de la α 2-AP (alfa-2-antiplasmina); así como, también incrementa la escisión proteolítica de los componentes del complemento que a su vez incrementa la resistencia a la actividad bactericida del suero.

Franco et al. (2011a), realizaron la detección del gen *cpa* en diferentes aislados de *C. sakazakii*, siendo el 98% positivos para este gen, mientras que nosotros encontramos que en el 53% de los aislados de *C. sakazakii*, se detectó este gen. La diferencia hallada en ambos estudios puede deberse a la divergencia nucleotídica del



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

género a nivel de especie e inter-especie, debido a que los iniciadores utilizados en dicho estudio sólo amplificaron una secuencia interna del gen *cpa*, comparado con nuestros iniciadores que amplificaron el gen completo.

El genoma de *Cronobacter turicensis* (GenBank [FN543093.1](#)), fue liberado recientemente (Stephan et al. 2011), por lo que se realizó la búsqueda de los genes analizados en este estudio. Sólo se encontró el gen *sip* que correlaciona con lo encontrado por Schmid et al. (2009), ya que evaluaron la expresión del sideróforo en esta cepa (3032-LMG 23827) a la cual fue positiva. La secuencia nucleotídica y proteica de la hemolisina también se encontró pero hay divergencia en la secuencia nucleotídica de *Cronobacter turicensis* al ser comparada con la de *Cronobacter sakazakii* ATCC-BAA894, razón por la cual no se detectó el gen mediante PCR con los iniciadores utilizados.

De acuerdo con el análisis realizado el activador del plasminógeno no se encontró en el genoma de *C. turicensis* resultado que correlaciona con lo reportado por Franco et al. (2011a), en el cual, el plásmido pCTU1 en *C. turicensis* no codifica para este gen.

En un estudio *in silico*, Franco et al. (2011a), realizaron el análisis del plásmido pESA3 en *C. sakazakii* y pCTU1 en *C. turicensis*, e identificaron varios grupos de genes de virulencia, tales como: dos sistemas de adquisición de hierro, en ambos plásmidos; *cpa* y un locus para sistema de secreción tipo 6, en pESA3. En pCTU1, se identificó el gen *fhaB* (hemaglutinina filamentous), *fhaC* (transportador) y un locus asociado a adhesinas putativas.

Lo anterior hace referencia una vez más a la diversidad que existe entre las especies y el mismo género de esta bacteria. Healy et al. (2009) demostraron que la divergencia genética entre *Cronobacter sakazakii* y el resto de las especies por medio de microarreglos, por lo que la disponibilidad de una sola secuencia y de una sola especie es una limitante para tratar de entender la biología y con ello los factores involucrados en la patogénesis de la bacteria.



En este estudio se mostró la viabilidad y diversidad en las diferentes especies de *Cronobacter*. La diversidad génica encontrada en las especies de *Cronobacter* spp. dificultó el establecimiento de marcadores involucrados en la virulencia del microorganismo. Sin embargo, algunos de los aislados de muestras humanas parecen contar con más características asociadas a virulencia, comparados con los aislados de muestras ambientales o de alimentos, especialmente los genes *cpa* y *hly* que estuvieron presentes sólo en algunas especies, lo cual puede ser de importancia en la patogénesis de la bacteria.

La aplicación de técnicas como la genómica comparativa, transcriptómica y proteómica, combinadas con análisis bioinformático, son esenciales para descifrar las complejas interacciones entre patógeno - hospedante y para identificar nuevas propiedades emergentes en *Cronobacter* spp. Además, poco se sabe acerca de los factores de virulencia *in vivo* y la patogenicidad de *Cronobacter* spp., que son cruciales en el diseño de terapias para el tratamiento y control de las infecciones por esta bacteria. Al igual que con otros microorganismos patógenos, *Cronobacter* spp. han surgido de una población más amplia de bacterias a través de su capacidad de sobrevivir en ambientes adversos o condiciones tales como las que se encuentran en las instalaciones de procesamiento de la FIP.

Como la aparición de microorganismos patógenos nuevos parece ser inevitable, es fundamental que la mejora de la seguridad alimentaria se base en la información científica y evaluaciones de riesgo que permitan identificar el control adecuado y soluciones de gestión. Estos sistemas sólo pueden ser eficaces cuando se sustentan en los datos generados a través del uso de métodos microbiológicos y moleculares sensibles.



X. CONCLUSIÓN



En este estudio, cuatro especies de *Cronobacter* mostraron características asociadas a virulencia consistentemente (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii* y con menor frecuencia *C. dublinensis*). Resultó de interés, que la especie; *C. sakazakii* contara con la mayoría de los genes putativos de virulencia evaluados, aunado a los valores más elevados de frecuencia de invasión. Estos resultados sugieren que las especies de *Cronobacter* con características como adherencia y capacidad de formación de biopelículas, son capaces de sobrevivir como bacterias libres en diferentes ambientes, mientras que la invasión, producción de toxinas y la presencia de algunos genes de virulencia (*hly* y *cpa*) les permiten ser un patógeno oportunista exitoso. Desafortunadamente, debido al tamaño de la muestra, no fue posible observar diferencias significativas entre las características de virulencia analizadas en estas especies de *Cronobacter*.



XI. PERSPECTIVAS



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

1. La adherencia es definida como un evento indispensable para realizar la colonización del hospedante. El mecanismo de adherencia para *Cronobacter* spp., no ha sido del todo identificado, se postula que esta mediado por proteínas afimbriales; sin embargo, en el genoma de la bacteria se encuentran secuencias proteicas que guardan una alta identidad con pilis de otras enterobacterias, la identificación y caracterización de estas fimbrias, mediante ensayos fenotípicos y genotípicos; permitiría entender mejor el proceso de colonización de este microorganismo.
2. En el presente trabajo, se observó efecto citopático en la monocapa de las células analizadas, lo anterior pone en evidencia la presencia de toxinas. La realización de ensayos de proteínas secretadas en los aislados de *Cronobacter* spp. positivos a esta prueba fenotípica de virulencia, serán de utilidad en la identificación de dichas proteínas mediante secuenciación y para su posterior caracterización bioquímica y biológica. El identificar las toxinas que participan en la patogénesis de *Cronobacter* spp.; principalmente las ligadas al cuadro clínico de ECN, nos proporcionarían blancos importantes para la detección oportuna y tratamiento de este microorganismo.
3. En el presente estudio se identificaron tres genes putativos de virulencia en los aislados de *Cronobacter* spp., el definir los niveles de expresión de dichos genes bajo diferentes condiciones nutricionales y ambientales, nos proporcionará información que posteriormente pudiera ser relacionada con el mecanismo de regulación de dichos genes y su posible participación en la patogénesis de la bacteria.
4. El fenotipo invasivo observado en el presente trabajo en la mayoría de los aislados clínicos y en algunos de origen ambiental, hace referencia a la importancia de determinar la o las proteínas involucradas en este proceso. Se sabe que *Cronobacter* spp. requiere de las proteínas OmpA y Cpa, para invadir diferentes líneas celulares; sin embargo, al seleccionar aquellos aislados positivos a este fenotipo y



Características asociadas a virulencia en especies de *Cronobacter* aisladas de diferentes ambientes

realizar un ensayo de mutación por transposición, podríamos acceder a nueva información que nos proporcione nuevos genes involucrados en este proceso.

5. El flagelo es considerada una estructura altamente inmunogénica, en patógenos como *Salmonella* y algunos patotipos de *E. coli*. *Cronobacter* spp., es una bacteria móvil por flagelos peritricos. El aislamiento, identificación y caracterización de esta estructura en *Cronobacter* spp., permitirá evaluar su capacidad de inducir citocinas pro- y anti-inflamatorias en diferentes líneas celulares (macrófagos derivados de monocitos humanos, intestinales o de origen cerebral), lo anterior para entender el mecanismo de patogénesis de la bacteria.
6. Establecer un modelo animal (ratas neonatas), que permita demostrar que los tres genes identificados en este trabajo como factores de virulencia, participan en el mecanismo de patogenicidad de *Cronobacter* spp.



XII. BIBLIOGRAFÍA



Almeida C., Azevedo N. F., Iversen C., Fanning S., Keevil C. W., y Vieira M. J. 2009. Development and Application of a Novel Peptide Nucleic Acid Probe for the Specific Detection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula. *Appl Environ Microbiol.* **75**(9):2925-30.

Amalaradjou M. A. y Venkitanarayanan K. 2011. Effect of trans-Cinnamaldehyde on Inhibition and Inactivation of *Cronobacter sakazakii* Biofilm on Abiotic Surfaces. *J Food Protect.* **74**(2):200-208.

Arseni A., Malamou-Ladas E., Koutsia C., Xanthou M., y E. Trikka. 1987. Outbreak of Colonization of Neonates with *Enterobacter sakazakii*. *J Hosp Infect.* **9**(2):143-150.

Baida G. E. y Kuzmin N. P. 1996. Mechanism of Action of Hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys Acta.* **1284**:122-124.

Baldwin A., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Kucerova E., Manning G., Dowson C. y Forsythe S. 2009. Multilocus Sequence Typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* Reveals Stable Clonal Structures with Clinical Significance which do not Correlate with Biotypes. *BMC Microbiol.* **9**:223.

Bar-Oz B., Preminger A., Peleg O., Block C., y Arad I. 2001. *Enterobacter sakazakii* Infection in Newborn. *Acta Pediatr.* **90**(3):356-358.

Baumgartner A., Grand M., Liniger M., y Iversen C. 2009. Detection and Frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Different Categories of Ready-to-Eat Foods other than Infant Formula. *Int J Food Microbiol.* **136**(2):189-192.



Beauchamp C. J., Simao-Beauvoir A. M., Beaulieu C., y Chalifour F. P. 2006. Confirmation of *E. coli* among other Thermotolerant Coliform Bacteria in Paper Mill Effluents, Wood Chips Screening Rejects and Paper Sludges. *Water Res.* **40**(12):2452–2462.

Bhat G. K., Anandhi R. S., Dhanya V. C. y Shenoy S. M. 2009. Urinary Tract Infection due to *Enterobacter sakazakii*. *Indian J Pathol Microbiol.* **52**(3): 430-431.

Biering G., Karlsson S., Clark N. C., E. Jonsdottir K., Ludvigsson P., y Steingrimsson O. 1989. Three Cases of Neonatal Meningitis Caused by *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk. *J Clin Microbiol.* **27**(9):2054–2056.

Breeuwer P., Lardeau A., Peterz M., y Joosten H. M. 2003. Desiccation and Heat Tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol.* **95**(3):967–973.

Caubilla-Barron J., Hurrel E., Townsend S., Cheetam P., Loc-Carrillo C., Fayet O., Prère M. F., y Forsythe S. J. 2007a. Genotypic and Phenotypic Analysis of *Enterobacter sakazakii* from an Outbreak Resulting in Fatalities in a Neonatal Intensive Care Unit in France. *J Clin Microbiol.* **45**(12):3979-3985

Caubilla-Barron J. y Forsythe S. 2007b. Dry Stress and Survival Time of *Enterobacter sakazakii* and Other *Enterobacteriaceae* in Dehydrated Powdered Infant Formula. *J Food Protect.* **70**(9):211-2117.

Clark N. C., Hill B. C., O’Hara C. M., Steingrimsson O., y Cooksey R. C. 1990. Epidemiologic Typing of *Enterobacter sakazakii* in Two Neonatal Nosocomial Outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **13**(6):467–472.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Cronobacter* species isolation in two infants - New Mexico, 2008. 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **58**(42):1179-1183.



Chen Y., Chang C., Chuang M. C., y Jeang, C. L. 2004. Characterization and Virulence of Hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. *Curr Microbiol.* **49**:175-179.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods of Antimicrobial Performance Standards for Antimicrobia Susceptibility Testing: Fourteenth informational supplement. CLSI document. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road. Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898. USA, 2007.

Cravioto A., Gross R.J., Scotland S. M., y Rowe B. 1979. An Adhesive Factor Found in Strains of *Escherichia coli* Belonging to the Traditional Infantile Enteropathogenic Serotypes. *Curr Microbiol.* **3**:95-99.

Dancer G. I., Mah J. H., y Kang D. H. 2009. Influences of Milk Components on Biofilm Formation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Lett Appl Microbiol.* **48**(6):718-725.

De Los Angeles Mosso M. D., Delarosa M .D., Vivar C., y Medina M. D. 1994. Heterotrophic Bacterial Populations in the Mineral Waters of Thermal Springs in Spains. *J Appl Bacteriol.* **77**:370-381.

Derzelle S. y Dilasser F. 2006. A Robotic DNA Purification Protocol and Real-Time PCR for the Detection of *Enterobacter sakazakii* in Powdered Infant Formulae. *BMC Microbiol.* **13**,6:100.

Donlan R. M., y Costerton J. W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* **15**(2):167-193.

Dudley D. J., Guentzel M. N., Ibarra M. J., Moore B. E., y Sagik B. P. 1980. Enumeration of Potentially Pathogenic Bacteria from Sewage Sludges. *Appl Environ Microbiol.* **39**(1):118-126.



Drudy, D., N. R. Mullane, T. Quinn, P. G. Wall, y Fanning S. 2006. *Enterobacter sakzakii*: An Emerging Pathogen in powdered Infant Formula. Clin Infect Dis. **42**: 996-1002.

Edelson-Mammel S. G., Porteous M. K., y Buchanan R. L. 2005. Survival of *Enterobacter sakzakii* in a Dehydrated Powdered Infant Formula. J Food Protect. **68**:1900-1902.

El-Sharoud W. M., O'Brien S., Negredo C., Iversen C., Fanning S., y Healy B. 2009. Characterization of *Cronobacter* Recovered from Dried Milk and Related Products. BMC Microbiol. **9**:24.

Evans N. J. y Rutter N. 1996. Development of the Epidermis in the Newborn. Biol Neonate. **49**:74-80.

Faraldo-Gomez J. D. y Sansom M. S. 2003. Acquisition of Siderophores in Gram-negative Bacteria. Nat Rev Mol Cell Biol. **4**(2):105-116.

Farber J. M. 2004. *Enterobacter sakzakii*-new foods for thought?. Lancet. **363**:5-6.

Farber J. M. y Forsythe S. J. 2008. Eds. Emerging issues in food safety: *Enterobacter sakzakii*. American Society of Microbiology. Washington D. C.

Farmer J. J. III, Hickmann A. M., y Brenner D. J. 1980. *Enterobacter sakzakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. Int J Syst Bacteriol. **30**:569-584.

Farmer III J. J., Davis R., Hickman-Brenner F. W., McWhorter A., Huntley G. P., Asbury M. A., Riddle C., Wathen-Grady H. G., Elias C., Fanning G. R., Steigerwalt A. G., O'Hara C. M., Morris K., Smith P. B., y Brenner J. 1985. Biochemical Identification of New Species and Biogroups of *Enterobacteriaceae* Isolated from Clinical Specimens. J Clin Microbiol. **21**:46-76.



Fernández Jiménez I. y De Las Cuevas Terán I. 2006. Protocolos de Neonatología: Enterocolitis Necrotizante Neonatal. Bol Pediatr. **46**:172-178.

Friedemann M. 2007. *Enterobacter sakazakii* In Food and Beverages (Other than Infant Formula and Milk Powder). Int J Food Microbiol. **116**(1):1-10.

Food and Agriculture Organization of the United Nations y World Health Organization Joint FAO/WHO. Activities on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods Call for data: *Enterobacter sakazakii* in follow-up formulae. Abril 2008.

Forsythe S. J. 2005. *Enterobacter sakazakii* and other Bacterial in Powdered Infant Milk Formula. Mattern Child Nutr. **1**:44-50.

Franco A. A, Hu L., Grim C. J, Gopinath G., Sathyamoorthy V., Jarvis K. G., Lee C., Sadowski J., Kim J., Kothary M. H., McCardell B. A. y Tall B. D. 2011a. Characterization of Putative Virulence Genes on the Related RepFIB Plasmids Harbored by *Cronobacter* spp. Appl Environ Microbiol. **77**(10):3255-3267.

Franco A. A., Kothary M. H., Gopinath G., Jarvis K. G., Grim C. J., Hu L., et al. 2011b. Cpa, the Outer Membrane Protease of *Cronobacter sakazakii*, Activates Plasminogen and Mediates Resistance to Serum Bactericidal Activity. Infect Immun. **79**(4):1578-1587.

Gallagher P. G. y Ball W. S. 1991. Cerebral Infarctions due to CNS Infection with *Enterobacter sakazakii*. Pediatr Radiol. **21**:135-136.

Gardiner G. E., O'Sullivan E., Kelly J., Autry M. A., Collins J. K., Ross R. P., y Santon C. 2000. Comparative Survival Rates of Human Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius*, Strains During Heat Treatment and Spray Drying. Appl Environ Microbiol. **66**(6):2605-2612.



Giovannini M., Verduci E., Ghisleni D., Salvatici E., Riva E., y Agostoni C. 2008. *Enterobacter sakazakii*: an Emerging Problem in Paediatric Nutrition. J Int Med Res. **36**(3):394–399

Gorvel J. P., y Moreno E. 2002. *Brucella* Intracellular Life: from Invasion to Intracellular Replication. Vet. Microbiol. **90**(1-4): 281-297.

Gosney M. 2008. *Enterobacter sakazakii* Bacteremia with Multiple Splenic Abscesses in a 75 Year Old Woman: Case Report. Age Ageing. **37**(2):236-238.

Grimm M., Stephan R., Iversen C., Manzardo G. G., Riedel T. R., Ruepp A., Frishman D., y Lehner A. 2008. Cellulose as an Extracellular Matrix Component Present in *Enterobacter sakazakii* Biofilms. J Food Protect. **71**(1):13-18.

Gurtler J. B., Kornacki J. L., y Beuchant L. R. 2005. *Enterobacter sakazakii* a Coliform of Increased Concern to Infant Health. Int J Food Microbiol. **104**(1):1-34.

Gurtler J. B. y Beuchat L. R. 2007. Inhibition of Growth of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Infant Formula by the Lactoperoxidase System. J Food Protect. **70**(9):2104-2110.

Guillaume-Gentil O., Sonnard V., Kandhai M. C., Marugg J. D., y Joosten H. 2005. A Simple and Rapid Cultural Medium for Detection of *Enterobacter sakazakii* in Environmental Samples. J Food Protect. **68**(1):64-69.

Hamilton J. M., Lehane M. J., y Braig H. R. 2003. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Midgut of *Stomoxys calcitrans*. Emerg Infect Dis. **9**:1355 -1356.



Hartmann I., Carranza P., Lehner A., Stephan R., Eberl L., y Riedel K. 2010. Genes Involved in *Cronobacter sakazakii* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol.* **76**(7):2251-2261.

Hassan A. A, Akineden O., Kress C., Estuningsih S., Schneider E., y Usleber E. 2007. Characterization of the Gene Encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and Development of a Species-Specific PCR Method. *Int J Food Microbiol.* **116**(2):214-20.

Healy B., Huynh S., Mullane N., O'Brien S., Iversen C., Lehner A. et al. 2009. Microarray-Based Comparative Genomic Indexing of the *Cronobacter* genus (*Enterobacter sakazakii*). *Int J Food Microbiol.* **136**(2):159-64.

Healy B., Cooney S., O'Brien S., Iversen C., Whyte P., Nally J., Callanan J. J., y Fanning S. 2010. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an Opportunistic Foodborne Pathogen. *Foodborne Pathog Dis.* **7**(4):339-50.

Himelrigh I., Harris E., Lorch V., Anderson M., Jones T., Craig A., Kuehnert M., Foster T., Arduino M., Jensen B., y Jernigan D. 2002. *Enterobacter sakazakii* Infections Associated with the Use of Powdered Infant Formula- Tennessee, 2001. *Morb Mort Week Rep.* **5**:298-300.

Hunter C. J., Petrosyan M., Ford H. R. y Prasadarao N. V. 2008a. *Enterobacter sakazakii*: an Emerging Pathogen in Infants and Neonates. *Surg Infect (Larchmt)* **9**(5):533-539.

Hunter C. J., Singamsetty V. K., Chokshi N. K., Boyle P., Camerini V., Grishin A. V., Upperman J. S., Ford H. R., y Prasadarao N. V. 2008b. *Enterobacter sakazakii* Enhances Epithelial Cell Injury by Inducing Apoptosis in a Rat Model of Necrotizing Enterocolitis. *J Infect Dis.* **198**(4): 586-593.



Hunter C., Williams M., Petrosyan M., Guner Y., Mittal R., Mock D., Upperman J. S., Ford H. R. y

Prasadarao N. V. 2009. *Lactobacillus bulgaricus* Prevents Intestinal Epithelial Cell Injury Caused by *Enterobacter sakazakii* Inducen Nitric Oxide both *In vitro* and in the Newborn Rat Model of Necrotizing Enterocolitis. *Infect Immun.* **77**(3):1031-1043.

Hurrell E., Kucerova E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., y Forsythe S. J. 2009a. Biofilm Formation on Enteral Feeding Tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae. *Int J Food Microbiol.* **136**(2):227-231.

Hurrell E., Kucerova E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Hilton A., Armstrong R., et al. 2009b. Neonatal Enteral Feeding Tubes as Loci for Colonization by Members of the Enterobacteriaceae. *BMC Infect Dis.* **9**:146.

Iversen C., Druggan P., y Forsythe S. 2004a. A Selective Differential Medium for *Enterobacter sakazakii*, a Preliminary Study. *Int J Food Microbiol.* **96**(2):133– 139.

Iversen C., y Forsythe S. 2004b. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from Powdered Infant Formula Milk and Related products. *Food Microbiol.* **21**:771-777.

Iversen C., Waddington M., Farmer J. J.III, y Forsythe S. J. 2006. The Biochemical Differentiation of *Enterobacter sakazakii* Genotypes. *BMC Microbiol.* **6**:94.

Iversen C. y Forsythe S. 2007. Comparasion of Media for the Isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol.* **73**(1):48-52.



Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., y Joosten H. 2007a. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. BMC Evol Biol. **7**:64.

Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., y Joosten H. 2007b. Identification of *Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*). J Clin Microbiol. **45**(11):3814-3816.

Iversen C., Druggan P., Schumacher S., Lehner A., Feer C., Gschwend K., Joosten H., y Stephan R. 2008. Development of a Novel Screening Method for the Isolation of ‘‘*Cronobacter*’’ spp. (*Enterobacter sakazakii*). Appl Environ Microbiol. **74**(8):2550-2553.

Jaradat Z. W., Ababneh Q. O., Saadoun I. M., Samara N. A., y Rashdan A. M. 2009 Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from Infant Food, Herbs and Environmental Samples and the Subsequent Identification and Confirmation of the Isolates Using Biochemical, Chromogenic Assays, PCR and 16S rRNA Sequencing. BMC Microbiol. **9**:225.

Jimenez E. y Jimenez C. 1982. Septic Shock Due to *Enterobacter sakazakii*. Clin Microbiol Newls. **4**:30.

Kandhai M. C., Reij W., Gorris L. G., Guillaume-Gentil O., y van Schothorst M. 2004. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. Lancet. **363**:39–40.

Keller R., Pedroso M., Ritchmann R., y Silva R. M. 1998. Occurrence of Virulence-Associated Properties in *Enterobacter cloacae*. Infect Immun. **166**:645-649.



Kilonzo-Nthenge A., Chen F. C., y Godwin S. L. 2008. Occurrence of *Listeria* and Enterobacteriaceae in Domestic Refrigerators. *J Food Protect.* **71**:608–612.

Kim K. S. 2003. Pathogenesis of Bacterial Meningitis: From Bacteraemia to Neuronal Injury. *Nat Rev Neurosc.* **4**:376-385.

Kim H., Ryu J-H., y Beuchat L. R. 2006. Attachment of and Biofilm Formation by *Enterobacter sakazkii* on Stainless Steel and Enteral Feeding Tubes. *Appl Environ Microbiol.* **72**(9):5846-5856.

Kim T. J., Chauhan S., Motin L. M., Goh E-V., Igo M. M. y Young M. G. 2007a. Direct Transcriptional Control of the Plasminogen Activator Gene of *Yersinia pestis* by the Cyclic AMP Receptor Protein. *J. Bacteriol.* **189**(24):8890–8900.

Kim H., Ryu J. H., y Beuchat L. R. 2007b. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* **73**(4):1256–1265.

Kim H., Bang J., Beuchat L. R., y Ryu J. H. 2008. Fate of *Enterobacter sakazakii* Attached to or in Biofilms on Stainless Steel upon Exposure to Various Temperatures or Relative Humidities. *J Food Protect.* **71**(15):940–945.

Kim K., Jang S. S., Kim S. K., Park J. H., Heu S., y Ryu S. 2009. Prevalence and Genetic Diversity of *Enterobacter sakazakii* in Ingredients of Infant Foods. *Int J Food Microbiol.* **122**(1-2): 196-203.

Kim K., Kim K. P., Choi J., Lim J. A., Lee J., Hwang S., et al. 2010. Outer membrane Proteins A (OmpA) and X (OmpX) are Essential for Basolateral Invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol.* **76**(15):5188-5198.



Kucerova E., Clifton S. W., Xia X. Q., Long F., Porwollik S., Fulton L., et al. 2010. Genome Sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and Comparative Genomic Hybridization Analysis with other *Cronobacter* species. PLoS One. **5**(3):e9556.

Kuhnert P., Korczak B. M., Stephan R., Joosten H., e Iversen C. 2009. Phylogeny and Prediction of Genetic Similarity of *Cronobacter* and Related Taxa by Multilocus Sequence Analysis (MLSA). Int J Food Microbiol. **136**(2):152-8.

Kuzina L. V., Peloquin J. J., Vacek Don C., y Miller T. A. 2001. Isolation and Identification of Bacteria Associated with Adult Laboratory Mexican Fruit Flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). Curr Microbiol. **42**(4):290–294.

Lai K. 2001. *Enterobacter sakazakii* Infections Among Neonatos, Children and Adults. Medicine. **80**(2):113-122

Li Q., Zhao W. D., Zhang K., Fang W. G., Hu Y., Wu S. H. y Chen Y. H. 2010. PI3K- Dependent Host Cell Actin Rearrangements are Required for *Cronobacter sakazakii* Invasion of Human Microvascular Endothelial Cells. Med Microbiol Immunol. **199**(4):333-340.

Lehner A., Tasara T., y Stephan R. 2004. 16S rRNA Gene Based Analysis of *Enterobacter sakazakii* Strains from Different Sources and Development of PCR Assays for Identification. BMC Microbiol. **4**:43.

Lehner R. G. K., Nitzche S., Breeuwer S., Diep P., Thelen K., y Stephan R. 2006. Comparison of Two Crhomogenic Media and Evaluation of Two Molecular Base Identification Systems for *Enterobacter sakazakii* Detection. BMC Microbiol. **6**:15.



Liu Y., Gao Q., Zhang X., Hou Y., Yang J., y Huang X. 2006a. PCR and Oligonucleotide Array for Detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. *Mol Cell Probes.* **20**(1):11-17.

Liu Y., Cai X., Zhang X., Gao Q., Yang X., Zheng Z., Luo M., y Huang X. 2006b. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for Detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. *J Microbiol Methods.* **65**(1):21-31.

Mange J. P., Stephan R., Borel N., Wild P., Kim K. S., Pospischil A., y Lehner A. 2006. Adhesive Properties of *Enterobacter sakazakii* to Human Epithelial and Brain Microvascular Endothelial Cells. *BMC Microbiol.* **6**:1-10.

Mareè D., Botha S., y Corli Witthuhn R. 2008. Evaluation of Different Methods for the Detection and Identification of *Enterobacter sakazakii* Isolated from South Africa Infant Formula Milks and the Processing Environment. *Int J Food Microbiol.* **127**(1-2):129-138.

Marlony B. y Wagner M. 2005. Detection of *Enterobacter sakazakii* Strains by Real Time PCR. *J Food Protect.* **68**(8):1623-1627.

Miethke M., y Marahiel, M.A. 2007. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev.* **71**(3):413-451.

Miled-Bennour R., Ells T. C., Pagotto F. J., Farber J. M., Kerouanton A., Meheut T., Colin P., Joosten H., Leclercq A., y Besse N. G. 2010. Genotypic and Phenotypic Characterisation of a Collection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) Isolates. *Int J Food Microbiol.* **139**(1-2):116-125.



Mittal R., Wang Y., Hunter C. J., Gonzalez-Gomez I., y Prasadarao N. V. 2009. Brain Damage in Newborn Rat Model of Meningitis by *Enterobacter sakazakii* a Roe for Outer Membrane Protein A. Lab Invest. **89**(3):263-277.

Mohan Nair M. K. y Venkitanarayanan K. S. 2006. Cloning and Sequencing of the *ompA* Gene of *Enterobacter sakazakii* and Development of an *ompA*-Targeted PCR for Rapid Detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. Appl Environ Microbiol. **72**(4):2539-2546.

Mohan Nair M.K. y Venkitanarayanan K. S. 2007. Role of Bacterial OmpA and Host Cytoskeleton in the Invasion of Human Intestinal Epithelial Cells by *Enterobacter sakazakii*. Pediatr. Res. **62**(6):664–669.

Mohan Nair M. K., Venkitanarayanan K., Silbart L. K., y Kim K. S. 2009. Outer Membrane Protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* Binds Fibronectin and Contributes to Invasion of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. Foodborne Pathog Dis. **6**(4):495-501.

Molloy C., Cagney C., O'Brien S., Iversen C., Fanning S. y Duffy G. 2009. Surveillance and Characterisation by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Cronobacter* spp. in Farming and Domestic Environments, Food Production Animals and Retail Foods. Int J Food Microbiol. **136**(2):198-203.

Monroe P. W. y Tift W. L. 1979. Bacteremia Associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow pigmented *Enterobacter cloacae*). J Clin Microbiol. **10**(6):850–851.

Mramba F., Broce A. B., y Zurek L. 2007. Vector Competence of Stable Flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Dipteria: Muscidae). J Vect Ecol. **32**(1):134-139.



Mullane N. R., Iversen C., Healy B., Walsh C., Whyte P., Wall P. G., Quinn T., y Fanning S. 2007a. *Enterobacter sakazakii* an Emerging Bacterial Pathogen with Implications for Infant Health. *Minerva Pediatr.* **59(2)**:137–148.

Mullane N. R., White P., Wall P. G., Quinn T., y Fanning S. 2007b. Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis to Characterized and Trace the Prevalence of *Enterobacter sakazakii*. *Int J Food Microbiol.* **116(1)**:73-81.

Mullane N., Healy B., Meade J., Whyte P., Wall P. G., y Fanning S. 2008a. Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Powdered Milk Protein Manufacturing Facility. *Appl Environ Microbiol.* **74(19)**:5913-5917.

Mullane N. R., Ryan M., Iversen C., Murphy M., O’Gaora P., Quinn T., Whyte P., Wall P. G., y Fanning S. 2008b. Development of Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis for the Molecular Subtyping of *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol.* **74(4)**:1223-1231.

Musil I., Jenesen V. Schilling J., Ashdown B., y Kent T. 2010. *Enterobacter cloacae* Infection of an Expanded Polytetrafluoroethylene Femoral-Popliteal Bypass Graft: a Case Report. *J Medical Case Reports.* **4**:131.

Muytjens H. L., Zanen H. C., Sonderkamp H. J., Kollee L. A., Wachsmuth I. K., y Farmer J.J. III. 1983. Analysis of Eight Cases of Neonatal Meningitis and Sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol.* **18(1)**:115-120.



Muytjens H. L., van der Ros-van de Repe J., y van Druten H. A. M. 1984. Enzymatic Profiles of *Enterobacter sakazakii* and Related Species with Special Reference to the Alpha Glucosidase Reaction and Reproducibility of the Test System. J Clin Microbiol. **20**:684-686.

Muytjens H. L. y van der Ros-van de Repe J. 1986. Comparative *in vitro* Susceptibilities of Eight *Enterobacter* Species, with Special Reference to *Enterobacter sakazakii*. Antimicrob Agents Chemother. **29**(2):367-370.

Muytjens H. L., Roelofs-Willemse H., y Jaspar G. H. 1988. Quality of Powdered Substitutes for Breast Milk with Regard to Members of the Family Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. **26**(4):743-746.

Muytjens H. L. y VAN DER ROS-VAN DER REPE J. 1989. Comparative In Vitro Susceptibilities of Eight *Enterobacter* with Special Reference to *Enterobacter sakazakii*. Antimicrob Agents Chemother. **29**:367-370.

Nazarowec-White M., y Farber J. M. 1997. *Enterobacter sakazakii*: a review. Int J Food Microbiol. **34**(2):103-111.

Nazarowec-White M. y Farber J. M. 1999. Phenotypic and Genotypic Typing of Food and Clinical Isolates of *Enterobacter sakazakii*. J Med Microbiol. **48**(6):559-567.

Nicholson T. F., Watts K. M. y Hunstad D. A. 2009. OmpA of Uropathogenic *Escherichia coli* Promotes Postinvasion Pathogenesis of Cystitis. Infect Immun. **77**(12): 5245-5251.



O'Brien S., Healy B., Negrodo C., Fanning S., e Iversen C. 2009b. Evaluation of a New One-Step Enrichment in Conjunction with a Chromogenic Medium for the Detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula. J Food Prot. **72**(7):1472-5.

Oh S. y Kang D. 2004. Fluorogenic Selective and Differential Medium for Isolation of *Enterobacter sakazakii*. Appl Environ Microbiol. **70**(9):5692-5694.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación y Organización Mundial de la Salud, Comisión del Códex Alimentarius. Anteproyecto de la Revisión del Código Internacional Recomendado de Prácticas para los Alimentos de Lactantes y Niños Pequeños Diciembre 2004.

Osaili T. M., Shaker R. R., Al-Haddaq M. S., Al-Nabulsi A. A., y Holley R. A. 2009. Heat Resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in Milk and Special Feeding Formula. J Appl Microbiol. **107**(3):928-35.

Pagotto F. J., Nazarowec-White M., Bidawid S., y Farber J. M. 2003. *Enterobacter sakazakii*: Infectivity and Enterotoxin Production *in vitro* and *in vivo*. J Food Prot. **66**(3):370-375.

Peeters E., Nelis H.J., y Coenye T. 2008. Comparison of Multiple Methods for Quantification of Microbial Biofilms Grown in Microtiter Plates. J Microbiol Methods. **72**(2):157-165.

Pizarro-Cerda J., y Cossart P. 2006. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. Cell. **124**(4):715-727.

Poudry I., Bouglè D., Coton E., Coton M., Leclercq R., y Vergnaud M. 2007. Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and Sequencing of the *fliC* gene. J Appl Microbiol. **104**(1):26-34.



Poudry I., Bouglé D., Leclercq R., y Vergnaud M. 2008. Tracing of *Enterobacter sakazakii* Isolates in Infant Milk Formula Processing by BOX-PCR Genotyping. J Appl Microbiol. **105**(2):550-558.

Reina J., Parras F., Gil J., Salva F., y Alomar P. 1989. Human Infection Caused by *Enterobacter sakazakii*. Microbiological Considerations. Enferm Infecc Microbiol Clin. **7**(3):147-150.

Restaino L., Frampton E. W., Lionberg W. C., y Becker R. J. 2006. A Chromogenic Plating Medium for the Isolation and Identification of *Enterobacter sakazakii* from Foods, Food Ingredients and Environmental Sources. J Food Prot. **69**(3): 315-322.

Rosario C., Puente J. L., Verdugo-Rodríguez A., Anderson R. y Eslava C. 2005. Phenotypic Characterization of *ipaH Escherichia coli* Strains Associated with Yolk Sac Infection. Avian Dis. **49**:409-417.

Sebbane F., Jarrett O., Gardner, D., Long, D. y Hinnebusch, J. 2006. Role of the *Yersinia pestis* Plasminogen Activator in the Incidence of Distinct Septicemic and Bubonic Forms of Flea-Borne Plague. Proc Natl Acad Sci U S A. **103**(14):5523-5530.

Schmid, M., Iversen, C., Gontia, I., Stephan, R., Hofmann, A., Hartmann, A., Jha B., Eberl L., Riedel K., y Lehner A. 2009. Evidence for a Plant-Associated Natural Habitat for *Cronobacter* spp. Res Microbiol. **160**(8): 608-614.

Schmitt C. K., Meysick K. C. y O'Brien A. 1999. Bacterial Toxins: Friends or Foes?. Emerg Infect Dis. **224**:224-234.

Seo K. H. y Brackett R. E. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. J Food Prot. **68**(1):59-63.



Simmons B. P., Gelfand M. S., Haas M., Metts L., y Ferguson J. 1989. *Enterobacter sakazakii* Infections in Neonates Associated with Intrinsic Contamination of a Powdered Infant Formula. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **10**(9):398–401.

Singamsetty V. K., Wang Y., Shimada H., y Prasadarao N. V. 2008. Outer Membrane Protein A Expression in *Enterobacter sakazakii* is Required to Induce Microtubule Condensation in Human Brain Microvascular Endothelial Cells for Invasion. *Microb Pathog.* **45**(3):181-191.

Stephan R., Lehner A., Tischler P. y Rattei T. 2011. Complete Genome Sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a Food-Borne Pathogen Causing Deaths in Neonates. *J Bacteriol.* **193**(1):309-310.

Stock I. y Wiedemann B. 2002. Natural Antibiotic Susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* Strains. *Clin Microbiol Infect.* **8**(9):564-578.

Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., y Swaminathan B. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* **33**(9):2233-2239.

Tortollero M. J. 2004. A Medium for the Presumptive Detection of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. *Food Microbiol.* **21**:527-533.

Townsend S., Hurrell E., Gonzalez-Gomez I., Lowe J., Frye J. G., Forsythe S., y Badger J. L. 2007a. *Enterobacter sakazakii* Invades Brain Capillary Endothelial Cells, Persists in Human Macrophages Influencing Cytokine Secretion and Induces Severe Brain Pathology in the Neonatal Rat. *Microbiology.* **153**(Pt 10):3538-47.



Townsend S., Caubilla Barron J., Loc-Carrillo C., y Forsythe S. 2007b. The Presence of Endotoxin in Powdered Infant Formula Milk and the Influence of Endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on Bacterial translocation in the infant rat. *Food Microbiol.* **24**(1):67-74.

Townsend S., Hurrell E., y Forsythe S. 2008. Virulence Studies of *Enterobacter sakazakii* Isolates with a Neonatal Intensive Care Unit Outbreak. *BMC Microbiol.* **8**:64.

Urmenyi, A.M.C. y Franklin A. W. 1961. Neonatal Death from Pigmented Coliform Infection. *Lancet.* **1**:313-315.

van Acker J., Smet F., Muyldermans G., Bougateg A., Naessens A., y Lauwers S. 2001. Outbreak of Necrotizing Enterocolitis Associated with *Enterobacter sakazakii* in Powdered Milk Formula. *J Clin Microbiol.* **39**(1):293-297.

Walsh D., Molloy C., Iversen C., Carroll J., Cagney J., Fanning S. and Duffy G. 2011. Survival characteristics of environmental and clinically derived strains of *Cronobacter sakazakii* in infant milk formula (IMF) and ingredients. *Appl. Microbiol.* **110**(3):697-703.

Weir E. 2002. Powdered Infant Formula and Fatal Infection with *Enterobacter sakazakii*. *CMAJ.* **166**(12):1570.

Witthuhn R. C., Kemp F., y Britz T. J. 2007. Isolation and PCR Detection of *Enterobacter sakazakii* in South African Food Products, Specially Infant Formula Milks. *World J Microbiol Biotechnol.* **23**:151-157.

Wu H. J., Wang A. H., y Jennings M. P. 2008. Discovery of Virulence Factors of Pathogenic Bacteria. *Curr Opin Chem Biol.* **12**(1):93-101.



Xicohtencatl-Cortes J., Monteiro-Neto V., Saldana Z., Ledesma M.A., Puente J. L., y Giron J.A. 2009. The Type 4 Pili of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are Multipurpose Structures with Pathogenic Attributes. *J Bacteriol.* **191**(1):411-421.

Ye. Y., Wu Q., Zhou Y., Dong X., y Zahng J. 2008. Analysis of Major Band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and Development of a Species-Specific PCR for Detection of *Enterobacter sakazakii* in Dry Food Samples. *J Microbiol Methods.* **75**:392-397

Yan X., Gurtler J., Fratamico P., Hu J., Gunther N. W. IV, Juneja V. y Huang L. 2011. Comprehensive Approaches to Molecular Biomarker Discovery for Detection and Identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) and *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol.* **77**(5):1833-843.

Zogaj X, W. Bokranz, M. Nimitz y Romling U. 2003. Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family Enterobacteriaceae Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. *Infect Immun.* **71**:4151–4158.