

Aplicación de tecnologías no-térmicas de conservación, pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), y altas presiones hidrostáticas (APH), para el control de *Cronobacter sakazakii* en fórmula láctea infantil: desarrollo de modelos predictivos y valoración de la exposición

MARÍA CONSUELO PINA PÉREZ

EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**Aplicación de tecnologías no térmicas de conservación,
pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) y altas
presiones hidrostáticas (APH), para el control de
Cronobacter sakazakii en fórmulas lácteas infantiles:
desarrollo de modelos predictivos y
evaluación de la exposición**

Presentada por:
MARIA CONSUELO PINA PÉREZ
Para optar al título de
DOCTOR por la
Universidad Politécnica de Valencia

Directores:
Dr. Antonio Martínez López
Dra. Maria Dolores Rodrigo Aliaga

Valencia, 2011



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Esta editorial es miembro de la UNE, lo que garantiza la difusión y comercialización de sus publicaciones a nivel nacional e internacional.

© Pina Pérez, María Consuelo

Primera edición, 2012

© de la presente edición:

Editorial Universitat Politècnica de València
www.editorial.upv.es

ISBN: 978-84-8363-825-5 (versión impresa)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

D. Antonio Martínez López, Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor de Investigación del CSIC, y Dña. M^a Dolores Rodrigo Aliaga, Doctor Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia, Científico Titular del CSIC, ambos en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICAN que

Doña M^a Consuelo Pina Pérez, Ingeniero Agrónomo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Aplicación de tecnologías no térmicas de conservación, pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) y altas presiones hidrostáticas (APH), para el control de *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles: desarrollo de modelos predictivos y evaluación de la exposición”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 2 de Abril de 2011.

Fdo. D. Antonio Martínez López

Director de tesis

Fdo. Dña M^a Dolores Rodrigo Aliaga

Directora de tesis

IATA (CSIC)
Avda Agustín Escardino,
46980 Paterna (VALENCIA)
TEL: 96 363 00 22
FAX:

María Consuelo Pina Pérez ha disfrutado de una beca JAE-Predoctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (JAE-Pre 088 BOE nº 305, 21/12/2007) para el desarrollo de la presente tesis doctoral llevada a cabo en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia.

Este trabajo ha sido co-financiado por:

- Proyecto de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL 2003-05236-C02-01) “Optimización y validación de procesos mínimos de conservación de un nuevo alimento funcional líquido mediante aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), solos o con calor”.
- Proyecto de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL 2006-13320-C03- 01/ALI) “Optimización de procesos mínimos de conservación en alimentos líquidos, mediante la aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) y Altas Presiones Hidrostáticas, para garantizar la seguridad alimentaria”
- Ayudas para la realización de acciones especiales I+D+I de la Generalitat Valenciana (AE/2007/151): “Estudio de la Aplicación de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad en la Pasterización de leche para biberones en Hospitales de la Comunidad Valenciana”

La presente tesis doctoral está enmarcada en el programa de doctorado con mención de calidad de Biotecnología (Ministerio de Educación MCD2006-00536) de la Universidad Politécnica de Valencia.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis significa mucho para mí. Con ella pongo fin a una etapa muy especial, en la que he guardado en el corazón, día a día, miles de recuerdos maravillosos, y en la que he aprendido mucho. Ha sido una etapa intensa y de esfuerzo. Precisamente por ello he aprendido la mejor lección con la que inicio el camino hacia un futuro lleno de esperanzas: *las personas que se cruzan en nuestra vida, por poco tiempo que permanezcan en ella, dejan en nosotros una huella. De todo lo que la vida nos da en cada etapa, las personas son lo más importante. Podremos ganar o perder batallas, metas, e ilusiones, pero lo que no perderemos será el apoyo de alguien que nos quiere y nos dedica su tiempo.* Trataré de ser yo misma y dar lo mejor de mí para responder a todas esas personas que siempre están ahí. Son ellos quienes merecerán siempre todo mi agradecimiento.

A la memoria de **D. Miguel Rodrigo Enguídanos**, pilar fundamental en mi paso por el IATA. A quien debo valiosas palabras de las que, muy atenta, tome nota. A quien recuerdo todos los días que entro en nuestro laboratorio, como aquel día en que entré por primera vez. De quien siento profundamente su falta, por estar segura de las muchas cosas que de su persona y profesionalidad, podía haber aprendido. Nunca le olvidaré.

A los doctores **D. Antonio Martínez López** y **Dña. María Dolores Rodrigo Aliaga**, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo y por haberme guiado enseñándome día a día, lo que significa ser un “*buen científico*”. A D. Antonio Martínez, por ser un jefe y amigo maravilloso con el que el camino diario se hace más llevadero. Por escuchar lo que tenía que decir y, por rectificarme cuando me equivoco. Por sacarme cada mañana una sonrisa con la que empezar el día. **Gracias Antonio.** A Dña M^a Dolores Rodrigo, por ser desde que la conocí, el mejor ejemplo de que con esfuerzo, trabajo y optimismo, los sueños se hacen realidad. Por mostrarse siempre cercana, y dispuesta a ayudarme en todo. Por abrirme los ojos en muchas circunstancias y experiencias del laboratorio y de la vida. Por ser mi jefa, compañera y amiga. **Gracias Loles.**

A **mis compañeros de laboratorio**, Alejandro, Fernando, Carmen y Daniela. Por haber sido mis amigos y compañeros durante los 4 años que compartimos como becarios predoctorales. Porque nos reímos infinitas veces y estos años están llenos de anécdotas para recordar. Por esos “*plannings imposibles*” de cumplir. Porque aprendimos los unos de los otros, cada uno aportando algo diferente. Porque compartíamos una segunda casa, el IATA. A Angela, y Clara, que llegando un poco más tarde, también se han convertido en compañeras y amigas. A vosotras que empezais, mucho ánimo chicas! Estoy para lo que necesitéis

A **Cheche**, que como técnico del laboratorio ha velado por ser nuestra amiga, y por ofrecer siempre la mejor sonrisa, bien compartiendo sus vivencias, o interesándose por las nuestras. Por tratarnos con humildad y compañerismo, ofreciendo su experiencia y valor humano de forma incondicional.

A los doctores **Pablo Fernández Escámez, Paula Periago Bayonas, Ana María Frígola Canovés, y María José Esteve Más**, porque gracias a su estrecha colaboración con el grupo, he podido conocer en estos años a unos muy buenos profesionales y excepcionales personas.

A todo **el personal del IATA**, administración, gerencia, almacén, biblioteca, informática, mantenimiento, planta piloto, limpieza, recepción, seguridad...por tener siempre la mejor disposición y contribuir de forma inestimable a la labor científica desde el ámbito que a cada uno le compete.

A **mis amigos y compañeros de Agrónomos**, porque cuando empezamos primer curso en E.T.S.I.A (UPV), no sabíamos de qué forma la vida guiaría nuestros caminos. Hoy miro atrás y veo un grupo de amigos que sigue compartiendo ilusiones y risas. El mejor regalo es que tus amigos se alegren por ti y compartan contigo los momentos importantes de la vida. En especial, gracias Juanví, Alfonso y Maria.

A mis padres, porque me han dado TODO lo que tengo, y lo que soy. Sois las personas que más admiro y quiero, porque habéis hecho de mi vida, algo perfecto. Gracias por vuestro amor y apoyo incondicional. Gracias por darme todo lo que tenéis y lo que sois. El mejor regalo a mis éxitos es ver en vuestros ojos esa luz de orgullo y felicidad. Y en los momentos no tan buenos, tener vuestro apoyo me da aliento, me hace ver la vida con otros ojos, y esperar que se abra una ventana cuando se cierra una puerta. Os merecéis TODO La única forma de devolveros lo que hacéis por mí, es esforzarme cada día por ser mejor. Seguiré trabajando y aprendiendo a ser mejor persona y profesional. Os quiero.

A mi hermana Raquel, por ser tan especial. Eres la palabra, la sonrisa, el gesto, la ilusión, el consejo, el apoyo, que siempre he necesitado y necesitaré. Esta tesis te la dedico porque en todos estos años me has visto trabajar duramente, te has preocupado por mí, y me has apoyado en los momentos más difíciles. Nos hemos reído y llorado juntas, y eso no tiene precio. Gracias por tu cariño y por tu compañía. Por alegrarte por mí cuando consigo algo, y animarme cuando algo me sale mal. Gracias por creer en mí, incluso más que yo misma. SIEMPRE estás ahí. Nunca sabrás cuanto te quiero y te valoro.

A Alejandro, porque ya no concibo mi vida sin ti. Por ser mi amor, mi amigo, y mi compañero desde mis inicios en el IATA. Gracias por entregarme todo de TÍ, e intentar ser mejor a mi lado. Gracias por quererme como soy, sin cambiar NADA. Esta tesis está llena de recuerdos contigo y te la dedico especialmente a tí. Gracias por despertar mi corazón y mi sonrisa cada día; y por el mejor regalo de nuestras vidas, Víctor.

A Víctor, a quien dedico todo mi tiempo y a quien regalo lo mejor de mí. Por descubrirme un nuevo significado para la palabra amor, un nuevo sonido para la risa, y como las pequeñas cosas se convierten en las más grandes, si las veo a través de tus ojos. Eres un TESORO

A mis Padres y Hermana

A Víctor y Alejandro



ÍNDICE

INDICE	i
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	xiii
INDICE DE ESQUEMAS	xvii
ABREVIATURAS	xix
RESÚMENES	xxv
<hr/>	
I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA	1
<hr/>	
II. INTRODUCCIÓN	5
II.1 ALIMENTACIÓN INFANTIL: HISTORIA Y ACTUALIDAD.....	5
II.1.1. Alimentación del lactante sano.....	7
II.1.2. Bebés prematuros y lactancia materna.....	8
II.2 FÓRMULAS INFANTILES (IFM).....	9
II.2.1 Fórmula infantil vs. Lactancia materna.....	9
II.2.2 Tipos de fórmulas.....	10
II.2.3 El mercado de las fórmulas infantiles en España.....	11
II.2.4 Proceso de producción de IFM.....	13
II.2.4.1. Fórmula infantil líquida: Tratamiento térmico.....	13
II.2.4.2 Fórmula infantil en polvo (PIFM).....	14
II.3 DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO: <i>Cronobacter sakazakii</i> (<i>Enterobacter sakazakii</i>).....	16
II.3.1 Riesgo de las fórmulas infantiles en polvo.....	16
II.3.2 <i>Cronobacter sakazakii</i> . Antecedentes en IFM.....	16
II.3.3 Vías de contaminación por <i>Cronobacter sakazakii</i>	20
II.3.4 Buenas prácticas en la reconstitución de PIFM.....	21
II.4 TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS.....	23
II.4.1 Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI).....	23
II.4.1.1 Fundamentos.....	23
II.4.1.2 Sistemas de tratamiento por PEAÍ.....	24
II.4.1.3 Factores de influencia en el tratamiento por PEAÍ: Biológicos y de proceso	
II.4.1.3.1 Factores Biológicos.....	26
II.4.1.3.2 Factores de proceso.....	26
II.4.1.4 Mecanismo de inactivación microbiana por PEAÍ.....	29
II.4.1.5 Daño celular producido por el tratamiento.....	29
II.4.2 Altas Presiones Hidrostáticas (APH).....	30
II.4.2.1 Historia y fundamentos.....	30
II.4.2.2 Sistemas de tratamiento por APH.....	32

ÍNDICE

II.4.2.3 Factores de influencia en el tratamiento por APH.....	35
II.4.2.3.1 Factores Biológicos.....	35
II.4.2.3.2 Factores de Proceso.....	36
II.4.2.4 Mecanismo de inactivación microbiana por APH.....	37
II.4.2.5 Daño celular producido por el tratamiento.....	38
II.5 Ingredientes Naturales con CAPACIDAD ANTIMICROBIANA.....	39
II.5.1 Factores de influencia en la actividad antimicrobiana de ciertas sustancias.....	40
II.5.2 Mecanismo de inhibición/inactivación microbiana por AN.....	40
II.5.3 Efecto sinérgico de los AN y las nuevas tecnologías de conservación: PEAI y APH.....	42
II.6 MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DEL COMPORTAMIENTO MICROBIANO: CRECIMIENTO E INACTIVACIÓN.....	44
II.6.1 Microbiología Predictiva.....	44
II.6.2 Clasificación de los modelos predictivos.....	45
II.6.3 Microbiología predictiva y seguridad alimentaria.....	55
II.7 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO (QMRA).....	55
II.7.1 Aproximaciones deterministas y estocásticas del QMRA.....	58
II.7.2 Software de análisis.....	60
II.7.2.1 Herramientas de aplicación al QMRA.....	60
II.7.2.1.1 Best Fit.....	60
II.7.2.1.2 Simulación de Monte Carlo (SMC).....	61
II.7.2.1.3 Análisis de sensibilidad.....	61

III.OBJETIVOS 65

IV.PLAN DE TRABAJO 69

V. RESULTADOS	77
CAPITULO V.1 EVALUACIÓN DE MODELOS MATEMÁTICOS EN EL CRECIMIENTO DE <i>Enterobacter sakazakii</i> A DIFERENTES TEMPERATURAS	
V.1.1 Abstract.....	83
V.1.2 Introducción.....	85
V.1.3 Objetivos.....	86
V.1.4 Material y Métodos.....	86
V.1.4.1 Reconstitución del liófilo.	86
V.1.4.2 Fórmula Infantil en polvo reconstituida (RPIFM).....	87
V.1.4.3 Inoculación.....	87
V.1.4.4 Modelización Matemática.....	88
V.1.4.4.1 Modelos primarios.....	88
V.1.4.4.2 Modelos secundarios.....	89
V.1.4.5 Análisis de datos y modelos matemáticos.....	90
V.1.5 Resultados.....	90
V.1.6 Conclusiones.....	100
V.1.7 Referencias.....	101
CCAPITULO V.2 INACTIVACIÓN DE <i>Enterobacter sakazakii</i> POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS (APH) EN FÓRMULA INFANTIL RECONSTITUIDA (RPIFM) Y AGUA DE PEPTONA TAMPONADA (BPW)	
V.2.1 Cinéticas de Inactivación.....	105
V.2.1.1 Abstract.....	107
V.2.1.2 Introducción.....	109
V.2.1.3 Objetivos.....	111
V.2.1.4 Material y Métodos.....	111
V.2.1.4.1 Cultivo del microorgnaismo.....	111
V.2.1.4.2 Preparación del inóculo de <i>E. sakazakii</i>	112
V.2.1.4.3 Fórmula infantil en polvo (PIFM).....	112
V.2.1.4.4 Tratamiento de las muestras por APH.....	113
V.2.1.4.5 Recuento de supervivientes.....	113
V.2.1.4.6 Modelización matemática.....	114
V.2.1.4.6.1 Modelo de Bigelow.....	114
V.2.1.4.6.2 Modelo de Weibull.....	114
V.2.1.4.6.3 Modelo Log-logistic.....	115
V.2.1.4.6.4 Modelo de Gompertz.....	115
V.2.1.4.6.5 Modelo de Baranyi.....	115
V.2.1.4.7 Análisis y evaluación de modelos.....	116

ÍNDICE

V.2.1.5 Resultados.....	116
V.2.1.5.1 Influencia del sustrato.....	116
V.2.1.5.2 Cinéticas de Inactivación.....	117
V.2.1.6 Conclusiones.....	126
V.2.1.7 Referencias.....	128
V.2.2 Detección de daño subletal por técnicas proteómicas en células de <i>Enterobacter sakazakii</i> tras diferentes tratamientos por APH en RPIFM y BPW.....	133
V.2.2.1 Abstract.....	135
V.2.2.2 Introducción.....	135
V.2.2.3 Objetivos.....	136
V.2.2.4 Material y Métodos.....	136
V.2.2.4.1 Preparación de suspensiones celulares para el tratamiento por APH.....	136
V.2.2.4.2 Tratamiento por APH.....	136
V.2.2.4.3 Detección daño subletal por APH. Análisis del patrón proteico.....	137
V.2.2.4.3.1 Preparación del extracto proteico.....	137
V.2.2.4.3.2 Cuantificación de las proteínas en la muestra.....	137
V.2.2.4.3.3 Electroforesis bidimensional (EF-2D).....	138
V.2.2.4.3.3.1 Primera dimensión (Isoelectroenfoque).....	138
V.2.2.4.3.3.2 Segunda dimensión.....	139
V.2.2.4.3.3.3 Tinción.....	140
V.2.2.4.3.4 Análisis de imagen y cuantificación.....	140
V.2.2.5 Resultados y Discusión.....	141
V.2.2.5.1 Células de <i>E. sakazakii</i> tratadas por APH.....	141
V.2.2.6 Conclusiones.....	144
V.2.2.7 Referencias.....	145

CAPITULO V.3 INACTIVACIÓN DE *Enterobacter sakazakii* POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD (PEAI) EN MEDIO DE REFERENCIA (BUFFERED PEPTONE WATER, BPW) Y FÓRMULA INFANTIL EN POLVO RECONSTITUIDA (RPIFM)

V.3.1 Abstract.....	151
V.3.2 Introducción.....	152
V.3.3 Objetivos.....	153
V.3.4 Material y Métodos.....	153
V.3.4.1 Cultivo Microbiológico.....	153
V.3.4.2 Sustratos e Inoculación.....	154

V.3.4.3 Equipo de tratamiento por PEAI.....	154
V.3.4.4 Medida de propiedades físicas.....	155
V.3.4.5 Análisis estadístico.....	156
V.3.4.6 Modelización matemática.....	157
V.3.4.6.1 Bigelow.....	157
V.3.4.6.2 Función de distribución de Weibull.....	157
V.3.5 Resultados.....	157
V.3.6 Discusión.....	166
V.3.7 Conclusión.....	169
V.3.8 Referencias.....	170

CAPITULO V.4 ESTUDIO DEL DAÑO SUBLETAL CAUSADO EN CÉLULAS DE *Cronobacter sakazakii* TRATADAS POR PEAI EN FÓRMULA EN POLVO RECONSTITUIDA Y MEDIO DE REFERENCIA (BPW)

V.4.1 Abstract.....	177
V.4.2 Introducción.....	178
V.4.3 Objetivos.....	180
V.4.4 Material y Métodos.....	180
V.4.4.1 Ceba.....	180
V.4.4.2 Tratamiento por PEAI y detección de daño subletal.....	187
V.4.4.2.1 Preparación de suspensiones celulares para el tratamiento por PEAI.....	181
V.4.4.2.2 Sistema de tratamiento por PEAI.....	181
V.4.4.2.3 Recuento de células viables y dañadas por PEAI.....	183
V.4.4.2.4 Cálculos.....	183
V.4.5 Resultados y Discusión.....	184
V.4.5.1 Inactivación de células de <i>C. sakazakii</i> tratadas por PEAI.....	184
V.4.5.2 Ocurrencia de daño subletal en células de <i>Cronobacter sakazakii</i> tras diferentes tratamientos por PEAI en RPIFM.....	185
V.4.5.3 Evaluación del daño subletal con el tiempo de almacenamiento.....	186
V.4.5.4 Daño subletal en función del consumo energético del tratamiento.....	190
V.4.6 Conclusiones.....	193
V.4.7 Referencias.....	194

CAPITULO V.5 EFECTO DEL POLVO DE CACAO EN LA INACTIVACIÓN DE *Cronobacter sakazakii* POR PEAI EN FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL

V.5.1 Abstract.....	201
V.5.2 Introducción.....	160
V.5.3 Objetivos.....	161
V.5.4 Material y Métodos.....	162
V.5.4.1 Cepa bacteriana y medio de crecimiento.....	162
V.5.4.2 Sistema de tratamiento por PEAI.....	162
V.5.4.3 Polvo de cacao (cocoanOX 12%, CCX).....	163
V.5.4.4 Composición de la fórmula e inuoculación.....	163
V.5.4.5 Recuento de células viables de <i>Cronobacter sakazakii</i>	164
V.5.4.6 Modelización de la inactivación de <i>C. sakazakii</i>	164
V.5.4.6.1 Modelo de inactivación.....	164
V.5.4.7 Análisis de datos y evaluación de modelos.....	165
V.5.5 Resultados.....	165
V.5.5.1 Inactivación de <i>C. sakazakii</i> por PEAI en FL no suplementada/suplementada con CCX.....	165
V.5.5.2 Efecto del momento de adición del polvo de cacao (CCX) en la inactivación por PEAI de células de <i>C. sakazakii</i> en FL/FL suplementada y en su evolución tras el tratamiento (8°C-12h).....	167
V.5.6 Conclusiones.....	176
V.5.7 Referencias.....	177

CAPITULO V.6 EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A *Cronobacter sakazakii* POR CONSUMO DE FÓRMULA INFANTIL EN POLVO RECONSTITUIDA (RPIFM) TRATADA POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD (PEAI), EN HOSPITALES

V.6.1 Abstract.....	225
V.6.2 Introducción.....	226
V.6.3 Objetivos.....	227
V.6.4 Material y Métodos.....	227
V.6.4.1. Hipótesis de partida.....	228
V.6.4.1.1. Condiciones iniciales.....	229
V.6.4.1.2 Evolución de la concentración de <i>Cronobacter sakazakii</i>	229
V.6.4.1.3 Concentración inicial en PIFM (H ₀)	230
V.6.4.1.4 Sumatorio de reducciones en Hospitales. Inactivación de <i>C. sakazakii</i> por PEAI.....	230

V.6.4.1.5 Sumatorio de incrementos por almacenamiento de RPIFM en Hospitales a 8 y 10°C.....	231
V.6.4.2 Escenarios de estudio.....	234
V.6.4.2.1 Escenario I. Reconstitución de PIFM en hospital y almacenamiento 8°C, 24h.....	234
V.6.4.2.2 Escenario II. Reconstitución de PIFM en hospital, tratamiento por PEAI y almacenamiento 8°C, 24h.....	234
V.6.4.2.3 Escenario III. Reconstitución de PIFM en hospital, tratamiento por PEAI y almacenamiento 10°C, 24h.....	234
V.6.4.3 Software de análisis.....	234
V.6.5 Resultados.....	235
V.6.5.2 Evaluación de la exposición en el escenario I.....	235
V.6.5.3 Evaluación de la exposición en el escenario II.....	236
V.6.5.4 Evaluación de la exposición en el escenario III.....	237
V.6.5.5 Análisis de sensibilidad.....	239
V.6.6 Discusión.....	241
V.6.7 Conclusiones.....	243
V.6.8 Referencias.....	244
VI. DISCUSIÓN GENERAL	249
VII. CONCLUSIONES	255
VIII. BIBLIOGRAFÍA	259
IX. ANEXOS	277
IX.1 Anexo I. Normativa de aplicación.....	279
IX.2 Anexo II. Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes (PPL) – Directrices FAO/OMS 2006.....	281
IX.3 Anexo III. Publicaciones científicas.....	287

INDICE DE TABLAS

Tabla II.2.1. Comparativa en composición de la leche humana (L.H.), leche de vaca (L.V.) y fórmula infantil para lactantes (IFM).....	10
Tabla II.2.2 Principales fabricantes y comercializadores de Alimentación Infantil en España.....	12
Tabla II.3.1 Historial de casos esporádicos y brotes de infección por <i>Enterobacter sakazakii</i> en los que la fórmula infantil reconstituida ha sido reconocida como fuente.....	19
Tabla V.1.1: Parámetros biológicos obtenidos para el crecimiento de <i>Enterobacter sakazakii</i> en RPIFM y TSB mediante los modelos de Baranyi y Gompertz a 8, 25 y 37 °C.....	91
Table V.1.2. Bondad del ajuste de los modelos de Baranyi y la ecuación de Gompertz, a los datos de crecimiento de <i>E. sakazakii</i> obtenidos experimentalmente, a diferentes temperaturas, en TSB y RPIFM.....	97
Tabla V.1.3 Valor de los parámetros que se incluyen en el modelo experimental de Gompertz calculado para definir el crecimiento de <i>E. sakazakii</i> en RPIFM para el rango de temperaturas entre 8 y 37°C.....	99
Tabla V.2.1.1 Valores de los parámetros de forma (n) y escala (b) del modelo de Weibull para los diferentes niveles de presión y para ambos sustratos.....	122
Tabla V.2.1.2 Valores de los parámetros cinéticos para los modelos Log-logistic, Baranyi y ecuación modificada de Gompertz en la inactivación de <i>E. sakazakii</i> en BPW y RPIFM.....	123
Tabla V.2.1.3 Valores de los parámetros indicadores de la bondad del ajuste para los modelos Lineal, Gompertz, Log-logistic, Baranyi y Weibull en la inactivación de <i>E. sakazakii</i> en RPIFM y BPW.....	126
Tabla V.2.2.1 Condiciones de tratamiento por APH para detección de daño subletal en células de <i>E. sakazakii</i> suspendidas en RPIFM y BPW.....	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla V.3.1 Condiciones de tratamiento por PEAI por combinación de intensidades de campo (E, kV/cm) y tiempos de tratamiento (t, μ s) aplicados para ambos sustratos, RPIFM y BPW, en la inactivación de <i>Enterobacter sakazakii</i>	156
Tabla V.3.2 Parámetros “a” (escala) y “b” (forma) del modelo de Weibull y valores de D del modelo de Bigelow obtenidos para los datos de inactivación de <i>E. sakazakii</i> en agua de peptona y fórmula infantil.....	162
Tabla V.3.3 Valores de los coeficientes R ² , Root Mean Square Error (RMSE) y factor de precisión (<i>Af</i>) para los modelos de Bigelow y Weibull en la inactivación de <i>E. sakazakii</i> en ambos sustratos.....	162
Tabla V.4.1. Condiciones de tratamiento por PEAI (Intensidad de campo eléctrico (E, kV/cm) y tiempo de tratamiento (t, μ s) aplicados a la inactivación de células de <i>C. sakazakii</i> ; y consumo energético correspondiente (kJ/mL) para cada combinación E-t.....	182
Tabla V.5.1. Niveles de inactivación de <i>Cronobacter sakazakii</i> por PEAI ($\text{Log}_{10}[\text{N}/\text{N}_0]$) en las diferentes fórmulas: FL-0%; FL-1%; FL-2.5%; y FL-5% a las diferentes condiciones de tratamiento.....	208
Tabla V.5.2 Valores de los parámetros b y n del modelo de Weibull para la inactivación de <i>C. sakazakii</i> en fórmula láctea (FL-0%), y FL suplementada con 3 concentraciones diferentes de CCX: FL-1%, FL-2.5%, y FL-5% (w/v). Valores de los parámetros que definen la bondad del ajuste para el modelo de Weibull: R ² ajustado y RMSE.....	211
Tabla V 6.1 Distribuciones de probabilidad que definen las variables consideradas para el tratamiento por PEAI.....	231
Tabla V.6.2 Distribuciones de probabilidad que definen las variables (inputs) consideradas en el crecimiento de <i>C. sakazakii</i> a diferentes temperaturas: 8 y 10°C.....	231
Tabla V.6.3 Niveles de probabilidad (%) y valores N _f (cfu/g) obtenidos para <i>C. sakazakii</i> en el escenario I para una RPIFM almacenada 8°C, 24h.....	235

Tabla V.6.4 Niveles de probabilidad (%) y valores de exposición por toma obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario I para una RPIFM almacenada 8°C, 24h.....236

Tabla V.6.5 Niveles de probabilidad (%) y valores Nf (cfu/g) obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario II para una RPIFM tratada por PEAI y almacenada a 8°C, 24h.....236

Tabla V.6.6 Niveles de probabilidad (%) y valores de exposición por toma obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario II para una RPIFM tratada por PEAI y almacenada a 8°C, 24h.237

Tabla V.6.7 Niveles de probabilidad (%) y valores Nf (cfu/g) obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario III para una RPIFM tratada por PEAI y almacenada a 10°C, 3, 8 y 24h.....238

Tabla V.6.8 Valores de exposición (cfu/toma) a *C. sakazakii* en RPIFM tras un tratamiento a 40 kV/cm-360µs y posterior almacenamiento 10°C, 3 y 24h.....238

Tabla V.6.9. Probabilidad de infección por *C. sakazakii* en bebés alimentados mediante 8 biberones de RPIFM con valores de Nf (cfu/toma) obtenidos en los diferentes escenarios estudiados.....242

INDICE DE FIGURAS

Figura II.2.1 Gráfico de reparto de mercado para alimentos infantiles en España.....	12
Figura II.4.1 Onda cuadrada bipolar (Barbosa <i>et al.</i> , 1999).....	27
Figura II.4.2 Onda cuadrada bipolar. Amplitud de pulso (τ).....	28
Figura II.4.3 Equipo de tratamiento por APH del IATA (CSIC).....	32
Figura II.4.4 Tratamiento por presión en una sola etapa.....	34
Figura II.4.5 Tratamiento por APH pulsado.....	34
Figura II.4.6 Tratamiento por APH escalonado.....	34
Figura II.6.1 Representación gráfica de la ecuación de Gompertz y sus parámetros cinéticos.....	46
Figura II.7.1 Componentes del análisis de riesgo (cuadro) y etapas del QMRA.....	57
Figura V.1.1. Curvas de crecimiento para <i>Cronobacter sakazakii</i> ajustadas a los modelos de Baranyi y Gompertz en (1) Tryptic Soy Broth (TSB) y (2) Reconstituted Infant Formula Milk (IFM), a diferentes temperaturas de incubación: (a) 8 °C, (b) 25 °C, (c) 37 °C. Valores observados (\blacklozenge), valores predichos por el modelo de Gompertz (____), valores predichos por el modelo de Baranyi (-----) y barras de error, calculadas para tres repeticiones.....	92
Figura V.1.2 Comparación gráfica de los valores observados y predichos para el ratio específico de crecimiento μ_{max} de <i>E. sakazakii</i> strain 858 CECT en RPIFM usando el método de la Línea de Equivalencia (LOE).....	97
Figura V.1.3 Superficie de respuesta para el modelo global de Gompertz que describe el crecimiento de <i>E. sakazakii</i> en RPIFM en un rango de temperaturas de 8 a 37°C.....	98
Figura V.2.1.1 Curvas de supervivencia para <i>E. sakazakii</i> en BPW. Ajuste a modelos matemáticos.....	119
Figura V.2.1.2 Curvas de supervivencia para <i>E. sakazakii</i> en RPIFM. Ajuste a modelos matemáticos.....	120
Figura V.2.2.1 Geles 2D-Electroforesis para extractos proteicos <i>Enterobacter sakazakii</i> (CECT 858) obtenidos en BPW para los diferentes tratamientos: (A) BPW (control); (B1) BPW tratada a 250MPa-1 min; (B2) BPW tratada a 250 MPa-5 min; y (B3) BPW tratada a 350 MPa-1 min. Aparecen señalados los “spots” que mostraron un aumento o reducción de intensidad al menos en 3 repeticiones.....	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura V.3.1 Curvas de inactivación para <i>E. sakazakii</i> en fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM) a las diferentes condiciones de tratamiento: ◆ 10kV/cm ■ 20 kV/cm; ▲ 30 kV/cm y ● 40 kV/cm.....	159
Figura V.3.2 Curvas de inactivación para <i>E. sakazakii</i> en agua de peptona tamponada (0.3 w/v) (BPW) a las diferentes condiciones de tratamiento: ◆ 10kV/cm ■ 20 kV/cm; ▲ 30 kV/cm y ● 40 kV/cm.....	159
Figura V.3.3 Datos de inactivación obtenidos experimentalmente para <i>E. sakazakii</i> en agua de peptona (BPW) y fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM) ajustados al modelo de Bigelow (Ec. 2.1) para 30kV/cm.....	161
Figura V.3.4 Datos de inactivación obtenidos experimentalmente para <i>E. sakazakii</i> en BPW y RPIFM ajustados al modelo de Weibull (Ec. 2.2) para 30kV/cm.....	161
Figura V.3.5. Gráfico de riesgo para la aplicabilidad del modelo a 40 kV/cm en: ■ BPW ($R^2 = 0.983$) y ◆ RPIFM ($R^2 = 0.9907$).....	163
Figura V.3.6 Gráfico de residuos para el LN(S) a 30kV/cm en BPW.....	164
Figura V.3.7. Superficie de respuesta para la relación ente Log (S), parámetro a de Weibull y tiempo de tratamiento, en la inactivación de <i>E. sakazakii</i> en RPIFM.....	165
Figura V.4.1 Niveles de inactivación por PEAI para las condiciones de 15kV/cm y 35 kV/cm.....	184
Figura V.4.2 Evolución de células tratadas por PEAI, a diferentes condiciones, durante el almacenamiento refrigerado para el periodo de 8°C-24h.....	187
Figura V.4.3 Supervivencia y muerte de células dañadas tratadas por PEAI a una intensidad de campo eléctrico de 15kV/cm tras diferentes tiempos de tratamiento: (a) 60 μ s; (b) 1000 μ s; (c) 3000 μ s; durante el almacenamiento refrigerado a 8°C – 24h.....	189
Figura V.4.4 Reducción decimal ($\log_{10} (N/N_0)$) alcanzada en los recuentos de <i>C. sakazakii</i> : (a) 15 kV/cm y (b) 35kV/cm debida (i) al efecto neto de la tecnología de PEAI (t=0h), donde N es la fracción de células supervivientes tras un tratamiento por PEAI correspondiente a los niveles energéticos de 200, 1000 y 1700 (kJ/mL), y N_0 el número inicial de células; (ii) y a la muerte de células dañadas tras 24h de almacenamiento donde N es la fracción de células supervivientes y N_0 corresponde al valor de N obtenido inmediatamente tras el tratamiento por PEAI.....	192
Figura V.5.1 Descomposición de la inactivación en efecto neto debido a la tecnología de PEAI ■ y efecto combinado de PEAI-CCX ■ a 15 kV/cm y para una concentración de CCX 5%.....	209

Figura V.5.2 Efecto del momento de adición del CCX, antes (t=0h) o después (t=0h) del tratamiento por PEAI (35kV/cm-700µs), en la inactivación de *C. sakazakii*.....210

Figura V.5.3 Resultados de inactivación tras el periodo refrigerado de 12h-8°C cuando las células de *C. sakazakii* fueron tratadas por PEAI (15kV/cm-3000µs) en FL-0%, y en las fórmulas suplementadas con CCX 0, 2, y 4h antes del tratamiento por PEAI.....212

Figura V.5.4 Niveles de inactivación alcanzados para células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI a 35kV/cm-700µs y almacenadas a 8°C cuando el CCX fue adicionado 0, 2 y 4 h tras el tratamiento por PEAI.....214

Figura V.5.5 Niveles de inactivación alcanzados tras las 12h de almacenamiento refrigerado, cuando el CCX se adicionó 0, 2 y 4 h tras el tratamiento por PEAI a 10 kV/cm, 3000µs.....215

Figura V.6.1 Distribución de probabilidad proporcionada por la herramienta BesFit (@Risk Palisade Corporation, SA) que define la variable H_0 = concentración inicial (FAO/WHO, 2004).....230

Figura V.6.2 Gráficos de tornado del análisis de sensibilidad llevado a cabo para los escenarios II y III.....240

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema II.2.1. Esquema de procesado de fórmula infantil en polvo mediante proceso en húmedo (EFSA, 2004).....21

Esquema II.3.1. Producción de IFM en polvo.* Posibles puntos de contaminación bacteriana (EFSA, 2004).....25

Esquema II.4.1 Esquema del circuito de funcionamiento del equipo de PEAI del IATA.....27

Esquema II.6.1 Etapas básicas a seguir en la modelización matemática de un escenario real.....44

Esquema IV.1. Resumen de actividades para el estudio de crecimiento de *C. sakazakii* en medio de referencia y RPIFM.....70

Esquema IV.2. Resumen actividades inactivación de *C. sakazakii* por PEAI.....70

Esquema IV.3. Resumen de actividades en el estudio de daño subletal sobre células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI.....71

Esquema IV.4. Resumen de actividades en el estudio de adición de CCX+ tratamiento por PEAI sobre células de *C. sakazakii*.....73

Esquema IV.5. Resumen de actividades en el tratamiento de *C. sakazakii* por APH y posterior aproximación al estudio de cambios proteómicos debidos al tratamiento.....74

Esquema IV.5. Resumen de la evaluación a la exposición para *C. sakazakii* en RPIFM tratado por PEAI en hospitales.....75

Esquema V.6.1 Diagrama representativo de reconstitución y procesado de PIFM en hospitales, hasta el momento de consumo (Vargas-leguás y col., 2009).....232

Esquema V.6.2 Evaluación de la exposición a *Cronobacter sakazakii* en fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM). Escenarios de estudio.233

ABREVIATURAS

AEP	Asociación Española de Pediatría
<i>A_f</i>	Factor de precisión
AMS	Asamblea Mundial de la Salud
ANOVA	Análisis de la varianza
AN	Ingredientes naturales con capacidad antimicrobiana
APH	Altas Presiones Hidrostáticas
ARICCP	Análisis de Riesgos y control de puntos críticos
ATCC	American Type culture collection
<i>aw</i>	Actividad de agua
BAR	Modelo de Baranyi de crecimiento
<i>B_f</i>	Factor de exactitud
BPW	Agua de peptona tamponada
°C	grados centígrados
CAC	Comisión del Codex Alimentarius
CCX	CocoanOX 12%
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
<i>cfu</i>	unidades formadoras de colonias
<i>cm</i>	centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECN	Enterocolitis Necrotizante
EF	Electroforesis
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Food and Agricultural Organization
FL	Fórmula láctea infantil
FL-0%	Fórmula láctea infantil con un 0% (w/v) de CCX
FL-1%	Fórmula láctea infantil con un 1% (w/v) de CCX
FL-2.5%	Fórmula láctea infantil con un 2.5% (w/v) de CCX
FL-5%	Fórmula láctea infantil con un 5% (w/v) de CCX
<i>g</i>	gramos
GMP	Modelo de Gompertz de crecimiento
H₀	Contaminación inicial en PIFM (cfu/g)
<i>h</i>	horas
ΣI	Sumatorio de incrementos
ICMSF	International Commission of Microbiological Specifications
in Foods	

ABREVIATURAS

IFM	Infant Formula Milk
kJ/mL	kilo-julio por mililitro
kV	kilovoltios
LM	Lactancia Materna
Log10	Logaritmo decimal
LN	Logaritmo neperiano
mA	miliamperios
min	minutos
mL	mililitros
MPa	MegaPascales
N	número final de microorganismos
N₀	número inicial de microorganismos
ng	nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Presión
PCC	Punto Crítico de Control
PEAI	Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad
PIFM	Fórmula Infantil en Polvo
QMRA	Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico
rpm	revoluciones por minuto
ΣR	Sumatorio de reducciones
RA	Análisis de Riesgos
RMSE	raíz cuadrada del error cuadrático medio
R²-corregido	coeficiente de regresión corregido
RPIFM	Fórmula Infantil en Polvo Reconstituída
S	Fracción de supervivientes
S/m	Siemens por metro
SDS	Sodio dodecil sulfato
SMC	Simulación de Monte Carlo
T	Temperatura
t	tiempo de tratamiento
t_{alm}	tiempo de almacenamiento
tg	tiempo de generación
TSA	Agar tripton-a-soja
TSB	Caldo de tripton-a-soja
UNICEF	Fondo de Naciones Unidas para la Infancia
UHT	Ultra-high-temperature

USFDA	U.S.Food and Drug Admistration
μs	microsegundo
μ	ratio específico de crecimiento
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VRBGA	Violet red bile glucosa agar
λ	duración de la fase de latencia



RESÚMENES

RESUMEN

Los bebés, especialmente prematuros e inmunocomprometidos, así como niños menores de 1 año, son altamente vulnerables a sufrir infecciones por patógenos. Por tanto, la seguridad alimentaria en lo que se refiere a fórmulas lácteas infantiles es de suma importancia. Numerosos estudios epidemiológicos han implicado a *Cronobacter sakazakii*, como contaminante ocasional de la fórmula infantil en polvo (Powdered Infant Formula Milk, PIFM) siendo causa de brotes de diversa consideración, produciendo sepsis, meningitis neonatal, enterocolitis necrotizante, meningoencefalitis, e incluso la muerte (40-80% de los casos). Tanto es así, que tras ser catalogado como microorganismo de “riesgo severo para poblaciones restringidas” por la Comisión Internacional para las Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (2002), investigadores de todo el mundo tratan de buscar medidas de control y eliminación de este problema.

La presente tesis doctoral plantea el estudio de la aplicación de diferentes medidas de control del crecimiento y/o inactivación (barreras) de *C. sakazakii* como son: pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), altas presiones hidrostáticas (APH), almacenamiento a temperatura de refrigeración o la adición de ingredientes naturales con capacidad antimicrobiana. Estas tecnologías se caracterizan por permitir obtener un producto seguro microbiológicamente, con un mayor respeto de los componentes nutricionales que el tratamiento térmico convencional.

Con el objetivo de poder realizar predicciones sobre la concentración final de *C. sakazakii* en nuestro producto, se han realizado ajustes de los datos experimentales a modelos matemáticos primarios (Bigelow, Weibull, Log-logistic, Baranyi, Gompertz) y secundarios (modelo raíz cuadrada, modelo de Arrhenius) que definen el comportamiento del microorganismo en cada caso. Estos modelos han servido de base para llevar a cabo una evaluación de la exposición, en la que se plantean escenarios probables relacionados con la preparación, uso y almacenamiento de fórmulas infantiles en hospitales, con el objetivo de establecer posibles escenarios de riesgo/no riesgo en función de las condiciones: temperatura y tiempo de almacenamiento del producto que será tratado por PEA I

RESUM

Els nadons, especialment prematurs e immunocompromesos, així com els xiquets menors a 1 any, son altament vulnerables a patir infeccions per patògens. Per tant, la seguretat alimentària pel que fa a fórmules làcties infantils és molt important. Estudis epidemiològics han implicat *Cronobacter sakazakii*, com contaminant ocasional de la fórmula infantil en pols (PIFM) sent causa de brots de diversa consideració, produint sèpsia, meningitis neonatal, enterocolitis necrotitzant, meningoencefalitis, i fins i tot la mort (40-80% dels casos). Tant és així, que després de ser catalogat com microorganisme de "risc sever per poblacions restringides" per la Comissió Internacional per a les Especificacions microbiològiques en Aliments (2002), investigadors de tot el món tracten de buscar mesures de control i eliminació d'aquest problema.

Aquesta tesi doctoral planteja l'estudi de l'aplicació de diferents mesures de control del creixement i / o inactivació (barreres) de *C. sakazakii* com són: polsos elèctrics d'alta intensitat (PEAI), altes pressions hidrostàtiques (APH), emmagatzematge a temperatura de refrigeració o l'addició d'ingredients naturals amb capacitat antimicrobiana. Aquestes tecnologies es caracteritzen per permetre obtenir un producte segur microbiològicament, amb un major respecte dels components nutricionals que el tractament tèrmic convencional.

Amb l'objectiu de poder realitzar prediccions sobre la concentració final de *C. sakazakii* en el nostre producte, s'han realitzat ajustaments de les dades experimentals a models matemàtics primaris (Bigelow, Weibull, Log-Logistic, Baranyi, Gompertz) i secundaris (model arrel quadrada, model d'Arrhenius) que defineixen el comportament del microorganisme en cada cas. Aquests models han servit de base per dur a terme una avaluació de l'exposició, en què es plantegen escenaris probables relacionats amb la preparació, ús i emmagatzematge de fórmules infantils en hospitals, amb l'objectiu d'establir possibles escenaris de risc / no risc en funció de les condicions: temperatura i temps d'emmagatzematge del producte que serà tractat per PEAi.

ABSTRACT

Babies, especially premature infants and immunocompromised, as well as children under 1 year are highly vulnerable to infection by pathogens. Therefore, food security in regard to infant milk formula is very important. Epidemiological studies have implicated *Cronobacter sakazakii* as an occasional contaminant in powdered infant formula (PIFM) being due to outbreaks of varying degrees of producing sepsis, neonatal meningitis, necrotizing enterocolitis, meningitis and even death (40-80% of cases). Therefore after being listed as a microorganism "severe risk to populations restricted" by the International Commission on Microbiological Specifications for Food Programme (2002), researchers around the world try to seek measures to control and eradicate this problem.

This doctoral thesis presents the study of the use of different measures of growth control and / or inactivation (hurdles) of *C. sakazakii* as: pulsed electric fields (PEF), high hydrostatic pressure (HHP), storage under refrigeration or the addition of natural ingredients with antimicrobial capacity. These technologies are characterized by enabling to obtain a microbiologically safe product, with a greater respect for the nutritional components than the conventional heat treatment. In order to be able to make predictions about the final concentration of *C. sakazakii* in our product, fittings have been made of experimental data to mathematical primary models (Bigelow, Weibull, Log-logistic, Baranyi, Gompertz) and secondary (square root model, Arrhenius model) that define the behavior of the organism in each case. These models have provided the basis for conducting an exposure assessment, the likely scenarios that arise related to the preparation, use and storage of infant formula in hospitals, with the aim of establishing possible scenarios of risk / no risk depending on the conditions: temperature and storage time of the product to be treated by PEAI



I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Se ha reconocido a nivel mundial que la lactancia materna representa la forma más idónea de alimentación para los lactantes aportando la totalidad de los nutrientes necesarios en la primera etapa de la vida; protegiendo contra infecciones, y con múltiples beneficios para la salud y el desarrollo integral de los niños (FAO/OMS (2008); AEP, 2008). Sin embargo, las fórmulas infantiles (Infant Formula Milk, IFM) son una alternativa a la lactancia materna cuando, por diversos motivos ésta no es posible.

La fórmula láctea infantil más utilizada en Europa y E.E.U.U, es la fórmula infantil en polvo (PIFM). No es un producto estéril, y puede estar expuesto a diversos niveles de contaminación. Este hecho unido a la vulnerabilidad que presenta este subgrupo de población, en especial bebés prematuros y de bajo peso, frente a patógenos, ha puesto en alerta a autoridades de salud pública de todo el mundo. *Cronobacter sakazakii*, anteriormente conocido como *Enterobacter sakazakii*, es el patógeno emergente principal, vehiculado mediante el consumo de PIFM rehidratada (RPIFM), tanto en hogares como en hospitales. Varias son las vías de contaminación del producto en polvo, entre ellas destacan: deficiencias en producción (procesos de tratamiento térmico), falta de buenas prácticas industriales (control puntos críticos), recontaminación de la PIFM en planta, y en ambientes de preparación de la RPIFM (hogares, hospitales, guarderías).

Las recomendaciones del Codex (2008) y FAO/OMS (2006) advierten de la necesaria aplicación de un tratamiento bactericida en la fase de preparación/reconstitución de la PIFM (por ejemplo, reconstituir con agua a una temperatura no inferior a 70 °C), sin embargo, son muchos los organismos internacionales de salud pública (ESPGHNA, 2004; EFSA, 2004; AEP, 2008) que han puesto en tela de juicio el uso de tratamientos a elevadas temperaturas para la reconstitución porque preocupan la pérdida de nutrientes sensibles al calor, y la aglomeración del polvo, entre otras circunstancias.

Por todo ello, la presente tesis doctoral se ha centrado en buscar métodos alternativos al térmico (pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), altas presiones

I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

hidrostáticas (APH); control de temperatura y adición de ingredientes naturales con poder antimicrobiano) para controlar el crecimiento e inactivar *C. sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles. Para evaluar el efecto que tienen los diferentes métodos, los datos experimentales se ajustarán a modelos matemáticos que describan la respuesta del microorganismo ante estos tratamientos y que permitan a su vez predecir tanto el número final de microorganismos como las condiciones más adecuadas en función de las exigencias. El control del riesgo microbiológico asociado al binomio PIFM-*C. sakazakii* se llevará a cabo tomando como base la modelización de resultados de crecimiento e inactivación, y nos permitirá llevar a cabo una valoración a la exposición en hospitales donde se propone la introducción de la tecnología de PEAI como alternativa a la reconstitución de la PIFM a elevadas temperaturas.



II.INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

II.1 ALIMENTACIÓN INFANTIL: HISTORIA Y ACTUALIDAD

La nutrición adecuada durante la infancia y niñez temprana es fundamental para el desarrollo del potencial humano completo de cada niño. Es bien conocido que el periodo entre el nacimiento y los dos años de edad es una “ventana de tiempo crítica” para la promoción del crecimiento, la salud y el desarrollo óptimos. Desde 1974 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y UNICEF, destacan los beneficios de la lactancia materna y la necesidad de incrementar las tasas de incidencia y duración de la misma. La OMS recomienda que los lactantes sean alimentados exclusivamente mediante leche materna durante los seis primeros meses de vida para que su crecimiento, desarrollo y salud sean óptimos. Después, con objeto de satisfacer sus necesidades nutricionales en evolución, los lactantes deben recibir alimentos suplementarios adecuados desde el punto de vista nutricional e inocuos (OMS/UNICEF, 2003). En España, los datos obtenidos en varias comunidades autónomas (2006) recogidos por el Comité de lactancia materna de la Asociación Española de Pediatría (AEP) revelan que la prevalencia de la lactancia materna se sitúa en torno al 20% para los primeros cuatro meses del bebé.

Los sucedáneos de la leche materna, ó fórmulas infantiles (Infant Formula Milk, IFM), fueron desarrolladas hacia fines del siglo XIX como un modo de proveer el sustento necesario para alimentar a huérfanos y a niños abandonados que de otro modo hubieran muerto de hambre. Actualmente, las fórmulas infantiles se presentan como alternativa a la lactancia materna cuando, por diversos motivos ésta no es posible. Aunque se ha reconocido a nivel mundial que la lactancia materna representa la forma más completa de alimentación para los lactantes de acuerdo a recomendaciones de la FAO/OMS (2007) y la Asociación Española de Pediatría (AEP, 2008), aportando la totalidad de los nutrientes necesarios en la primera etapa de la vida; protegiendo contra infecciones, y con múltiples beneficios para la salud y el desarrollo integral de los niños; son muchos los motivos por los que es necesario disponer de fórmulas lácteas especiales. Entre ellos destacan:

- a. Sustitución de la lactancia materna por IFM en lactantes cuyas madres no pueden o no desean amamantar.

II. INTRODUCCIÓN

- b. Suplemento para lactantes cuyas madres desean interrumpir parcialmente la lactancia.
- c. Complemento cuando la producción de leche materna es insuficiente.
- d. Indicaciones médicas especiales entre las que destacan:
 1. Enfermedades infecciosas como: listeriosis neonatal, hepatitis B materna, VIH, varicela, tosferina, tuberculosis activa y lesiones herpéticas o sifilíticas en el pecho materno.
 2. Precaución extrema en enfermedades metabólicas, tirotoxicosis materna con tratamiento antitiroideo.
 3. Consumo de anfetaminas y otras drogas, la exposición a radiación o tratamientos farmacológicos para combatir el cáncer, son algunas de las situaciones en las que no se recomienda la lactancia materna, ya que los componentes de las sustancias empleadas en las terapias antes mencionadas, pueden transmitirse al niño por medio de la leche.
- e. La necesidad de utilizar una alternativa a la leche de vaca en etapas tempranas del crecimiento.

A pesar de ello, son muchos los estudios que manifiestan las múltiples ventajas que posee la lactancia materna, ya que los bebés amamantados por la madre presentan con menos frecuencia:

- Infecciones de oído
- Infecciones estomacales o intestinales
- Bajos niveles de hierro en la sangre (anemia ferropénica)
- Enfermedades de la piel (eccema infantil)
- Alergias infantiles.
- Problemas digestivos tales como estreñimiento o diarrea
- Sobrepeso u obesidad
- Presión arterial alta

- Diabetes
- Caries dental

Además de los beneficios para el lactante, las madres que amamantan a sus bebés disfrutan de:

- No tener que limpiar biberones
- No tener que preparar fórmulas o leches maternizadas
- Bajos costos
- Pérdida de peso más fácilmente
- Menos sangrado posparto
- Fortalecimiento del vínculo único entre madre e hijo

Como consecuencia de todo ello, y debido al marcado acento que la sustitución progresiva de la lactancia natural por IFMs ha tenido, sobretodo a partir de la segunda mitad del siglo XX, han surgido en España más de 50 grupos de apoyo a la lactancia. Ya en 1974 la 27ª Asamblea Mundial de la Salud (AMS) advirtió el descenso de la lactancia materna (LM) en muchos países del mundo y lo relacionó con la promoción indiscriminada de sucedáneos industriales, recomendando a los estados miembros adoptar medidas correctoras. En 1978 la 31ª AMS volvió a recomendar la regulación de la promoción de estos productos; en 1979 se realizó una Reunión Conjunta OMS/UNICEF sobre Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño. Finalmente en mayo del 1981 se aprobó el Código Internacional de Comercialización de Sucédáneos de Leche Materna, al que el Gobierno Español se adhirió 12 años más tarde por medio del RD 1408/92 en BOE 13.01.93 (Patricio y col., 2004).

II.1.1 Alimentación del lactante sano

El lactante es el niño que se alimenta fundamentalmente de leche. Comprende la edad que va desde 1 mes a 12 meses. El conocimiento de las necesidades nutricionales del lactante en los primeros meses de vida se ha obtenido de un modelo biológico insuperable: la leche materna.

II. INTRODUCCIÓN

La superioridad de la leche materna sobre cualquier otro alimento hace que deba ser el alimento aconsejado y recomendado para el recién nacido y lactante sano durante los 4-6 primeros meses de vida, ya que su composición se adapta a las limitaciones fisiológicas del tubo digestivo, del metabolismo intermediario y de la función renal, aportando además una serie de ventajas nutricionales, inmunológicas, psicológicas y económicas (Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría en 1997). Los sustitutos de la leche materna se utilizan en la alimentación de estos lactantes cuando la lactancia materna no es posible por diversos motivos.

II.1.2 Bebés prematuros y lactancia materna

Un bebé prematuro es el que nace antes de las 37 semanas de gestación como consecuencia de un parto prematuro. Los bebés prematuros representan de un 8% a un 12% de todos los nacimientos. Los problemas de estos bebés se centran en la dificultad para adaptarse al medio extrauterino por su inmadurez y su bajo peso (< 2.500 g). Cuanto más pequeño e inmaduro, mayores son los riesgos de enfermedades del bebé. Los sistemas respiratorio, nervioso, digestivo, renal, inmunológico y la visión pueden estar comprometidos (Monforte y col., 2005).

La leche de la propia madre es la alimentación preferida para el prematuro que le protege frente a la enterocolitis necrotizante (ECN). La tendencia mundial es que la alimentación comience lo antes posible por sonda naso-gástrica que se acopla a una jeringa que contiene leche materna extraída.

Sin embargo, los sustitutos de la lactancia materna se utilizan en estos bebés debido a las alteraciones específicas que presentan: prematuridad, intolerancia a la lactosa, enfermedades atópicas, errores metabólicos congénitos, etc. Estas fórmulas son sinónimos de *fórmulas terapéuticas* o de uso médico especial y en nuestro país debieran indicarse solo bajo prescripción médica, ya que los prematuros alimentados con leche de su propia madre, reciben mayor cantidad de probióticos y tienen floras intestinales más sanas que aquellos alimentados mediante fórmulas infantiles, que en ocasiones pueden contener gérmenes hospitalarios causantes de las ECN (Bar-Oz y col. 2001).

II.2 FÓRMULAS INFANTILES

II.2.1. Fórmula infantil vs. lactancia materna

La fabricación de las fórmulas infantiles nunca estuvo pensada para su amplio consumo como sucede en la actualidad. En este limitado contexto, es decir cuando no existe otro alimento disponible, la fórmula infantil permite salvar vidas. Sin embargo, con el paso del tiempo, y a medida que el tema de la nutrición humana en general, y la nutrición infantil en particular, pasó a ser algo más 'científico', los sucedáneos de la leche artificial comenzaron a comercializarse entre el público como una mejora tecnológica de la leche materna (Gómez, A, 2004).

La primera fórmula basada en leche de vaca se comercializó en 1867 por el químico alemán Von Liebig. Sin embargo hasta 1941 no aparecieron las leches acidificadas, propuestas por Marriot, seguidas más tarde de las leches humanizadas o maternizadas. Posteriormente a partir de 1977 este término se sustituyó por el de “fórmulas adaptadas” (FAO, 2003)

Las fórmulas infantiles (IFM). Son fórmulas elaboradas a partir de la leche de vaca. Hasta el momento no existe una 'fórmula' para la fórmula. La mayoría de ellas se elaboran a base de leche de vaca. Pero antes de que un lactante pueda beber leche de vaca en la forma de fórmula infantil, es preciso reducir el contenido de proteínas y minerales e incrementar el contenido de carbohidratos. La grasa originaria se elimina y reemplaza por otras grasas vegetales, animales o minerales, se agregan vitaminas y elementos traza (Sarriá, 1998) Las grasas de estas fórmulas deben constituir el 40-55% del aporte calórico total. La lactosa debe ser el hidrato de carbono mayoritario. El contenido de sales minerales es reducido aunque no inferior al contenido en la leche de mujer. Además la IFM puede ser suplementada con hierro, indicándolo si lo lleva en el etiquetado (debiendo contener 1 mg/100 kcal o 0,7 mg/100 mL).

La tabla II.2.1 muestra una comparativa en cuanto a composición nutricional entre leche humana, leche de vaca y fórmulas infantiles. (AEP, 2004)

II. INTRODUCCIÓN

Tabla II.2.1. Comparativa en composición de la leche humana (L.H.), leche de vaca (L.V.) y fórmula infantil para lactantes (IFM)

Composición leche humana y leche para lactantes			
	L.H (100mL)	L.V.(100mL)	IFM (100 mL/100 Kcal)
Energía (kcal)	62-70	68	60-75
Proteínas (g)	0.9-1	3.5	1.8-3g/100 kcal
Caseína/Seroproteínas	40/60	82/18	40/60
Grasas (g)	3.8	3.7	4.0-6.5
Ácido Linoléico (g)	0.38	0.06	0.3-1.2
Hidratos de carbono (g)	7.1	6.1	7-14
Lactosa (g)	6.5	5.0	>3.5
Sodio (mg)	16	95	20-60
Potasio (mg)	53	89	60-145
Calcio (mg)	29-34	120	>50
Fósforo (mg)	14	92	25-90
Hierro (mg)	0.05-0.1	0.05	Suplementadas: 0.5-1.5

II.2.2 Tipos de Fórmulas

Los preparados comerciales se suelen presentar como:

- ✓ fórmula en polvo
- ✓ líquida concentrada,
- ✓ o listas para tomar (ready-to-eat):

Todas ellas pueden encontrarse como:

→ *Sucedáneos de la leche materna* en lactantes sanos normales menores de seis meses

→ *Preparados con fines médicos especiales* para lactantes: son sucedáneos de la leche materna para lactantes enfermos (pacientes), especiales para niños prematuros o de bajo peso al nacer, intolerantes a las proteínas o a la lactosa de la leche, con mala absorción de grasas, con reflujo gastro-esofágico, enriquecidas con hierro etc.

→ *Preparados complementarios* (bebés > 6 meses) pueden sustituir la leche materna en los lactantes mayores que también toman otros alimentos suplementarios.

La manera más común de comercializar los preparados para lactantes **es en polvo**, que más tarde deben reconstituirse con agua, y que por tanto no son estériles, mientras que las fórmulas líquidas sí lo son (CAC/RCP 66 – 2008).

II.2.3 El mercado de las fórmulas infantiles en España

El crecimiento de la población infantil en España durante los últimos años ha supuesto un empuje para todos aquellos productos específicos, tanto en el ámbito de la alimentación como en el de la higiene. Según los datos recogidos por el INE, en 2008 el número de niños entre 0 y 3 años aumentó un 4,2% hasta superar los 1,8 M, siendo el 51,5% varones y el 48,5% mujeres (INE, 2008).

El mercado de alimentos infantiles en España vive uno de sus mejores momentos tras mover en 2008 un total de 71.444 tn y rozar los 585 M€, procedentes de la distribución moderna (52,8%), el canal farmacéutico (42,1%) y las parafarmacias (3,4%). Continuando con los datos por valor, el primer producto comercializado fue la leche infantil (55,2%), seguido de los tarritos (25,5%), las papillas (18,7%) y los zumos (0,6%). Este mercado se caracteriza por la fuerte competencia entre el canal de alimentación y el farmacéutico (Financial food, 2008). La tabla II.2.2 recoge las principales empresas productoras de alimentos infantiles en España.

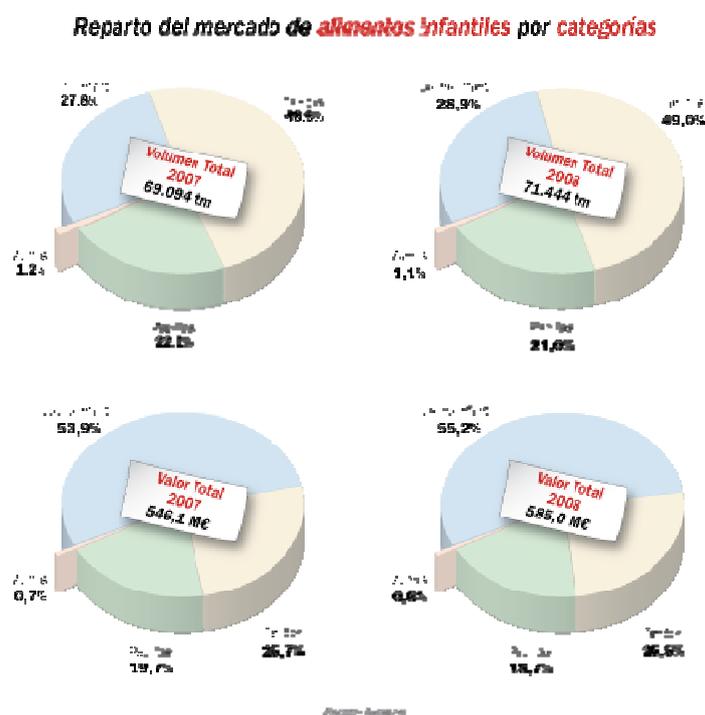


Figura II.2.1. Gráfico de reparto de mercado para alimentos infantiles en España

II. INTRODUCCIÓN

Tabla II.2.2 Principales fabricantes y comercializadores de Alimentación Infantil en España

Empresa	Localidad	Marca	Producto	Canal
Puleva Foods, S.A.	Granada	Nadó	Leche/Potitos/ Harinas	Alimentación
Alter Farmacia, S.A.	Madrid	Nutribén SMA	Leche/Potitos/ Harinas	Farmacia
Milupa, S.A.	Valdemoro	Milupa/milumil	Leche/Harinas	Farmacia Alimentación
Hero España, S.A.	Alcantarilla, MU	Hero baby	Leche/Potitos/ Harinas	Alimentación
Grupo Leche Pascual, S.A.	Madrid	Pascual Baby	Leche	Alimentación
Mead-Johnson	Madrid	Enfalac	Leche	Farmacia
Nestlé España, S.L.	Espugas Ll.	Nestlé	Leche/Potitos/ Harinas	Farmacia Alimentación
Nutricia, S.A.	Valdemoro (M)	Almirón	Leche	Farmacia
Laboratorios Ordesa, S.L.	Barcelona	Blemil/Blevit	Leche/Potitos/ Harinas	Farmacia Alimentación

II.2.4 Proceso de Producción de IFM

II.2.4.1. Fórmula infantil líquida: Tratamiento térmico

La esterilización de la leche líquida por calor se hace habitualmente en botellas, mediante un procedimiento discontinuo o continuo. En ambos casos, la leche puede pre-esterilizarse a temperatura comprendida entre 120°C y 135°C durante unos pocos segundos. Después se envasa a 60°C~70°C en botellas calientes de vidrio o recipientes metálicos, e incluso, más recientemente, en botellas de plástico. Estas botellas o recipientes se tapan herméticamente y se calientan durante períodos de 20 minutos a una hora hasta temperaturas de 120°C para conseguir que la leche del interior del recipiente o botella alcance, por lo menos, una temperatura de 115°C durante 15 minutos. En el caso de fórmulas infantiles líquidas, un grupo de investigadores liderado por Dimler y col. (1995) desarrollaron un proceso de esterilización específico para este tipo de producto y consistente básicamente en añadir iones citrato (128ppm) a la fórmula (que actúan como estabilizadores de la leche sometida a altas temperaturas) ajustando el pH a 6.8 antes de someterla a la temperatura de 132°C, o

superiores, durante el tiempo necesario para alcanzar la esterilización (Dimler y col., 1995).

En el caso de las fórmulas listas para tomar se pueden esterilizar por calor según el método UHT (aproximadamente 150°C durante 3 segundos) y posteriormente se envasa asépticamente (Sarriá, 1998).

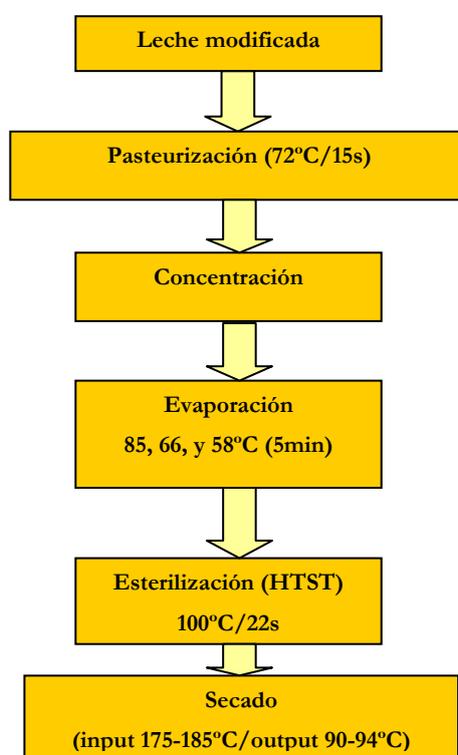
El procesamiento industrial que se aplica para la fabricación de estos productos no debería variar los niveles de nutrientes presentes en el producto final, no obstante, esto no suele ser así, y por ejemplo en el caso de las vitaminas termolábiles es necesario considerar las pérdidas que se producen durante el tratamiento térmico y añadir las cantidades adicionales durante la elaboración de la fórmula

II.2.4.2 Fórmula infantil en polvo (Powdered Infant Formula Milk, PIFM)

Según los expertos de la industria de los Estados Unidos y Europa, los preparados en polvo para lactantes se pueden fabricar de diversas maneras:

a. Proceso de mezcla en húmedo: Todos los ingredientes se manejan en fase líquida y se someten a tratamiento térmico (punto crítico de control [CCP]), por ejemplo, pasteurización, esterilización y luego secado (Breeuwer et al., 2003)

b. Proceso de mezcla en seco: Los ingredientes se preparan por separado, se someten a tratamiento térmico según convenga, se secan y luego se mezclan en seco (Breeuwer y col., 2003).



Esquema II.2.1. Esquema de procesamiento de fórmula infantil en polvo mediante proceso en húmedo (EFSA, 2004)

c. Proceso combinado: Una parte de los ingredientes se elabora según el método a), a fin de obtener un polvo de base al que se añade el resto de los ingredientes según el método b) (Breeuwer y col., 2003). En este proceso los preparados en polvo para lactantes se fabrican a partir de ingredientes que pueden incluir leche, derivados lácteos, concentrados de proteína de soja, hidratos de carbono, grasas, minerales, vitaminas y algunos aditivos alimentarios. Estos ingredientes, en forma líquida o en polvo, normalmente se mezclan con agua para formar una mezcla líquida, que luego se seca hasta obtener un polvo ($a_w = 0,3$) en grandes secadores de pulverización. Antes del secado, la mezcla líquida se calienta (se pasteuriza a 71,6°C durante 15 segundos o 74,4°C durante 25 segundos, o a temperaturas más altas [por ejemplo, 105°C-125°C durante 5 segundos por lo menos]), se homogeniza, en algunos casos se evapora y a veces se almacena en grandes depósitos refrigerados. Durante el proceso de secado, la

mezcla líquida se calienta a unos 82°C y se bombea con alta presión hasta las boquillas pulverizadoras o un atomizador montado en una cámara amplia de secado a través de la cual fluye aire filtrado a temperatura elevada. La mezcla líquida se seca de manera casi instantánea en el aire caliente y el polvo resultante cae al fondo del secador para su recogida.

En algunos casos los fabricantes elaboran los preparados para lactantes secando primero una mezcla en húmedo de los ingredientes principales (proteínas, grasas e hidratos de carbono). Esto es lo que normalmente se conoce como polvo base de los preparados. Luego se mezclan los ingredientes secundarios secos, como las vitaminas, los minerales y otros hidratos de carbono, con el polvo base en grandes mezcladores hasta obtener la formulación del producto final.

Una vez finalizadas las fases de secado o mezcla, el producto final se transfiere de los silos de almacenamiento o mezcladores, y posteriormente a la maquinaria de llenado, donde se introduce en botes o recipientes flexibles. Los recipientes se tratan con gas inerte y se sellan, codifican, etiquetan y embalan en cajas de cartón para su expedición. El producto terminado se suele retener para someterlo a pruebas finales, que incluyen un examen del contenido de nutrientes, la uniformidad y un análisis microbiológico (USFDA, 2005).

Es importante señalar que los preparados en polvo para lactantes que cumplen las normas actuales no son productos estériles. No se ha podido desarrollar aún un método, utilizando la tecnología actual, para producir preparados estériles de este tipo sin alterar sus propiedades nutricionales

II.3 DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO: *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*)

II.3.1 Riesgo de las fórmulas infantiles en polvo.

En las fórmulas comerciales se ha detectado la presencia de microorganismos y sus toxinas, como *Salmonella* y aflatoxinas, potentes agentes tóxicos, carcinógenos, mutagénicos, inmunosupresores producidos por especies del hongo *Aspergillus*. Sin embargo, tanto la FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) como la OMS (Organización mundial de la Salud) centran hoy día su atención en un microorganismo patógeno emergente: la bacteria *Cronobacter sakazakii*, como principal vector del riesgo asociado al uso de fórmulas infantiles en la alimentación neonatal. *Cronobacter sakazakii* se puede aislar de ciertos alimentos en polvo (Edelson-Mammel et al., 2004) y puede causar sepsis (devastadora infección bacteriana en el torrente sanguíneo), meningitis (inflamación de las membranas que recubren el cerebro) y enterocolitis necrotizante (infección e inflamación grave del intestino delgado y del colon) en recién nacidos (FAO/OMS, 2006).

II.3.2 *Cronobacter sakazakii*. Antecedentes en IFM

Cronobacter sakazakii es una bacteria gram-negativa que no forma esporas, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Aunque *C. sakazakii* ha sido considerado como patógeno oportunista, siendo causa de infecciones nosocomiales, su hábitat natural y epidemiología resultan inciertas aún en la actualidad.

Fue definida como especie nueva en 1980 por Farmer et al. (1980) denominándose *Enterobacter sakazakii*. Hasta entonces, *Cronobacter sakazakii* fue referenciado como “yellow-pigmented *Enterobacter cloacae*” ya que produce un pigmento-amarillo en medio TSA (agar de trisona-soja) al ser incubado durante 48h a 25 °C. *Enterobacter sakazakii* difiere significativamente de otras especies del género *Enterobacteriaceae* en cuanto a composición genética (DNA), reacciones bioquímicas, y susceptibilidad a antimicrobianos. Por ello, *E. sakazakii* ha sido reclasificado en 4 especies, dentro de

un nuevo género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*: género *Cronobacter*. Dentro de este género las especies relacionadas con infecciones neonatales pertenecen al grupo *Cronobacter sakazakii* (grupo 1) y corresponden a las especies *Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*, y *Cronobacter sakazakii subsp malonaticus* (Iversen y col., 2008).

C. sakazakii ha estado relacionado con casos esporádicos de importantes brotes de sepsis, meningitis, cerebritis y enterocolitis necrotizante. Si bien ha provocado enfermedades en todos los grupos de edades, las más adversas consecuencias se concentran en los casos notificados en lactantes de menos de 28 días. Aunque incompletos, los datos publicados sobre estos lactantes indican que alrededor de la mitad de ellos tenían un peso al nacer inferior a 2 000g y dos tercios eran prematuros, habiendo nacido con menos de 37 semanas de gestación. Es también probable que los lactantes inmunocomprometidos o médicamente débiles sean más susceptibles a las infecciones por *C. sakazakii.spp. sakazakii*. La pauta de la enfermedad en los lactantes nacidos a término es menos clara, presentando algunos anomalías congénitas importantes (por ejemplo, defectos en el tubo neural y trisomía en el cromosoma 21 [síndrome de Down]), mientras que en otros casos no se han manifestado síntomas de inmunodepresión en el huésped, sin embargo *C. sakazakii spp. sakazakii* ha producido sepsis o meningitis (Lai, 2001). También se han observado casos de bacteriemia por *C. sakazakii* entre lactantes en hospitales y lactantes en hogares (Simmons, 1989; CDC, 2002). Además, en las heces o la orina de lactantes asintomáticos se ha detectado la presencia de *C. sakazaki spp. sakazakii* (Biering, y col., 1989; Block y col., 2002) y se ha demostrado su presencia en las heces después de 18 semanas de infección (Block y col., 2002).

También tienen riesgo los lactantes cuyas madres son VIH positivas, debido a que pueden requerir preparados específicos y suelen ser más susceptibles a la infección. Esto, junto con el bajo peso al nacer, puede ser motivo de especial preocupación en algunos países en desarrollo donde la proporción de tales lactantes es superior a la de los países desarrollados.

II. INTRODUCCIÓN

En general la incidencia de la enfermedad es baja. Las principales enfermedades vehiculizadas por *C. sakazakii* presente en fórmula infantil en polvo (PIFM) son (Shaker y col., 2007):

Meningitis neonatal: fiebre, decaimiento, disminución del apetito, espasmos rígidos (cabeza, cuello y columna arqueadas hacia atrás), rigidez cervical y convulsiones

Enterocolitis necrotizante: intolerancia al alimento, decaimiento, alteraciones en recuento de glóbulos blancos y shock; síntomas gastrointestinales: distensión abdominal, vómitos biliosos, sangre en heces (macro o microscópica) y colecta de líquido en exceso en cavidad abdominal.

Bacteriemia/ sepsis: shock, fiebre y enfermedad sistémica.

La infección puede provocar una morbilidad importante en forma de deficiencias neurológicas, especialmente entre los afectados por meningitis y cerebritis bacteriana (Havelaar. y Zwietering., 2004). Se han notificado tasas de mortalidad debida a la infección por *C. sakazakii* de hasta el 50%, aunque esta cifra se ha reducido a menos del 20% en los últimos años.

La Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América (FDA, 2005) destacó “el alto índice de letalidad” asociado a las infecciones posiblemente ocasionadas por *C. sakazakii*. La Convocatoria de Información de FAO/OMS describe las “graves infecciones con riesgo de muerte ocasionadas por *C. sakazakii*”. Los estudios de investigación señalan que “el daño neurológico puede ser severo en los lactantes sobrevivientes” (FAO/OMS, 2002). En algunas zonas con altos índices de infección por VIH, la letalidad puede ser mucho mayor, en base a que la preocupación sobre la transmisión del virus VIH a través de la lactancia materna conduce a un mayor uso de la fórmula infantil. Este es un asunto sumamente importante a tener en cuenta. (OMS, 2004)

La tabla II.3.1 recoge un histórico de los casos de infección por *C. sakazakii* detectados en todo el mundo, así como la mortalidad asociada.

Tabla II.3.1 Historial de casos esporádicos y brotes de infección por *Enterobacter sakazakii* en los que la fórmula infantil reconstituida ha sido reconocida como fuente

Localización (año)	Nº casos	Nº muertes	Fuente	Referencia
Inglaterra (1958)	2	2	Desconocido	<i>Urmenyi et al., 1961</i>
Dinamarca (1958)	1	1	Desconocido	<i>Joker et al., 1965</i>
Georgia (1958)	1	0	Desconocido	<i>Monroe et al., 1979</i>
Oklahoma (1958) EEUU	1	1	Desconocido	<i>Adamson et al., 1981</i>
Indiana (1981) EEUU	1	0	Desconocido	<i>Muytjens et al., 1983</i>
Dinamarca (1963)	8	6	RPIFM	<i>Aldova et al., 1984</i>
Grecia (1977-1981)	1	1	No especificada	<i>Arseni et al., 1987</i>
Grecia (1984)	11	4	Desconocido	<i>Naqvi et al., 1985</i>
Missouri (1984) EEUU	1	0	Desconocido	<i>Willis et al., 1988</i>
Massachusetts (1984) EEUU	2	1	Desconocido	<i>Biering et al., 1989</i>
Islandia(1986-1987)	3	1	RPIFM, biberon	<i>Simmons, et al. 1989; Nazarovec-White and Farber 1997</i>
Tennessee (1968) EEUU	4	0	RPIFM, biberon	<i>Noriega et al., 1990</i>
Maryland (1993) EEUU	1	0	No especificada	<i>Gallager et al., 1991</i>
Ohio (1990) EEUU	1	0	RPIFM	<i>Van Acker et al., 2001</i>
Belgica (1998)	12	2	RPIFM, biberon	<i>Bar-Oz et al., 2001; Block et al., 2002</i>
Israel (1999-2000)	2	0	RPIFM	<i>Himelright et al., 2002</i>
Tennessee (2001) EEUU	10	1	RPIFM	<i>FDA, 2005</i>
Bélgica 2002	1	1	RPIFM	<i>FDA 2005</i>
Nueva Zelanda (2004)	5	1	RPIFM	<i>FDA 2005</i>
Francia 2006	4	2	RPIFM	<i>Food safety Authority 2006</i>

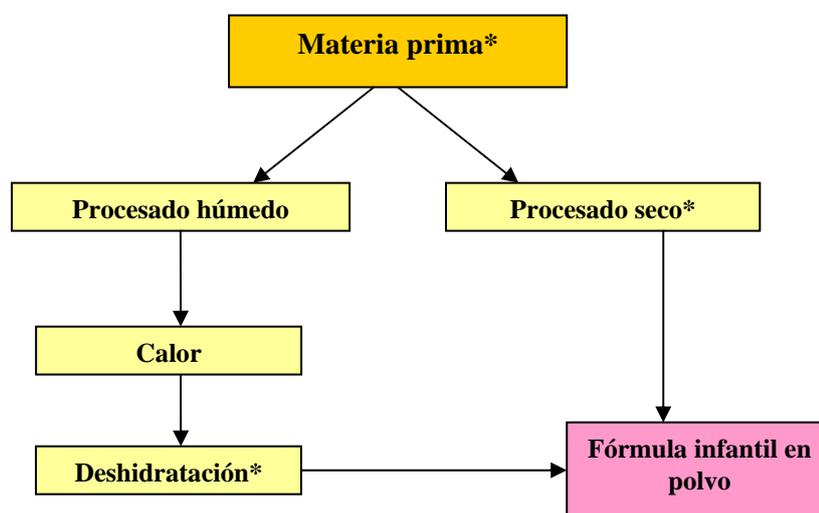
II.3.3 Vías de contaminación por *C. sakazakii*

Cronobacter sakazakii es uno de los microorganismos más termotolerantes de los pertenecientes a la familia de *Enterobacteriaceae* con valores de D entre 54.8, 23.7, 10.3, 4.2 y 2.5 min para temperaturas de 52, 54, 56, 58, y 60°C respectivamente (Nazarowec-White y col., 1999). El tratamiento térmico es un paso crucial para asegurar la inocuidad de los preparados en polvo, y por consiguiente se considera un punto crítico de control. Los tratamientos térmicos utilizados como procesos antibacterianos deberían, como mínimo, lograr la pasteurización, que se basa en la reducción de las formas vegetativas de patógenos hasta un nivel en que ya no constituyen una amenaza importante para la salud. Al mismo tiempo, las combinaciones de tiempo y temperatura utilizadas para lograr la pasteurización deberían tener en cuenta las propiedades del producto, por ejemplo el contenido de grasas, la materia seca, los sólidos totales, etc. que pudieran repercutir sobre la resistencia térmica de los organismos “objetivo”. Estos tratamientos térmicos se consideran puntos críticos de control y, por consiguiente, debe haber procedimientos establecidos para detectar desviaciones – tales como disminuciones de la temperatura y tiempo de tratamiento insuficiente. Además, *C. sakazakii* es un microorganismo altamente resistente en planta, sobrevive adherido a los equipos de tratamiento y puede recontaminar la fórmula tras el tratamiento térmico, durante el manejo y llenado de envases. Las zonas de producción líquida y en polvo se encuentran separadas en la industria. En ocasiones, aunque el tratamiento térmico recibido por el producto sea el adecuado, se puede producir una recontaminación posterior al tratamiento ya que la zona de secado y llenado de envases pueden estar expuestas, a condiciones ambientales, que actúan como vehículo de transmisión del microorganismo.

Sobre la base de los conocimientos actualmente disponibles, parece que la esterilización del producto final en su forma seca en un entorno de elaboración en botes o bolsas sólo es posible mediante irradiación. Sin embargo, dadas las dosis que probablemente se necesitarán para inactivar *C. sakazakii* en estado seco, no parece que la tecnología sea viable, debido al deterioro organoléptico del producto.

Hay algunas otras tecnologías, como las altas presiones hidrostáticas (APH) y los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), que son posibles opciones. Se recomienda que se realicen investigaciones en este sector, teniendo en cuenta la necesidad de una validación cuantitativa del efecto letal (FAO/OMS, 2004).

Por ello, si bien las fórmulas infantiles líquidas y “listas para tomar” son estériles (esterilización-ensado aséptico), no así las fórmulas en polvo, atendiendo a puntos de posible recontaminación (esquema II.2) como por ejemplo la etapa de deshidratación, tras el tratamiento térmico.



Esquema II.3.1. Producción de IFM en polvo. * Posibles puntos de contaminación bacteriana (EFSA, 2004)

II.3.4. Buenas prácticas en la reconstitución de PIFM

Teniendo en cuenta que los preparados en polvo no son estériles, se recomiendan unas buenas prácticas de reconstitución de la PIFM aplicables en el entorno de hogares y hospitales.

El peligro identificado en la etapa de reconstitución de biberones en salas de preparación y posterior almacenamiento, es la proliferación del microorganismo. Son necesarias por tanto, medidas preventivas en este aspecto. Edelson-Mammel y

II. INTRODUCCIÓN

Buchanan (2004) demostraron que mediante la rehidratación de preparados en polvo para lactantes con agua previamente equilibrada a 70°C se podía conseguir una reducción superior a 4 log₁₀ unidades de *C. sakazakii*. Diversas autoridades en salud pública (FAO/WHO, 2006, EFSA, 2004; Codex 2008) recomiendan que la reconstitución de la PIFM se realice a temperaturas de entre 50-70°C, como medida de control. Sin embargo, todas estas organizaciones, así como la comunidad científica y médica, advierten de la pérdida de valor nutricional asociada a esta práctica, algo indeseable en la alimentación de bebés. En este sentido, la investigación y aplicación de tecnologías no –térmicas de conservación, para controlar e inactivar a *C. sakazakii*, encuentran justificación.

El tiempo máximo que los botes en polvo pueden permanecer abiertos es de un mes. Pasado este tiempo se desecharán (Vargas-leguás y col., 2009). En el almacenamiento de la RPIFM, el PCC es mantener la temperatura de refrigeración a ≤ 4°C. A esta temperatura, tanto *C. sakazakii* como otras enterobacterias permanecen inactivos. El límite crítico se ha establecido en 8°C con una humedad relativa máxima de 70% (Kandhai y col., 2004; Pina y col., 2007). El tiempo de refrigeración no puede ser mayor de 24 h a la temperatura óptima. La vigilancia se establece por el control continuo de las temperaturas de las neveras a través de termómetros externos y del registro diario de máximos y mínimos. Las medidas correctoras en caso de que la temperatura de refrigeración sea mayor a la permitida son: la revisión del sistema de refrigeración y la identificación de las posibles causas que aumentan la temperatura de refrigeración. Si se sobrepasa la temperatura máxima durante más de una hora o el tiempo de refrigeración es mayor de 24h, los biberones almacenados deben desecharse.

II.4. TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

La innovación tecnológica en la industria alimentaria es uno de los pilares en los que se sustenta el incremento de la competitividad y el aporte de alimentos seguros desde el punto de vista microbiológico, con una calidad y disponibilidad nutricional acordes con las exigencias del consumidor actual, que demanda “productos semejantes al fresco”. Actualmente están emergiendo nuevas tecnologías no térmicas para obtener alimentos con una mayor calidad nutritiva y sensorial, ya que éstos aspectos suelen verse afectados por los tratamientos térmicos aunque sean mínimos. Por consiguiente, los procesos no térmicos están desarrollándose para la conservación de alimentos como una alternativa a los tratamientos térmicos tradicionales (Selma y col., 2003; Rodrigo y col., 2003).

II.4.1 Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad

II.4.1.1 Fundamentos

El origen de su uso se sitúa a finales de los años 20 en EE.UU. cuando Fetteiman intentó tratar leche mediante impulsos eléctricos para pasteurizarla (Fetteiman, 1923).

El procesado por PEAI consiste en la aplicación de pulsos eléctricos de corta duración (1-20 μ s) a alimentos situados entre dos electrodos, uno de los cuales está conectado a tierra y el otro conectado a la corriente pulsante, produciéndose un campo eléctrico elevado en el espacio comprendido entre ellos (20-40 kV/cm). Es un proceso no térmico, ya que los alimentos tratados se mantienen a temperatura ambiente, o en todo caso a temperaturas inferiores a las de pasterización del alimento. Por ello los alimentos tratados por esta tecnología tienen unas propiedades sensoriales y nutritivas más parecidas al producto fresco (Barbosa y col, 2001; Devlieghere y col, 2004).

Los resultados de estudios experimentales han demostrado la eficacia y validación de estos métodos en la preservación y extensión de la vida útil de alimentos como la leche, zumos de frutas y yogurt, entre otros. Los PEAI se han utilizado con gran éxito en estos y otros productos líquidos, sin embargo, algunos alimentos semisólidos y pulverulentos también han sido tratados (Góngora-Nieto y col., 2002).

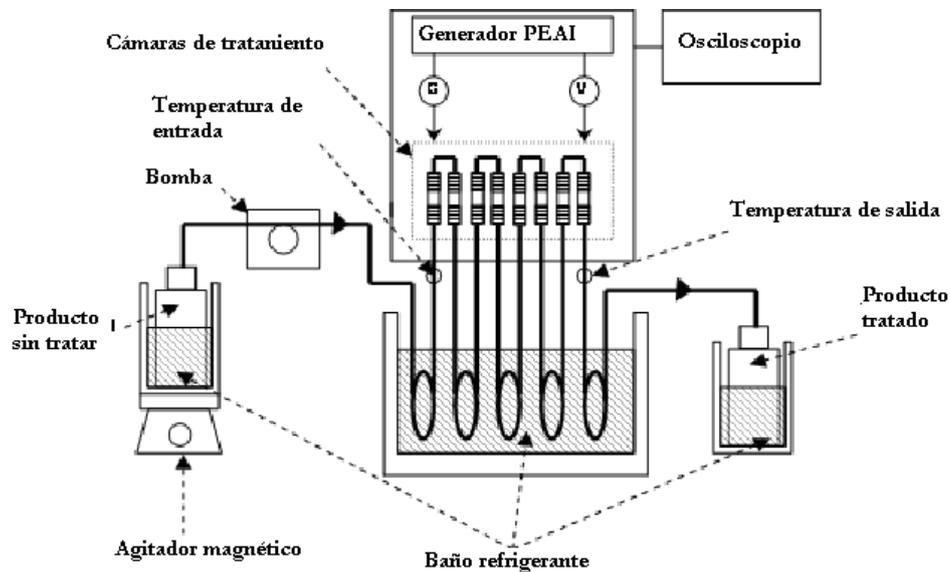
II.4.1.2 Sistemas de Tratamiento por PEAI

Los aspectos más importantes en la aplicación de esta tecnología se encuentran focalizados en el generador de pulsos eléctricos de alta intensidad, el diseño de cámaras para el tratamiento del alimento (de tal manera que éste reciba un tratamiento uniforme con un mínimo de incremento de la temperatura) y en el buen diseño de electrodos para minimizar la electrolisis.

Los diferentes componentes con los que cuenta un equipo de tratamiento por PEAI son los siguientes (Grahl y col, 1996):

- Generador de alto voltaje
- Interruptor de alto voltaje
- Cámaras de tratamiento
- Transformador
- Sondas de temperatura, voltaje e intensidad de corriente
- Osciloscopio
- Sistema de refrigeración

En el esquema adjunto aparecen recogidos los principales constituyentes del equipo (esquema II.4.1)



Esquema II.4.1 Esquema del circuito de funcionamiento del equipo de PEAI del IATA.

El osciloscopio se utiliza para comprobar el voltaje, la intensidad de corriente aplicada durante el tratamiento y la duración del pulso. La energía se suministra por medio de una fuente de alto voltaje y ésta se almacena en uno o varios condensadores que descargan sobre los alimentos a tratar en forma de pulsos. La energía contenida en los condensadores puede ser descargada casi instantáneamente en una millonésima de segundo. Esto se produce en una cámara de tratamiento donde el alimento circula a través de un conducto cilíndrico pequeño (Barbosa y col, 2001).

Las cámaras de tratamiento consisten en dos electrodos separados por un material aislante resistente al alto voltaje en los cuales se aloja el alimento líquido a tratar. Existen distintos tipos de cámaras según el volumen almacenado, distribución y geometría (Barbosa y col, 1999).

II.4.1.3 Factores de influencia en el tratamiento por PEAI: Biológicos y de Proceso

II.4.1.3.1. Factores Biológicos

El tipo de microorganismo (bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras ó esporas); características específicas, como el diámetro de los microorganismos, ó la estructura de la membrana, intervienen en la efectividad del tratamiento por PEAI (Jeyamkondan y col., 1999; Heinz, Alvarez, Angersbach, y Knorr, 2001).

La eficiencia de la inactivación por PEAI también se ve afectada por la concentración inicial de microorganismos en el alimento a tratar.

La fase de crecimiento en que se encuentra el microorganismo es también importante en cuanto a niveles de inactivación. Gásková y col (1996) publican que la inactivación con PEAI en la fase logarítmica es mayor un 30% que en la fase estacionaria, resultados observados también por muchos otros investigadores (Molinari y col., 2004)

II.4.1.3.2. Factores de Proceso

La intensidad de campo eléctrico se produce en el interior de las cámaras y para una geometría de cámaras cofield se define como la diferencia de potencial aplicada entre los dos electrodos dividida por la distancia entre ellos. Según la ley de Gauss, el campo eléctrico en geometría plana se puede definir como:

$$E = \frac{V}{d} \quad \text{Ecuación II.1}$$

donde E es la intensidad de campo eléctrico (kV/cm), V diferencia de potencial (Voltios) y d es la distancia entre electrodos (cm) (Barbosa y col, 1999).

Es uno de los factores más importantes en la inactivación de microorganismos por PEAI, ya que para producir la ruptura de la membrana y posterior muerte del microorganismo es necesario superar el denominado potencial crítico transmembrana o intensidad de campo eléctrico crítica (E_c) que suele situarse en un valor de 5 kV/cm (Hülshager y col., 1983; Qin y col, 1995).

La forma del pulso también interviene directamente en la inactivación de microorganismos. Existen diversos tipos de onda que forman el pulso, entre los cuales podemos destacar: onda de caída exponencial y onda cuadrada

Dependiendo de la polaridad de los pulsos éstos pueden tener características monopolares o bipolares. Los pulsos bipolares son aquellos que aplican un pulso de onda positiva seguido de un pulso de onda negativa (Figura II.4.1). La aplicación de pulso bipolar produce cambios en la orientación de las moléculas cargadas de las células provocando un estrés añadido en la membrana celular, facilitando su ruptura (Ho y col., 1995).

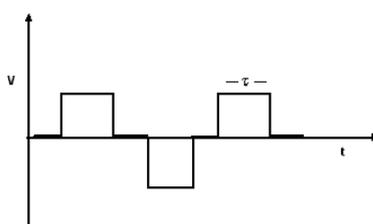


Figura II.4.1 Onda cuadrada bipolar (Barbosa *et al.*, 1999).

La temperatura es otro de los factores importantes en el tratamiento. Durante el tratamiento por PEAI se produce un aumento de la temperatura que dependerá, principalmente, del campo eléctrico aplicado, del tiempo de tratamiento y de las características físico-químicas del alimento. Un aumento de la intensidad del tratamiento por PEAI provocará un mayor aumento de la temperatura.

El incremento de la temperatura inicial del tratamiento favorecerá, en general, la efectividad del tratamiento, produciéndose un efecto sinérgico (pulsos-temperatura) a temperaturas comprendidas entre 35-60 °C. Esto es debido a cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana y conductividad eléctrica del alimento, aumentando así las probabilidades de ruptura de la membrana (Jayaram y col., 1992; Rodrigo y col., 2003, Sampedro y col., 2006; Barbosa y Zhang, 2001).

II. INTRODUCCIÓN

El tiempo de tratamiento (t) es otro de los parámetros directamente relacionados con la inactivación de microorganismos por PEAI y se define como:

$$t = n \times \tau \quad \text{Ecuación II.2}$$

donde t es el tiempo de tratamiento (μs), n es el número de pulsos aplicados y τ es la amplitud o duración del pulso (μs). En general, un incremento del tiempo de tratamiento produce un incremento de la temperatura y una mayor inactivación. La aplicación de tiempos de tratamientos largos y por tanto de un aumento del gasto energético no produce un aumento significativo de la inactivación (Raso y col., 2003, Aronsson y col., 2001).

La amplitud del pulso (τ), se define como el tiempo o duración de un pulso en microsegundos y depende de la forma del mismo (Figura II.4.2). En general, si se aplica una amplitud de pulso excesiva y un tiempo largo de tratamiento se puede producir un incremento excesivo de la temperatura y alterar la conductividad del alimento, con la consiguiente reducción en la efectividad del tratamiento por PEAI. Es fundamental combinar de forma adecuada esta variable para optimizar el tratamiento, logrando una mayor inactivación con un menor incremento de temperatura. Se ha comprobado que un valor cercano a los dos microsegundos logra una mayor reducción microbiana.

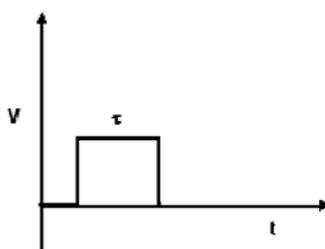


Figura II.4.2 Onda cuadrada bipolar. Amplitud de pulso (τ).

Aspectos como las características físico-químicas de los productos susceptibles de ser tratados por PEAI afectan directamente a la efectividad del tratamiento. Las principales son: el pH, actividad de agua (a_w), presencia de burbujas, y la presencia de sustancias antimicrobianas. Últimamente se ha comprobado que la composición del

alimento (p.e contenido en grasa) es también un factor importante a tener en cuenta (Sampedro y col., 2006; Barbosa y col, 1999)

II.4.1.4 Mecanismo de Inactivación Microbiana por PEAI

Durante la fase de desarrollo de una nueva tecnología de conservación de alimentos es necesario conocer en profundidad los mecanismos por los cuales se inactivan los microorganismos. Se han propuesto varias teorías para estudiar la inactivación de microorganismos por PEAI. La teoría más aceptada en este campo es la teoría de la electroporación. Según esta teoría, la célula expuesta a un campo eléctrico sufre una desestabilización temporal de la bicapa lipídica y de las proteínas de su membrana. Como consecuencia se da la formación de poros en la misma, por lo que ésta queda parcial o totalmente dañada (Chang, 1992; Barbosa y Zhang, 2001; Herrero y col, 2006).

II.4.1.5 Daño celular producido por el tratamiento

Tradicionalmente, la inactivación microbiana por PEAI ha sido descrita en bibliografía como un proceso de “todo o nada”, es decir las células tras el tratamiento, o bien mueren o bien permanecen intactas (Simpson et al., 1999; Russell et al., 2000). Sin embargo publicaciones recientes, describen el proceso de inactivación desde otro punto de vista (García et al., 2003, 2005, 2006).

El efecto de los PEF sobre la membrana celular es bien conocido en la actualidad. Dependiendo de la intensidad del tratamiento el fenómeno de electroporación puede ser responsable de la generación irreversible, de poros en membrana, que den lugar a la muerte celular; ó a la formación reversible de poros (Jaeger y col., 2009; Saldaña y col., 2009; Somolinos y col., 2008; Pina-Pérez y col., 2009) que den lugar a la supervivencia de células subletalmente dañadas que puedan recuperar su capacidad viable bajo condiciones óptimas.

Publicaciones recientes resumen que para condiciones suaves de tratamiento, las células supervivientes aparecen divididas en “sub-poblaciones”: células “no dañadas”, “células dañadas sub-letalmente”, y “células muertas”, utilizando para su determinación medios selectivos y generales, respectivamente. Son muchos los

II. INTRODUCCIÓN

estudios que en los últimos años se han publicado sobre la aparición de células subletalmente dañadas tras diversos tratamientos de conservación, físicos (PEAI, APH, calor, irradiación, etc) o químicos (adición de sustancias antimicrobianas), incluyendo también estudios de recuperación ó muerte de las mismas (Perni et al., 2007; Simpson et al., 1999).

II.4.1.2 Altas Presiones Hidrostáticas (APH)

II.4.2.1 Historia y Fundamentos

El potencial de la alta presión (APH) para conservar alimentos se conoce desde finales del siglo XIX. Su utilidad en este campo fue señalada por el equipo de Bert H. Hite a partir de los estudios iniciados en el año 1899 sobre los efectos de las altas presiones en la conservación de leche, carne y zumos de frutas (Hite, 1989). Ya en la década de los ochenta, la universidad e industria japonesas, apoyadas por el Ministerio de Agricultura, fueron pioneras en el desarrollo de la APH para su aplicación en la industria alimentaria.

Esta iniciativa fue seguida por la comercialización de otros productos, avalada por un interés creciente de los consumidores, que valoran las características organolépticas de los productos tratados por presión, ya que los asocian a productos naturales y con muy poca transformación. En 1998, una industria de Estados Unidos inició la comercialización de ensalada de aguacate tratado por APH, mientras que, en Europa, Francia y España también lanzaban al mercado productos tratados por esta técnica. Utilizando el tratamiento de APH se obtienen productos cuyas vitaminas, así como los sabores, aromas y colores naturales se conservan en mayor medida que tras un procesado térmico. El alimento, a pesar de haber sido procesado, es muy parecido al natural, y es justamente eso lo que los consumidores prefieren.

La APH es probablemente la tecnología no térmica más desarrollada comercialmente. En el mercado mundial se pueden encontrar productos cárnicos loncheados, ostras crudas, jaleas de fruta y mermeladas, zumos de fruta, aliños para la ensalada, calamar crudo, pasteles de arroz, hígado de pato, jamón y guacamole, platos preparados, entre otros, procesados por APH (Fonterra cooperative Group, Nueva Zelanda; Donny Boy Fresh Food, Australia; España S.A., España).

Esta tecnología se utiliza para conservar alimentos sólidos y líquidos, envasados o no, mediante presiones entre 100 y 800 MPa. Las temperaturas que se alcanzan durante el tratamiento pueden ir desde los 0°C a los 100°C y los tiempos de exposición desde pocos segundos hasta 20 minutos.

La aplicación de esta tecnología sigue 2 principios básicos:

- Principio de Le Chatelier
- Principio de Pascal

De acuerdo al principio de LeChatelier, la presión acelera las reacciones que implican reducciones de volumen, e inhibe las reacciones que cursan con aumentos de volumen.

Puesto que el medio utilizado para transmitir la presión suele ser agua (fluido incompresible), se verifica en la aplicación de APH el principio de Pascal postulando que “el incremento de presión aplicado en la superficie de un fluido incompresible, contenido en un recipiente indeformable, se transmite con el mismo valor a cada una de las partes del mismo”. La presión aplicada se transmite de manera isostática (uniforme) y casi instantánea a todos los puntos del alimento, independientemente de su composición, tamaño y forma. Ello evita la deformación del producto, a pesar de estar sometido a tan altas presiones, y hace que éste sea muy homogéneo y no presente zonas sobretratadas. Cuando los alimentos se tratan en su envase, éste debe ser flexible y deformable (ha de tolerar reducciones de volumen de hasta un 15%).

Es especialmente importante la evacuación de los gases del interior para evitar que su compresión reduzca la eficacia de la presurización.

La compresión aumenta uniformemente la temperatura de los alimentos aproximadamente 3°C por cada 100 MPa. Un aumento en la temperatura del alimento por encima de la temperatura ambiente, y en menor grado, una disminución por debajo de la temperatura ambiente, aumentan la tasa de inactivación de los microorganismos durante el tratamiento por altas presiones.

Con fines distintos a la conservación, la aplicación de altas presiones hidrostáticas permite obtener distintos tipos de geles de pescado, carne, huevo y leche. Así mismo, esta tecnología acelera la difusión de solutos en diversos alimentos, la solubilización de gases y los procesos de extracción. La posibilidad de utilizar altas presiones para

II. INTRODUCCIÓN

mantener alimentos a temperaturas inferiores a 0 °C en estado líquido (a 207,5 MPa, el agua permanece líquida a temperaturas de -22°C) o para inducir una congelación y descongelación ultra-rápida constituye un nuevo y prometedor campo de estudio y aplicación en la industria alimentaria.

II.4.2.2 Sistemas de tratamiento por APH

Los principales componentes de un equipo de Altas Presiones son:

- La vasija de tratamiento
- El sistema de generación de presión (bomba)
- El sistema de control de temperatura
- Software (controlador)

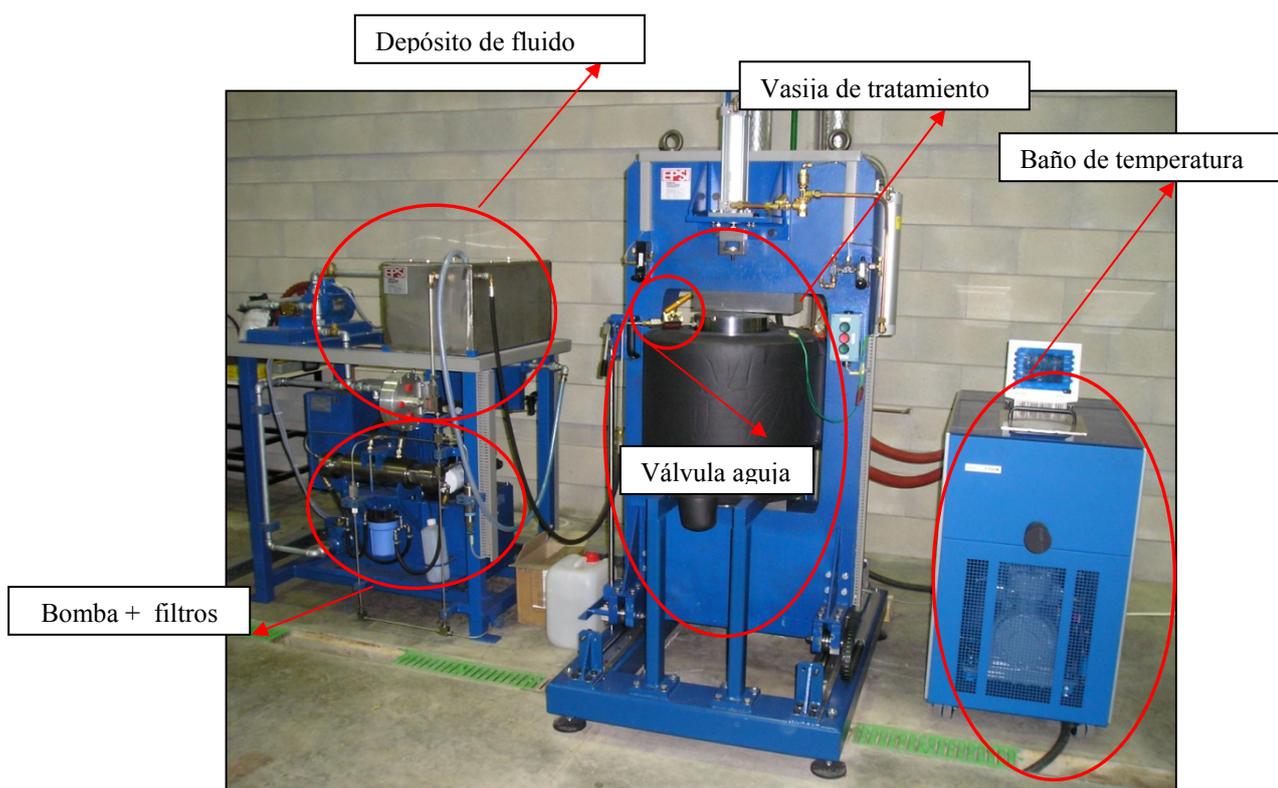


Figura II.4.3 Equipo de tratamiento por APH del IATA (CSIC)

Los equipos de alta presión hidrostática empleados en el procesado de alimentos están formados, fundamentalmente, por una cámara de presurización (cilíndrica de acero de elevada resistencia), un generador de presión (generalmente un sistema de bombeo constituido por una bomba hidráulica y un sistema multiplicador de presión) y un sistema de control de temperatura. En la actualidad existen equipos de funcionamiento discontinuo, los más utilizados (funcionan por ciclos), y semicontinuos.

En los primeros, los alimentos (líquidos o sólidos) envasados se colocan en el interior de la cámara de presurización. Cada ciclo consiste en a) el llenado de la vasija de tratamiento, mediante fluido presurizante (agua o aceite) procedente del depósito contenedor; b) cuando la vasija está llena introducción del producto a presurizar; c) cerrado de la vasija y la válvula; d) incremento de la presión hasta valores que hayamos establecido, sustituyendo el aire de la cámara por el fluido de presurización hasta su total llenado y posteriormente, incrementando la presión hasta los niveles prefijados. e) Una vez alcanzada la presión deseada, la válvula que cierra el circuito permitirá el mantenimiento de la presión durante el tiempo requerido, sin necesidad de aporte adicional de energía. El registro de la temperatura en el interior de la vasija se realiza mediante termopares inmersos en el fluido presurizante. f) Una vez finalizado el tratamiento, se procede a la descompresión de la vasija y a continuación a la extracción de las muestras tratadas

Los sistemas por cargas y semi-continuos pueden adaptarse a operaciones consistentes en un sólo paso u operaciones de tratamiento escalonadas.

El sistema de tratamiento en una sola etapa es el sistema convencional de tratamiento por APH más utilizado en la actualidad. Consiste en aumentar la presión hasta el nivel de trabajo, mantener la presión al nivel deseado un cierto tiempo, y proceder a la descompresión del sistema (Figura II.4.4).



Figura II.4.4 Tratamiento por presión en una sola etapa

Estudios preliminares llevados a cabo por Aleman y col. (1996) mostraron que un tratamiento pulsado por APH aumentaba los niveles de inactivación conseguidos en células vegetativas y levaduras. Estudios posteriores ratifican este hecho considerando los tratamientos pulsados aptos para producir la germinación parcial de esporas. Estos tratamientos pulsantes consisten en la aplicación de varios pulsos de presión, siendo el tiempo total de exposición igual al tiempo de exposición a que estarían sometidas las células, si se diese un solo pulso de presión. Sin embargo, la mayor efectividad de este tratamiento pulsado se debe a factores como: la frecuencia de pulsación, el tiempo de cada intervalo [presión-sin presión], sometiendo a las células a un mayor estrés por las sucesivas compresiones y descompresiones. El tratamiento pulsado puede realizarse a nivel constante de presión o escalonado aumentando progresivamente el nivel.

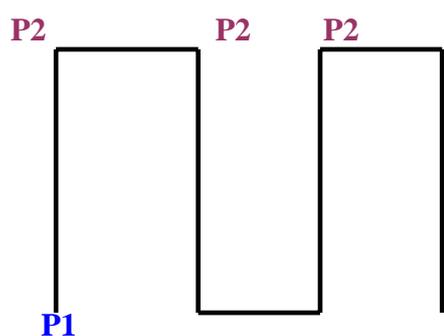


Figura II.4.5 Tratamiento pulsado

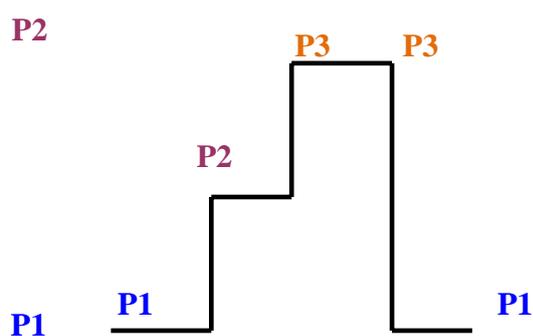


Figura II.4.6 Tratamiento escalonado

II.4.2.3. Factores de influencia en el tratamiento por APH. Biológicos y de Proceso

Entre los factores críticos del tratamiento por APH destacan: el nivel de presión, tiempo de tratamiento, tiempo para lograr la presión prefijada “come up time”, tiempo de descompresión, temperatura durante el tratamiento (incluyendo la correspondiente al calentamiento adiabático), temperatura del producto inicial, distribución de temperatura en el recipiente a esa presión, pH del producto, composición del producto, actividad de agua del producto, integridad del material de empaquetado, y las contribuciones del proceso coexistentes.

II.4.2.3.1. Factores Biológicos

Al igual que en la aplicación de la tecnología de PEAI, también influye en la resistencia del microorganismo a los tratamientos por APH (Barbosa y col, 1999): (i) la sensibilidad de los microorganismos al tratamiento con APH, que varía con cada tipo de microorganismo; las células vegetativas son más sensibles que las esporas. Sin embargo, dependiendo de las condiciones experimentales, se puede lograr una inactivación irreversible de esporas bacterianas después del tratamiento con APH (1) por combinación de P elevada-T^a elevada-tiempo elevado; b) En 2 etapas: una primera en la que se consigue la germinación parcial de las esporas, tratadas a presión y temperaturas moderadas; y una segunda etapa en la que se consigue la inactivación de las células vegetativas, esporas germinadas (Marquez *et al* 1997). (ii) El tamaño de los microorganismos también influye en la eficacia de la inactivación microbiana producida por APH (Barbosa y Zhang, 2001; Barbosa y col, 1999).

Las características de la célula y, en especial su membrana, son diferentes en cada etapa de desarrollo del microorganismo. En la fase logarítmica las células son más sensibles a un factor externo como las APH, que en la fase estacionaria; ya que las células se encuentran en división y por tanto la membrana celular es más susceptible a los cambios externos (Barbosa y Zhang, 2001; Barbosa y col, 1999; Amiali, 2007). Por lo tanto, en estudios de inactivación microbiana se deberían estudiar las condiciones

II. INTRODUCCIÓN

más desfavorables para las que las células resultan más resistentes, es decir, cuando se encuentran en fase estacionaria (Torres, 2005)

II.4.2.3.2. Factores de Proceso

Un aumento del nivel de presión, el tiempo de tratamiento, o la temperatura de procesado, se traducen en incrementos considerables en los niveles de inactivación microbiana.

Otros aspectos importantes de proceso a tener en cuenta en los tratamientos por presión son: el come-up-time (tiempo empleado en aumento del nivel de presión hasta la presión de tratamiento), el tiempo de descompresión (tiempo requerido para reducir la presión desde el nivel de presión de tratamiento hasta presión atmosférica), y los cambios en temperatura producidos durante la compresión/descompresión (calentamiento/enfriamiento adiabático).

Obviamente, un come-up-time prolongado implica un cierto pre-tratamiento de la muestra, afectando así los niveles de inactivación alcanzados tras completar el tratamiento; por ello la consideración de estos tiempos debe ser tenida en cuenta en el diseño del tratamiento por APH. Temperaturas en el rango de 45 a 50°C parecen aumentar los ratios de inactivación en microorganismos patógenos y en levaduras. Temperaturas de procesado entre 90-110°C en combinación con niveles de presión entre 700-900MPa consiguen la inactivación de esporulados tales como el *Clostridium botulinum* (Zook y col, 1999).

Otros factores, como el pH del alimento y la presencia de antimicrobianos, pueden influir en la efectividad del tratamiento. El pH del medio juega un papel importante en la inactivación mediante APH, viéndose ésta tanto más favorecida cuanto más bajo es el pH del alimento. La presencia de antimicrobianos en el producto a tratar, como lisozima en el huevo, reduce la viabilidad de microorganismos patógenos, lo que a su vez aumenta la efectividad del tratamiento. Cada uno de estos factores genera un estrés adicional a los microorganismos, y el resultado es un incremento en la inactivación total (Smelt, 1998; Masschalk, 2001; Barbosa y col, 1999; Barbosa y Zhang, 2001).

II.4.2.4 Mecanismo de Inactivación microbiana por APH

Los mecanismos de inactivación por APH han sido atribuidos principalmente, a efectos a nivel de (i) membrana celular y componentes de la misma; (ii) cambios en aspectos de bioquímica celular, (iii) cambios morfológicos y (iv) efectos a nivel genético (Brown y col., 2003).

Según datos bibliográficos, la (i) membrana celular es una de las estructuras principalmente dañada por la presión, responsable en muchos casos de la muerte irreversible de las células sometidas a condiciones suficientes de tratamiento. Uno de los (ii) componentes celulares más afectados por la presión, son las proteínas. A presiones superiores a 100MPa las interacciones hidrofóbicas tienden a aumentar de volumen (Suzuki y Suzuki 1962). El grado de desnaturalización de una proteína bajo presión depende del grado de hidrofobicidad de dicha proteína (Jaenicke 1981). En la inactivación de enzimas la presión incide alterando estructuras intramoleculares y generando cambios conformacionales en el centro activo (Suzuki y Suzuki 1962). Se asume que en algunos organismos la desnaturalización de las enzimas es la clave de la muerte y/o daño celular producidos en células microbianas bajo presión (Laidler 1951).

Las altas presiones producen (iii) cambios morfológicos en las células vegetativas de los microorganismos como: compresión del gas de las vacuolas, alargamiento de las células, separación de la membrana y pared celular, contracción de la pared celular con formación de poros, modificaciones del citoesqueleto, modificaciones de los núcleos y orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares fuera de la célula. Otras modificaciones son a nivel (iv) genético por inactivación de enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN (Téllez- Luis y col., 2001).

II.4.2.5 Daño sub-letal producido por el tratamiento

Para incrementar el rango de productos que pueden ser procesados de forma segura mediante APH se requiere un conocimiento más profundo de los factores que influyen en la resistencia de los microorganismos a la presión. Además, un conocimiento más profundo de la forma en que la presión actúa a nivel celular nos permite definir los tratamientos que, solos o combinados con calor o sustancias antimicrobianas, son más efectivos en la inactivación (Hauben y col., 1996; Kalchayanand y col., 1994; Kalchayanand y col., 1998; Patterson y col., 1998).

Diversos estudios ponen de manifiesto que las APH dan lugar a la generación de poblaciones dañadas subletalmente que podrían recuperarse en condiciones óptimas tras el tratamiento (Pagán y col., 2000; Pagán y col., 2001; Wouters y col., 1998). Un indicador del posible daño subletal en las células tratadas es el cambio o pérdida en la funcionalidad de las proteínas de membrana, responsables de actividades vitales a nivel celular (Klotz y col., 2009). La presencia de células subletalmente dañadas, y capaces de recuperarse en cualquier producto tratado, debe ser un aspecto a tener en cuenta en lo que se refiere a la seguridad del producto, definición de condiciones de tratamiento, establecimiento de periodos y condiciones de almacenamiento, etc; de lo contrario, estaríamos sobreestimando la seguridad del producto a largo plazo, proporcionando un valor de vida útil incorrecto (Bozoglu, Alpas y Kaletunç, 2004). Niveles de daño subletal del orden del 99%, tras tratamientos por APH, se han obtenido p.e. para *Listeria monocytogenes* (Stewart y col., 1997).

II.5. INGREDIENTES NATURALES CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

El creciente interés social y científico por la sustitución de “conservantes alimentarios químicos”, así como la tendencia al uso de productos con menor impacto medioambiental, ha fomentado la investigación en la selección de productos vegetales ó sustancias naturales que reúnan ciertas propiedades, como por ejemplo un potencial efecto antimicrobiano. Son muchas las sustancias naturales de las que se sabe que han sido empleadas en gastronomía mediterránea, no sólo para el condimento de alimentos, sino por sus beneficiosas propiedades para la salud y la cura de enfermedades. A muchas de estas sustancias, y a sus compuestos derivados se les ha atribuido también capacidad antimicrobiana (López-Malo y col., 2000).

Existen en la actualidad, diversos estudios que recogen resultados concluyentes en cuanto a potenciales efectos antimicrobianos atribuidos a sustancias naturales, presentes en productos vegetales muy variados, y que pueden controlar la proliferación de microorganismos patógenos diversos (Valero y col, 2003; Burt, 2004), presentando en la actualidad buenas perspectivas como complemento en la conservación de alimentos, solos o combinados.

Incluidos en el ámbito de la conservación de alimentos desde el punto de vista microbiológico, los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de componentes vegetales principales responsables de la actividad antimicrobiana (Davidson, 1997; Burt, 2004; Mosqueda-Melgar, 2008). La mayoría son metabolitos secundarios, que en muchos casos sirven como mecanismo de defensa vegetal contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros; algunos de ellos son terpenoides, quinonas y taninos (Cowan, 1999). Son muchos los estudios que demuestran que, bajo determinadas circunstancias, las sustancias naturales con efecto antimicrobiano actúan sinérgicamente con otros métodos de preservación: bajo valor de pH, baja actividad de agua del alimento, presencia de agentes quelantes, tratamiento térmico moderado, altas presiones hidrostáticas (APH) (Indrawati y col., 2004; Martin-

II. INTRODUCCIÓN

Belloso, 2003; Pina y col., 2009), pulsos eléctricos (PEAI) (Dutreux y col., 2000a; Liang y col., 2002; Pina y col., 2009; Burt, 2004).

II.5.1 Factores de influencia en la actividad antimicrobiana de ciertas sustancias

Evidentemente, el efecto de toda sustancia con ciertas propiedades, se verá condicionado por la concentración, ya que ciertos efectos beneficiosos se consiguen a ciertas concentraciones, por debajo o por encima de las cuales, dicho efecto puede no darse (Kotzekidou et al., 2008).

Así mismo, existen condiciones en el sustrato que entran en conflicto con la sustancia adicionada. Generalmente se asume que altas concentraciones de lípidos y/o proteínas en los alimentos protegen a las bacterias de la acción de los antimicrobianos naturales. Contrariamente, una concentración alta de agua y/o sal facilita la acción antibacteriana. La estructura física del alimento puede limitar la acción antibacteriana de las sustancias antimicrobianos naturales. Se ha comprobado que se requieren concentraciones mayores de los antimicrobianos naturales cuando se adicionan a los alimentos, para generar el mismo efecto antimicrobiano que en ensayos *in vitro*. Este efecto puede ser debido a que los alimentos poseen más nutrientes que el medio de cultivo y por tal razón permite que las células bacterianas dañadas reparen su daño en menos tiempo. Sin embargo, no únicamente actúan las propiedades intrínsecas (contenido de grasas, proteínas, concentración de agua, antioxidantes, conservantes, pH, sal y otros aditivos) del alimento en la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos naturales, sino que las características extrínsecas (temperatura, envase y las características del microorganismo) son determinantes (Burt, 2004).

II.5.2. Mecanismo de inhibición/inactivación microbiana por AN

Los antimicrobianos naturales están compuestos por diferentes grupos químicos, por lo que su actividad antimicrobiana no es atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula bacteriana (Fabio et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo de acción específico de estos compuestos aún hoy no ha sido claramente caracterizado. Algunos autores

plantean que su actividad bacteriostática y/o bactericida se debe, fundamentalmente, a la desestabilización a la que es sometida la membrana celular de los microorganismos de forma tal que ésta pierde la integridad (Maguna et al., 2006; López 2006; Griffin, 1979).

Se ha atribuido a los compuestos fenólicos gran parte del poder antimicrobiano de las sustancias naturales, aspecto relacionado a su vez con las características de sus grupos hidroxilo (Raso and Barbosa, 2003). Los compuestos fenólicos por ejemplo producen efectos a dos niveles, sobre la integridad celular, y sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. El poder de acción de los compuestos fenólicos se concentra en lugares vitales para la célula bacteriana causando: degradación de la pared celular, daño en la membrana citoplasmática, permeabilización de la membrana, daño en las proteínas de membrana, pérdida del contenido intercelular al exterior, coagulación del citoplasma y pérdida de la fuerza motriz de protones. Todos estos mecanismos de inactivación no actúan independientemente; algunos afectan a la célula bacteriana como consecuencia del daño anteriormente producido por otro mecanismo de inhibición. Además pueden desnaturalizar las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos para iniciar el proceso de germinación.

La estructura química de cada antimicrobiano natural afecta en su modo de acción e intensidad a la actividad antibacteriana (Burt, 2004). Se ha podido demostrar concretamente que derivados fenólicos tales como el carvacrol y el eugenol provenientes de clavo y tomillo causan la desintegración de la membrana de *E. coli* y *S. typhimurium*. El eugenol (componente mayoritario del aceite de clavo) y el cinamaldehído (componente de la canela) actúan inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular.

Además, la actividad antibacteriana de los antimicrobianos naturales varía de acuerdo con el tipo de microorganismo y se ve influenciada por la temperatura de almacenamiento del alimento. Las bacterias Gram positivas son generalmente más sensibles a los antimicrobianos naturales que las Gram negativas. Se ha estudiado que altas concentraciones de antimicrobianos naturales prolongan considerablemente la

II. INTRODUCCIÓN

fase de latencia de los microorganismos ó logran su inhibición. El aceite de canela, por ejemplo, es efectivo en la inhibición de *B.cereus* (Valero *et al*, 2003; Burt, 2004).

Dependiendo del tipo de material vegetal utilizado, en términos de su naturaleza (especies, extracto ó aceite esencial), el origen (país de origen, altitud a la que crece, temporada de cosecha), el proceso de producción, grado de pureza y su conservación, el efecto antimicrobiano puede verse intensificado o suavizado (Valero y col, 2003).

II.5.3Efecto sinérgico de los AN y las nuevas tecnologías de conservación: (PEAI y APH)

Diversos estudios publicados hacen referencia a la aparición de un efecto sinérgico en conservación de alimentos cuando dos tecnologías, cuya aplicación se produce conjuntamente, producen un mayor efecto que la simple suma de efectos atribuidos a cada acción por separado. Este hecho, ha sido también observado en el uso de AN combinados con otras técnicas de conservación de alimentos demostrando la aparición de sinergismos sobre la inactivación microbiana, reduciendo la necesidad de tratamientos más severos y aumentando la efectividad del conjunto (Ogihara y col., 2008). Tradicionalmente, la aplicación de temperaturas moderadas en combinación con tratamientos por APH y PEA y/ó la preservación de los productos alimenticios en frío, han jugado un papel importante en la inhibición de microorganismos (Delgado y col., 2004). En cuanto a la combinación de sustancias antimicrobianas con otras tecnologías, los estudios son mucho más recientes (Devlieghere y col., 2004; Mahmoud y col., 2006; Marcos y col., 2008; Jofré y col., 2008; Santiago-Silva y col., 2009). Desde que se ha demostrado que nuevas tecnologías de conservación, como los PEA y las APH causan daño en la membrana celular, se sugiere que ambas tecnologías aplicadas simultáneamente a la adición de antimicrobianos naturales tienen el mismo órgano blanco en las células bacterianas, posibilitando así un posible efecto sinérgico.

Como ejemplos, el timol y el carvacrol muestran un efecto sinérgico con las APH, obteniéndose reducciones en *L. monocytogenes* a 300MPa y 3mmol/L de timol ó carvacol (Burt, 2004). Estudios recientes realizados sobre células vegetativas de *Bacillus cereus* en leche desnatada y bebida mezcla de leche y huevo demuestran que el

tratamiento por ambas tecnologías suplementadas con sustancias naturales como vainilla, canela, anís y polvo de cacao, a las que les ha sido atribuido algún efecto antimicrobiano (Busta y Peck, 1968; Ceylan y col., 2004; Ngarmsak y col., 2006), poseen también efectos sinérgicos incrementando la efectividad de los tratamientos por PEAI (Calderón-Miranda y col., 1999; Gill y col., 2004; Pina y col., 2009) y APH (Heinz y Knorr, 2000; Pina y col., 2009). El efecto sinérgico entre tecnologías no-térmicas de conservación y sustancias naturales con propiedades antimicrobianas, además de conferir efectos saborizantes, aromatizantes y excitantes, abre un campo potencial de trabajo hacia posibles tratamientos más suaves combinados con concentraciones moderadas de estas sustancias de gran aceptación entre los consumidores (Mosqueda Melgar. 2007).

II.6. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DEL COMPORTAMIENTO MICROBIANO. CRECIMIENTO E INACTIVACIÓN

1.6.1 Microbiología predictiva

McMeekin *et al.* (1993) definió el término microbiología predictiva como una ciencia cuantitativa que evalúa objetivamente el efecto de las operaciones de procesado, distribución y almacenamiento sobre la seguridad microbiológica y calidad de los alimentos. Consiste en la predicción a través de modelos matemáticos, del comportamiento de patógenos alimentarios en respuesta a condiciones ambientales. Se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles, y de este modo es posible, desde observaciones realizadas experimentalmente, predecir las respuestas de esos microorganismos en condiciones similares (Ross y col., 2000). Un modelo matemático puede definirse como “una representación simplificada de la realidad, que incluye aspectos esenciales de los sistemas existentes, que puede usarse con fines predictivos y de control (Eykoﬀ, 1979). Todos los modelos son simplificaciones que representan los complejos procesos bioquímicos que controlan el crecimiento/inactivación de microorganismos. Los modelos empezaron a utilizarse en microbiología de alimentos a principios del siglo XIX, buscando describir la inactivación de patógenos durante el procesado de alimentos (Larcher y col., 2006). Desde entonces y gracias al auge de la informática, su empleo en microbiología ha crecido considerablemente.

El procedimiento a seguir en modelización matemática viene representado en el diagrama adjunto.



Esquema II.6.1 Etapas básicas a seguir en la modelización matemática de un escenario real.

II.6.2 Clasificación de los modelos predictivos

La clasificación de los modelos predictivos aún no tiene un único esquema con completo apoyo por parte de la comunidad científica (McDonald y Sun, 1999). Sin embargo, el esquema propuesto por Whiting y Buchanan (1997) de modelos primarios, secundarios y terciarios actualmente es el más aceptado:

Los modelos predictivos se pueden clasificar de acuerdo al esquema propuesto por Whiting y Buchanan (1993):

1. Modelos de nivel primario. Describen cambios en el número de microorganismos en función del tiempo, bajo unas condiciones particulares del entorno y cultivo. Los modelos se pueden cuantificar por ejemplo en cfu/mL, formación de toxinas, productos metabólicos, absorbancia o impedancia. Ejemplos de estos modelos son:

Modelos de crecimiento

✓ Ecuación de Gompertz

El de Gompertz es uno de los modelos más utilizados para describir el desarrollo microbiano (Gibson y col., 1988; Zwietering, 1990) determinado la respuesta de los microorganismos bajo diversas combinaciones de factores (Buchanan y Klawitter, 1992)

Una de las ecuaciones más ampliamente utilizadas es la ecuación de Gompertz (GMP, ec. 1) introducida por Gibson, Bratchell y Roberts (1988):

$$\log_{10}(N(t)) = A + \frac{C}{(1 + e^{(-B(t-M))})} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde $N(t)$ es el número de células a tiempo t ; A es la asíntota a tiempo cero, C es la diferencia entre el valor de asíntota superior e inferior, B es el ratio relativo de crecimiento a M , y M es el tiempo al cual el ratio absoluto de muerte es máximo.

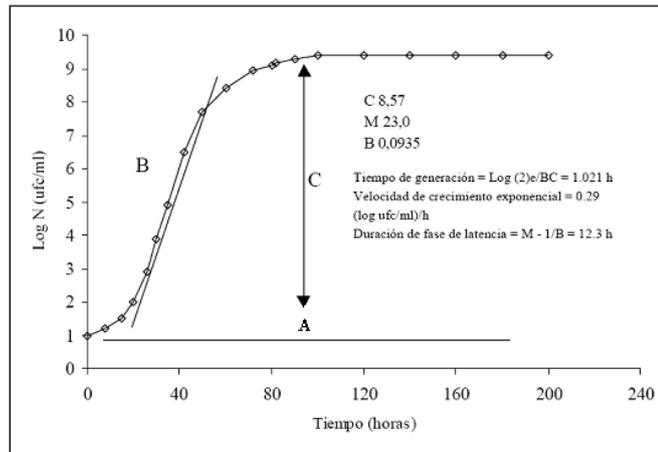


Figura II.6.1. Representación gráfica de la ecuación de Gompertz y sus parámetros cinéticos

Los parámetros de la ecuación de Gompertz que permiten caracterizar el crecimiento del microorganismo se exponen a continuación:

$$\text{Tiempo de latencia } (t_{lag}) = M - \left(\frac{1}{B}\right) + \frac{\text{Log}N(0) - A}{BC/e} \quad \text{Ecuación II.3}$$

$$\text{Ratio específico de crecimiento } (\mu_{m\acute{a}x}) = BC/e \quad \text{Ecuación II.4}$$

$$\text{Tiempo de generación } (t_g) = \frac{\text{log}(2)e}{BC} = \frac{0,8183}{BC} \quad \text{Ecuación II.5}$$

Con el objetivo de simplificar el proceso de ajuste, se propone una re-parametrización integrada en la ecuación de Gompertz, quedando como sigue (Zwietering y col., 1990):

$$\log_{10}(N(t)) = A + C \exp\left(-\exp\left(2,71\left(\frac{\mu}{C}\right)(\lambda - t) + 1\right)\right) \quad \text{Ecuación II.6}$$

donde $A = \log_{10}(N_0)$ (cfu/mL), N_0 es el número inicial de microorganismos, C el crecimiento asintótico en la densidad de población (cfu/mL), μ el ratio de crecimiento (cfu/h) y λ es la fase de latencia (h).

✓ Ecuación de Baranyi y Roberts

Baranyi y Roberts (1994) describen el crecimiento bacteriano mediante un par de ecuaciones diferenciales, las cuales pueden ser usadas en casos en los cuales se den ensayos de crecimiento con variación simultánea de temperatura y tiempo, Para condiciones isotermas, sin embargo, la ecuación que describe el crecimiento se presenta a continuación:

$$y(t) = y_o + \mu A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_o)}} \right) \quad \text{Ecuación II.7}$$

donde

$$A(t) = t + \frac{1}{\nu} \ln(e^{-\nu t} + e^{-ho} - e^{-\nu t - ho}) \quad \text{Ecuación II.8}$$

y_o es el logaritmo natural de la concentración inicial de microorganismos, y_{\max} es el logaritmo natural de la concentración de células al alcanzar la fase estacionaria, μ es el ratio máximo específico de crecimiento, ν es el parámetro de curvatura que caracteriza la transición a la fase exponencial, y ho es el producto de m y de la duración de la fase lag. El parámetro m caracteriza la curvatura antes de alcanzar la fase estacionaria. Cuando $m = 1$ la función se reduce a una curva logística, una simplificación del modelo que es asumida con frecuencia.

Modelos de inactivación

✓ Modelo Log-logístico

El modelo Log-logistic fue propuesto inicialmente por Cole et al. (1993) para describir la inactivación no térmica de microorganismos y posteriormente fue modificada por Chen y Hoover (2003) para evitar el uso directo de números iniciales y reducir el número de parámetros de la ecuación de 4 a 3:

$$\text{Log} \left(\frac{N}{N0} \right) = \frac{A}{1 + e^{4\sigma(\tau - \log t)/A}} - \frac{A}{1 + e^{4\sigma(\tau + 6)/A}} \quad \text{Ecuación II.9}$$

donde A es la diferencia entre la asíntota superior e inferior (cfu/mL), σ e ratio máximo de inactivación ((cfu/mL)/min), τ es el log10 del tiempo al cual se da el máximo ratio de inactivación (min).

II. INTRODUCCIÓN

✓ Modelo de Weibull

El modelo de Weibull asocia la letalidad con probabilidades y representa las curvas de supervivencia como curvas de probabilidad acumuladas para una distribución de sucesos letales (Peleg and Cole, 1998; 2000; van Boekel, 2002). Este modelo ha sido utilizado con éxito para describir la inactivación térmica de microorganismos como *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans*, y *Clostridium botulinum* (Fernandez et al., 2002; Mafart et al., 2002; Corradini et al., 2005).

La función de densidad en términos de inactivación microbiana se representa de la siguiente forma:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b(t^n) \quad \text{Ecuación II.10}$$

Donde $[N/N_0]$ es la fracción de supervivientes, t es el tiempo de tratamiento; b (μs^{-1}) y n son los factores de escala y forma respectivamente. El factor n factor interpreta la forma de la curva de supervivencia, de modo que cuando $n < 1$ la curva de supervivencia es cóncava (y se da la formación de colas), si $n > 1$ indica que la curva de supervivencia es convexa (y aparecen hombros), y cuando $n = 1$ indica que existe una relación lineal entre el t de tratamiento y Log S

✓ Modelo de Baranyi (inactivación)

El modelo de Baranyi, originariamente desarrollado para curvas de crecimiento, (Baranyi y col, 1996) se utiliza también para modelizar curvas sigmoidales de inactivación, expresado como sigue:

$$\frac{dN}{dt} = -k_{\text{máx}}\alpha(t)N\beta(t) \quad (N > 0; t \geq 0) \quad \text{Ecuación II.11}$$

$$N(0) = N_0 \quad (N_0 > 0; t = 0) \quad \text{Ecuación II.12}$$

Donde N y N_0 representan el número de microorganismos a tiempo t y tiempo cero, respectivamente; $k_{\text{máx}}$ es el ratio máximo de muerte; $\alpha(t)$ es la función de ajuste para hombros; $\beta(t)$ es la función de ajuste para colas; y el signo negativo hace referencia a la inactivación de microorganismos. La función de ajuste de hombros $\alpha(t)$

puede tomar diferentes formas, pero las ecuaciones que la describen con mayor frecuencia se presentan a continuación:

$$\alpha(t) = \frac{r^n}{r^n + t^n} \quad \text{Ecuación II.13}$$

Donde r y n son parámetros. El parámetro r es el tiempo requerido para alcanzar un ratio relativo de muerte igual a $1/2$ del ratio máximo relativo de muerte $k_{\text{máx}}$. El parámetro n es el parámetro de curvatura.

La función $\beta(t)$ se utiliza para describir la formación de colas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\beta(t) = 1 - \frac{N_{\text{mín}}}{N(t)} \quad \text{Ecuación II.14}$$

Donde $N_{\text{mín}}$ es la mínima concentración de células que se alcanza en la fase de cola, de modo que cuando $N_{\text{mín}} = 0$ significa que no existe cola. Sin embargo la función de colas $\beta(t)$ varía ampliamente durante la transición desde la fase lineal hasta la fase de cola. Esta función tiende a 0 en la fase lineal porque usualmente $N_{\text{mín}}$ es más pequeña que N . Tras la integración la ecuación queda descrita como sigue:

$$N(t) = N_{\text{mín}} + (N_0 - N_{\text{mín}})e^{k_{\text{máx}}(t-B(t))} \quad \text{Ecuación II.15}$$

Donde $B(t)$ viene descrita por la siguiente función:

$$B(t) = \frac{r}{3} \left[\frac{1}{2} \ln \frac{(r+1)^2}{r^2 - rt + t^2} \right] + \sqrt{3} \arctan \frac{2t-r}{r\sqrt{3}} \quad \text{Ecuación II.16}$$

En términos de logaritmo decimal, la ecuación 1.11 puede ser re-escrita como sigue:

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log \left[q_B + (1 - q_B) e^{(-k_{\text{máx}}(t-B(t)))} \right] \quad \text{Ecuación II.17}$$

II. INTRODUCCIÓN

✓ Ecuación modificada de Gompertz (inactivación)

La ecuación modificada de Gompertz fue propuesta originalmente por Gibson et al. (1988) para modelizar curvas de crecimiento y posteriormente se propuso una modificación para ajustar cinéticas de inactivación:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = Ce^{-e^{BM}} - Ce^{-e^{B(t-M)}} \quad \text{Ecuación II.18}$$

Donde M es el tiempo al cual se produce se da el valor absoluto del ratio máximo de muerte; B es el ratio relativo de inactivación; y C es la diferencia entre la asíntota superior e inferior.

✓ Modelo de inactivación térmica (D)

Los modelos cinéticos clásicos asumen una relación de primer orden entre la población microbiana y la intensidad de tratamiento. Así pues el modelo desarrollado por Bigelow para la inactivación térmica (parámetros D y z) es en ciertos casos aplicable para explicar la cinética de inactivación por PEAI ó APH.

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{D}\right) \quad \text{Ecuación II.19}$$

Donde $[N/N_0]$ es la fracción de supervivientes calculada como número final de microorganismos vivos tras un determinado tratamiento (N) y el número inicial de microorganismos (N_0); D es el tiempo de reducción decimal y t es el tiempo de tratamiento. Se trata de una explicación mecanicista de la muerte del microorganismo debida a la inactivación de algún enzima o sistema enzimático.

2. Modelos secundarios. Están compuestos por ecuaciones que describen cómo varían los parámetros de los modelos primarios (tasa de crecimiento, duración fase de adaptación, velocidad de inactivación, etc.) con cambios en uno o más factores ambientales (temperatura, pH, a_w , atmósfera gaseosa, etc. Ejemplos de ello son:

- ✓ Modelo de la raíz cuadrada (Ratkowsky1982).

En este modelo el ratio específico de crecimiento estimado en condiciones isotermas se modelizado como función de la temperatura de incubación (Ratwosky 1982; Pin y col., 2002):

$$\sqrt{\mu_{m\acute{a}x}} = b(T - T_{\min}) \quad \text{Ecuación II.20}$$

donde b es una constante, T (°C) es la temperatura de incubación y T_{min} es la temperatura teórica mínima para el crecimiento del organismo, estimada por extrapolación en la línea de regresión a $\mu_{\max} = 0$.

- ✓ Modelo de Arrhenius.

El modelo de Arrhenius definido como la relación del logaritmo del parámetro de ln (x) frente al inverso del factor ambiental que está siendo estudiado. El análisis de Arrhenius para una ratio de crecimiento (μ_{\max}) a una temperatura dada (T, °C) se describe mediante ajuste por regresión de la siguiente ecuación (Willis y Robinson, 1988):

$$\ln(\mu_{\max}) = \ln(\mu_{ref}) + \frac{E_a}{R} \times \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \quad \text{Ecuación II.21}$$

Donde E_a es la energía de activación (J/mol)

- ✓ Modelo del valor z.

Tradicionalmente la termorresistencia de los microorganismos se ha establecido en base a 2 parámetros: D_T y z. D_T representa el tiempo necesario, a una temperatura determinada, para reducir una población microbiana en un 90%; mientras que z informa de cómo varía la sensibilidad del microorganismo al modificarse la temperatura. Ambos parámetros se calculan mediante una regresión lineal empleándose el modelo de Bigelow (1920):

$$\text{Log} \left(\frac{N}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{D} \right) \quad \text{Ecuación II.22}$$

II. INTRODUCCIÓN

Donde N es el recuento (cfu) en un instante de tiempo, N_0 es la población inicial (cfu), t es el tiempo y D_T es el valor de D a la temperatura considerada. El valor de z se define como la inversa de la pendiente del log D frente a la temperatura. Esta misma relación se aplica a otros tratamientos de conservación, distintos al térmico, cuando se de un comportamiento lineal en la inactivación con el tiempo. En este caso el valor de z (z_P , z_E , z_{pH} , z_{aw} , etc) se calcula como la inversa de la pendiente del logaritmo del parámetro primario, frente a la variable ambiental (Presión, campo eléctrico, pH, a_w , etc).

- ✓ Modelo de probabilidades
- ✓ Modelos de respuesta superficial o polinomial
- ✓ Modelo de redes neuronales

3. Modelos terciarios. Son aplicaciones de uno o más modelos primarios y secundarios, incorporados a programas informáticos de control a nivel de usuario, cuyo uso facilita la aplicación de dichas ecuaciones. Estos permiten calcular la respuesta de los microorganismos en las distintas condiciones, comparar los efectos de dichas condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos. Estos modelos pueden ser caracterizados como puramente descriptivos (empíricos) o basarse en criterios microbiológicos (cinéticos). También pueden ser lineales, no lineales, segregados (población de células heterogéneas) o no segregados, estructurados (multicomponentes) o no estructurados (Whiting, 1995). Ejemplos de ellos son:

- ✓ Pathogen Modeling Program: USDA.
- ✓ Seafood Spoilage (and Safety) Predictor o SSP o SSSP.
- ✓ @Risk Palisade Corporation: USA
- ✓ ComBase
- ✓ MicroFit
- ✓ Food MicroModel: UK

Bondad del ajuste y Validación de modelos matemáticos

Existen muchos parámetros estadísticos utilizados para evaluar la bondad del ajuste de unos datos experimentales a un modelo determinado. Entre ellos destacan los siguientes:

- ✓ Raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (fitted - observed)^2}{n - p}} \quad \text{Ecuación II.23}$$

donde n es el número de observaciones y p es el número de parámetros a estimar.

- ✓ Coeficiente de regresión corregido (R^2 -corregido)

$$CorrectedR^2 = \left[1 - \frac{(m-1) \left(1 - \frac{SSQ_{regression}}{SSQ_{total}} \right)}{(m-j)} \right] \quad \text{Ecuación II.24}$$

donde m es el número de observaciones, j es el número de parámetros del modelo, SSQ es la suma de cuadrados, y SD es la desviación estándar.

- ✓ Dócima de Durvin Watson (DW)
- ✓ Criterio de Akaike (AIC)
- ✓ Criterio de información bayesiano (BIC) (Carlin y Louis, 1996)
- ✓ Contraste de Kolmogoroff-Smirnoff (KSL)
- ✓ SWOT (Ferrer et al., 2009)

La validación de un modelo se puede definir como la demostración de su exactitud para una aplicación concreta. Un tipo de validación muy útil en modelización matemática, cuando trabajamos sobre sistemas ensayados experimentalmente, es la validación funcional. Dicha validación consiste en la verificación del modelo frente a observaciones obtenidas de manera independiente. La

II. INTRODUCCIÓN

evaluación ideal consiste en obtener los datos pertinentes del mundo real y realizar una comparación estadística de los resultados predichos por el modelo y las observaciones obtenidas experimentalmente.

Entre los índices más utilizados para validar un modelo destacan los propuestos por Ross (1996). Estos índices, denominados factor sesgo (Bf) y exactitud (Af), proporcionan un fácil resumen de la fiabilidad de los modelos y han sido ampliamente utilizados en estudios de validación de modelos microbiológicos (Miles y col., 1997; Nerbrink y col., 1999; Barco, 2001; Castillejo- Rodríguez y col., 2002; Xiong et al., 1999; Linton et al., 1995; Ross 1996; Peleg and Cole, 1998).

Accuracy (Af) y Bias factors (Bf) (Ross, T., 1999) proporcionan información sobre la desviación media entre las predicciones del modelo y los datos observados experimentalmente, siendo tanto más próximos a 1 cuanto mejor es el ajuste dado por el modelo. Los citados indicadores proporcionan de forma efectiva y práctica de predecir la validez del modelo. El bias y accuracy factors se definen como sigue:

$$Bf = 10 \frac{\sum \log(\text{predicted} / \text{observed})}{n} \quad \text{Ecuación II. 25}$$

$$Af = 10 \frac{\sum |\log(\text{predicted} / \text{observed})|}{n} \quad \text{Ecuación II. 26}$$

donde n es el número de observaciones llevadas a cabo. El ratio de valores predichos frente a observados se refiere a la relación entre la fracción de supervivientes dada por el modelo y los valores obtenidos experimentalmente.

II.6.3 Microbiología predictiva y seguridad alimentaria

La microbiología predictiva ha pasado de ser un campo prometedor en microbiología de los alimentos a ser una exigencia en el control de la calidad y seguridad alimentaria. Los modelos predictivos se están aplicando en la actualidad en los sistemas de Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos (ARPC), en el desarrollo de nuevos productos, en el establecimiento de vida comercial, y en la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico (Quantitative Microbiological Risk Assessment, QMRA). Esta última aplicación ha cobrado una gran relevancia internacional, ya que los resultados de la misma constituirán la base para la toma de decisiones en materia de seguridad alimentaria (Gestión de Riesgos). Asimismo, el Reglamento 178/2002 establece el proceso de “Análisis de Riesgos” (Risk Analysis, RA) (Evaluación, Gestión y Comunicación del Riesgo), como base para el desarrollo, por los distintos países, de medidas en materia de seguridad alimentaria.

II.7.EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO (Quantitative Microbiological Risk Assessment, QMRA)

Durante el último decenio, ha surgido el análisis del riesgos (Risk Analysis, RA)-proceso consistente en la i) evaluación, ii) la gestión y iii) la comunicación del riesgo - como modelo estructurado para mejorar nuestros sistemas de control de la seguridad de los alimentos, con los objetivos de conseguir que sean inocuos, reducir el número de enfermedades transmitidas por ellos y facilitar el comercio nacional e internacional de productos alimenticios.

La gestión de la seguridad alimentaria ha evolucionado desde una primera aproximación puntual basada en inspección y analíticas sobre el producto final; a un control integral de todo el proceso basado en la identificación de peligros, y la propuesta de medidas a tomar para reducir o controlar dichos peligros (ARIPCC), con la convicción de que así se reduce el riesgo; hasta un sistema global de análisis de

II. INTRODUCCIÓN

riesgos; que tiene una fuerte base científica que ayuda a tomar decisiones en cuanto a estrategias de gestión de la seguridad alimentaria

Dentro del sistema RA diferenciamos las siguientes etapas/procesos:

1. Evaluación de Riesgos. La evaluación de riesgos aplica un enfoque estructurado para estimar el riesgo y comprender mejor los factores que intervienen de forma positiva o negativa. Un riesgo puede evaluarse en términos absolutos (por ejemplo, calculando el número de consumidores que enferman cada año por comer determinados productos) o en términos relativos (por ejemplo, comparando la seguridad de un producto con la de otro).

2. Gestión del Riesgo. Los gestores de riesgos dirigen el análisis de riesgos, deciden si la evaluación de un riesgo es necesaria o no para resolver un problema y apoyan a los evaluadores en su trabajo. Una vez realizada la evaluación, los gestores de riesgos se basan en el resultado para decidir qué medidas hay que tomar. Cuando es preciso reducir el riesgo, la gestión de riesgos debe optar por las mejores medidas posibles para lograrlo.

3. Comunicación del Riesgo. A la hora de decidir cuál es la mejor manera de controlar un riesgo y de ejecutar las decisiones, la comunicación entre los gestores de riesgos y los sectores público y privado es muy importante. Este debate es menos técnico y tiene en cuenta, por ejemplo, puntos de vista éticos, sociales y económicos. A fin de tomar una decisión que se adecue al objetivo y sea aceptable para todas las partes interesadas, la gestión de riesgos debe asegurar una comunicación adecuada.

Una vez definidas las etapas del RA, la principal tarea de los investigadores en microbiología se centra en la etapa de **Evaluación del riesgo**, sobre todo a nivel cuantitativo (**Quantitative Microbiological Risk Assessment, QMRA**). Esta es una tarea que requiere muchos recursos y un enfoque multidisciplinar. La metodología de QMRA fue definida por el Codex Alimentarius (CAC, 1999) y consta de 4 subetapas señaladas en la figura 9 (FAO/OMS, 2006).



Figura II.7.1. Componentes del análisis de riesgo: evaluación, gestión y comunicación. Etapas

Identificación del peligro es la etapa clave en la evaluación del riesgo, ya que sienta las bases hacia las que dirigir la investigación. En esta fase es muy importante establecer el binomio agente biológico-alimento sobre los que recabar la información necesaria para llevar a cabo la evaluación del riesgo. Responde a preguntas del tipo ¿de qué agente químico/físico/biológico se trata? ¿con qué alimentos está asociado? ¿a qué sector de la población afecta?.

Caracterización del peligro consiste en describir la naturaleza del efecto adverso (tipo de daño y grado de severidad) asociada al consumo del alimento que contiene el agente microbiológico a estudiar. Siempre que sea posible se debe establecer una relación de dosis-respuesta entre diferentes niveles de exposición al peligro por el consumo del alimento (dosis), con la naturaleza e intensidad de los efectos adversos (respuesta).

En **la valoración de la exposición** se trata de evaluar cualitativa o cuantitativamente la ingesta del patógeno a través de todas las vías de exposición. Es decir, se requiere conocer el grado de exposición de la población a dicho peligro, teniendo en cuenta el grado de contaminación del alimento en el momento del consumo. Los datos que van a facilitar esta información se pueden agrupar en dos

II. INTRODUCCIÓN

epígrafes: a) incidencia y niveles de concentración del patógeno en el alimento y b) datos de consumo de la población.

La **caracterización del riesgo**, finalmente, implica integrar toda la información obtenida en apartados anteriores en un modelo que permita estimar la probabilidad de que la población resulte afectada por la exposición a dicho peligro. La caracterización del riesgo suele incluir otras referencias o comentarios relativos al impacto de diferentes escenarios en el riesgo.

II.7.1 Aproximaciones deterministas y estocásticas del QMRA

Las evaluaciones de riesgos se realizan con un fin determinado (*fit-for-purpose*), y pueden estimar los riesgos de forma cualitativa o cuantitativa. Las evaluaciones cuantitativas (QMRA) tienen la ventaja de que pueden ser utilizadas para valorar el efecto de diferentes intervenciones en el riesgo estudiado (escenarios dentro del modelo), lo que les confiere un gran valor añadido. Estas valoraciones cuantitativas pueden ser estimaciones puntuales (deterministas o estimaciones puntuales) o estocásticas (probabilísticas).

La **aproximación determinista** o “estimación puntual” proporciona valores simples representativos del valor medio, para cada una de las condiciones de entrada en el modelo. Un valor sencillo (medio, máximo, más frecuente, 95th percentil, etc) se elige para caracterizar cada variable que interviene en el modelo (concentración microbiana; cantidad de alimento consumido; concentración tóxica, etc). Los valores puntuales estimados se combinan en modelos matemáticos para generar valores de salida. Cuando se llevan a cabo estudios deterministas, seleccionando un valor “conservacionista” determinado para cada variable de entrada, se pueden conseguir resultados del lado de la seguridad alimentaria, para las variables de salida. Sin embargo, una consideración “conservadora” de las variables de entrada, puede resultar irrealista, proporcionando sobreestimaciones para la variable de salida, ya que un escenario altamente improbable (por ejemplo, resultado de la combinación de sucesos muy desfavorables y poco probables) puede ser obtenido como output. Algunos valores son ciertamente más probables que otros, sin el conocimiento de qué valores

de salida son los más probables, poco valor puede tener la estimación realizada. Los modelos probabilísticos o estocásticos, solucionan este problema.

Una evaluación *estocástica o probabilística* de los datos, recoge toda la información inherente a cada variable de entrada, información codificada en forma de distribuciones de probabilidad que incluyen todos los posibles valores que puede tomar la variable en estudio. Consecuentemente, la variable de salida “output” de una evaluación estocástica, viene también definida por una distribución de probabilidad que describe el rango de valores de la variable que pueden suponer un riesgo para el consumidor o la población en su globalidad, así como el nivel “más probable” de riesgo al que estaremos expuestos. La distribución utilizada para describir las variables del modelo depende de los datos de que dispongamos, del número de observaciones, y del conocimiento sobre la naturaleza del fenómeno o proceso en estudio.

Investigadores de todo el mundo han profundizado en las posibles distribuciones de probabilidad más adecuadas para describir cada tipo de proceso o variable. Entre las citadas revisiones destacan las llevadas a cabo por Vose (2006), Morgan and Henrion (1990) and Cullen and Frey (1999).

La transición de evaluar un proceso a nivel determinista hasta una evaluación probabilista o estocástica es un proceso complejo que requiere de tiempo e información. Sin embargo, gracias a la disponibilidad de programas informáticos de simulación, es posible abarcar rangos muy amplios de estudio con un esfuerzo razonable. Los softwares y paquetes informáticos disponibles en el mercado, como por ejemplo, @Risk de Palisade, ó Cristal ball, fueron diseñados en un principio con objetivos en materia económica; estimación del riesgo financiero, estimación de costes etc., y actualmente también son de gran utilidad en microbiología predictiva. En estos casos, los programas utilizan los datos introducidos en una hoja Excel, provenientes de la experimentación en laboratorio, industria, ó administración pública, realizando muestreos al azar o fijos, de las distribuciones de cada variable, emitiendo salidas que reproducen el comportamiento real del sistema completo Además permiten, evaluar diferentes situaciones hipotéticas o escenarios, introduciendo los cambios deseados en los inputs seleccionados. La ventaja de los modelos estocásticos frente a los

II. INTRODUCCIÓN

deterministas radica en el volumen de información que nos devuelve, una información más aproximada a la realidad, muy necesaria para sustentar cualquier proceso de toma de decisiones en seguridad alimentaria y trazabilidad, y el ahorro de tiempo y dinero en experimentación (Garrido, 2008)

II.7.2 Software de análisis

El software @Risk (Palisade Corporation, USA) nos permite incluir la incertidumbre presente en las estimaciones para generar resultados que muestren todos los valores posibles en el escenario planteado, de forma dinámica y realista (distribuciones de probabilidad).

Este software utiliza la herramienta denominada “simulación” para combinar todos los factores inciertos identificados en la situación que se desea modelizar. Mediante el software @Risk podemos introducir en nuestras estimaciones todo lo que sabemos a cerca de una variable. @Risk utiliza toda esa información, a través de hojas Excel, para analizar los posibles resultados, llevando a cabo cientos de miles de análisis de escenarios diferentes, al mismo tiempo. @Risk estructura los resultados del análisis se estructuran en tablas y gráficos que ilustran los riesgos a los que nos enfrentamos en cada caso/escenario (Risk Analysis and SimulationAdd-In for Microsoft® Excel Version 4.5. 2002)

II.7.2.1 Herramientas de aplicación al QMRA

II.7.2.1.1 Best Fit

Cada escenario vendrá definido por sus propias variables. Mediante la herramienta BestFit del software @Risk podemos asignar distribuciones de probabilidad, que definan fielmente la incertidumbre de una variable, estableciendo el rango de valores que la variable puede tomar (del máximo al mínimo), y la probabilidad de que cada valor del rango realmente se produzca (Risk Analysis and SimulationAdd-In for Microsoft® Excel Version 4.5. 2002)

II.7.2.1.2 Simulación de Monte Carlo (SMC)

Existen numerosas referencias bibliográficas de autores que han empleado la simulación de Monte Carlo como herramienta de análisis en procesos de evaluación de riesgo microbiológico (Van Impe y col., 2001, Berg, T., 2000; Poschet y col., 2003; Pouillot y col., 2003, Nauta y col., 2009; Ferrer y col., 2006; Pina y col., 2009). En el presente estudio, utilizaremos modelos matemáticos y la simulación de Monte Carlo para llevar a cabo nuestro QMRA. El software @Risk utiliza la simulación de Monte Carlo como método de cálculo en el que se genera una distribución de posibles resultados mediante el cálculo repetido del modelo, utilizando cada vez una serie diferente de valores de las variables de entrada (inputs), escogidos aleatoriamente para crear la distribución de probabilidad de la variable de salida (output). Se lleva a cabo la simulación de miles de escenarios. Cada nuevo cálculo de condiciones o valores para las variables de entrada, se denomina iteración. Los resultados del análisis se presentan en forma de distribuciones de probabilidad.

II.7.2.1.3 Análisis de Sensibilidad

El análisis de sensibilidad permite determinar la influencia que las variables de entrada del modelo (inputs) tienen en las variables de salida (outputs). Mediante este análisis es posible identificar los inputs cuyo efecto resulta significativo sobre el valor del output. El análisis de sensibilidad nos devuelve los valores de los coeficientes de correlación que existen entre el output y cada input. Los resultados pueden ser expresados gráficamente mediante gráficos de “tornado”. Estos gráficos consisten en un conjunto de barras cada una de las cuales representa una variable de entrada, y cuya longitud determina la sensibilidad que el output tiene a las variaciones del citado input.



III. OBJETIVOS

III OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es estudiar el efecto de diferentes barreras como son los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), altas presiones hidrostáticas (APH), la adición de ingredientes naturales con capacidad antimicrobiana o la temperatura de almacenamiento en la inactivación y crecimiento de *Cronobacter sakazakii*

Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de crecimiento de *C. sakazakii* a diferentes temperaturas de incubación en fórmulas lácteas infantiles y medio de referencia. Ajuste a modelos matemáticos y cálculo de parámetros cinéticos.
2. Efecto de los PEAÍ y APH sobre la inactivación de *C. sakazakii* en fórmula en polvo reconstituida y medio de referencia. Ajuste a modelos matemáticos y cálculo de parámetros cinéticos.
3. Efecto de los PEAÍ y APH sobre la generación y evolución de células de *C. sakazakii* subletalmente dañadas
4. Efecto de la adición de cacao como ingrediente natural con capacidad antimicrobiana sobre la inactivación de *C. sakazakii*. Ajuste a modelos matemáticos y cálculo de parámetros cinéticos.
5. Desarrollo de una evaluación de la exposición para *C. sakazakii* en fórmula infantil en polvo reconstituida en hospitales.

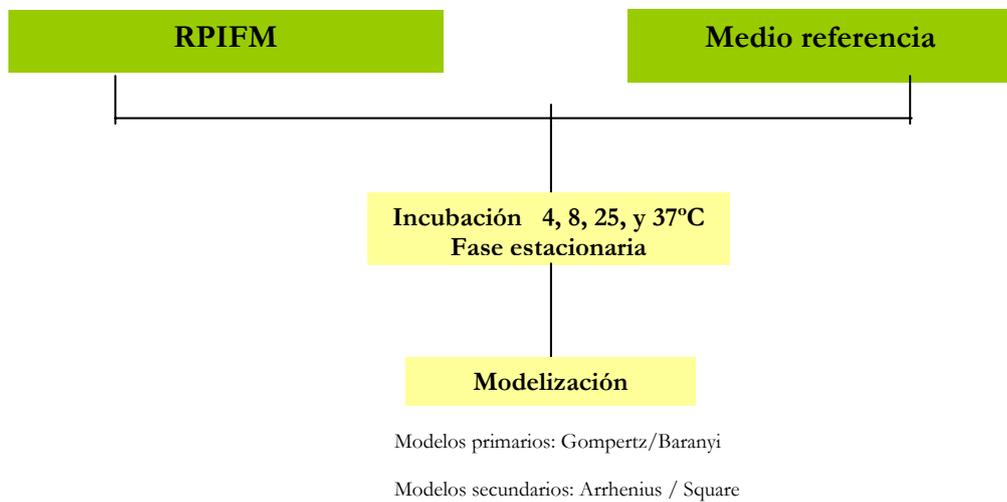


IV. PLAN DE TRABAJO

IV PLAN DE TRABAJO

IV.1) Crecimiento de *Cronobacter sakazakii* a diferentes temperaturas

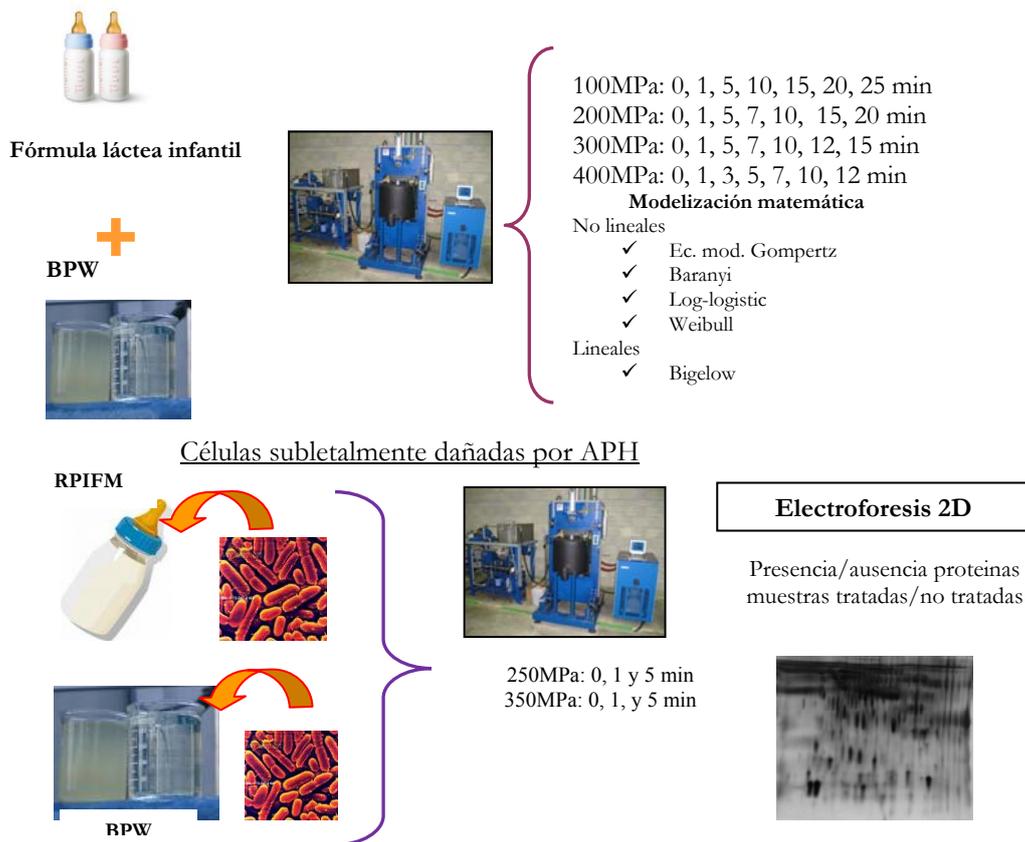
En el presente trabajo se llevará a cabo un estudio de crecimiento para *C. sakazakii* (CECT 858) en dos sustratos: medio de referencia (BPW) y fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM), a diferentes temperaturas de almacenamiento: 4, 8, 25, 37°C. Los datos experimentales se ajustarán a modelos primarios y secundarios, calculándose los parámetros que caracterizan el crecimiento.



Esquema IV. 1. Resumen de actividades para el estudio de crecimiento de *C. sakazakii* en medio de referencia y RPIFM.

IV.2) Tratamiento de *Cronobacter sakazakii* por Altas Presiones Hidrostáticas (APH)

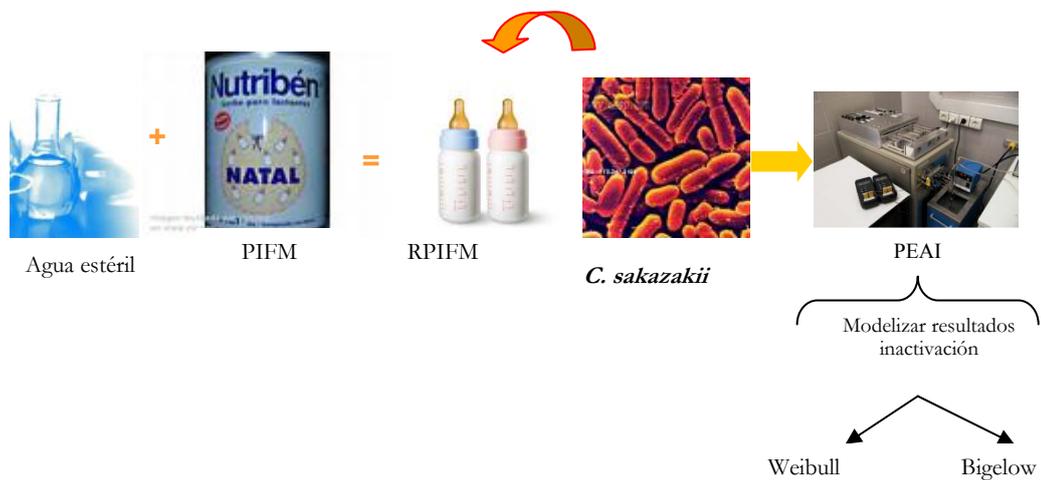
En el presente trabajo se llevará a cabo un estudio para evaluar la resistencia del microorganismo *C. sakazakii* a la tecnología APH, bajo diferentes condiciones, cuando se encuentra suspendido en RPIFM y BPW. Se utilizaron niveles de presión de 100, 200, 300, y 400 MPa, y 7 tiempos de tratamiento para cada nivel de presión. Los datos experimentales se ajustarán a modelos matemáticos lineales y no lineales y se obtendrán los parámetros cinéticos que caracterizan su inactivación. También se realizó una primera aproximación proteómica con el objetivo de asociar un posible daño-celular causado por la tecnología de APH, con cambios en la inducción ó expresión proteica



Esquema IV.2. Resumen de actividades en el tratamiento de *C. sakazakii* por APH y posterior aproximación al estudio de cambios proteómicos debidos al tratamiento.

IV.3) Tratamiento de *Cronobacter sakazakii* por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI) en BPW y RPIFM

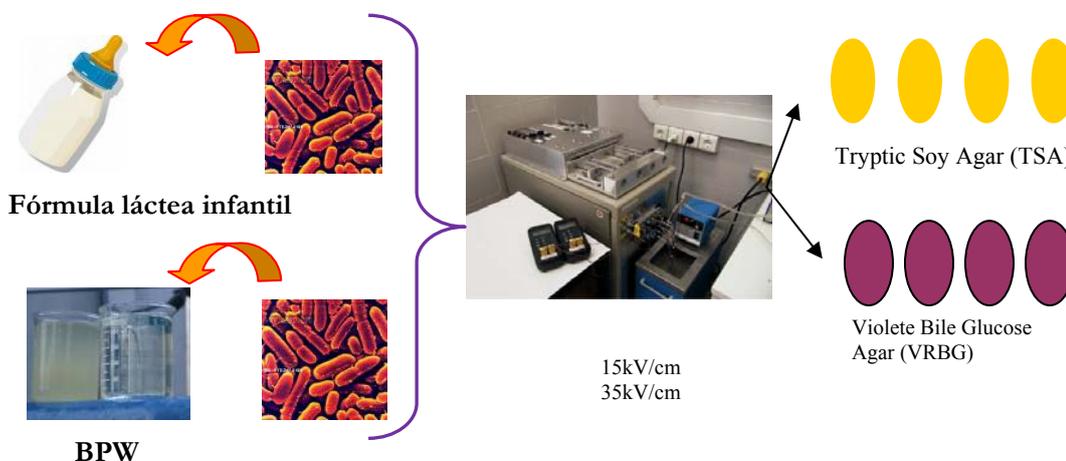
En el presente capítulo se pretende evaluar la resistencia del microorganismo *C. sakazakii* a la tecnología PEA, bajo diferentes condiciones, cuando se encuentra suspendido en RPIFM y BPW. Se aplicarán intensidades de campo eléctrico de 10, 20, 30 y 40 kV/cm, y 10 tiempos de tratamiento por campo. Los datos obtenidos se ajustarán a modelos matemáticos lineales y no lineales y se obtendrán los parámetros cinéticos que caracterizan su inactivación



Esquema IV. 3. Resumen actividades inactivación de *C. sakazakii* por PEA.

IV.4) Estudio de daño subletal en células de *Cronobacter sakazakii* tratadas por PEAI.

Este capítulo se centran en estudiar la posible generación de daño subletal en las células de *Cronobacter sakazakii* tratadas por PEAI en función de la intensidad de campo eléctrico y de la energía aplicada en el proceso y tras el tratamiento y durante 24h de almacenamiento refrigerado

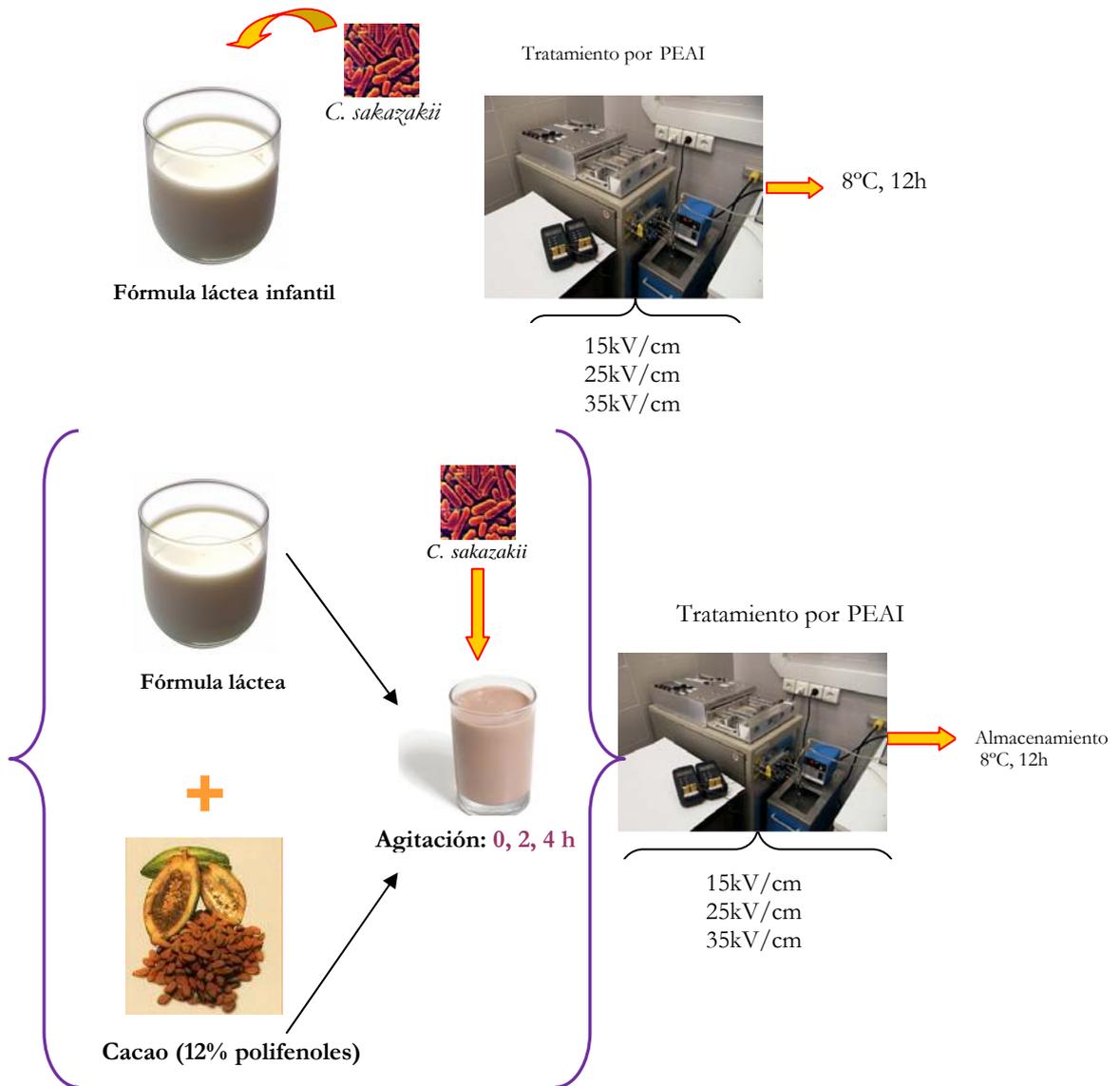


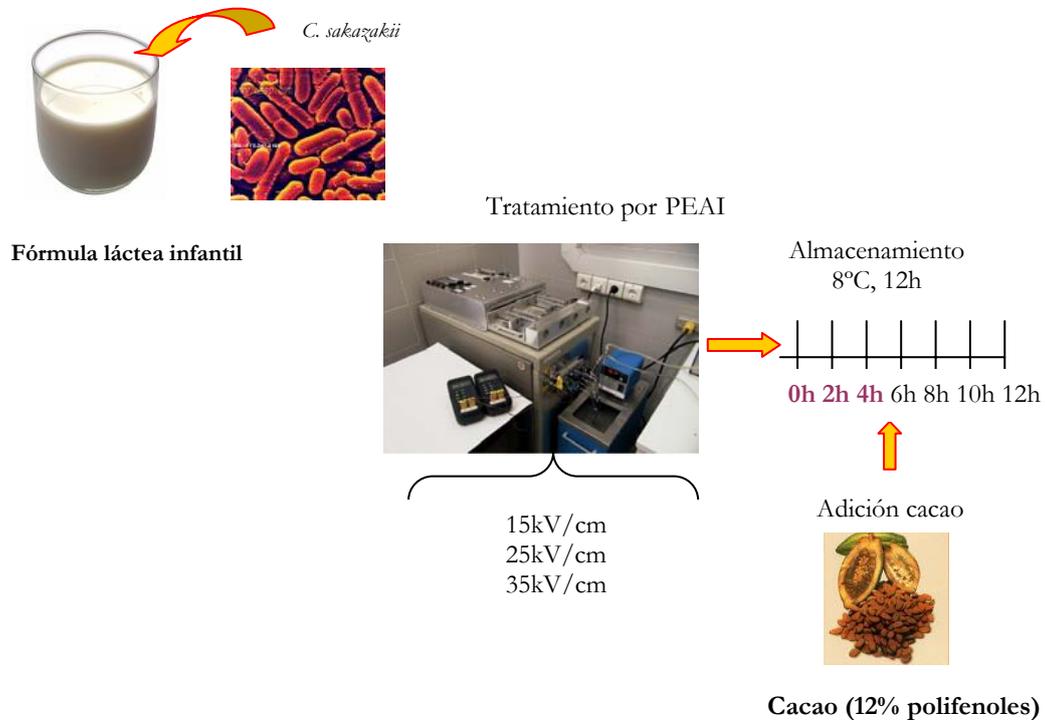
$$\%SD = \frac{(cfu / ml)TSA - (cfu / ml)VRBG}{(cfu / ml)TSA} \times 100$$

Esquema IV. 4. Resumen de actividades en el estudio de daño subletal sobre células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI.

IV. 5) Tratamiento de *Cronobacter sakazakii* por PEAI en fórmula láctea suplementada con polvo de cacao (CocoanOX 12%).

En el presente trabajo se llevarán a cabo estudios sobre el posible efecto bactericida o bacteriostático de un polvo de cacao rico en polifenoles como una barrera adicional en la inactivación de células de *Cronobacter sakazakii* tras el tratamiento por PEAI y tras 12h de almacenamiento refrigerado de las células tratadas. Se evaluarán distintas concentraciones de CCX y diferentes momentos de adición del CCX a la fórmula láctea infantil (0, 2 y 4h antes y después del tratamiento de PEAI)

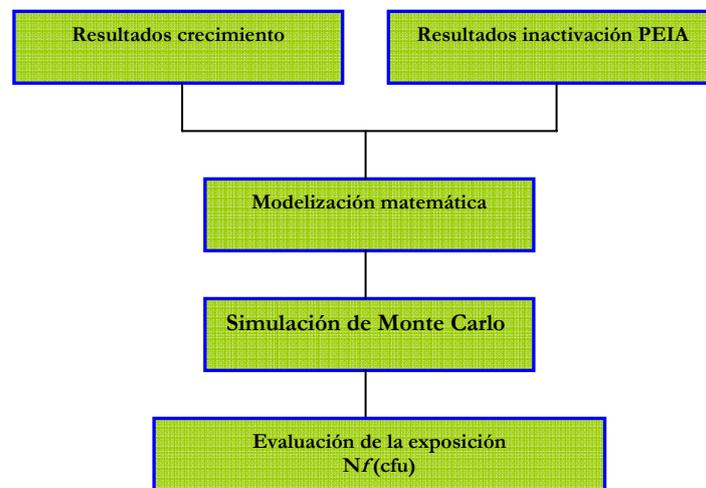




Esquema IV. 5. Resumen de actividades en el estudio de adición de CCX+ tratamiento por PEAI sobre células de *C. sakazukii*

IV. 6) Evaluación de la exposición para *Cronobacter sakazakii* en RPIFM

Considerando el proceso global de reconstitución, almacenamiento y consumo de fórmulas infantiles en polvo reconstituidas, se llevará a cabo una evaluación de la exposición a *C. sakazakii* por consumo de RPIFM en hospitales. Para ello se hará uso de la modelización matemática para el crecimiento e inactivación por PEAI obtenida en capítulos previos, y se aplicará la metodología de simulación de Monte Carlo como herramienta básica para obtener los valores de exposición (N_f) más probable ingerida por los bebés en hospitales.



Esquema IV.6. Evaluación de la exposición a *Cronobacter sakazakii* por consumo de RPIFM tratada mediante PEAI



V.RESULTADOS



*Capítulo V.1. EVALUACIÓN DE MODELOS
MATEMÁTICOS EN EL CRECIMIENTO DE
Enterobacter sakazakii A DIFERENTES
TEMPERATURAS*

Publicaciones

Predictive Modelling in Foods

Conference Proceedings

Evaluation of mathematical models for microbial growth of *Enterobacter sakazakii*

M.C. Pina¹., Rodrigo D¹., Blesa E.², Pagán M.J.²., Martínez A.¹

1. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. C.S.I.C. Avda. Agustín Escardino, 7,
46980 Paterna (Valencia)
2. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de
Vera s/n, Valencia, España

Copyright C. Agricultural University of Athens (Athens 2007)

ISBN 978-960-89313-7-4

Congresos

AUTORES Pina M.C., Rodrigo D., Pagán, MJ., Blesa, E., Martínez López A.

TÍTULO Evaluation of mathematical models for microbial growth of *Enterobacter sakazakii*

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de Póster

CONGRESO 5TH International Conference Predictive Modelling in Foods

LUGAR DE REALIZACIÓN Atenas, Grecia - **Internacional**

AÑO Septiembre 2007

V.1.1 Abstract

Con objeto de conocer el posible incremento en la concentración de *E. sakazakii* durante el período que comprende desde la reconstitución de la fórmula hasta el momento de la ingesta en hogares y hospitales, se llevó a cabo un estudio partiendo de niveles de concentración del patógeno $\approx 10^2$ ucf/mL, inoculado en medio de referencia y caldo de triptona-soja (TSB) y en fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM). El estudio se llevó a cabo para ambos sustratos inoculados e incubados a las temperaturas de 4, 8, 25, y 37°C.

Como objetivos principales del presente estudio se plantea: a) conocer detalladamente el comportamiento del crecimiento de *E. sakazakii* a diferentes temperaturas, en ambos sustratos, utilizando para ello modelos predictivos primarios y secundarios y; comparar la adecuación de cada modelo, como herramienta para ajustar las curvas de crecimiento del microorganismo y realizar predicciones.

Las cinéticas de crecimiento de *C. sakazakii* se ajustaron a los modelos de Baranyi y al modelo de Gompertz para determinar los parámetros que definen el crecimiento del microorganismo: concentración inicial (N_0), fase de latencia (λ), ratio específico de crecimiento máximo (μ_{\max}) y concentración final al alcanzar la fase estacionaria (N_{\max}).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el proceso de modelización y ajuste, la ecuación de Gompertz proporcionó una mejor descripción del crecimiento ajustando con mayor precisión los datos experimentales a las diferentes temperaturas de estudio.

La temperatura afectó significativamente ($P < 0.01$) a los valores del parámetro λ , siendo tanto más prolongada la fase de latencia, cuanto más baja es la temperatura de incubación. El valor de fase lag obtenido para la temperatura de 8°C fue de 139.6h, resultando para 37 °C un valor de λ de 0.475h.

La tasa de crecimiento (μ_{\max}) depende también de la temperatura ($P = 0.000$), con valores entre 0.025-0.029 (\log_{10} cfu/h) a 8 °C; 0.303-0.400 (\log_{10} cfu/h) a 25 °C; y 0.799-0.780 a 37 °C, para la RPIFM y el TSB, respectivamente.

A partir del modelo primario de Gompertz se desarrollaron 2 modelos secundarios que describen la relación entre el parámetro μ_{\max} , tasa específica de crecimiento, y la temperatura: el modelo raíz cuadrada y el modelo ecuación de Arrhenius. Ambos modelos resultaron válidos para describir la relación de

dependencia entre el parámetro y la temperatura, relación que resultó significativa en un 99.7 %.

Palabras clave: Fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM), *Enterobacter sakazakii*, crecimiento, modelización, temperatura.

V.1.2 Introducción

Actualmente en el mercado existen gran variedad de productos específicamente formulados para niños menores de 1 año y niños de edades comprendidas entre 1 y 3 años. Estos productos abarcan diversas categorías y son sometidos a complejos procesos de producción, incluyendo composiciones variadas, intentando satisfacer los requerimientos nutricionales especiales de este subgrupo de población.

La seguridad microbiológica de estos productos resulta de gran importancia porque tanto bebés como niños de corta edad son particularmente vulnerables a sufrir infecciones por patógenos alimentarios (Delignette-Muller, 2005).

Estudios epidemiológicos han revelado la presencia e implicación de *E. sakazakii* como contaminante ocasional en fórmulas infantiles en polvo (PIFM) causando sepsis, meningitis neonatal, bacterinemia, enterocolitis necrotizante (ECN), y meningoencefalitis tras la ingestión del producto reconstituido (Mellefont y Ross, 2003). Se ha considerado que incluso niveles bajos de contaminación por *E. sakazakii* en los preparados en polvo para lactantes constituyen un factor de riesgo, dado el potencial de multiplicación que posee este microorganismo, durante la preparación y el tiempo de conservación de la RPIFM antes del consumo.

E. sakazakii puede crecer, en un amplio rango de temperaturas que va de los 4 a los 45°C (Iversen y col., 2004). Además, es la *Enterobacteria* más resistente a condiciones adversas como la deshidratación o el estrés osmótico (Breuwer y col., 2003). Estos aspectos juegan un papel muy importante en la contaminación y multiplicación del microorganismo en PIFM y RPIFM. En general, las poblaciones bacterianas pueden alcanzar altas densidades muy rápidamente.

Aunque existen recomendaciones de cómo preparar y conservar los biberones dictadas por asociaciones profesionales (FAO/OMS, 2006), a veces no se respetan en su totalidad. En otras ocasiones, las recomendaciones a las que los padres tienen acceso no detallan en profundidad algunas de estas prácticas, como cuánto tiempo puede permanecer sin refrigerar la fórmula ya reconstituida, temperatura de los refrigeradores, tipo de envases para la conservación de RPIFM, etc. Una encuesta efectuada entre más de 1.000 madres norteamericanas mostró que algo más del 3% diluían o concentraban las fórmulas; un 0,15% dejaban las fórmulas ya reconstituidas a

temperatura ambiente más de dos horas, y un 35% añadían algún otro tipo de componente diferente a la leche en polvo al biberón antes de los cinco meses de edad (Bernaerts y col., 2003).

Investigadores y autoridades de salud pública, en todo el mundo, se encuentran en la actualidad estudiando la forma de eliminar la bacteria *E. sakazakii* o controlar su crecimiento en RPIFM, en áreas de procesado industrial, y en zonas de reconstitución y preparación de las fórmulas en hospitales.

La necesidad de determinar los niveles en los que se encuentra el microorganismo en la PFIM, tras la reconstitución y durante el almacenamiento, refrigerado/o no, es el primer paso en la adopción de medidas útiles de control.

V.1.3 Objetivos

El objetivo planteado en el presente estudio consiste en (i) describir el crecimiento de *E. sakazakii* a diferentes temperaturas (de refrigeración estricta, 4°C; de ligero abuso, 8°C; temperatura ambiente, 25°C; y la óptima de crecimiento para el microorganismo, 37°C); en dos sustratos, medio de referencia caldo de trisóna-soja, y RPIFM; (ii) obtener los modelos matemáticos que mejor describen el crecimiento; (iii) validar los modelos matemáticos en estudio; (iv) obtener y explicar el sentido biológico de los parámetros de crecimiento obtenidos a partir de los modelos primarios; y (v) obtener modelos secundarios que relacionen los parámetros de crecimiento con los factores tiempo y temperatura de crecimiento.

V.1.4 Material y Métodos

V.1.4.1 Reconstitución del líófilo. El cultivo puro liofilizado de *C. sakazakii* fue proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 858 equivalente a 29544 ATCC).

El líófilo fue re-hidratado en 10 mL de TSB (Scharlab Chemie, Barcelona, Spain), y mantenido en agitación a 37°C. Tras 20 minutos, los 10 mL fueron inoculados en 500 mL de TSB e incubados a 37° C durante 24 h, en agitación continua a 200 rpm hasta obtener células en fase estacionaria. A partir de la suspensión de células obtenida tras 24h a 37°C, se procedió a realizar 2 tandas de lavado de las células mediante

centrifugación (5000g, 5°C, 10 min) (centrífuga Sorvall RC-5B de ultravelocidad) obteniendo 50 viales madre como resultado del proceso de reconstitución.

A continuación se comprobó la concentración de los viales madre a partir de 5 de ellos, mediante diluciones seriadas en agua de peptona al 1% y siembra en placa (agar tristonso-soja, TSA) por duplicado. La concentración media obtenida para los viales madre resultó de $1 \times 10^8 \pm 0.08 \times 10^8$ cfu/mL.

A partir de los viales madre se realizaron paralelamente 3 curvas de crecimiento resuspendiendo una concentración de 10^2 cfu/mL en matraces de 500mL de TSB, mantenidos en agitación a 37°C - 200 rpm hasta obtener células en fase estacionaria. Las curvas de crecimiento se obtuvieron mediante espectrofotometría y recuento en placa de forma simultánea, tomando muestra cada hora. El proceso hasta el alcance de fase estacionaria fue seguido del lavado de las células y la posterior obtención de viales de trabajo, un total de 100 viales con concentración final de $1 \times 10^8 \pm 0.05 \times 10^8$ cfu/mL.

V.1.4.2 Fórmula Infantil en polvo reconstituida (RPIFM). La fórmula infantil en polvo utilizada en el presente estudio (Natal, Nutribén® Alter Farmacia, S.A., Burgos, Spain) fue re-hidratada de acuerdo a las instrucciones del productor.

Se re-hidrataron 160 g de PIFM con 1000 mL de agua estéril a la temperatura de 70 °C (Codex Alimentarius, 2002). La mezcla se mantuvo en agitación a 1000 rpm bajo condiciones estériles. Una vez reconstituida y homogenizada se inoculó a concentración final de 10^2 cfu/mL, y se llevó a la temperatura de incubación. En el caso del medio de referencia, se procede de modo similar. El medio TSB estéril, fue inoculado y llevado a la temperatura de incubación para realizar el estudio. Los valores de pH de ambos sustratos fueron 6.4 ± 0.250 y 6.7 ± 0.250 para RPIFM y TSB respectivamente. Con relación al valor de a_w se obtuvo un valor de 0.130 ± 0.012 y 0.150 ± 0.022 para la RIFM y TSB respectivamente.

V.1.4.3 Inoculación. Los viales de trabajo obtenidos a partir de viales madre, y mantenidos a -80°C se inocularon en 1l de RPIFM o 1l de TSB hasta obtener una concentración final de 10^2 cfu/mL.

El estudio de crecimiento se llevó a cabo por triplicado para cada sustrato, de modo que 3 matraces de 1l de RIFM fueron incubados a las temperaturas de 4, 8, 25 y 37 °C; y del mismo modo se procedió con los 3 matraces para el medio de referencia.

La extracción de muestra se realizó también por triplicado, para cada uno de los sustratos, y a cada tiempo de muestreo. Los intervalos de muestreo utilizados dependieron de la temperatura de incubación, siempre para permitir llevar a cabo un posterior eficiente estudio cinético de crecimiento desde fase de latencia hasta el alcance de la fase estacionaria.

Para los recuentos celulares, se tomaron volúmenes de 0.1 mL en diluciones seriadas a partir de la RPIFM y el TSB, sembrando en placa de TSA por duplicado para cada dilución, e incubando las placas a 37°C, por 24 h. Una cuarta muestra fue obtenida para validar los modelos de crecimiento.

Cada cultivo fue mantenido en condiciones constantes durante el periodo experimental. El número de puntos experimentales osciló entre 20-30, con frecuencia de muestreo variable.

V.1.4.4 Modelización Matemática

V.1.4.4.1 Modelos primarios. La variación del logaritmo de la población microbiana con el tiempo se define a través de curvas de crecimiento (Koutsoumanis y col., 2001; Kandhai y col., 2006). Los datos de crecimiento para *Enterobacter sakazakii* expresados en $\log_{10} N_f$ (Log(cfu/mL)) en RIFM y TSB incubados bajo las diferentes condiciones de temperatura (4, 8, 25, 37 °C) fueron ajustadas a los modelos de Baranyi y Roberts (Baranyo y Roberts, 1994), y a la ecuación de Gompertz (Gibson y col., 1988).

Asumimos que la temperatura es el único factor o variable que influencia el crecimiento de *E. sakazakii* en el presente estudio.

Una de las ecuaciones más ampliamente utilizadas es la ecuación de Gompertz (GMP, ec. II.1) introducida por Gibson, Bratchell y Roberts (1988):

$$\log_{10}(N(t)) = A + C \exp\left(-\exp\left(2.71\left(\frac{\mu}{C}\right)(\lambda - t) + 1\right)\right) \quad \text{Ecuación V.1.1}$$

donde $A = \log_{10} (N_0)$ (\log_{10} (cfu/mL)), N_0 es el número inicial de microorganismos, C el crecimiento asintótico en la densidad de población (\log_{10} (cfu/mL)), μ el ratio de crecimiento (\log_{10} (cfu/h)) y λ es la fase de latencia (h).

Baranyi y Roberts (1994). introdujeron un modelo mecanicista para describir el crecimiento bacteriano (BAR). La ecuación que describe el crecimiento se presenta a continuación:

$$y(t) = y_0 + \mu A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad \text{Ecuación V.1.2}$$

donde

$$A(t) = t + \frac{1}{\nu} \ln(e^{-\nu t} + e^{-h\nu} - e^{-\nu t - h\nu}) \quad \text{Ecuación V.1.3}$$

y_0 es el logaritmo natural de la concentración inicial de microorganismos, y_{\max} es el logaritmo natural de la concentración de células al alcanzar la fase estacionaria, μ es el ratio máximo específico de crecimiento, ν es el parámetro de curvatura que caracteriza la transición a la fase exponencial, y $h\nu$ es el producto de m y de lag. El parámetro m caracteriza la curvatura antes de alcanzar la fase estacionaria. Cuando $m = 1$ la función se reduce a una curva logística, una simplificación del modelo que es asumida con frecuencia.

V.1.4.4.2 Modelos secundarios. El ratio específico de crecimiento estimado en condiciones isotermas fue modelizado como función de la temperatura de incubación haciendo uso para ello del modelo de raíz cuadrada (Ratwosky 1989; Pin y col., 2002):

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b(T - T_{\min}) \quad \text{Ecuación V.1.4}$$

donde b es una constante, T ($^{\circ}\text{C}$) es la temperatura de incubación y T_{\min} es la temperatura teórica mínima para el crecimiento del organismo, estimada por extrapolación en la línea de regresión a $\mu_{\max} = 0$.

Se utilizó también como modelo secundario el gráfico de Arrhenius definido como representación de $\ln(\mu_{\max})$ frente al inverso de la temperatura $1/T$. El análisis de Arrhenius para una ratio de crecimiento (μ_{\max}) a una temperatura dada (T , $^{\circ}\text{C}$) se describe mediante ajuste por regresión de la siguiente ecuación (Willis y Robinson, 1998):

$$\ln(\mu_{\max}) = \ln(\mu_{ref}) + \frac{E_a}{R} \times \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \quad \text{Ecuación V.1.5}$$

V.1.4.5 Análisis de datos y modelos matemáticos. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics (Statgraphics® Centurion XV, Statpoint Incorporated, USA, 2005) software. El análisis incluye la media y desviación estándar para todas las experiencias realizadas por triplicado. Un análisis de la Varianza ANOVA se llevará a cabo para detectar diferencias significativas entre sustratos.

El análisis también incluye la determinación de la bondad del ajuste para los modelos primarios y secundarios utilizados en el presente estudio. La bondad del ajuste se determinará mediante el coeficiente de regresión corregido (R^2 -corregido), y la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE).

Para validar los modelos utilizados haciendo uso de datos experimentales independientes se utilizarán los indicadores Accuracy (A_f) y Bias factors (B_f) (Ross T., 1999).

Un cuarto set de datos experimentales fue obtenido a las diferentes temperaturas y utilizado en la validación de los modelos matemáticos de crecimiento.

V.1.5 Resultados

Las curvas de crecimiento para *Enterobacter sakazakii* se obtuvieron en RPIFM y TSB a cuatro temperaturas de incubación: 4, 8, 25, y 37°C. Los resultados obtenidos para la temperatura de 4 °C permanecieron en valores de concentración en torno a 1.8×10^2 cfu/mL, o decrecieron con el tiempo. Estudios previos realizados para *C. sakazakii* demuestran que 4°C es la temperatura mínima de crecimiento para el microorganismo (Nazarowec y Farber, 1997), coincidiendo así con los resultados obtenidos experimentalmente en nuestro estudio.

Los resultados de crecimiento a 8, 25, y 37°C fueron ajustados mediante los modelos primarios de Baranyi y la ecuación de Gompertz, con el objetivo de calcular los parámetros biológicos: tasa específica de crecimiento (μ_{\max}), fase lag (λ), máxima

densidad de población (N_f). La tabla V.1.1 muestra los valores de los parámetros predichos por cada uno de los modelos en los diferentes sustratos: RPIFM y TSB.

Tabla V.1.1. Parámetros biológicos obtenidos para el crecimiento de *Enterobacter sakazakii* en RPIFM y TSB mediante los modelos de Baranyi y Gompertz a 8, 25 y 37 °C

		Baranyi			
	T ^a (°C)	Log N ₀	Log N _f	μ	λ
RPIFM	8 °C	2.007 ± 0.063	8.079 ± 0.506	0.025 ± 0.012	111.610 ± 8.726
	25 °C	1.740 ± 0.313	8.550 ± 0.037	0.303 ± 0.044	1.929 ± 0.236
	37 °C	1.027 ± 0.113	8.111 ± 0.371	0.799 ± 0.010	0.478 ± 0.7810
TSB	8 °C	2.017 ± 0.102	8.280 ± 0.487	0.029 ± 0.010	132.054 ± 20.157
	25 °C	1.700 ± 0.086	8.822 ± 0.010	0.400 ± 0.052	2.181 ± 0.087
	37 °C	1.144 ± 0.043	8.017 ± 0.152	0.780 ± 0.007	0.479 ± 0.059
		Gompertz			
	T ^a	Log N ₀	Log N _f	μ	λ
RPIFM	8 °C	2.061 ± 0.212	8.355 ± 0.945	0.027 ± 0.013	113.4000 ± 4.808
	25 °C	2.112 ± 0.415	8.662 ± 0.368	0.384 ± 0.037	3.242 ± 0.609
	37 °C	0.957 ± 0.156	8.570 ± 1.167	0.924 ± 0.052	0.834 ± 0.567
TSB	8 °C	2.055 ± 0.088	8.352 ± 0.580	0.035 ± 0.010	139.600 ± 16.546
	25 °C	1.844 ± 0.060	8.944 ± 0.126	0.473 ± 0.072	3.435 ± 1.766
	37 °C	1.113 ± 0.126	8.490 ± 1.322	0.909 ± 0.043	0.475 ± 0.146

Log N₀: Log₁₀(cfu/mL); Log N_f: Log₁₀ (cfu/mL); μ (h⁻¹); λ (h)

El análisis de la varianza (ANOVA) llevado a cabo para ambos sustratos muestra que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para ambos sustratos N_f , μ (h⁻¹) y λ (h). La idoneidad que tanto la fórmula reconstituida como el medio de referencia suponen para favorecer el crecimiento del microorganismo, *E. sakazakii*, puede constituir una explicación a este resultado.

En cuanto a la máxima densidad de población alcanzada por la células de la cepa CECT 858 a las diferentes temperaturas de incubación, no existen diferencias significativas entre los valores de N_f para las diferentes temperaturas ($P > 0.05$). El parámetro N_f presenta un valor medio de 10⁸ cfu/mL. La concentración inicial de microorganismos, comprendida en el rango de $\pm 10^2$ y 10³ cfu/mL, no resultó influyente sobre la máxima densidad de población alcanzada N_f ($P > 0.05$).

La fase de latencia, definida por el parámetro λ , resulta dependiente de la temperatura para ambos sustratos. Se observa una disminución del valor de λ con el

aumento de la temperatura ya que el tiempo necesario para iniciar la fase de crecimiento exponencial se reduce cuando la temperatura aumenta debido a un aumento de la actividad metabólica que ocurre simultáneamente.

La figura V.1.1 muestra gráficamente las curvas de crecimiento obtenidas experimentalmente y los ajustes realizados por los modelos propuestos, para TSB y RPIFM

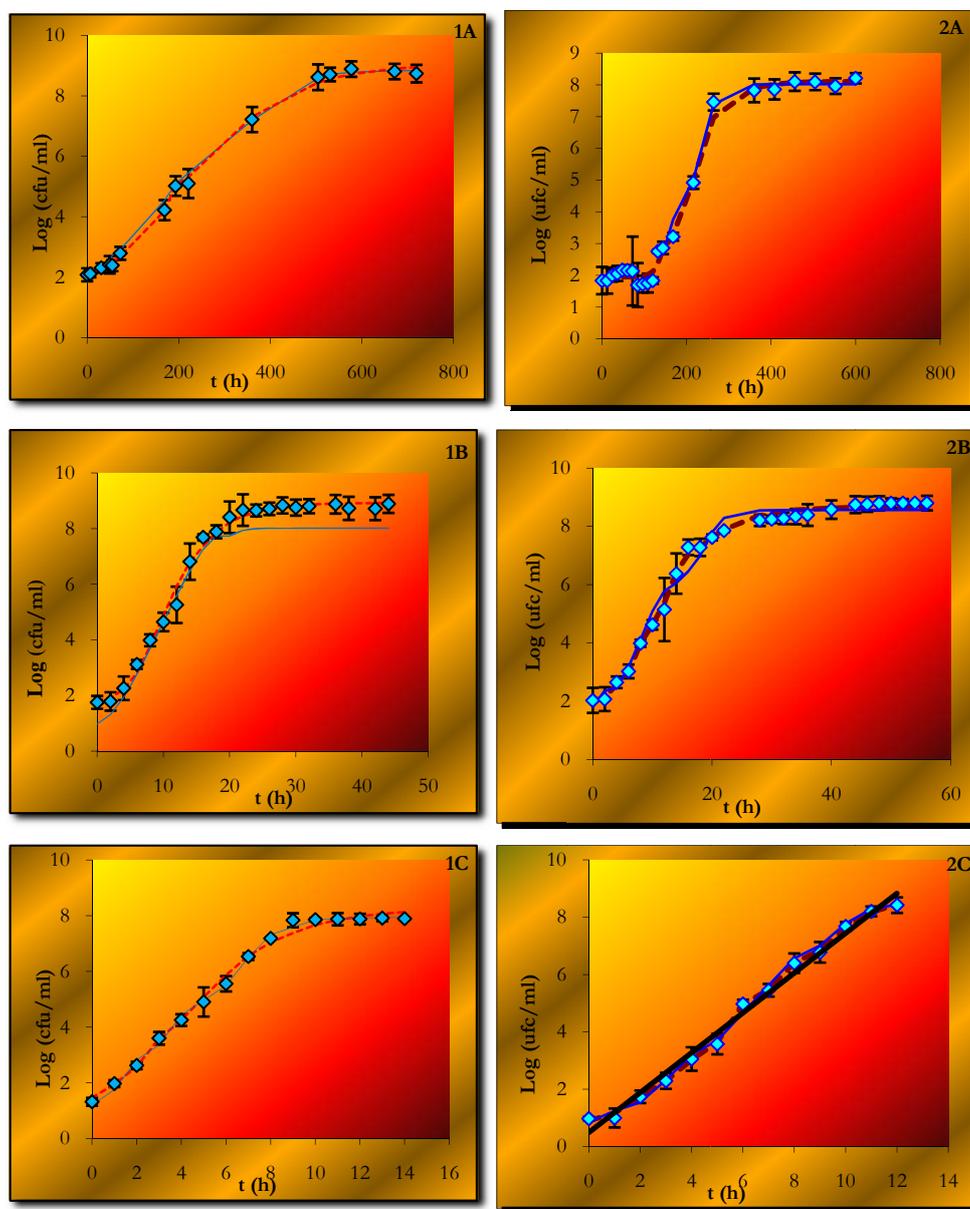


Figura V.1.1. Curvas de crecimiento para *Cronobacter sakazakii* ajustadas a los modelos de Baranyi y Gompertz en (1) Tryptic Soy Broth (TSB) y (2) Reconstituted Infant Formula Milk (IFM), a diferentes temperaturas de incubación: (a) 8 °C, (b) 25 °C, (c) 37 °C. Valores observados (♦), valores predichos por el modelo de Gompertz (—), valores predichos por el modelo de Baranyi (---) y barras de error, calculadas para tres repeticiones

Estos resultados resultan similares a los obtenidos por Buchanan y Klawitter (1992) en cuanto a influencia de la temperatura sobre el parámetro λ . Buchanan y Klawitter exponen que para *Escherichia coli* O157:H7, temperaturas bajas de incubación prolongan la fase de latencia. Similares resultados fueron obtenidos por Sutherland y col. (1992) para el microorganismo *Staphylococcus aureus*. A todo ello se suma lo observado por el grupo de Kandhai y col (2006) para *E. sakazakii* ATCC 29544. El citado grupo observó una reducción progresiva en los valores de λ a medida que aumentó la temperatura de incubación para el microorganismo en fórmula infantil reconstituida.

El hecho de realizar una aproximación lo más definida posible en cuanto a parámetro lag time es muy importante por varias razones; en primer lugar la fase de latencia condiciona la vida útil en almacenamiento de la fórmula infantil reconstituida, siendo tanto mayor dicha vida útil, cuanto más prolongada sea la citada fase de latencia, algo que conseguimos para temperaturas en el rango de 4-8°C; en segundo lugar, la fase lag resulta de gran relevancia como parámetro determinante en modelización matemática de crecimiento, ya que una adecuada predicción de este parámetro nos permitirá tomar decisiones permaneciendo siempre del lado de la seguridad en el producto, y para el microorganismo considerado. Para encontrar una relación que defina la dependencia de la fase lag y la T de almacenamiento se aplicó inicialmente una relación lineal. Sin embargo, los coeficientes de relación obtenidos indicaron que la relación de dependencia entre ambas variables no era lineal. Es posible expresar la relación entre el valor experimental de lag time y T (°C) mediante una ecuación exponencial. Los resultados obtenidos a partir de los parámetros proporcionados por los modelos son los siguientes (GMP, Gompertz; BAR, Baranyi):

GMP (IFM):

$$\lambda = 373.53e^{-0.1721T} \quad R^2 = 0.976 \quad \text{Ecuación V.1.6}$$

GMP (TSB)

$$\lambda = 611.76e^{-0.1974T} \quad R^2 = 0.995 \quad \text{Ecuación V.1.7}$$

BAR (IFM):

$$\lambda = 10^{(-0.0747T+2.5723)} \quad R^2 = 0.9766 \quad \text{Ecuación V.1.8}$$

BAR (TSB)

$$\lambda = 10^{(-0.0857T+2.7866)} \quad R^2 = 0.9945 \quad \text{Ecuación V.1.9}$$

En cuanto al parámetro ratio específico de crecimiento (μ_{\max}) resultó también dependiente de la temperatura aumentando conforme aumentó la temperatura de incubación ($P = 0.000$), en ambos sustratos. Un análisis de la varianza ANOVA mostró que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los valores de μ_{\max} para IFM y TSB en las mismas condiciones. Por ejemplo, los valores de μ_{\max} para el modelo de Gompertz fueron 0.027-0.035 h⁻¹ a 8 °C, 0.384-0.473 h⁻¹ a 25 °C, y 0.924-0.909 h⁻¹ a 37 °C, para RPIFM y TSB respectivamente (Tabla 1.1).

Utilizando la ecuación de Arrhenius como modelo secundario para describir la relación de dependencia μ_{\max} vs. T partiendo de los modelos de Gompertz y Baranyi, se obtuvieron las ecuaciones que se presentan a continuación

GMP (RPIFM)

$$\ln \mu_{\max} = -34.411(1/T) + 0.650 \quad R^2 = 0.986 \quad \text{Ecuación V.1.10}$$

GMP (TSB)

$$\ln \mu_{\max} = -32.276(1/T) + 0.668 \quad R^2 = 0.995 \quad \text{Ecuación V.1.11}$$

BAR (RPIFM)

$$\ln \mu_{\max} = -32.993(1/T) + 0.417 \quad R^2 = 0.977 \quad \text{Ecuación V.1.12}$$

BAR (TSB)

$$\ln \mu_{\max} = -32.345(1/T) + 0.512 \quad R^2 = 0.995 \quad \text{Ecuación V.1.13}$$

El modelo secundario de raíz cuadrada fue utilizado para definir la relación de dependencia entre el ratio específico de crecimiento y la temperatura. Los parámetros del modelo y coeficientes de correlación se muestran en las ecuaciones siguientes:

GMP (RPIFM)

$$\sqrt{\mu_{\max}} = 0.0275 * T - 0.0593 \quad R^2 = 0.999 \quad \text{Ecuación V.1.14}$$

GMP (TSB):

$$\sqrt{\mu_{\max}} = 0.0266 * T - 0.0115 \quad R^2 = 0.994 \quad \text{Ecuación V.1.15}$$

BAR (RPIFM):

$$\sqrt{\mu_{\max}} = 0.0252 * T - 0.0524 \quad R^2 = 0.996 \quad \text{Ecuación V.1.16}$$

BAR (TSB):

$$\sqrt{\mu_{\max}} = 0.0247 * T - 0.0130 \quad R^2 = 0.995 \quad \text{Ecuación V.1.17}$$

El modelo describe de forma apropiada el efecto de la temperatura sobre el crecimiento del microorganismo, de acuerdo a los valores de R^2 . La temperatura mínima obtenida experimentalmente para *E. sakazakii* (ATCC 29544) en el presente estudio fue de 4°C. El valor esperado para μ_{\max} a esta temperatura fue de ≈ 0 . El modelo de raíz cuadrada proporciona una buena predicción de los valores del parámetro μ_{\max} en TSB e IFM a la temperatura mínima de 4°C (ej. para IFM: GMP 0.0025 (h^{-1}); BAR 0.0023 (h^{-1})).

Ambos modelos secundarios, Arrhenius y el modelo de raíz cuadrada describen la dependencia de μ_{\max} con la temperatura, resultando estadísticamente significativos en un 99.7%. Sin embargo, de acuerdo a los valores de R^2 el modelo de raíz cuadrada proporciona un mejor ajuste que el modelo de Arrhenius.

Kandhai y col. (2006) utilizaron también varios modelos secundarios que describen la relación de dependencia de μ_{\max} con la temperatura. Los modelos secundarios utilizados por el citado grupo fueron el modelo de raíz cuadrada de Ratwosky (1982) y el modelo de Rosso y col (1995), siendo éste último el que aportó mejor ajuste.

Los coeficientes y parámetros que definen la bondad del ajuste para los modelos primarios son: el coeficiente de correlación corregido (adjusted- R^2), RMSE, accuracy

factor (A_f) y bias factor (B_f). Estos parámetros fueron calculados para los modelos primarios y aparecen recogidos en la Tabla 2. Los mayores valores de R^2 –corregido, los valores más bajos de RMSE y A_f y B_f próximos a 1 se muestran para ambos modelos (tabla V.1.2)

Tabla V.1.2. Bondad del ajuste de los modelos de Baranyi y la ecuación de Gompertz, a los datos de crecimiento de *E. sakazakii* obtenidos experimentalmente, a diferentes temperaturas, en TSB y RPIFM.

IFM	Baranyi				Gompertz			
	R ² - corregido	RMSE	A_f	B_f	R ² - corregido	RMSE	A_f	B_f
8 °C	0.997	0.095	1.023	1.012	0.998	0.026	1.027	1.008
25 °C	0.979	0.056	1.049	0.998	0.992	0.018	1.023	1.000
37 °C	0.998	0.106	1.054	1.005	0.997	0.072	1.054	1.009
TSB								
8 °C	0.991	0.068	1.038	0.999	0.995	0.038	1.034	1.008
25 °C	0.998	0.080	1.126	0.875	0.996	0.023	1.030	1.004
37 °C	0.996	0.050	1.035	1.007	0.988	0.074	1.039	1.004

Un segundo método utilizado para determinar la bondad de la correspondencia entre los valores experimentales y los predichos por los modelos es el método gráfico en el que se representan los valores predichos de μ_{\max} frente a los observados experimentalmente para ambos modelos en RPIFM (Wijtzes et al., 1993) obteniéndose una línea de equivalencia. Esta línea divide el gráfico en dos zonas, de peligro y de seguridad frente al crecimiento de *E. sakazakii*, tal como se muestra en la figura V.1.2 para el sustrato RPIFM. Para ambos modelos los valores están enmarcados en la zona “segura” de predicciones, sin embargo, los valores predichos por el modelo de GMP están más cercanos a la LOE indicando una mejor predicción

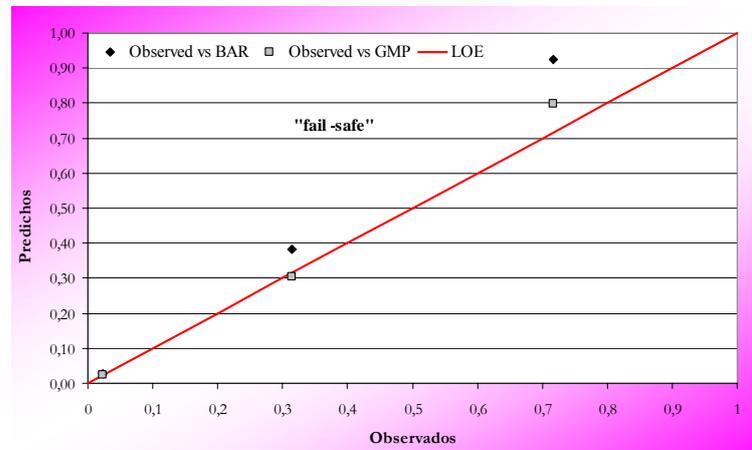


Figura V.1.2 Comparación gráfica de los valores observados y predichos para el ratio específico de crecimiento μ_{\max} de *E. sakazakii* strain 858 CECT en RPIFM usando el método de la Línea de Equivalencia (LOE).

Ya que el modelo de Gompertz proporciona un ajuste más preciso y “seguro” de los datos experimentales, se construye un modelo experimental basado en el de GMP para la RPIFM. La relación obtenida para μ_{\max} (\log (cfu/mL) h^{-1}) y λ (h) frente a la temperatura (T ($^{\circ}C$)), ecuaciones V.1.6 y V.1.14, fueron introducidas en la ecuación de Gompertz (Ec. V.1.1) obteniendo el siguiente modelo experimental:

$$\log_{10}(N(t)) = \alpha + \beta \exp\left(-\exp\left(2.71\left(\frac{(\chi T - \delta)^2}{\beta}\right)\left((\varepsilon \exp(\phi T)) - t\right) + 1\right)\right) \quad \text{Ecuación V.1.18}$$

donde $\alpha = \log_{10}(N_0)$ (\log_{10} cfu/mL), N_0 es el número inicial de microorganismos; β es el aumento asintótico de la densidad de población (\log_{10} cfu/mL); t es el tiempo (h); y T es el valor de la temperatura ($^{\circ}C$). Los parámetros estimados (ε , ϕ , χ , δ) y los intervalos de confianza obtenidos se muestran en la Tabla V.1.3.

Tabla V.1.3 Valor de los parámetros que se incluyen en el modelo experimental de Gompertz calculado para definir el crecimiento de *E. sakazakii* en RPIFM para el rango de temperaturas entre 8 y 37°C.

Paramete r	Estima te	Assymptotic interval	95.0 % confidence
α	1.313		0.150
β	7.485		0.120
χ	0.025		0.0006
δ	0.054		0.010
ϵ	373.12		0.002
ϕ	0.617		0.110

Un set adicional de datos experimentales ($\log(N(t))$) se ajustó a la ecuación 26 por medio de una regresión no-lineal (Statgraphics Centurion XV). Los resultados experimentales fueron comparados con los predichos por el modelo, y la bondad del ajuste fue calculada mediante los factores accuracy (A_f) y bias (B_f).

De acuerdo a los valores obtenidos para el A_f y B_f en el modelo global, 1.080-1.120 respectivamente, se aprecia un alto nivel de correspondencia entre valores observados y predichos, con un valor de error en las predicciones entre el 8.5 y el 12%. La figura V.1.3 muestra la superficie de respuesta para el crecimiento de *E. sakazakii* de acuerdo al modelo global propuesto en el rango de temperaturas de estudio 8-37°C.

Modelo Global de Gompertz en RPIFM

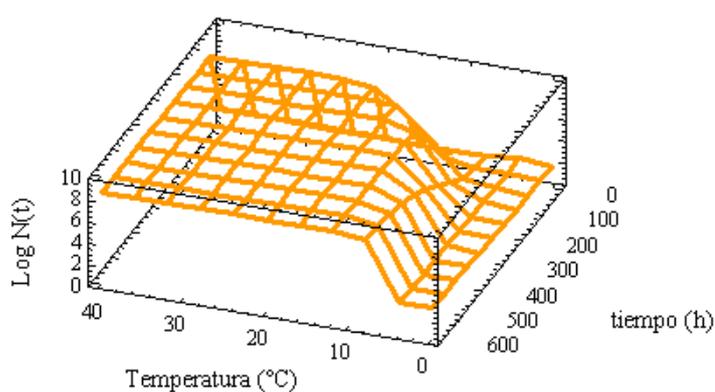


Figura V.1.3 Superficie de respuesta para el modelo global de Gompertz que describe el crecimiento de *E. sakazakii* en RPIFM en un rango de temperaturas de 8 a 37°C

V.1.6 Conclusiones

Los resultados del presente capítulo ponen de manifiesto la importancia de la temperatura como factor determinante en una posible proliferación de *E. sakazakii* en RPIFM cuando sea almacenada hasta la ingesta. Para temperaturas de 8°C o inferiores, obtenemos para *E. sakazakii*, tiempos de latencia prolongados (λ), y por tanto RPIFMs más seguras que aquellas que se mantienen a temperatura ambiente, por ejemplo, por inadecuadas prácticas domésticas. La modelización matemática del crecimiento nos permite predecir el número final de microorganismos cuando la RPIFM sea almacenada a las temperaturas comprendidas en el rango estudiado [8-37°C].

V.1.7 Referencias

Arrhenius, S., 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Z für Physikalische Chem.* 4, 226-248.

Baranyi, J., T.A. Roberts, 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Inter J Food Microbiol.* 23, 277-294.

Bernaerts, K., E. Dens, K. Vereecken, A. Geeraerd, F. Devlieghere, J. Debevere, J.F. Van Impe, 2003. Modeling microbial dynamics under time-varying conditions. In: McKellar, R., Lu, X. (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Foods*, CRC Press, Boca Raton, Chapter 7, 243-261.

Buchanan R. L. and Klawitter L. A. 1992. The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* vol. 9, nº3, pp. 185-196.

Delignette-Muller, M.L., F. Baty, M. Cornu, H. Bergis. 2005. Modelling the effect of a temperature shift on the lag phase duration of *Listeria monocytogenes*. *Inte. J. Food Microbiol.* 100, 77-84.

Gibson, A.M., N. Bratchell, T.A. Roberts, (1988) Predicting microbial growth responses of salmonellae in laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Inter J Food Microbiol.* 6, 155-178.

Iversen, C., M. Lane, and S.J. Frosythe. 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 378-382.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1986. *Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications.* 2nd ed. Toronto: University of Toronto Press.

Kandhai, M.C., M.W. Reij, C. Grogno, M. van Shothorst, L.G.M. Gorris, M.H. Zwietering, 2006. Effects of Preculturing conditions on Lag Time and Specific Growth Rate of *Enterobacter sakazakii* in Reconstituted Powdered Infant Formula. *Appl Environ Microbiol.* 72(4), 2721-2729.

Koutsoumanis, K.P., 2001. Predictive modelling of the shelf life of fish under non-isothermal conditions. *Appl Environ Microbiol.* 67, 1821-1829.

Mellefont, L., and T. Ross, 2003. The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Inter J Food Microbiol.* 83, 295-305.

Nazarowec-White, M., and J.M Farber. 1997. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Prot.* 60(3): 226-230



*Capitulo V.2. INACTIVACIÓN DE *Enterobacter sakazakii*
POR ALTAS PRESIONES HIDOSTÁTICAS (APH) EN
FÓRMULA INFANTIL EN POWLO RECONSTITUIDA
(RPIFM) Y AGUA DE PEPTONA TAMPONADA (BPW)*

V.2.1 CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN DE *Enterobacter sakazakii* POR ALTAS PRESIONES HIDOSTÁTICAS EN FÓRMULA INFANTIL Y AGUA DE PEPTONA TAMPONADA

Publicaciones

Journal of Food Protection, Vol. 70, No. 10, 2007, Pages 2281–2289
Copyright ©, International Association for Food Protection

Pressure Inactivation Kinetics of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula Milk

M. C. PINA PÉREZ,¹ D. RODRIGO ALIAGA,² D. SAUCEDO REYES,¹ AND A. MARTÍNEZ LÓPEZ^{1*}

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, C.S.I.C., P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain; and ²Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot, Valencia, Spain

MS 07-094: Received 21 February 2007/Accepted 9 May 2007

ABSTRACT

Survival curves of *Enterobacter sakazakii* inactivated by high hydrostatic pressure were obtained at four pressure levels (250, 300, 350, and 400 MPa), at temperatures below 30°C, in buffered peptone water (BPW; 0.3%, wt/vol) and infant formula milk (IFM; 16%, wt/vol). A linear model and four nonlinear models (Weibull, log-logistic, modified Gompertz, and Baranyi) were fitted to the data, and the performances of the models were compared. The linear regression model for the survival curves in BPW and IFM at 250 MPa has fitted regression coefficient (R^2) values of 0.940 to 0.700, respectively, and root mean square errors (RMSEs) of 0.770 to 0.370. For the other pressure levels, the linear regression function was not appropriate, as there was a strong curvature in the plotted data. The nonlinear regression models with the log-logistic and modified Gompertz equations had R^2 values of 0.960 to 0.992 and RMSE values of 0.020 to 0.130 within pressure levels of 250 to 400 MPa, respectively. These results indicate that they are both better models for describing the pressure inactivation kinetics of *E. sakazakii* in IFM and BPW than the Weibull distribution function, which has an R^2 minimum value of 0.832 and an RMSE maximum value of 0.650 at 400 MPa. On the other hand, the parameters for the Weibull distribution function, log-logistic model, and modified Gompertz equation did not have a clear dependence on pressure. The Baranyi model was also analyzed, and it was concluded that this model provided a reasonably good fit and could be used to develop predictions of survival data at pressures other than the experimental pressure levels in the range studied. The results provide accurate predictions of survival curves at different pressure levels and will be beneficial to the food industry in selecting optimum combinations of pressure and time to obtain desired target levels of *E. sakazakii* inactivation in IFM.

Congresos

AUTORES: Pina Pérez M.C, Rodrigo Aliaga D., Ferrer Bernat C., Rodrigo Enguidanos M., Martínez López A.

TÍTULO: “Pressure inactivation kinetics of *Enterobacter sakazakii* in buffered peptone water and infant formula milk”

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de Póster

CONGRESO Applications of Novel Technologies in Food and Biotechnology
Internacional

LUGAR DE REALIZACIÓN Cork, Ireland

AÑO Septiembre 2006

V.2.1.1 Abstract

En el presente capítulo se ha llevado a cabo un estudio de inactivación de células de *E. sakazakii* por Altas Presiones Hidrostáticas (APH) (250, 300, 350, y 400 MPa). Se utilizaron 2 sustratos para la suspensión del microorganismo: un medio de referencia, agua de peptona tamponada (BPW; 0.3%, w/v) y fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM) (IFM; 16%, w/v).

Con el objetivo de describir la inactivación del microorganismo, los datos se ajustaron a 5 modelos matemáticos: 1 lineal, Bigelow; y 4 modelos no lineales: Weibull, Log-logistic, ecuación modificada de Gompertz, y el modelo de Baranyi. La bondad del ajuste se determinó mediante los valores de R^2 -corregido, Root Mean Square Error (RMSE) y accuracy factor (A_f).

El modelo lineal se ajustó a los resultados obtenidos para el nivel de presión de 250 MPa, en ambos sustratos, dando valores de R^2 -corregido entre 0.940 y 0.700, en BPW y RPIFM respectivamente; con valores de RMSE entre [0.770-0.370]. Para los demás niveles de presión (300, 350, 400MPa) el modelo lineal no resultó adecuado para ajustar los datos, ya que el patrón de inactivación siguió tendencias no lineales, mostrando importantes curvaturas en las gráficas de supervivencia.

Los modelos no-lineales de Gompertz y Log –Logistic proporcionaron muy buen ajuste de los resultados con valores de R^2 - corregido de 0.960 a 0.992 (BPW y RPIFM) y valores de RMSE de 0.020 a 0.130 para los niveles de presión en el rango de estudio [250 a 400 MPa]. Estos resultados indican que ambos modelos proporcionan una mejor descripción de la inactivación de *E. sakazakii* en RPIFM y BPW que el modelo de Weibull ($R^2=0.832$ y $RMSE = 0.650$ a 400 MPa).

Sin embargo, los parámetros obtenidos para los modelos de Weibull, log-logistic, y para la ecuación modificada de Gompertz, no muestran una clara dependencia de la presión. El modelo de Baranyi también fue analizado, y a partir del análisis concluimos que este modelo proporciona un buen ajuste para los resultados de inactivación en ambos sustratos, y podría ser utilizado para realizar predicciones sobre la supervivencia del microorganismo sometido a tratamientos de presión en el rango de estudio.

Los resultados que se desprenden del presente capítulo pueden resultar muy relevantes a nivel industrial en cuanto a la posible aplicación de esta tecnología en la fabricación de productos de alto valor añadido como son las fórmulas infantiles líquidas, por ejemplo. Al mismo tiempo, los presentes resultados nos proporcionan una orientación sobre posibles combinaciones en las condiciones de tratamiento, que nos permitan reducir la concentración del microorganismo hasta niveles aceptables.

Palabras clave: Altas Presiones Hidrostáticas (APH), *Enterobacter sakazakii*, modelización matemática.

V.2.1.2 Introducción

Estudios epidemiológicos han relacionado al microorganismo *Enterobacter sakazakii* con casos de contaminación ocasional de fórmula infantil en polvo (PIFM) causando sepsis generalizada, meningitis neonatal, bacteremia, enterocolitis necrotizante, y meningoencefalitis tras la ingestión de la fórmula reconstituida (RPIFM) (Muytjens, y Kollee, 1990; Nazarowec-White, y Farber. 1997). El primer brote relacionado con *E. sakazakii* asociado al consumo de PIFM a partir de un bote sin abrir se produce en 2001 (CDC, 2002; Himmelright y col, 2002). Los síntomas publicados al respecto suelen ser severos: abscesos cerebrales, hidrocefalia, retraso en el crecimiento, y la muerte en el 40 a 80% de los casos. Los bebés prematuros son más susceptibles que los bebés a término, los niños o adultos, por lo que gran parte de los brotes se han producido en hospitales en unidades de recién-nacidos.

Aunque *E. sakazakii* puede causar enfermedad en niños de todos los grupos de edad, la gran mayoría de casos se producen en bebés menores de 2 meses. Aproximadamente 50 casos han sido publicados en niños menores de 60 días en todo el mundo (Iversen y Forsythe. 2003). Muchos de ellos eran prematuros (<37 semanas de gestación) con bajo peso al nacer, por debajo de los 2500 g (Lai, 2001; Weir, 2002). Las formulas infantiles constituyen la principal fuente asociada a la infección por *E. sakazakii* (Himmelright y col, 2002)

En Noviembre del 2004, el panel de riesgos biológicos de la European Food Safety Authority publicó un informe sobre los riesgos asociados al consumo de fórmulas (EFSA, 2004). El panel concluyó que *Salmonella* y *E. sakazakii* son los microorganismos de mayor relevancia en fórmulas infantiles, por su incidencia tanto en hospitales como en hogares. *Salmonella* y *E. sakazakii* pueden crecer en el producto reconstituido si éste se almacena a temperaturas > 5°C durante el tiempo suficiente, siendo la multiplicación muy rápida a temperatura ambiente.

Los sustitutos de la leche materna son necesarios cuando, por diversos motivos, los bebés no pueden ser alimentados por su madre. Una gran variedad de fórmulas infantiles está disponible en el mercado, con composiciones adaptadas a las necesidades específicas de los bebés. Las podemos encontrar disponibles como: fórmula infantil en polvo, líquida (concentrada o lista para tomar), y todas ellas en

gran variedad de envases y tamaños. En E.E.U.U y Canadá, la formula infantil en estado líquido es la más consumida, mientras que en el resto del mundo lo es la fórmula en polvo. Cabe destacar que las formulas infantiles listas para tomar son productos estériles, y por tanto, sometidos a intensos tratamientos térmicos (FAO/OMS, 2004). Las intensidades de tratamiento (combinación de tiempo y temperatura) varían según productores y productos. En los últimos años, el procesado de ultra-high-temperature–short-time (UHTST) es el proceso más utilizado en la producción de fórmulas estériles en Europa. Este proceso implica tratamientos de muy corta duración (3 a 10 s) pero con temperaturas de elevada intensidad (130 a 150°C) (Lonnerdal y col, 2001).

Desde el punto de vista nutritivo y fisicoquímico, el calor puede modificar irreversiblemente los componentes de la leche; causando, por ejemplo, reducción en los niveles de Ca⁺, desnaturalización de proteínas del suero, y degradación de vitaminas. El calor, además, rompe el equilibrio fisicoquímico de los componentes lácteos (Eckner y Zottola. 1991).

Además, el procesado de fórmulas infantiles a elevadas temperaturas, durante largos periodos de tiempos afecta a carbohidratos y proteínas y podrían generar compuestos indeseables, como furfural, en estadios avanzados de la reacción de Maillard (Caric, 1993; Ferrer y col., 2002; Lonnerdal y col., 2001). El mayor problema de los sistemas UHT a nivel industrial en el procesado de formula infantil radica en la formación de material de depósito que se acumula y actúa como barrera a la transferencia de calor, reduciendo por tanto, la efectividad del tratamiento e incrementando el tiempo necesario para conseguir la esterilización de un producto (Dimler y col., 1995).

En comparación con el tratamiento térmico, el procesado mediante la tecnología APH permite inactivar microorganismos a temperaturas más bajas e incluso próximas a la temperatura ambiente, resultando los productos tratados con propiedades sensoriales y calidad nutricional próximas a la de los alimentos frescos (Chen y Hoover, 2003). La tecnología de APH, se utiliza comercialmente como método de pasterización no térmica, y consiste en la aplicación de niveles de presión en torno a 400-700 MPa que se mantienen durante tiempos que van de los segundos hasta los 6-8

min aproximadamente. El interés en la aplicación de esta tecnología a leche y productos lácteos se ha incrementado recientemente. Niveles de presión entre 300 y 600 MPa han resultado efectivos en la inactivación de microorganismos, incluyendo aquellos patógenos bacterianos más virulentos (Kalchayanand y col., 1998)

El hecho de que esta tecnología permita una conservación de los valores nutricionales, vitaminas, sabor y aspecto del producto semejantes al fresco, la ha convertido en una importante alternativa al tratamiento térmico de pasterización, que utilizan ya numerosas empresas de todo el mundo. Las APH ofrecen a la industria láctea innumerables aplicaciones prácticas para producir alimentos microbiológicamente seguros, mínimamente procesados con mejoradas propiedades de textura, sabor, color, valor nutricional, extendiendo a la vez la vida útil del producto (Kalchayanand y col., 1998).

V.2.1.3 Objetivos

Teniendo en cuenta el potencial de la tecnología de APH como método no térmico de pasterización respetuoso con los componentes más sensibles del alimento, y teniendo en cuenta la importancia que tiene la conservación de estos componentes en un alimento como la IFM base del sustento infantil en la etapa neonatal, ya que en muchos caso es alimento exclusivo, se plantea el presente estudio con el objetivo de determinar la efectividad de las APH en la inactivación de *E. sakazakii* como alternativa al tratamiento térmico, respondiendo así a las necesidades de investigación, en nuevas tecnologías aplicadas al tratamiento de PIFM, expuestas por el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2006).

V.2.1.4 Material y Métodos

V.2.1.4.1 Cultivo del microorganismo. El cultivo puro de de *E. sakazakii* se obtuvo a partir de la Colección Española de Cultivos Tipo (858 CECT). El cultivo fue re-hidratado con 10mL de caldo de tristonso-soja (TSB; Scharlab Chemie, Barcelona, Spain). Después de 20min, los 10 mL fueron inoculados en 500mL de TSB e incubados a 37°C en agitación continuada a 200 rpm durante 14 h hasta obtener

células en fase estacionaria. Con los correspondientes datos se obtuvieron las curvas de crecimiento del microorganismo a su temperatura óptima (37°C).

Las células se centrifugaron 2 veces a 5000g, 5°C, durante 15min. Tras la segunda centrifugación las células se resuspendieron en 20 mL de TSB con 20% glycerol, y se repartieron en viales de 2mL.

Los viales de 2-mL se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C hasta ser utilizados, constituyendo lo que llamamos “viales madre”, a partir de los cuales obtendremos las células que serán utilizadas en los tratamientos por APH.

V.2.1.4.2 Preparación del inóculo de *E. sakazakii*. Para llevar a cabo los tratamientos de APH, los viales de *E. sakazakii* CECT 858, almacenados y congelados a -80°C, se recuperaron y mantuvieron a la temperatura de 37°C, 14h hasta alcanzar la fase estacionaria. A partir de estas células, y por centrifugación, se obtuvo la suspensión de células, con las que trabajamos en los ensayos de inactivación. Cada vial de células se obtuvo con una concentración media de 2×10^9 cfu/mL. Todas las muestras se inocularon 10 min antes de comenzar el tratamiento para asegurar la aclimatación del microorganismo al medio. Varios mL de la RPIFM no inoculada se transfirieron a placas de agar tristona-soja (ISA) y fueron incubados a 37°C, 6 días, para asegurar que las muestras de leche no estaban previamente contaminadas.

V.2.1.4.3 Fórmula Infantil en Polvo (PIFM). Como sustratos en el presente estudio se utilizó, un producto comercial, fórmula infantil en polvo, y un medio de referencia, agua de peptona tamponada (buffered peptone water, BPW) (0.3g/100mL). La formula en polvo comercial (Nutribén NATAL, Alter Farmacia, S.A., Madrid, Spain) que se utilizó es un producto rico en vitaminas (E, K₁, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, ácido fólico y vitamina D₃) y sales minerales (Mg, Ca, Fe, Zn, Na, K, y Mn).

La PIFM rehidratada (RPIFM) se obtuvo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Quinientos mL de agua estéril se mezclaron con 69.17g de fórmula en polvo IFM. La mezcla se agitó en condiciones estériles, y una vez enfriado el producto se inoculó el microorganismo al sustrato. El valor de pH para el producto es de 6.4.

V.2.1.4.4 Tratamiento de las muestras por APH. En el presente estudio se utilizó el equipo de APH del IATA (CSIC) (High Pressure Food Processor, EPSI NV, Walgoedstraat 19, Temse, Belgium), con el que se pueden llevar a cabo tratamientos máximos a 680 MPa, con capacidad de vasija de 2.35 L, siendo el líquido presurizante una mezcla de agua y aditivo anticongelante (etilenglicol). El tiempo requerido para el aumento de presión “come up time” es de aproximadamente 1min cada 300MPa, sin embargo la pérdida de presión es instantánea. Durante el aumento de la presión se producen también aumentos de temperatura debidos a la presurización en condiciones adiabáticas, a razón de 3.5°C/100 MPa, y que son registrados mediante 2 termopares de tipo K. Estos aumentos de temperatura que tienen lugar durante el aumento de presión deben ser tenidas en cuenta si deseamos un tratamiento por debajo de la temperatura ambiente. En nuestro caso, la temperatura se mantuvo por debajo de 30°C para todas las condiciones de tratamiento.

A continuación se describe la metodología seguida en el tratamiento de las muestras: se llenaron viales estériles (Daslab, Nirco, S.L., Madrid, Spain) con 1.5 mL de la muestra de RPIFM y BPW inoculadas hasta concentración final de 10⁸cfu/mL. Estos viales se taparon evitando la formación de burbujas, y se introdujeron en bolsas de plástico llenas de agua (5 viales /bolsa ~ 5 replicas), que fueron posteriormente selladas, listas para los tratamientos de presurización. Dichas bolsas fueron posteriormente sometidas a distintos niveles de presión (250, 300, 350, y 400 MPa) a temperatura inicial de 15°C, y tiempos de tratamiento entre 1 y 25 min. Inmediatamente tras la presurización, los viales se transfirieron a un baño de hielo y se procedió al recuento de viables.

V.2.1.4.5 Recuento de supervivientes. Las suspensiones celulares de cada vial, se diluyeron seriadamente en una solución al 0.1% (1g/1000mL) de agua de peptona, y cada dilución fue sembrada en placa de TSA (Scharlab Chemie, Barcelona, S.A.) por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y transcurrido ese periodo se procedió a la enumeración de viables. Las muestras no presurizadas se utilizaron como “muestras blanco” y se procedió a la enumeración de cfu/mL del igual modo.

V.2.1.4.6 Modelización matemática. Los datos experimentales fueron ajustados a modelos matemáticos. Se utilizó un modelo lineal, de Bigelow (Bigelow 1921) (ecuación V.5.1.1), y 4 modelos no lineales: la función de distribución de Weibull (Weibull, 1951) (ecuación V.5.1.2), el modelo Log-logistic (Cole y col., 1993) (ecuación V.5.1.3), la ecuación modificada de Gompertz (ecuación V.5.1.4), y el modelo de Baranyi (Xiong y col., 1999) (ecuación V.5.1.5)

V.2.1.4.6.1 Modelo de Bigelow

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{D}\right) \quad \text{Ecuación V.2.1.1}$$

donde $[N/N_0]$ es la fracción de supervivientes calculada como número final de microorganismos vivos tras un determinado tratamiento (N) y el número inicial de microorganismos (N_0); D es el tiempo de reducción decimal (tiempo requerido para reducir 1-ciclo log el número de células); $D = \ln(10)/k = 2.303/k$; y t es el tiempo de tratamiento.

V.2.1.4.6.2 Modelo de Weibull

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b(t^a) \quad \text{Ecuación V.2.1.2}$$

donde $[N/N_0]$ es la fracción de supervivientes, t es el tiempo de tratamiento; a (μs) y b son los factores de escala y forma respectivamente. El factor b factor interpreta la forma de la curva de supervivencia, de modo que cuando $b < 1$ la curva de supervivencia es cóncava (y se da la formación de colas), si $b > 1$ indica que la curva de supervivencia es convexa (y aparecen hombros), y cuando $b = 1$ indica que existe una relación lineal entre el t de tratamiento y Log S

V.2.1.4.6.3 Modelo de Log-logistic

El modelo Log-logistic fue propuesto por Cole y col (1993):

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \frac{A}{1 + e^{4\sigma(\tau - \log t)/A}} - \frac{A}{1 + e^{4\sigma(\tau + 6)/A}} \quad \text{Ecuación V.2.1.3}$$

donde A es la diferencia entre la asíntota superior e inferior ($\log_{10}\text{cfu/mL}$), σ el ratio máximo de inactivación ($\log_{10}(\text{cfu/mL})/\log_{10} \text{min}$), τ es el \log_{10} del tiempo al cual se da el máximo ratio de inactivación ($\log_{10} \text{min}$).

V.2.1.4.6.4 Modelo de Gompertz

La ecuación modificada de Gompertz fue propuesta originalmente por Gibson et al. (1988) para modelizar curvas de crecimiento y posteriormente se propuso una modificación para ajustar cinéticas de inactivación:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = Ce^{-e^{BM}} - Ce^{-e^{B(t-M)}} \quad \text{Ecuación V.2.1.4}$$

donde M es el tiempo al cual se produce el ratio máximo de muerte; B es el ratio relativo de inactivación; y C es la diferencia entre la asíntota superior e inferior.

V.2.1.5.6.5 Modelo de Baranyi

El modelo de Baranyi fue originariamente desarrollado para curvas de crecimiento (Baranyi y Roberts, 1994; Baranyi y Roberts, 1993). Para modelizar curvas sigmoidales, puede venir expresado como sigue:

$$\frac{dN}{dt} = -k_{\text{máx}}\alpha(t)N\beta(t) \quad (N > 0; t \geq 0) \quad \text{Ecuación V.2.1.5}$$

$$N(0) = N_0 \quad (N_0 > 0; t = 0) \quad \text{Ecuación V.2.1.6}$$

donde N y N_0 representan el número de microorganismos a tiempo t y tiempo cero, respectivamente; $k_{\text{máx}}$ es el ratio máximo de muerte; $\alpha(t)$ es la función de ajuste para hombros; $\beta(t)$ es la función de ajuste para colas; y el signo negativo hace referencia a la inactivación de microorganismos.

V.2.1.4.7 Análisis y Evaluación de modelos. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa Microsoft Excel 2000 y SPSS (SPSS Inc., Chicago, Ill.), a partir de 3 repeticiones válidas de cada punto experimental con 5 réplicas cada una de ellas. La evaluación de la bondad del ajuste de los modelos se lleva a cabo mediante el coeficiente de regresión corregido (R^2 -corregido) y el RMSE.

V.2.1.5 Resultados

V.2.1.5.1 Influencia del sustrato

El grado de inactivación de *E. sakazakii* depende del nivel de presión y del tiempo de tratamiento, de forma que a niveles de presión más elevados, los niveles de inactivación también aumentan. La aplicación de APH en RPIFM inoculada, permitió reducir la población de *E. sakazakii* hasta 7- \log_{10} ciclos para las condiciones de 400MPa-10min. Se observa, sin embargo, que para bajas intensidades de tratamiento, por ejemplo 250MPa – 5min, se alcanzan reducciones de 1.4 \log_{10} ciclos en RPIFM, mientras que en BPW se obtienen 2.4 \log_{10} ciclos. Similares niveles de inactivación (2.4 \log_{10} ciclos) fueron alcanzados por otros investigadores para las condiciones de 400MPa-1min en 2 cepas de *E. sakazakii*: ATCC 51329 y ATCC 29004 en RPIFM (Gonzalez y col, 2004). Este grupo también observó que la población de *E. sakazakii* fue más resistente a la presión en el alimento (RPIFM) de lo que lo fue cuando se suspendió en el tampón.

El efecto del sustrato en el presente estudio se ha analizado mediante un ANOVA. Los resultados de este análisis indican que la inactivación conseguida por APH en población de *E. sakazakii* resulta significativamente afectada por el sustrato en el que se suspendió el microorganismo ($P \leq 0.01$). Las diferencias en los niveles de inactivación alcanzados en ambos sustratos pueden ser debidos a la diferencias en la composición del medio. Los constituyentes de los alimentos ejercen efectos complejos sobre la resistencia del microorganismo a la APH.

Los investigadores Chen y Hoover (2003, 2004) publicaron que la resistencia de *Yersinia enterocolitica* a la presión varía significativamente dependiendo del ambiente en el que se lleva a cabo. Utilizando como sustrato leche entera, el microorganismo presentó una mayor resistencia frente a la presión que cuando se utilizó como sustrato

un tampón. Bajo las mismas condiciones de tratamiento, se consiguió una reducción de 8 ciclos log en células de *Y. enterocolitica* suspendidas en tampón, mientras que en el sustrato lácteo, la reducción fue de tan solo 2.5 ciclos log. Estas observaciones coinciden con las realizadas por Styles y col., (1991) y Simpson y Gilmour (1997), quienes encontraron una mayor resistencia de *Listeria monocytogenes* sometida a APH cuando el sustrato fue leche que cuando se trató el microorganismo inoculado en un tampón (0.1M fosfato sódico, pH 7.0).

Otros ejemplos de posible efecto protector del sustrato frente a la inactivación por APH fueron observados por el grupo de investigación de Gervilla y col. (1999) para el microorganismo *Escherichia coli* (CECT 405) tratado por APH.

V.2.1.5.2 Cinéticas de inactivación

Aunque el tratamiento del microorganismo *E. sakazakii* por calor ha sido ampliamente estudiado, los estudios del tratamiento de este microorganismo por nuevas tecnologías no térmicas de conservación son limitados. En los últimos años se han publicado escasos trabajos que versan sobre la efectividad que las tecnologías no térmicas de conservación pueden ejercer sobre este microorganismo, siendo nuestro grupo de investigación pionero en este aspecto en los que se refiere a PEA y APH (Pina y col., 2007; Pina y col., 2007; Pina y col., 2009). En general, los patrones de inactivación de microorganismos por APH son ligeramente variables en función de varios factores. Se han observado diversas desviaciones con respecto a la linealidad, entre ellas encontramos curvas sigmoidales, curvas que presentaron hombros, o curvas en las que aparecen colas. Tradicionalmente, este tipo de curvas de supervivencia se han interpretado mediante modelos como el de Baranyi, Buchanan, Log Logistic, Gompertz y Weibull (Baranyi y Roberts, 1994; Bhaduri y col, 1991; Chen y Hoover, 2003; Xiong y col, 1999).

De acuerdo con los resultados de nuestro estudio, la forma de las curvas de supervivencia para *E. sakazakii* varía en función de las condiciones de tratamiento. A 250MPa tanto en RPFIM como en BPW, las curvas de supervivencia fueron lineales y se ajustaron al modelo de Bigelow con muy buenos valores para los parámetros de bondad de ajuste (R^2 -corregido y RMSE). A 300 MPa en RPIFM el modelo lineal

sigue siendo adecuado para ajustar la curva de supervivencia, mientras que para BPW a 300MPa, el ajuste lineal ya no es posible apareciendo una curvatura más marcada. Las figuras V.2.1.1 y V.2.1.2 muestran los resultados de inactivación obtenidos experimentalmente en ambos sustratos y para todas las condiciones de tratamiento, así como el ajuste llevado a cabo por cada uno de los modelos en estudio.

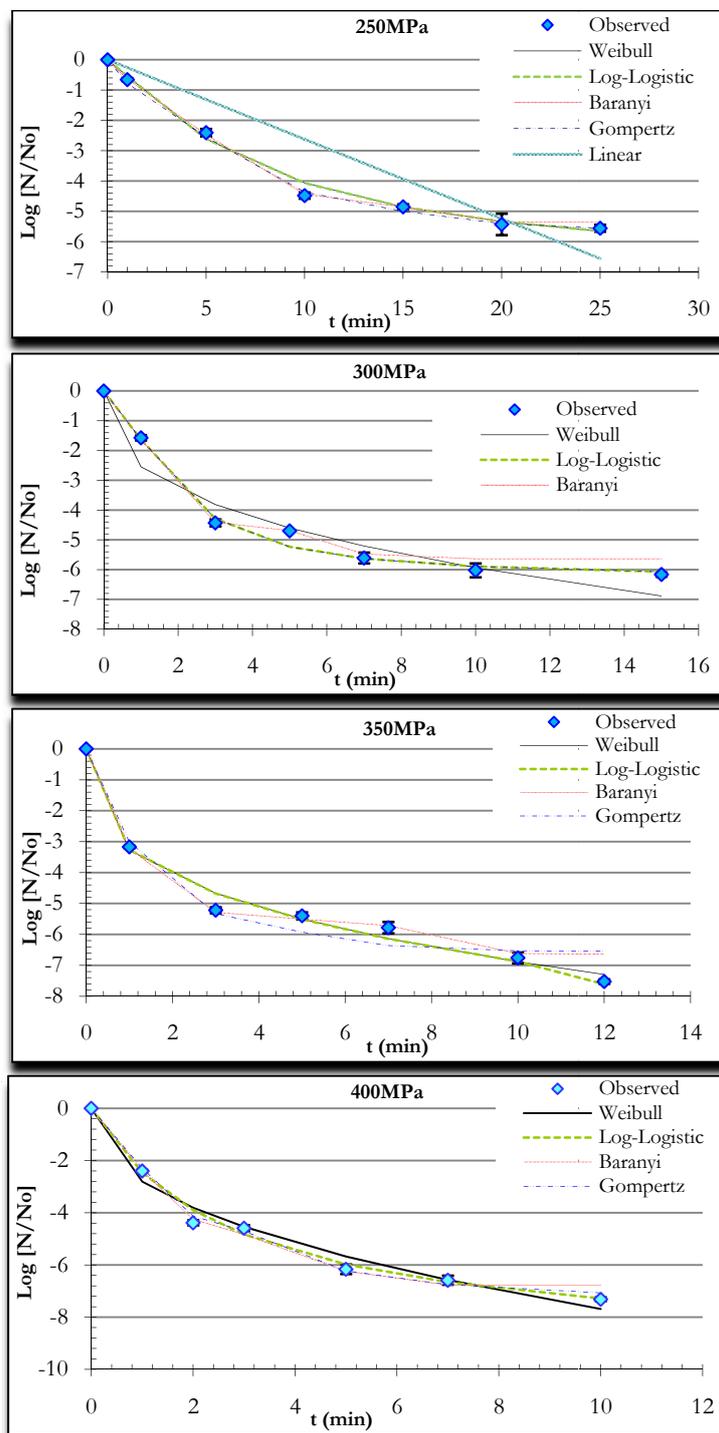


Figura V.2.1.1. Curvas de supervivencia para *E. sakazakii* en agua de peptona tamponada (BPW). Ajuste a modelos matemáticos

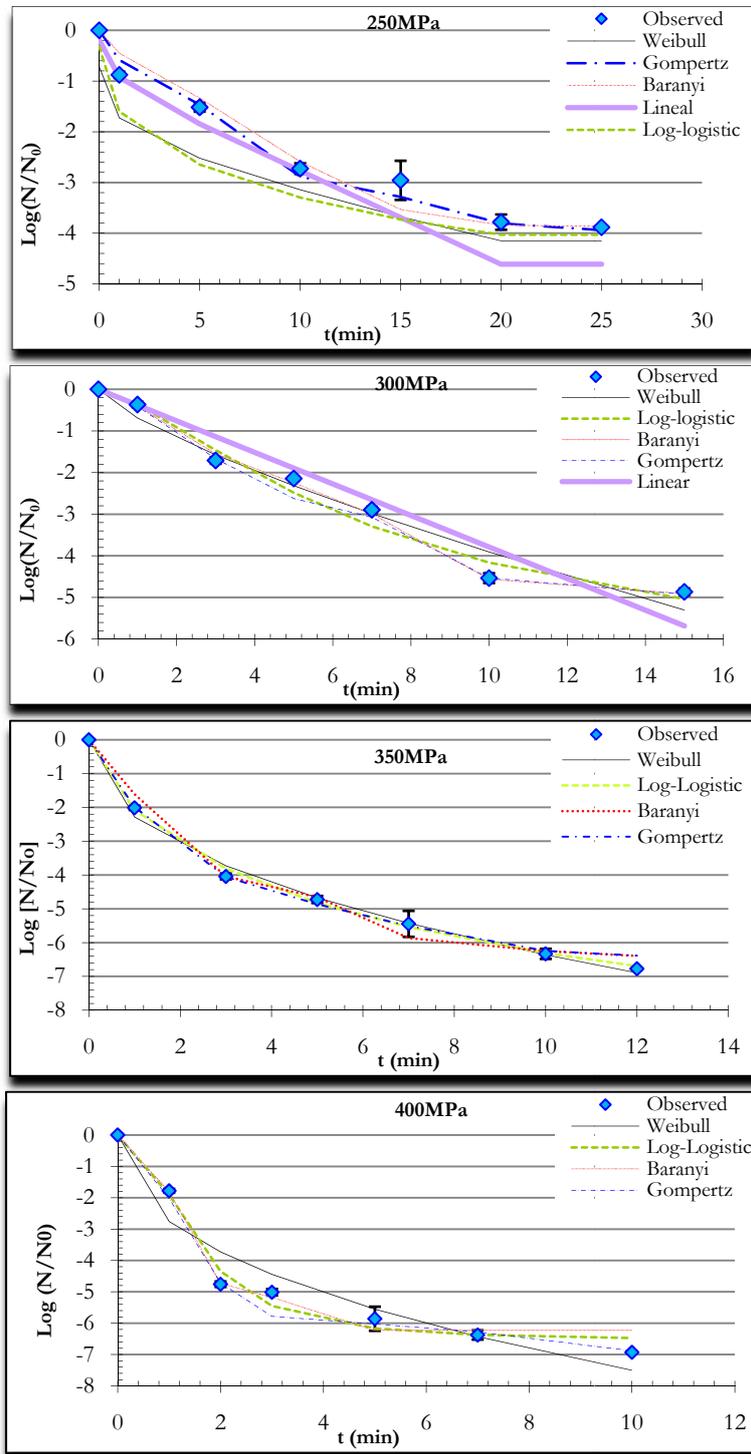


Figura V.2.1.2. Curvas de supervivencia para *E. sakazakii* en RPIFM. Ajuste a modelos matemáticos

Función de distribución de Weibull. Como primera etapa en la modelización matemática, los resultados obtenidos tras el tratamiento por APH de células de *E. sakazakii* suspendidas en ambos sustratos se ajustaron al modelo de Weibull, coincidiendo así con otros muchos autores que han hablado de la efectividad de este modelo para describir el comportamiento no lineal de varios microorganismos a la inactivación por tecnologías no térmicas de conservación como PEAI y APH (Rodrigo y col., 2003; Pina y col., 2007; Chen y Hoover, 2003). La tabla V.5.1.1 muestra los valores de los parámetros del modelo de Weibull. Las curvas de supervivencia muestran factores de forma < 1 , lo cual indica que todas las curvas presentan forma cóncava. El factor de escala se considera una medida de la velocidad de inactivación (parámetro cinético). El modelo de Weibull se estudió en profundidad para determinar el posible efecto de la presión en el valor de los parámetros b y n (tabla 3.2). De acuerdo al ANOVA, para BPW y niveles de presión entre 250 y 400 MPa, los valores de n difieren significativamente afectados por la presión, siendo tanto más pequeños cuánto más se incrementa la presión entre 250-350 MPa, pero aumentan a presión de 400MPa. Por otra parte, el ANOVA para RPIFM, muestra que sólo existen diferencias significativas en los valores de n para presiones entre 250 y 350MPa.

En lo que respecta al parámetro b , para las presiones en el rango de estudio [250-400MPa], un ANOVA muestra que existen diferencias significativas en los valores de b para BPW mientras que para RPIFM los valores de b fueron significativamente diferentes únicamente para presiones de 300 a 400MPa.

Estos resultados nos permiten concluir que ambos parámetros – escala y forma– no fueron presión-dependientes para el rango de estudio en ambos sustratos BPW y RPIFM. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Buzrul y Alpas (2004), investigadores que tampoco encontraron dependencia de los parámetros b y n con la presión y la temperatura.

Tabla V.2.1.1 Valores de los parámetros de forma (n) y escala (b) del modelo de Weibull para los diferentes niveles de presión y para ambos sustratos.

Nivel de Presión (MPa)	Parámetros del modelo de Weibull	
	b	n
BPW		
250	1.010±0.016 ^a	0.536±0.025 ^a
300	2.550±0.032 ^b	0.366±0.005 ^b
350	3.278±0.026 ^c	0.322±0.009 ^c
400	2.809±0.050 ^d	0.437±0.015 ^d
RPIFM		
250	0.719±0.111 ^a	0.546±0.040 ^a
300	0.687±0.039 ^a	0.756±0.029 ^b
350	2.281±0.026 ^b	0.446±0.007 ^c
400	2.755±0.109 ^c	0.435±0.014 ^c

Los valores corresponden a la media±desviación estándar

Los superíndices hacen referencia a la existencia de diferencias significativas

Ecuación modificada de Gompertz. Los investigadores Linton y col (1995; 1996) utilizaron la ecuación modificada de Gompertz para ajustar las curvas no lineales de *Listeria monocytogenes* sometida a tratamiento térmico en IFM, observando la efectividad del modelo para describir curvas sigmoidales. De acuerdo a estos resultados, obtenidos para el mismo sustrato de nuestro estudio RPIFM, hemos ajustado los datos obtenidos experimentalmente a la ecuación modificada de Gompertz, estudiando además la relación que existe entre los parámetros del modelo y la cinética de inactivación. La tabla V.2.1.2 muestra los valores del parámetro cinético para la ecuación modificada de Gompertz en ambos sustratos. El ratio relativo de muerte (B) aumenta con la presión para el sustrato BPW en todo el rango de estudio [250-400MPa], mientras que en RPIFM el valor de B aumenta para presiones entre 250-350MPa. Por tanto, este modelo no puede explicar el efecto que la presión ejerce sobre el parámetro cinético para todo el rango de presiones estudiado en RPIFM.

Tabla V.2.1.2 Valores de los parámetros cinéticos para los modelos Log-logistic, Baranyi y ecuación modificada de Gompertz en la inactivación de *E. sakazakii* en BPW y RPIFM.

P (MPa)	Gompertz <i>B</i>	Log-logistic τ	Baranyi $k_{\text{máx}}$
BPW			
250	0.140±0.007	2.019±0.062	1.045±0.300
300	0.233±0.007	0.629±0.052	3.390±0.258
350	0.291±0.005	10.604±0.278	4.400±0.396
400	1.120±0.102	1.026±0.130	3.998±0.430
RPIFM			
250	0.173±0.038	1.030±0.113	0.565±0.038
300	0.557±0.033	2.000±0.134	1.065±0.032
350	0.556±0.204	2.150±0.343	2.236±0.240
400	0.386±0.030	0.395±0.014	3.998±0.430

Modelo Log-logistic, τ min;

Modelo modificado de Gompertz, *B*, log (cfu/mL)/min

Modelo de Baranyi model, $k_{\text{máx}}$, log (cfu/mL)/min.

Modelo Log-Logistic. El modelo predictivo Log-logistic propuesto por Cole y col. (1993) se basa en distribuciones de sensibilidad de las células constituyentes de una población sometida a tratamiento. Como describió Guan y col (2005) este modelo predictivo ha resultado útil para aplicaciones de APH en productos lácteos, especialmente mediante estudios llevados a cabo en *Salmonella typhimurium*. La tabla V.2.1.2 recoge los valores del parámetro cinético del modelo log-logistic con su desviación estándar. En BPW el parámetro τ decrece desde presiones de 250 a 300MPa y desde 350 a 400MPa.

Para la RPIFM, los valores de τ guardan una relación parabólica convexa con la presión (ecuación 3.7):

IFM 250 < P < 400MPa

$$\tau = -0.0003P^2 + 0.1736P - 25.397 \quad R^2=0.97 \quad \text{Ecuación V.5.1.7}$$

El modelo Log-logistic ha sido utilizado por otros autores que describen la inactivación microbiana de células vegetativas (Simon y Handse, 2001; Ellison y col. 1994) y esporas bacterianas (Anderson y col., 1996), por calor. De acuerdo a los resultados de Raso y col., (2000) en un estudio para *Salmonella Senftenberg* tratada por PEAI, se observó una relación lineal entre el parámetro τ y el nivel de presión, tanto

en BPW como en RPIFM. Anderson y col., (1996) encontraron una relación cuadrática entre las τ y P para inactivación de esporas bacterianas. En el presente estudio, hemos encontrado también una relación cuadrática entre el valor de τ y el nivel de presión en ambos sustratos BPW y RPIFM.

Modelo de Baranyi. De acuerdo a los estudios de Xiong y col. (1999) aunque el modelo de Baranyi es empírico cuando se utiliza para describir curvas de supervivencia, es un modelo apto para describir 4 formas de curvas características: curvas lineales, curvas con fase de latencia, curvas con colas, y curvas sigmoidales. La ecuación modificada de Gompertz utiliza siempre 3 parámetros para describir los 4 tipos de curvas, mientras que el modelo de Baranyi puede utilizar un número de parámetros igual o inferior a 3, para ajustar las mismas curvas.

En el rango de estudio, la resistencia a la presión de *E. sakazakii* varió significativamente dependiendo de las condiciones del sustrato, con valores de $k_{m\acute{a}x}$ mayores para BPW que para RPIFM para el mismo nivel de presión. Una posible explicación la encontramos en que el ratio de muerte de *E. sakazakii* es más rápido en BPW que en RPIFM por el efecto protector que ejercen los constituyentes tal y como describen otros autores (Chen y Hoover, 2003; Guan y col, 2005). El máximo ratio de inactivación, $k_{m\acute{a}x}$, aumenta con la presión para RPIFM en el rango de estudio, según las siguientes ecuaciones:

RPIFM, 250MPa < P < 400MPa

$$k_{m\acute{a}x} = 0.0002P^2 - 0.0857P + 11.186 \quad R^2 = 0.999 \quad \text{Ecuación V.2.1.8}$$

$$\log(k_{m\acute{a}x}) = 0.0062P - 1.795 \quad R^2 = 0.998 \quad \text{Ecuación V.2.1.9}$$

Esta relación nos permite predecir el efecto de la presión sobre el valor de $k_{m\acute{a}x}$. Zook y col (1999) utilizaron un parámetro similar a la constante de resistencia térmica $z(I)$ del modelo clásico de tiempo de reducción decimal para predecir la dependencia con la presión del parámetro cinético primario. El parámetro $z(P)$ puede ser definido como el aumento en el nivel de presión requerido para alcanzar 1 reducción

logarítmica en el valor del ratio de inactivación y que puede ser calculado para *E. sakazakii* en RPIFM como el recíproco de la pendiente de la curva que representa el $\log(k_{\text{máx}})$ frente a la presión:

$$z(P) = 1 / \text{slope} = 161.3 \text{MPa}. \quad \text{Ecuación V.2.1.10}$$

Un valor de $z(P)$ alto significa una menor sensibilidad del parámetro cinético $k_{\text{máx}}$ a la presión, y por tanto serán necesarios niveles más altos de presión para alcanzar el valor de 1 reducción decimal en el valor de $k_{\text{máx}}$.

Existe un número limitado de referencias en las que se describe la influencia de la presión sobre parámetros cinéticos primarios. Es posible comparar el valor de $z(P)$ de 161.3 MPa obtenido para *E. sakazakii* con el valor de $z(P)$ de 578 MPa obtenido para *Listeria monocytogenes* en leche (Xiong y col., 1999), otro microorganismo de relevancia en leche, con una elevada resistencia a la presión en las mismas condiciones de sustrato lácteo, donde la grasa y la proteína aumentan la resistencia del microorganismo a la presión.

Sin embargo, para el mismo sustrato y *Lactobacillus plantarum*, existen estudios (Linton y col., 1996; Mallidis y col., 2003) en los que se ha demostrado que el valor del parámetro cinético es mucho más sensible a la presión ($z(P) = 71 \text{MPa}$)

La tabla V.2.1.3 recoge los valores de los parámetros utilizados para calcular la bondad del ajuste, R^2 -corregido y RMSE. El modelo Log-logistic > ecuación modificada de Gompertz > Baranyi proporcionan un ajuste aceptable a los datos de supervivencia obtenidos experimentalmente en ambos sustratos, algo que coincide con estudios previos realizados por Xiong y col (1999), Chen y Hoover (2003) y Guan y col (2005).

Tabla V.2.1.3 Valores de los parámetros indicadores de la bondad del ajuste para los modelos Lineal, Gompertz, Log-logistic, Baranyi y Weibull en la inactivación de *E. sakazakii* en RPIFM y BPW.

Presión (MPa)	RMSE					R2-correctado				
	Linear	Weibull	Logistic	Baranyi	Gompertz	Linear	Weibull	Logistic	Baranyi	Gompertz
BPW										
250	0.770	0.180	0.050	0.065	0.035	0.940	0.958	0.988	0.944	0.9925
300	-	0.460	0.060	0.170	0.091	-	0.836	0.979	0.989	0.973
350	-	0.090	0.090	1.013	0.0366	-	0.965	0.965	0.833	0.907
400	-	0.150	0.060	0.430	0.090	-	0.979	0.980	0.927	0.978
RPIFM										
250	0.370	0.090	0.070	0.086	0.061	0.700	0.931	0.950	0.956	0.960
300	0.290	0.160	0.080	0.030	0.068	0.910	0.953	0.970	0.951	0.981
350	-	0.040	0.020	0.563	0.097	-	0.980	0.980	0.843	0.971
400	-	0.650	0.130	0.530	0.176	-	0.832	0.970	0.895	0.959

V.2.1.6 Conclusiones

Tres son las rutas principales por las que *E. sakazakii* puede producir infección debida al consumo de alimentos: i) a través de los ingredientes contaminados y añadidos tras la deshidratación de la fórmula en polvo, ii) a través de la contaminación presente en el ambiente de procesado y que puede producirse o entrar en contacto con el producto tras la deshidratación y antes del embalaje (contaminación intrínseca) y iii) a través de una contaminación externa a la fórmula producida durante las fases de reconstitución y manipulación de la misma.

La medida más efectiva de control para minimizar el riesgo asociado a *E. sakazakii* para bebés prematuros e inmunocomprometidos sería la utilización de fórmula infantil líquida estéril (concentrada o lista para tomar). La introducción de las APH como tecnología no térmica de pasterización en el procesado de fabricación de IFM en estado líquido puede plantearse como una alternativa al tratamiento térmico de acuerdo a los resultados del presente estudio. Mediante esta tecnología se da la posibilidad de inactivar 7 ciclos log de *E. sakazakii* a niveles de presión no excesivamente elevados (350-400MPa) en combinación con tiempos de tratamiento entre 10 y 15 minutos y temperaturas alrededor de la temperatura ambiente (25°C).

Estas intensidades de tratamiento son también capaces de inactivar *Salmonella*, otro de los microorganismos de riesgo de la PIFM, consiguiendo valores de inactivación de 4 ciclos log (González y col., 2006). Este tecnología se presenta por tanto como de potencial aplicación en productos de alto valor añadido, como las fórmulas infantiles y en los que las *Enterobacteriaceae* constituyan los microorganismos “objetivo” del producto.

Una buena predicción de la efectividad de las APH frente a los microorganismos patógenos basada en cinéticas de inactivación resulta fundamental para producir alimentos seguros (Kalchayanand y col., 1996; CDC, 2002). En la pasada década, se produjeron avances significativos en el área de la modelización microbiana en alimentos, sin embargo, el campo del procesado por APH necesita todavía del desarrollo de modelos matemáticas que permitan predecir niveles de inactivación y parámetros de proceso. El presente estudio, proporciona un parámetro equivalente al tradicional valor de D y z de la temperatura.

V.2.1.7 Referencias

- Álvarez, I., R. Pagan, S. Codon, and J. Raso. 2003. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 87:87–95.
- Anderson, W. A., P. J. McClure, A. C. Baird-Parker, and M. B. Cole. 1996. The application of a log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* at 213B at temperatures below 121°C. *J. Appl. Bacteriol.* 80:283–290.
- Baranyi, J., T. A. Roberts, and P. McClure. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10:43–59.
- Baranyi, J., and T. A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 23:277–294.
- Baranyi, J., T. Ross, T. A. McMeekin, and T. A. Roberts. 1996. Effects of parameterization on the performance of empirical models used in “predictive microbiology.” *Food Microbiol.* 13:83–91.
- Bhaduri, S. P. W. S., S. A. Palumbo, C. O. Turner-Jones, J. L. Smith, B. S. Marmer, R. L. Buchanan, L. L. Zaika, and A. C. Williams. 1991. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiol.* 8:75–78.
- Bigelow, W. D. 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* 29:528–536.
- Breeuwer, P., A. Lardeau, M. Peterz, and H. M. Joosten. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.* 95:967–973.
- Buzrul, S., and H. Alpas. 2004. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS Microbiol. Lett.* 238:29–36.
- Caric, M. 1993. Concentrated and dried dairy products, p. 257–300. In Y. H. Hui (ed.), *Dairy science and technology handbook*. VCH, New York.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula—Tennessee, 2001. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:297–300.
- Chen, H., and D. G. Hoover. 2003. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4:25–34.
- Chen, H., and D. G. Hoover. 2003. Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 161–171.
- Cole, M. B., K. W. Davies, G. Munro, C. D. Holyoak, and D. C. Kilsby. 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J. Ind. Microbiol.* 12:232–237.

Dimler, S. R., D. V. Diodato, B. M. Terrence, D. L. McKamy, and J. M. Simpson. January 1995. Aseptic processing of infant formula. U.S. patent 5,378,488.

Eckner, K., and E. Zottola. 1991. Potential for the low temperature pasteurization of dairy fluids using membrane processing. *J. Food Prot.* 54:793–797.

Ellison, A., W. Anderson, M. B. Cole, and G. S. A. B. Stewart. 1994. Modelling the thermal inactivation of *Salmonella typhimurium* using bioluminescence data. *Int. J. Food Microbiol.* 23:467–477.

Ferrer, E., A. Alegría, R. Farré, P. Abellán, and F. Romero. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas. Changes during heat treatment storage. *J. Chromatogr. A* 947:85–95.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization activities on microbiological risk assessment. 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Meeting report. Microbiological risk assessment series: 6.

Gervilla, R., V. Ferragut, and B. Guamis. 1999. High pressure inactivation and sublethal injury of pressure resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1566–1568.

Gibson, A. M., N. Bratchell, and T. A. Roberts. 1988. Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 6:155–178.

González, S., G. J. Flick, F. M. Arritt, D. Holliman, and B. Meadows. 2006. Effect of high-pressure processing on strains of *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Prot.* 69:935–937.

Guan, D., H. Chen, and D. G. Hoover. 2005. Inactivation of *Salmonella typhimurium* DT 104 in UHT whole milk by high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 104:145–153.

Himmelright, I., E. Harris, V. Lorch, and M. Anderson. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula—Tennessee, 2001. *JAMA* 287:2204–2205.

International Commission on Microbiological Specification for Foods. 2002. Micro-organisms in foods, vol. 7. Microbiological testing in food safety management, chap. 8. Selection of cases and attribute plans. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Iversen, C., and S. Forsythe. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.* 14:443–454.

Kalchayanand, N., A. Sikes, C. P. Dunne, and B. Ray. 1998. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.* 15:207–214.

Lai, K. K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltim.)* 80:113–122.

Linton, R. H., W. H. Carter, M. D. Pierson, and C. R. Hackney. 1995. Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* 58:946–954.

Linton, R. H., W. H. Carter, M. D. Pierson, C. R. Hackney, and J. D. Eifert. 1996. Use of the modified Gompertz equation to predict the effect of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. *J. Food Prot.* 59:16–23.

Lönnnerdal, B., S. L. Kelleher, and E. L. Lien. 2001. Extent of thermal processing of infant formula affects copper status in infant rhesus monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:914–919

Mallidis, C., P. Galiatsatou, P. S. Taoukis, and C. Tassou. 2003. The kinetic evaluation of the use of high hydrostatic pressure to destroy *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38:579–585.

Muytjens, H. L., and L. A. Kollee. 1990. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9:372–373.

Nazarowec-White, M., and J. M. Farber. 1997. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 15:207–214.

Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. 2004. Microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. Question EFSA-Q-2003-111. *EFSA J.* 113:1–35.

Pina-Pérez, M.C., Rodrigo, D., Ferrer Bernat, C., Rodrigo Enguidanos, M., Martínez-López, A., 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk. *International Dairy Journal* 17 (2007), 1441–1449.

Pina Pérez M.C., Silva-Angulo A.B., Muguerza-Márquez B., Rodrigo Aliaga D., and Martínez A. 2009. Synergistic effect of High Hydrostatic Pressure and Natural Antimicrobials on Inactivation Kinetics of *Bacillus cereus* in Liquid Whole Egg and Skim Milk mixed beverage. *Food Borne pathogens and diseases*: 6(6): 649-656.

Raso, J., I. Álvarez, S. Condón, and F. J. Sala Trepert. 2000. Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1:21–29.

Rodrigo D, Ruíz P, Barbosa-Cánovas GV, Martínez A, and Rodrigo M. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *Int J Food Microbiol* 2003; 81:223–229.

Simon, M., and A. P. Hansen. 2001. Effect of various dairy packaging materials on the shelf life and flavour of ultrapasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 84:784–791.

Simpson, R. K., and A. Gilmour. 1997. The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods. *Food Microbiol.* 14:567–573.

Styles, M. F., D. G. Hoover, and D. F. Farkas. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.* 56:1404–1407.

Weibull, W., 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics* 51, 293–297.

Weir, E. 2002. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *Can. Med. Assoc. J.* 166:1570.

Xiong, R., G. Xie, A. S. Edmondson, R. S. Linton, and M. A. Sheard. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiol.* 16:269–279.

V.2.2 DETECCIÓN DE DAÑO SUBLETAL POR TÉCNICAS
PROTEÓMICAS EN CÉLULAS DE *Enterobacter sakazakii* TRAS
DIFERENTES TRATAMIENTOS POR ALTAS PRESIONES
HIDROSTÁTICAS (APH) EN AGUA DE PEPTONA (BPW) Y FÓRMULA
INFANTIL EN POLVO RECONSTITUIDA (RPIFM)

Congresos

***Enterobacter sakazakii* cells treated with high hydrostatic pressure (HHP):
A PROTEOMIC ANALYSIS**

Pina, M.C¹; Martínez, A.¹; Periago, P.M.²

¹*Department of Preservation and Food Quality, Institute of Agrochemistry and Food Technology-CSIC,
Campus de la Coma, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

²*Department of Food Engineering and Agricultural Machinery, Polytechnic University of Cartagena, P
Alfonso XIII No. 48, 30203 Cartagena, Spain. E-mail: paula.periago@upct.es*

CONGRESO: PROTEOM'LUX 2006, LUXEMBOURG. "Bridging the Gap Between
Gene Expression and Biological Function"

V.2.2.1 Abstract

En el presente estudio se llevó a cabo una primera aproximación a la aplicación de técnicas proteómicas para detectar daño subletal en células de *E. sakazakii* tratadas por APH (250 y 350MPa), en agua de peptona tamponada (BPW), y fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM). Las condiciones elegidas incluyen niveles de inactivación de 0.80 ciclos \log_{10} (250MPa-1min), ~ 2 ciclos \log_{10} (250MPa-5min y 350MPa-1min) y ~ 6 ciclos \log_{10} (350MPa-5min). De los resultados se extrae la influencia que la intensidad del tratamiento tiene sobre la expresión proteica.

V.2.2.2 Introducción

Si bien es cierto que tanto genómica como proteómica se han convertido en herramientas muy potentes en la investigación de la fisiología celular y bacteriana, no existen todavía publicaciones relativas a la utilización de estas técnicas para identificar posibles alteraciones a nivel proteómico en células de *E. sakazakii* sometidas a tratamientos sub-letales térmicos/no-térmicos. Sin embargo, se sabe que ante condiciones ambientales estresantes (estrés osmótico, desecación, calor, entre otros) el perfil proteico del microorganismo se modifica viéndose afectados aspectos funcionales tales como: proteínas de síntesis, factores de transcripción, metabolismo energético, metabolismo de aminoácidos, y factores de transporte (Rieder y Lehner, 2007).

En líneas generales, cuando una célula recibe un estímulo ambiental, su dotación genética activa una maquinaria que puede desencadenar un sinnúmero de respuestas. Existen múltiples evidencias de que la exposición de procariotas a condiciones sub-óptimas o estresantes modifica el perfil de proteínas e incluso induce la síntesis de proteínas específicas de respuesta al estrés. En el caso de microorganismos patógenos, un cambio en la expresión de las proteínas puede desencadenar un cambio en la virulencia del microorganismo o un aumento de la resistencia frente a estreses, comprometiendo así la seguridad alimentaria del producto tratado.

V.2.2.3 Objetivos

El objetivo del presente estudio es la búsqueda de indicios a nivel proteómico sobre un posible daño subletal en células de *C. sakazakii* tratadas por APH. Para ello se realizaron los siguientes estudios: (i) estudio de la resistencia del microorganismo a diferentes condiciones de tratamiento por APH; y (ii) evaluación de posibles modificaciones en el perfil de proteínas del microorganismo bajo dichas condiciones.

V.2.2.4 Material y métodos

V.2.2.4.1 Preparación de suspensiones celulares para el tratamiento por APH. Como sustratos se utilizaron: una fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM) (Natal, Nutribén S.A) y un sustrato de referencia, agua de peptona tamponada (BPW 1%).

La PIFM fue reconstituida de acuerdo a las especificaciones del productor y agitada a 1000 rpm en condiciones estériles. El sustrato se inoculó con 1 vial de 2 mL hasta concentración final de $1-3 \times 10^7$ cfu/mL. Las suspensiones celulares se distribuyeron en eppendorfs de 1.5mL repartidos en bolsas para el tratamiento por APH, a razón de 5 eppendorf/bolsa.

V.2.2.4.2 Tratamiento por APH. En el presente estudio se eligieron tratamientos que dieran lugar a distintos niveles de inactivación teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la parte I del presente capítulo.

En consecuencia, ambas muestras se trataron a 250MPa-1min, 250MPa-5min y 350MPa-5min, para conseguir respectivamente 0.8, 2 y 6 ciclos \log_{10} de inactivación de *C. sakazakii*. Adicionalmente también se probó el tratamiento de 350MPa-1min que produjo un nivel de inactivación de 2 ciclos \log_{10} pero con distinto nivel de tiempo y presión; para poder evaluar si existen diferencias en la expresión de proteínas en función de t y P aplicados. Los tratamientos se llevaron a cabo de acuerdo a lo expuesto en el apartado 5.4.4 de la parte I del presente capítulo.

Las condiciones de tratamiento seleccionadas fueron de intensidades en el rango de estudio entre 250MPa-1min a 350MPa-5 min. Las condiciones estudiadas aparecen recogidas en la tabla V.2.2.1.

Tabla V.2.2.1 Condiciones de tratamiento por APH para detección de daño subletal en células de *E. sakazakii* suspendidas en RPIFM y BPW.

Condiciones de tratamiento	Nivel de Presión	Tiempo de tratamiento
	250MPa	1min
250MPa	5min	
350MPa	1min	
350MPa	5min	

Los niveles de inactivación para las condiciones de tratamiento fueron determinados mediante recuento en placa de TSA por duplicado.

V.2.2.4.3 Detección daño subletal por APH. Análisis del patrón proteico

V.2.2.4.3.1 Preparación del extracto proteico

La extracción de proteínas se realizó según la metodología propuesta por (Wouters y col., 1999). Se utilizaron 10 mL del cultivo celular expuesto previamente a las condiciones estresantes, se centrifugó (Heraeus Labofuge 400R, España) a 4000 rpm durante 10 min y, a continuación, las células se resuspendieron en 1 mL de solución lisis (urea 8 M (PlusOne, Amersham Biosciences, Suiza)), CHAPS al 2% (w/v) (PlusOne, Amersham Biosciences), inhibidor de proteasas (Roche, Alemania), DTT 5 mM (PlusOne, Amersham Biosciences y agua MilliQ). Posteriormente se rompieron empleando 0,5 g de perlas de zirconio de 5 mm de diámetro (Biospec Product, USA) en un Mini BeadBeaker (Biospec Product) realizando 6 repeticiones de 1 min cada una (enfriando en hielo entre cada agitación). Después de la sedimentación de las perlas de zirconio, el sobrenadante se transfirió a un eppendorf y se almacenó a -80°C hasta su análisis posterior.

V.2.2.4.3.2 Cuantificación de las proteínas en la muestra

Las proteínas presentes en el extracto se cuantificaron usando un kit RC-DC protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), procedimiento colorimétrico basado en el método de cuantificación de Lowry (1951).

Este procedimiento consiste en la determinación de cambios de absorbancia ocasionados por la reacción de las proteínas con varios reactivos que forman un complejo coloreado con las mismas.

Todas las muestras se cuantificaron por duplicado y se realizaron las curvas de calibración correspondientes, con un mínimo de cinco puntos. Se utilizó 1,4 mg/mL de albúmina de suero bovino (ASB) como proteína estándar. La concentración de la muestra a cuantificar se determinó mediante la interpolación de los valores en la curva de calibración. La medición de las variaciones de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (Lan Optics serie 2000, Labolan, Arcoyen-Navarra), a una longitud de onda de 750 nm.

V.2.2.4.3.3 Electroforesis bidimensional (EF-2D)

Se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional (EF-2D) con el fin de separar la mezcla de proteínas presente en el extracto proteico de *E. sakazakii*. La separación se hizo en dos etapas:

V.2.2.4.3.3.1 Primera dimensión (Isoelectroenfoque)

El isoelectroenfoque (IEF) es un método capaz de separar las proteínas de acuerdo con su punto isoelectroforético (pI). Esta etapa consistió en: a) rehidratación de las tiras comerciales de poliacrilamida con inmobilinas, es decir, con un pH inmovilizado de forma covalente (IPG strips, Immobiline Dry strips, Amersham Biosciences, Uppsala Suiza), y b) la aplicación del isoelectroenfoque, mediante una corriente eléctrica, menor a un 1 mA y un alto voltaje (3500 V).

Rehidratación de las tiras IPG: las muestras se mezclaron con un tampón de rehidratación (TR), el cual consistió en una mezcla de urea 8 M, 2% CHAPS, 5.6 mg de DTT, 20 µl de tampón IPG (Bio Rad, Alemania) y azul de bromofenol 0.002% w/v (usb, Corporation, Cleveland, USA). Esta solución permite mantener a las proteínas reducidas y desnaturalizadas. La cantidad de proteína cargada en la IPG strips de 7 cm, con un intervalo de pH de 4 – 7, fue de 20 µg diluida en el TR hasta un

volumen de 125 μ L. Para evitar la desecación de la tira IPG, durante las 12 horas de rehidratación, se añadió en superficie aproximadamente 1,5 mL de aceite mineral (DryStrip cover fluid, Plusone-Pharmacia-Biotech, Uppsala Suiza).

El isoelectroenfoque se realizó en un sistema IPGphor (Amersham Biosciences). Para enfocar las proteínas se utilizó el siguiente programa: S₁ 500 V durante 30 min; S₂ 1000 V durante 30 min; S₃ 5000 V durante 1:40 horas, se alcanzó un voltaje total de 6500 V.

V.2.2.4.3.3.2 Segunda dimensión

Las proteínas se separaron según su peso molecular (P_m) en las etapas siguientes: Las tiras IPG se equilibraron en dos pasos con un tampón compuesto por urea 6 M, Tris-HCl pH 8,8-1.5 M, glicerol al 20% (NORTAPUR, PROLABO, Comunidad Europea), agua bidestilada, DTT 130 mM y/o iodoacetamida 135 mM (Merk, Alemania). Las IPG strips se colocaron durante 15 min con 2,5 mL del tampón que contenía DTT. El reactivo DTT mantiene a las proteínas reducidas. A continuación, se pusieron en contacto durante otros 15 min con la misma solución de equilibrio sin DTT, pero con iodoacetamida, que alquila el exceso de DTT y los grupos tiol de las proteínas evitando así su reoxidación durante la electroforesis.

Por último, se procedió a separar las proteínas en geles SDS (Sodio Dodecilsulfato) con 12% de poliacrilamida (Pharmacia Biotech). Las tiras IPG se depositaron en contacto con el gel y se colocó un papel Whatman con 2 μ L de una mezcla de marcadores moleculares (Unstained Protein Standards, Bio-Rad). Para favorecer el contacto de la tira con el gel y así facilitar la migración de las proteínas de la tira IPG al gel SDS, se añadió 1 mL de agarosa (0.5% w/v) (Merck, Alemania). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad). La separación se realizó en dos pasos: se aplicó a intensidad de 100 mA por gel durante 1 hora y, posteriormente, se utilizó una intensidad final de 150 mA.

V.2.2.4.3.3. Tinción

Para la visualización de las proteínas en los geles SDS, éstas se tiñeron empleando el método de Shevchenko y col. (1996) de tinción de plata, modificado para que fuese compatible con la espectrofotometría de masas. Este método de tinción es de una elevada sensibilidad, ya que permite detectar 1 ng de proteína en el gel. Para llevar a cabo el proceso de tinción se utilizó el kit Silver staining Kit Protein (Amersham-Biosciences). El método consta de 5 pasos:

1. **Fijación:** en esta etapa se fijan las proteínas y se eliminan los compuestos que puedan interferir posteriormente.
2. **Sensibilización:** los reactivos de la solución utilizada se unen a las proteínas y en la etapa posterior se unen a los iones de plata.
3. **Tinción con plata:** los geles se impregnan con nitrato de plata.
4. **Revelado:** la plata que se ha unido a las proteínas se reduce a plata metálica.
5. **Parada:** se utiliza para detener la reacción de revelado.

V.2.2.4.3.4 Análisis de imagen y cuantificación

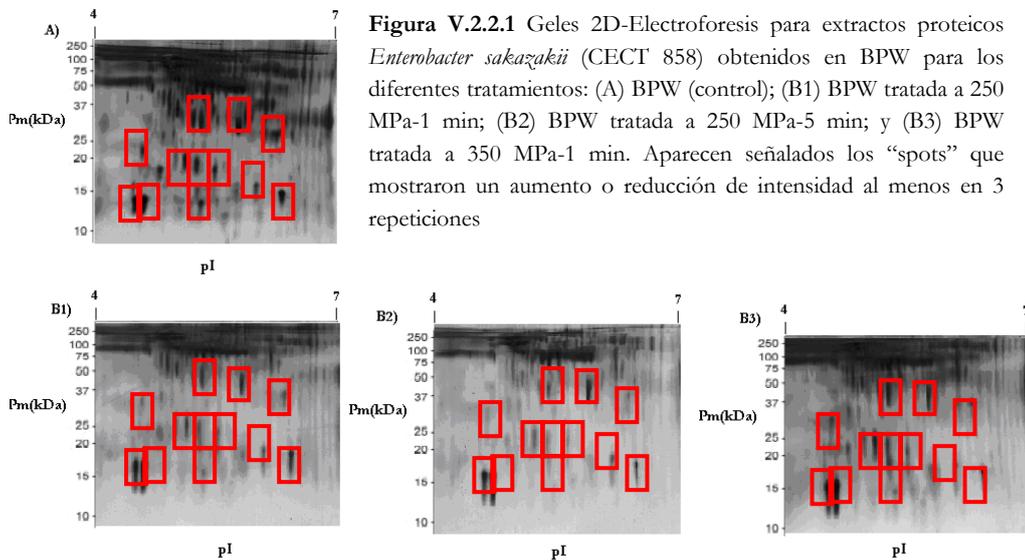
Una vez teñidas las proteínas de los geles, estos se digitalizaron utilizando el escáner ImageScanner II Desktop (Amersham Bioscience) y se generaron imágenes de alta resolución en formato TIFF. Los patrones o perfiles proteicos obtenidos de los geles bidimensionales, se analizaron cuantitativamente usando el programa PDQuest 2-D software V 8.0.1 (Bio-Rad). Se crearon imágenes consenso de los geles comparando las manchas de dos geles distintos (n=2) por cada uno de los grupos analizados, y tomando las manchas comunes a todos ellos. Para compensar los posibles errores introducidos durante la carga proteica y en el desarrollo de la tinción de plata entre los geles, los niveles de intensidad de cada proteína (mancha) se normalizaron expresando la intensidad de cada proteína como la proporción respecto a la intensidad total de todas las proteínas presentes en el gel. Los valores medios y los coeficientes de variación de los puntos que presentaron diferente expresión, se calcularon con el mismo programa y se confirmaron por inspección visual. Mediante

la utilización de dicho programa se llevó a cabo la caracterización y posición de los puntos respecto a su pI y Pm.

V.2.2.5 Resultados y Discusión

V.2.2.5.1 Células de *E. sakazakii* tratadas por APH

Para detectar la posible modificación en el perfil proteico atribuido al tratamiento por APH, se llevó a cabo el presente estudio sobre células de *E. sakazakii* tratadas y no tratadas. Tras el tratamiento, las células tratadas y muestras no tratadas fueron sometidas a un proceso de extracción de proteínas, descrito previamente en el apartado de material y métodos, y a continuación se realizó una electroforesis SDS-PAGE 2D con el objetivo de observar posibles diferencias en el patrón proteico dependiendo de la intensidad de tratamiento y del sustrato. La figura V.2.2.1 muestra los resultados obtenidos por electroforesis para las células de *E. sakazakii* tratadas/no tratadas por APH en BPW.



Los resultados obtenidos con el análisis informático (programa PDQuest 2-D software V 8.0.1, BioRad) permiten realizar ciertas observaciones que servirán de base a futuros estudios en este mismo sentido. Los resultados en BPW muestran una reducción en la expresión proteica de células de *E. sakazakii* (CECT 858) sometidas a tratamiento por APH, con respecto a muestras no tratadas. Observamos que para un tratamiento de intensidad leve, 250MPa-1min, la expresión proteica es mayor que la observada para 250MPa-5min, donde la cantidad de proteínas expresadas se reduce considerablemente. De acuerdo a los resultados, parece que el tiempo de exposición al factor de estrés, en este caso la presión, juega un papel determinante en la respuesta proteica. Los resultados obtenidos en RPIFM permiten extraer las mismas conclusiones en cuanto a reducción en la expresión proteica, para intensidades de tratamiento crecientes.

El efecto del tiempo de exposición ha sido observado por otros autores, por ejemplo en lo referente a la síntesis de proteínas de shock-térmico, por exposición prolongada al calor (Aertsen y col, 2004). Otros autores también coinciden en la observación de una reducción en los niveles de expresión proteica tras tratamientos de presión de 55 MPa (Welch et al. 1993) para *E. coli*, que se traducen en síntesis de

proteínas de respuesta al estrés en las 6h siguientes al tratamiento. Las diferencias en el perfil proteico de *E. sakazakii* han sido estudiadas por otros investigadores demostrando que ante diferentes condiciones de estrés osmótico, el perfil proteico cambia, tanto en cuanto a proteínas intracelulares como de membrana; así como en lo que se refiere a la funcionalidad de las mismas: factor de elongación ó proteínas de termorregulación, por ejemplo (Rieder y Lehner, 2007).

Bibliográficamente se sabe que la pérdida de componentes intracelulares indica la presencia de daño en la membrana celular, lo que impide el crecimiento y la replicación de la célula (Busta, 1976). Investigaciones previas demuestran que las proteínas pertenecen al grupo de componentes que las células subletalmente dañadas suelen modificar bajo condiciones de estrés prolongado, además de sufrir pérdidas en Mg²⁺, K⁺, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc, material que queda en los alrededores (Hurst, 1977; Palumbo, 1989). Células de *Staphylococcus aureus* sometidas a tratamiento térmico subletal pierden potasio, aminoácidos, y proteínas. También se han observado cambios en su composición macromolecular, cambios en componentes funcionales relacionados con actividades metabólicas quedan dañados (Ray, 1979; Jay y col., 2005).

La importancia de un estudio basado en detectar cambios en el perfil proteico de células sometidas a distintos tipos de estrés radica en el establecimiento de medidas específicas que garanticen la seguridad del producto. Se ha visto que ante factores estresantes como congelación, deshidratación, e irradiación la integridad de la pared celular y la síntesis proteica son aspectos ambos cruciales en la viabilidad celular (Busta, 1976; Jay y col., 2005). En el caso de células dañadas reversiblemente tras un tratamiento, se recuperan en un intervalo de 2–4 h en condiciones adecuadas de temperatura y en medio de enriquecimiento no-selectivo. Considerando que la RPIFM permanece preparada, en hogares u hospitales, un máximo de 12h hasta el consumo, en condiciones adecuadas para el microorganismo, por ejemplo para temperatura de ligero abuso > 8°C, sería posible una rápida recuperación y proliferación de *E. sakazakii*, con el riesgo que ello supone. Se sabe que células sometidas a estrés y resistentes al mismo, poseen una patogeneidad totalmente reestablecida una vez que se

han recuperado (Meyer y Donnelly, 1992). De ahí la importancia de establecer experimentalmente los mecanismos de inactivación por APH para este microorganismo con el objetivo de garantizar la seguridad de un producto pasteurizado por esta tecnología y comercializado en frío.

V.2.2.6 Conclusiones

Es necesario completar los estudios realizados experimentalmente a nivel proteómico en cuanto al tratamiento de células de *C. sakazakii* por esta tecnología, y ampliar conocimientos sobre posibles cambios en la virulencia y resistencia del microorganismo tras el tratamiento. Aunque se ha demostrado que las técnicas proteómicas constituyen una potente herramienta en la investigación de adaptación celular a diversas condiciones de estrés, para *C. sakazakii* queda todavía un largo camino por recorrer, ya que son muy pocos los factores de estrés para los que se ha estudiado su respuesta. De estudios en esta misma línea se pueden extraer valiosas conclusiones sobre la necesidad de adoptar medidas específicas de control tras el tratamiento, si se desea garantizar la seguridad de una PIFM líquida, pasteurizada, donde el tratamiento térmico sea substituido por el tratamiento por APH, y donde a posteriori se refrigere el producto.

V.2.2.7 Referencias

- Aersten A., Vanoirbeek K., De Spiegeleer P., Sermon J., Hauben K., Farewel A., Nyström T., y Michiels C.W. 2004. Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol7(5): 2660-2666.
- Dutreux, N., Notermans, S., Witjzes, T., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (2000). Pulsed electric fields inactivation of attached and free living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *International Journal of Food Microbiology* 54, 91-98.
- Hurst, 1977 A. Hurst, Bacterial injury: a review, *Can. J. Microbiol.* 23 (1977), pp. 935–944. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus | Cited By in Scopus (53)
- Jay et al., 2005 J.M. Jay, M.J. Loessner and D.A. Golden, *Modern Food Microbiology*, Springer, New York, NY (2005) pp. 229–233.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall, **1951. Protein** measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Meyer and Donnelly, 1992 D.H. Meyer and C.W. Donnelly, Effect of incubation temperature on repair of heat-injured *Listeria* in milk, *J. Food Prot.* 55 (1992), pp. 579–582.
- Palumbo, 1989 S.A. Palumbo, Injury in emerging foodborne pathogens and their detection. In: B. Ray, Editor, *Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurrence and Detection in Food, Water and Feeds*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1989), pp. 115–132.
- Ray, 1979 B. Ray, Methods to detect stressed microorganisms, *J. Food Prot.* 42 (1979), pp. 346–355.
- Riedel K and Lehner A. 2007. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics*, 7: 1217-1231.
- Shevchenko,A.; Jensen,O.N.; Podtelejnikov,A.V.; Sagliocco,F.; Wilm,M; Vorm,O.; Mortensen,P.; Shevchenko,A.; Boucherie,H.; Mann,M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1996**, *93*, 14440-14445.
- Welch, T. J., A. Farewell, F. C. Neidhardt, and D. H. Bartlett. 1993. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.* 175:7170–7177.



*Capitulo V.3. INACTIVACIÓN DE *Enterobacter sakazakii*
POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD
(PEAI) EN MEDIO DE REFERENCIA (BUFFERED
PEPTONE WATER, BPW) Y EN FÓRMULA INFANTIL
EN POLVO RECONSTITUIDA (RPIFM)*



Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk

M.C. Pina Pérez, D. Rodrigo Aliaga, C. Ferrer Bernat,
M. Rodrigo Enguidanos, A. Martínez López*

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, C.S.I.C., P.O. Box 73 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 13 June 2006; accepted 23 April 2007

Abstract

The effect of high-intensity pulsed electric field (PEF) treatment on the survival of *Enterobacter sakazakii* suspended in buffered peptone water (BPW) and powdered infant formula milk (IFM) was evaluated. Reference medium and IFM samples were treated with PEF. Electric field intensity and treatment time were varied from 10 to 40 kV cm⁻¹ and from 60 to 3895 μs, respectively. Samples of buffered peptone water (3 g L⁻¹) and IFM were inoculated with *E. sakazakii* (CECT 838) (10⁸ cfu mL⁻¹) and then treated with PEF. The inactivation data were adjusted to the Weibull frequency distribution function and Bigelow model, and constants were calculated for both substrates. A maximum 2.7 log (cfu mL⁻¹) reduction was achieved in BPW after exposure of *E. sakazakii* to PEF for 360 μs (2.5 μs pulse width) at 40 kV cm⁻¹. In IFM, exposure of *E. sakazakii* to PEF, with the same conditions, led to a 1.2 log (cfu mL⁻¹) reduction. The greater the field strength and treatment time, the greater the inactivation achieved in both substrates. Even though further research will be necessary, according to the results, there are good prospects for the use of PEF in hospitals to achieve safe reconstituted infant formula before storage at refrigerated temperatures.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Infant formula milk; Pulsed electric fields; *Enterobacter sakazakii*; Inactivation kinetics

Congresos

AUTORES Pina Pérez M.C., Rodrigo Aliaga D., Ferrer Bernat C., Martínez López A.

TÍTULO Inactivación de *Enterobacter sakazakii* por pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) en agua de peptona y fórmula infantil re-hidratada

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de Póster

CONGRESO I Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria

INTERNACIONAL

LUGAR DE REALIZACIÓN: Sevilla, España

AÑO Mayo 2006

V.3.1 Abstract

La supervivencia de células de *Enterobacter sakazakii* tratadas por PEAI se estudió en dos sustratos, un medio de referencia, agua de peptona tamponada (BPW, concentración 0.3% w/v), y un sustrato real, fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM). Se aplicaron intensidades de campo eléctrico (E) y tiempos de tratamiento (t) entre 10 a 40 kV/cm y 60 a 3895 μ s, respectivamente. Las curvas de supervivencia se ajustaron a la función de distribución de Weibull y al modelo de Bigelow, siendo calculados los parámetros que definen ambos modelos en ambos sustratos. El nivel máximo de inactivación para *E. sakazakii* por PEAI resultó de 2.70 ciclos log (cfu/mL) y fue alcanzado en BPW tras un tratamiento de 360 μ s (2.5 μ s amplitud de pulso) a 40 kV/cm. En RPIFM, la exposición de *E. sakazakii* al tratamiento por PEAI en las mismas condiciones de E y t, condujo a un nivel de inactivación de 1.24 ciclos log (cfu/mL). Para todas las condiciones de tratamiento, a mayor intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento, mayor fue el nivel de inactivación conseguido, en ambos sustratos. Aunque estudios en profundidad son aún necesarios, de acuerdo a los resultados que se desprenden de la presente tesis, existen buenas perspectivas con respecto al uso de la tecnología de PEAI en hospitales para conseguir un producto reconstituido más seguro antes del almacenamiento refrigerado.

Palabras clave: Fórmula infantil en polvo, PEAI, *Enterobacter sakazakii*, cinéticas de inactivación.

V.3.2 Introducción

Los bebés y niños son particularmente vulnerables a las infecciones por patógenos alimentarios, por lo que la seguridad microbiológica de todos los productos destinados a ellos es de vital importancia.

Aunque *E. sakazakii* ha sido aislado de una gran variedad de productos e ingredientes alimentarios, las causas más graves de infección en niños y bebés, causando incluso la muerte, se deben a su presencia en fórmula infantil en polvo (PIFM) (Muytjens y Kollee, 1990). Los casos más severos afectan a bebés menores de 60 días, prematuros (gestación < 37 semanas) con bajo peso al nacer, por debajo de 2500 g (Lai, 2001; Codex, 2003) o inmunocompetidos. El resultado de la infección por *E. sakazakii* con secuelas neurológicas graves tiene una incidencia del 2-5% en bebés prematuros y del 13% en bebés de menos de 1500g de peso al nacer. Un ratio de mortalidad de entre 40 y 80% aparece descrito en bibliografía en bebés neonatos de pocos días de edad (Iversen y Forsythe, 2003).

Las autoridades públicas e investigadores de todo el mundo se encuentran actualmente investigando modos de eliminar el microorganismo o controlar su crecimiento en PIFM, tanto en ambientes de procesado industrial como en áreas de preparación, en hospitales especialmente. *E. sakazakii* es un microorganismo ambiental y como tal puede resistir las condiciones estresantes que puedan darse a nivel de planta de tratamiento, sobrevivir adherido a las paredes de equipos, o recontaminar la fórmula una vez finalizado el tratamiento durante los procesos de manipulación o llenado de envases. La recontaminación puede tener lugar también durante la preparación o reconstitución de la fórmula en polvo, por un pobre esterilizado de los biberones, o un pobre mantenimiento e higiene del material utilizado en hogares u hospitales. Las principales causas de contaminación y proliferación del microorganismo en la PIFM se deben a temperaturas de abuso en el almacenamiento de la fórmula reconstituida, y/ó pobres prácticas higiénicas.

Recientemente, la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en alimentos (ICMSF, 2002) clasificó el microorganismo como “riesgo severo para poblaciones restringidas causando secuelas crónicas o de larga duración” A este rango

de riesgo pertenecen otros microorganismos más frecuentes en alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tipos A y BV, y *Cryptosporidium parvum*.

V.3.3 Objetivos

En virtud del aparente potencial que supone la tecnología de los PEAI respetando los constituyentes nutricionales de los alimentos, esta investigación se lleva a cabo con el objetivo de determinar la efectividad que diversos tratamientos por PEAI pueden tener sobre la inactivación de *E. sakazakii* como medida de control adicional junto con una política estricta de buenas practicas higiénicas de manipulación y producción de fórmulas infantiles.

V.3.4 Material y Métodos

V.3.4.1 Cultivo Microbiológico. Un cultivo puro de *E. sakazakii* (CECT 858 equivalente a 29522 ATCC) fue proporcionado por la colección española de cultivos tipo, en formato liofilizado.

El líofilo fue rehidratado en 10 mL de caldo de tristonso-soja (TSB) (Scharlab Chemie, Barcelona, Spain), y mantenido en agitación a 37°C. Tras 20 minutos, los 10 mL fueron inoculados en 500 mL de TSB e incubados a 37° C durante 24 h, en agitación continua a 200 rpm hasta obtener células en fase estacionaria. A partir de la suspensión de células obtenida tras 24h a 37°C, se procedió a realizar 2 tandas de lavado de las células mediante centrifugación (5000g, 5°C, 15 min) obteniendo 50 viales como resultado del proceso, que fueron almacenados a -80°C hasta su utilización. A continuación se comprobó la concentración de los mismos a partir de 5 de ellos, mediante diluciones seriadas en agua de peptona al 1% y siembra en placa (Agar tristonso-soja, TSA) por duplicado. La concentración media obtenida para los viales madre resultó de $1 \times 10^9 \pm 0.5 \times 10^9$ cfu/mL.

A partir de este cultivo se obtuvieron viales de trabajo de concentración conocida. Para ello se diluyeron viales iniciales en medio TSB hasta concentración de 10^6 cfu/mL. Un mililitro de esta disolución se transfirió a un matraz de 500 mL de TSB y fue incubado a 37°C en agitación continua a 200 rpm durante 14 h hasta obtener células en fase estacionaria. Las suspensiones celulares se sometieron a 2 tandas de

lavados a $5000\times g$, $5^{\circ}C$, durante 15 min, seguidas de una concentración en medio TSB estéril y a partir de este cultivo se prepararon 50 viales de 2 mL, cada uno mezcla de 1mL de suspensión bacteriana y 1 mL de glicerol (20%) hasta concentración final de $1-3 \times 10^9$ cfu/mL. Posteriormente los viales fueron almacenados a $-80^{\circ}C$ para uso en los experimentos por PEF (Ananta, y col., 2001; Rodrigo y col., 2003; De Paoli, 2005). Todas experiencias se llevaron a cabo en el periodo de 2 meses.

V.3.4.2 Sustratos e Inoculación

Agua de peptona tamponada. Agua de peptona a concentración de 0.3% (w/v), con un valor de conductividad de 0.25 S/m y un valor de pH de 7.8, fue utilizada como sustrato. Un litro de agua de peptona estéril fue inoculado con 1 vial de 2mL, previamente obtenido, hasta concentración final de $1-3 \times 10^6$ cfu/mL.

Fórmula infantil en polvo. En el presente estudio se utilizó también un sustrato real, una fórmula infantil comercial en polvo (Nutribén® NATAL, Alter Farmacia, S.A, Madrid, Spain). Productos de este tipo son formulados tratando de reproducir la composición de la leche humana en lugar de asemejarse a la leche de vaca (Breeuwer et al., 2003). Este producto es rico en vitaminas y sales minerales (Mg, Ca, Fe, Zn, Na, K, Mn). La conductividad del producto re-hidratado fue de 2.78 mS/cm y el valor del pH de 6.4.

La fórmula infantil en polvo (PIFM) fue rehidratada atendiendo a las especificaciones del fabricante. De este modo, 500 mL de agua estéril se mezclaron con 79.9 g de PIFM. La mezcla fue agitada a 1000 rpm bajo condiciones de esterilidad, hasta temperatura ambiente, previa a la inoculación. El sustrato fue inoculado, con uno de los viales mantenidos en congelación, hasta concentración final de $1-3 \times 10^6$ cfu/mL.

V.3.4.3 Equipo de tratamiento por PEAI. Un equipo de PEAI a escala de laboratorio, diseñado por la Universidad de Ohio (Columbus, OH 43210-1007, USA), se utilizó para tratar las muestras. Se conectaron en serie para ello, 8 cámaras de tratamiento con diámetro de 0.23 cm y una distancia entre ellos de 0.293 cm. Las temperaturas de entrada y salida del fluido en las cámaras se registraron mediante un

sistema de termopares tipo T. La amplitud de pulso se fijó en 2.5 μ s. La forma del pulso, el voltaje e intensidad de tratamiento se registraron mediante un osciloscopio digital (Tektronic TDS 210, Tektronic Ins., OR, USA).

Al comienzo de cada experiencia, el sustrato no-inoculado se bombeó a través del sistema para garantizar el llenado de las conducciones y eliminar burbujas de aire del sistema. Una vez el sustrato se encuentra circulando a velocidad constante se fija el flujo a la velocidad de (v) 30 mL/min. El sustrato inoculado se bombeó a través del sistema durante 2 minutos para desplazar el sustrato no-inoculado. La temperatura inicial del sustrato fue de 25°C. La intensidad de campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la amplitud de pulso se prefijaron antes de cada experiencia. Los tiempos de tratamiento oscilaron entre 60 y 3895 μ s, y las intensidades de campo eléctrico estudiadas fueron de 10, 20, 30 y 40 kV/cm. Previo y posterior a cada uno de los tratamientos estudiados, se recogió una muestra de 5 mL en un tubo graduado, para el recuento de viables, N_0 y N respectivamente. Las muestras se diluyeron seriadamente en agua de peptona estéril al 0.1%, y se sembraron en placas petri de TSA, que se incubaron a continuación a 37°C, 24h.

El uso de una cepa de la CECT (CECT 858) asegura la autenticidad del microorganismo. El protocolo de verificación de cepas de la FDA se ha utilizado en el presente estudio para *E. sakazakii* CECT 858, el cual fue sembrado en placas de medio selectivo violet red bile glucose agar (VRBGA) en 2 series por triplicado e incubadas a 37°C, 24h, algo que nos permitió la confirmación visual de la morfología de las colonias (colonias púrpuras rodeadas de halo púrpura). Las colonias de la cepa CECT 858 se sembraron en placas de TSA (TSA; Scharlab Chemie, Barcelona, Spain) y fueron incubadas a 25°C durante 48-72 h para comprobar la formación de colonias pigmentadas en amarillo.

Todas las experiencias de PEAI se llevaron a cabo por quintuplicado.

V.3.4.4 Medida de propiedades físicas. La conductividad eléctrica y valor de pH de ambos sustratos se midió a temperatura ambiente (25°C). Para la medida de la conductividad se utilizó un conductímetro (Crison 525 conductimeter, Crison instruments, S.A., Alella, Barcelona, Spain). La medida de pH se llevó a cabo con un

pH – metro (Crison 2001 pH-meter, Crison instruments, S.A., Alella, Barcelona, Spain).

V.3.4.5 Análisis estadístico. El diseño experimental en este estudio fue el siguiente: 2 sustratos, agua de peptona (BPW) y fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM); 32 condiciones de tratamiento por PEAI, por combinación de 4 intensidades de campo eléctrico y 8 tiempos de tratamiento por cada intensidad de campo; con tres tiempos coincidentes para todas las intensidades de campo (360, 240 y 60 μ s); cada combinación de intensidad de campo y tiempo de tratamiento (Tabla V.2.1) para cada sustrato (PIFM o BPW) se repitieron 5 veces. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante los programas Microsoft Excel™ y SPSS (SPSS Ins., IL, USA).

Tabla V.3.1 Condiciones de tratamiento por PEAI por combinación de intensidades de campo (E, kV/cm) y tiempos de tratamiento (t, μ s) aplicados para ambos sustratos, RPIFM y BPW, en la inactivación de *Enterobacter sakazakii*.

E (kV cm ⁻¹)	10	20	30	40
Tiempos de tratamiento (μ s)				
t ₁	60	60	60	60
t ₂	120	120	120	120
t ₃	360	360	155	155
t ₄	460	460	240	180
t ₅	860	680	300	240
t ₆	1260	860	360	300
t ₇	2500	1000	460	320
t ₈	3895	1660	680	360

V.3.4.6 Modelización matemática

En el estudio de las cinéticas de inactivación por PEAI para *E. sakazakii* se utilizaron 2 modelos para analizar los datos experimentales.

V.3.4.6.1 Bigelow (1921)

$$\text{Log}_{10}(S) = -\left(\frac{t}{D}\right) \quad \text{Ecuación V.3.1}$$

donde S es la fracción de supervivientes $[N/N_0]$ a tiempo de tratamiento (t), N es el número final de microorganismos a tiempo de tratamiento (t) (cfu/mL), N_0 es el número inicial de microorganismos antes del tratamiento (cfu/mL) y D es el tiempo de reducción decimal, definido matemáticamente como la inversa negativa de la pendiente de la curva de inactivación.

V.3.4.6.2 Función de distribución de Weibull (1951)

$$\text{Log}(S) = -\left(\frac{t}{a}\right)^b \quad \text{Ecuación V.3.2}$$

$\text{Log}(S)$ es el logaritmo natural de S, S es la fracción de supervivientes $[N/N_0]$ a tiempo de tratamiento (t), a (μs) y b son los factores de escala y forma respectivamente. El factor b interpreta la forma de la curva de supervivencia, de modo que cuando $b < 1$ la curva de supervivencia es cóncava (en la curva aparecen colas), $b > 1$ indica que la forma de la curva es convexa (en la curva aparecen hombros), y para $b = 1$ la forma de la curva es una línea recta.

La bondad del ajuste del modelo lineal y no lineal se comprobó por comparación de los valores de los coeficientes R^2 , RMSE y Af.

V.3.5 Resultados

La inactivación de *E. sakazakii* por PEAI se estudió en medio de referencia (BPW) y fórmula infantil en polvo rehidratada (RPIFM). Las figuras V.3.1 y V.3.2 muestran las curvas de supervivencia para *E. sakazakii* en cada uno de los sustratos.

La población de *E. sakazakii* se redujo en un máximo de 2.70 ciclos log_{10} cuando el se fue inoculado en BPW y procesado por PEAI a 40 kV/cm-360 μs . Para las mismas

condiciones de tratamiento, la inactivación alcanzada cuando se utiliza como sustrato la RPIFM es de 1.22 ciclos \log_{10} . La efectividad del tratamiento por PEAI en la inactivación de *E. sakazakii* suspendido en BPW ó RPIFM dependió fundamentalmente de la intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento aplicados. Para la intensidad de campo eléctrico de 10 kV/cm, la inactivación conseguida en ambos sustratos fue similar, y en torno a 1 ciclo \log_{10} . Los máximos niveles de inactivación para intensidades de campo de 20 y 30 kV/cm se alcanzaron a 1660 μ s y 860 μ s, respectivamente. Otros autores (Evrendilek *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2006) han publicado incrementos considerables en los niveles de inactivación como resultado de incrementar la intensidad de campo eléctrico y/ó los tiempos de tratamiento para cada intensidad de campo, algo que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio para *E. sakazakii*.

Para determinar el efecto de ambos parámetros, tiempo e intensidad de campo, en la inactivación de *E. sakazakii*, se llevó a cabo un análisis de ANOVA. Ambos parámetros afectan significativamente la inactivación de *E. sakazakii* en ambos sustratos (P-value < 0.01). Además, el valor de la F-ratio es mayor para el factor intensidad de campo eléctrico que para el tiempo de tratamiento, en ambos sustratos, por lo que podemos concluir que el parámetro más importante en la inactivación de *E. sakazakii* por PEAI es la intensidad de campo eléctrico.

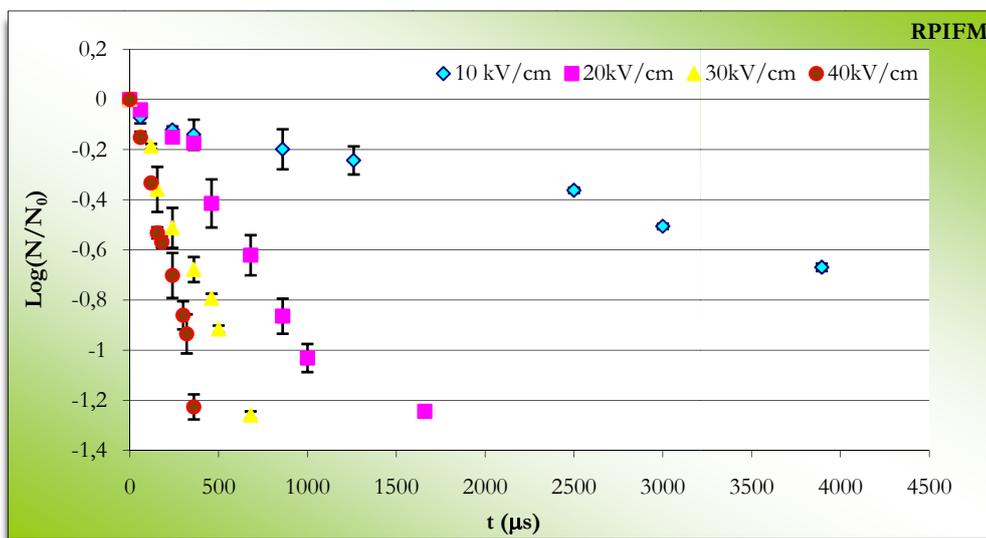


Figura V.3.1 Curvas de inactivación para *E. sakazakii* en fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM) a las diferentes condiciones de tratamiento: \blacklozenge 10kV/cm; \blacksquare 20 kV/cm; \blacktriangle 30 kV/cm y \bullet 40 kV/cm.

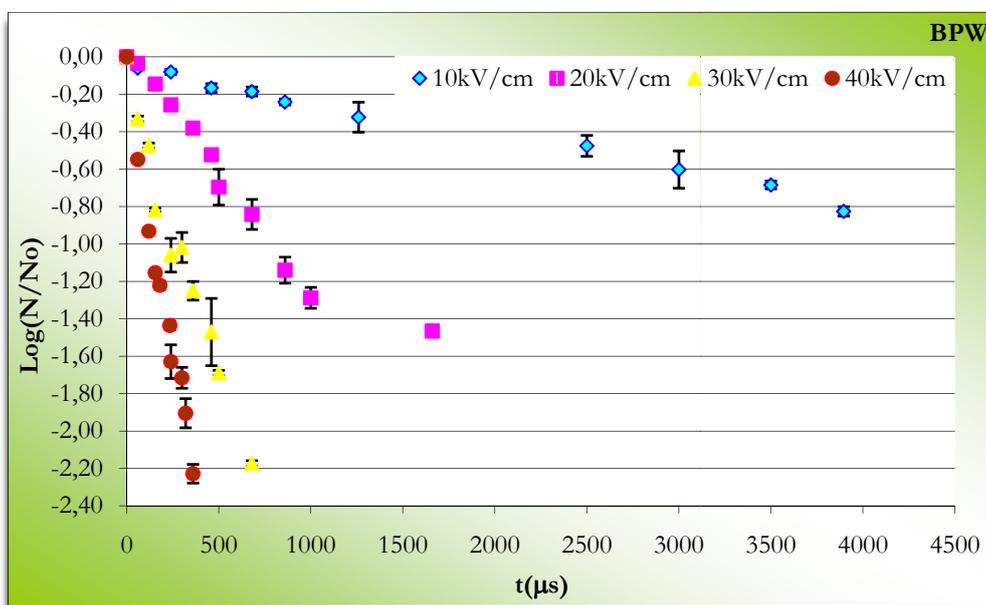


Figura V.3.2 Curvas de inactivación para *E. sakazakii* en agua de peptona tamponada (0.3 w/v) (BPW) a las diferentes condiciones de tratamiento: \blacklozenge 10kV/cm; \blacksquare 20 kV/cm; \blacktriangle 30 kV/cm y \bullet 40 kV/cm.

El efecto del sustrato se analizó mediante un ANOVA. Los resultados indican que la inactivación de *E. sakazakii* por PEAI se ve afectada por el sustrato de forma significativa (P-value < 0.01). El P-value del F-test fue menor que 0.05, lo cual indica que existen diferencias estadísticas significativas entre los valores medios de \log_{10} (S) entre sustratos para el intervalo de confianza del 95.0% entre los dos sustratos para las mismas condiciones de tratamiento y para cada sustrato entre distintas condiciones de tratamiento.

Las curvas de supervivencia obtenidas para las diferentes intensidades de campo eléctrico se ajustaron a los modelos primarios (ecuaciones V.3.1 y V.3.2) para estimar los parámetros de cada modelo. Las gráficas 3 y 4 recogen sendos ejemplos de cómo los modelos (Bigelow y Weibull, respectivamente) ajustan los datos de inactivación para *E. sakazakii* tratado por PEAI a 30 kV/cm en ambos sustratos. El gráfico representa los valores predichos por el modelo frente a los experimentales poniendo de manifiesto la precisión de los modelos estudiados.

Los valores de los parámetros estimados por cada modelo con su desviación estándar se muestran en la tabla V.3.2.

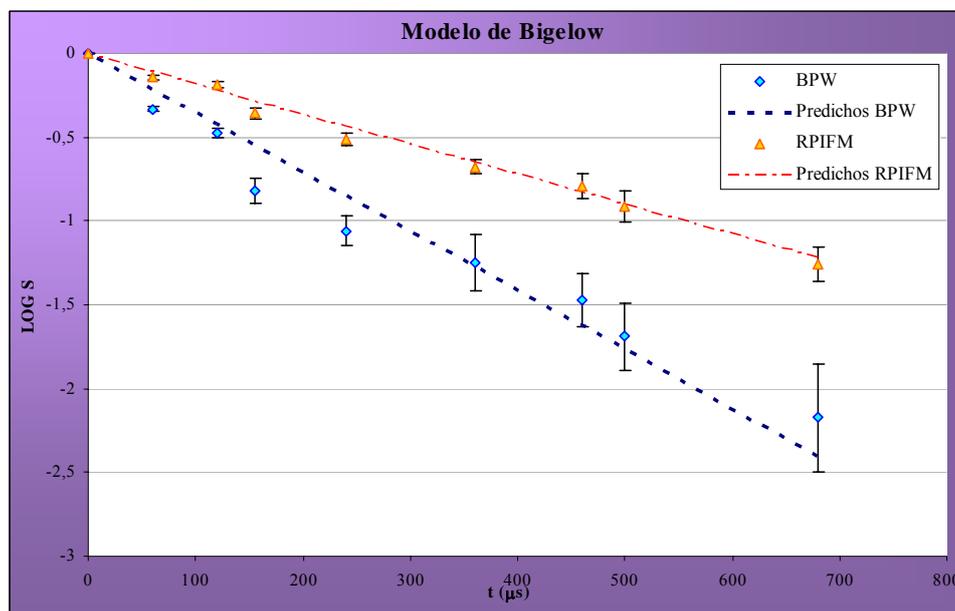


Figura V.3.3 Datos de inactivación obtenidos experimentalmente para *E. sakazkii* en agua de peptona (BPW) y fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM) ajustados al modelo de Bigelow (Ec. V.2.1) para 30kV/cm.

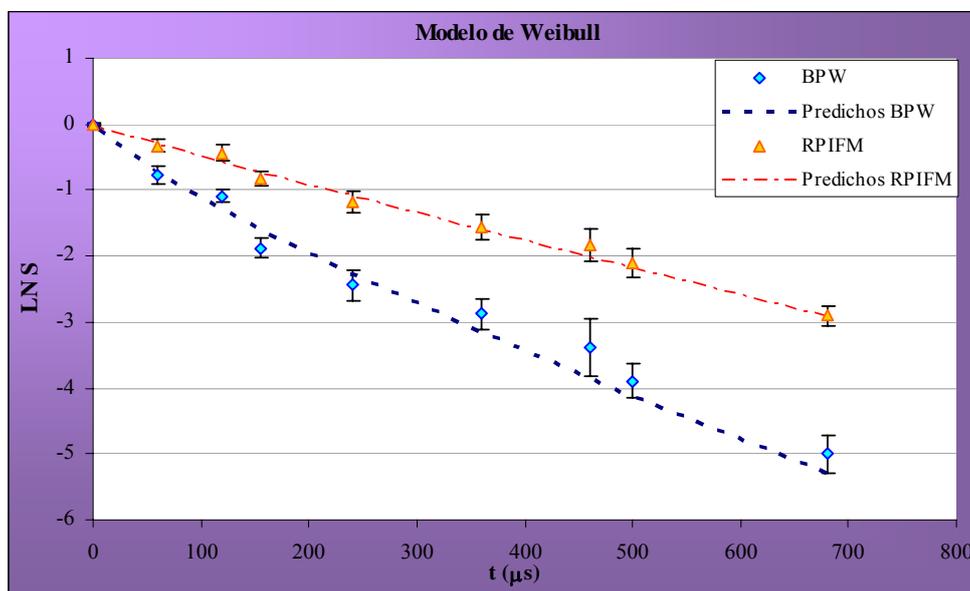


Figura V.3.4 Datos de inactivación obtenidos experimentalmente para *E. sakazkii* en agua de peptona (BPW) y fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM) ajustados al modelo de Weibull (Ec. V.2.2) para 30kV/cm.

Tabla V.3.2 Parámetros “a” (escala) y “b” (forma) del modelo de Weibull y valores de D del modelo de Bigelow obtenidos para los datos de inactivación de *E. sakazakii* en agua de peptona y fórmula infantil.

^a E	BPW		
	Weibull		Bigelow
	a (μs)	b	D (μs)
10	1845.32 ± (32.10)	0.73 ± (0.01)	4847.20 ± (49.72)
20	369.59 ± (17.10)	0.85 ± (0.04)	995.09 ± (24.08)
30	88.66 ± (8.18)	0.82 ± (0.05)	283.25 ± (7.00)
^a E	RPIFM		
	Weibull		Bigelow
	a (μs)	b	D (μs)
10	2372.75 ± (42.02)	0.81 ± (0.09)	5798.96 ± (41.31)
20	462.40 ± (25.09)	0.93 ± (0.03)	1153.79 ± (32.93)
30	220.62 ± (4.07)	0.94 ± (0.07)	532.73 ± (18.20)
40	144.99 ± (5.97)	1.09 ± (0.2)	318.72 ± (9.01)

^aE: Intensidad de campo eléctrico (kV/cm)

La capacidad predictiva de ambos modelos se probó utilizando los siguientes coeficientes: coeficiente R², RMSE, y factor de precisión (*Af*), mediante un conjunto de datos experimentales independientes (Tabla V.2.3).

Tabla V.3.3 Valores de los coeficientes R², Root Mean Square Error (RMSE) y factor de precisión (*Af*) para los modelos de Bigelow y Weibull en la inactivación de *E. sakazakii* en ambos sustratos.

^a E	BPW					
	R ²		RMSE		<i>Af</i>	
	Bigelow	Weibull	Bigelow	Weibull	Bigelow	Weibull
10	0.92	0.93	0.04	0.02	1.14	1.09
20	0.94	0.95	0.12	0.06	1.19	1.12
30	0.88	0.92	0.05	0.02	1.43	1.19
40	0.89	0.91	0.05	0.03	1.47	1.20
^a E	RPIFM					
	R ²		RMSE		<i>Af</i>	
	Bigelow	Weibull	Bigelow	Weibull	Bigelow	Weibull
10	0.84	0.97	0.005	0.006	1.15	1.14
20	0.88	0.88	0.024	0.02	1.18	1.13
30	0.93	0.94	0.010	0.01	1.28	1.23
40	0.86	0.86	0.017	0.02	1.23	1.16

^aE: intensidad de campo eléctrico (kV/cm)

Como puede observarse, en todo caso el modelo de Weibull presentó mejores valores de A_f que el modelo de Bigelow (próximos a 1). Esto es debido a que las curvas de supervivencia muestran una ligera cola (con valores de b de Weibull ≤ 1). Este hecho ha sido observado también por otros autores usando diferentes tecnologías de inactivación (Peleg, 1995) proporcionando el modelo de Weibull un mejor ajuste de los datos que el modelo tradicional de Bigelow.

Sin embargo, para juzgar la aplicabilidad del modelo de Weibull se utilizó el llamado gráfico de riesgo (Nelson, 1972; Hutchinson, 2000). Si el modelo de Weibull resulta adecuado, el gráfico de riesgo nos proporciona una línea recta cuando $\text{Log}(-\text{Log}(S))$ se representa frente a $\text{Log}(t)$. La figura V.3.5 muestra el gráfico de riesgo para la intensidad de campo de 40 kV/cm. Como puede verse, se obtuvieron 2 líneas rectas para ambos sustratos. De acuerdo a valores de R^2 , existe un nivel de significancia del 99%.

La figura V.3.6 muestra distribución aleatoria de los residuos, indicando el buen ajuste del modelo de Weibull a los datos experimentales.

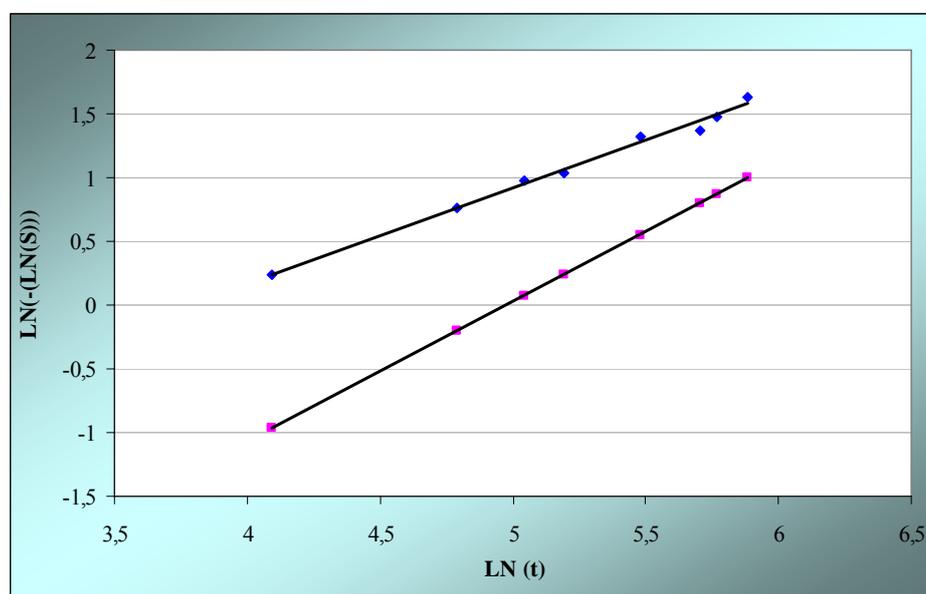


Figura V.3.5. Gráfico de riesgo para la aplicabilidad del modelo a 40 kV/cm en: ■ BPW ($R^2 = 0.983$) y ◆ RPIFM ($R^2 = 0.9907$)

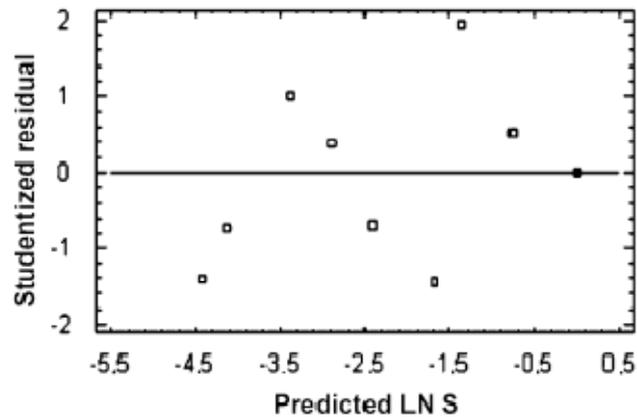


Figura V.3.6. Gráfico de residuos para el LN(S) a 30kV/cm en BPW.

Contrariamente a los resultados obtenidos en BPW, un análisis de ANOVA confirmó que no existen diferencias significativas entre los valores de b obtenidos a diferentes intensidades de campo eléctrico en RPIFM. Las curvas de supervivencia fueron re-ajustadas utilizando para ello un valor medio para el parámetro b en RPIFM, $b = 0.943$. Sin embargo, los valores del parámetro “ a ” de Weibull decrecen al aumentar la intensidad de campo eléctrico aplicado entre 10 y 40 kV/cm en RPIFM. Para el parámetro “ a ” de Weibull, en el rango de intensidades de campo estudiadas, se observó una relación de dependencia lineal entre a y E . (ecuación V.2.5), relación que se expone a continuación:

$$\text{Log}(a) = 8.359 - 0.091E \quad (R^2 = 0.978) \quad \text{Ecuación V.3.5}$$

donde E (kV/cm) es la intensidad de campo eléctrico

Para RPIFM, el modelo de Weibull puede ser redefinido y simplificado sustituyendo el valor de “ a ” por la ecuación previamente deducida (ec. V.3.5), y sustituyendo b por su valor medio (0.943) (ecuación V.3.6):

$$\text{Log} S(t) = - \left(\frac{t}{e^{(8.359 - 0.091E)}} \right)^{0.943} \quad \text{Ecuación V.3.6}$$

Con el objetivo de determinar la precisión del modelo experimental, un set adicional de datos experimentales se comparó con los resultados estimados por el mismo. El coeficiente de correlación entre los valores medidos y los estimados fue de 0.98 (\pm 0.01) para RPIFM.

La ecuación V.3.6 se utilizó para generar un gráfico tridimensional de relación entre el $\text{Log}(S)$; los valores de "a" y tiempos de tratamiento coincidentes. Esta relación viene dada en la figura V.3.7. La figura muestra que el tiempo de tratamiento necesario para obtener un nivel de inactivación determinado decrece al aumentar la intensidad de campo eléctrico. Por ejemplo, para obtener 0.2 ciclos \log_{10} , el tiempo de tratamiento necesario decrece desde 360 a 60 μs cuando la intensidad de campo eléctrico aumenta desde 10 a 40 kV/cm.

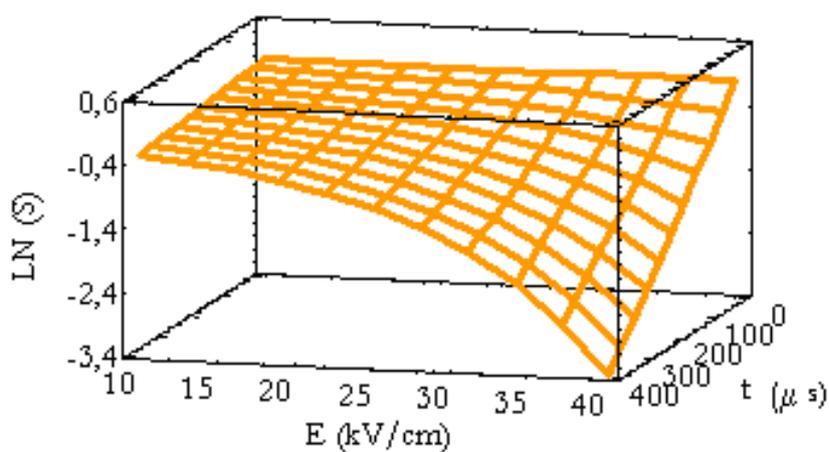


Figura V.3.7. Superficie de respuesta para la relación entre $\text{Log}(S)$, parámetro a de Weibull y tiempo de tratamiento, en la inactivación de *E. sakazakii* en RPIFM.

V.3.6 Discusión

Los procesos de tratamiento térmico, de pasteurización o ultra-high-temperature (UHT), son ampliamente utilizados en la industria láctea, tanto para inactivar enzimas como microorganismos patógenos, haciendo seguros para el consumidor, todos estos productos. Sin embargo, el tratamiento térmico puede modificar de forma irreversible, algunos de los constituyentes de la leche, causando, por ejemplo, una reducción del calcio, desnaturalización de proteínas del suero, y degradación de vitaminas. Además, el calor rompe el equilibrio fisicoquímico existente en el sistema lácteo (Eckner y Zottola 1991; Simon y Hansen 2001).

En el presente estudio por PEAI, la temperatura máxima alcanzada, para todas las condiciones de tratamiento, resultó siempre inferior a 40°C. Incrementos en la temperatura durante el tratamiento podrían tener un efecto relevante incrementando los niveles de inactivación conseguidos. De acuerdo a los estudios de Breeuwer y col. (2003), el valor del tiempo de reducción decimal $D_{58^{\circ}\text{C}}$ para *E. sakazakii* oscila entre 0.39 y 0.60 min.

E. sakazakii es considerado como el aislado clínico más termorresistente perteneciente a las Enterobacterias. Diversos estudios demuestran que es necesaria la aplicación de una temperatura mínima de 60°C para alcanzar 1.3 ciclos \log_{10} (Nazarowec-White y Farber 1997). Todos estos datos corroboran que la inactivación alcanzada para las células de *E. sakazakii* en el presente estudio se deben exclusivamente al tratamiento por PEAI aplicado en cada caso.

Las características fisicoquímicas del producto, constituyen uno de los principales factores que pueden influir la efectividad del tratamiento por PEAI, siendo en el caso de los tampones, los valores de conductividad y pH las características más importantes a considerar por su influencia en la transmisión física de la energía a través de la estructura celular. Reduciendo la conductividad de un producto, aumenta el gradiente de conductividad entre el microorganismo y el sustrato. Este hecho constituye un factor adicional de presión, de naturaleza osmótica, sobre la membrana del

microorganismo, haciéndolo más sensible al tratamiento por PEAI (Jayaram y col., 1992). En el presente estudio, los valores de conductividad medidos en ambos sustratos fueron similares, sin embargo, este factor tuvo mayor influencia en la inactivación conseguida en BPW. El efecto de los PEAI en tampones ha sido ampliamente estudiado (Castro y col., 1993; Martín-Belloso y col., 1994; Hülsheger y col., 1983; Zhang y col., 1994).

A diferencia de los medios de referencia o tampones, la influencia que la composición de alimentos o sustratos reales tiene en los niveles de inactivación, permanecen todavía escasamente explicados. Algunos investigadores han publicado el efecto protector que ciertos componentes ejercen frente al tratamiento, como por ejemplo la goma xantana (Ho y col., 1995), proteínas (Martín-Belloso y col., 1997) o grasas (Grahl y Märkl, 1996). A pesar de ello., otros autores no han observado diferencias entre los niveles de inactivación alcanzados en medios de referencia y alimentos complejos como la leche (Reina y col., 1998; Dutreux y col., 2000). El equipo de investigación de Breeuwer y col. (2003) utilizaron en sus estudios dos sustratos: tampón fosfato deshidrogenado con valor de pH neutro y tampón fosfato hidrogenado, observando diferencias en los valores de D debidos a la diferente composición del sustrato. Diferencias en la composición de la formula infantil influyen significativamente en los niveles de inactivación conseguidos para *E. sakazakii* por irradiación y por tratamiento térmico (Kindle et al., 1996). En formulas en polvo, los constituyentes fundamentales, como caseína, proteínas del suero (β -lactoglobulinas, α -lactoalbuminas, inmunoglobulinas), pueden afectar los niveles de inactivación por tratamiento térmico. En el presente estudio, el contenido en grasa (3.5%, w/v) y la presencia de proteínas del suero lácteo en el sustrato RPIFM pueden ejercer un efecto protector frente a la inactivación de *E. sakazakii* por PEIA. Cuanto mayor sea la cantidad de grasa, proteínas y carbohidratos presentes en la formula, el efecto protector frente a la inactivación térmica de *E. sakazakii* será mayor, con valores de D crecientes.

El tratamiento de *E. sakazakii* por PEAI en medio de referencia o productos lácteos no ha sido estudiado previamente, por lo que no se pueden establecer comparaciones de nuestro estudio con publicaciones previas. Sin embargo, algunos estudios hacen referencia a los efectos que esta tecnología produce en diversas *Enterobacterias*. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* es un microorganismo también relevante en fórmulas infantiles en polvo, debido a la generación de la enterotoxina estafilocócica. Con tratamientos por PEAI para condiciones de 450 μ s y 35 kV/cm se consigue reducir de forma significativa la población de células en leche desnatada (7 ciclos \log_{10}) (Evrendilek y col., 2004)

El presente estudio indica que es posible obtener niveles considerables de inactivación para *E. sakazakii* en ambos sustratos estudiados aplicando diferentes condiciones de tratamiento por PEAI, especialmente para intensidades de campo eléctrico elevadas. Por ello, existen unas buenas perspectivas en cuanto a la utilización de esta tecnología en el procesado de RPIFM en hospitales, por ejemplo, o en la industria, en cuanto a la obtención de un producto pasteurizado. La tecnología de PEAI proporciona una alternativa muy atractiva frente al tratamiento térmico ya que evita la destrucción de caracteres tan apreciados como el sabor y conservación de nutrientes, considerando que las *Enterobacterias* se encuentran en estos productos en bajos niveles, desde 0-1 cfu/g hasta 100 cfu/g.

En la industria de formulas infantiles, existe una gran variedad de productos especialmente preparados listos para este subgrupo de población, disponibles en botes, latas, breaks, tarros, etc. Sin embargo, siempre que sea posible, y en especial en el caso de bebés con especial riesgo (bajo peso, prematuros, inmunocomprometidos), es recomendable utilizar fórmulas líquidas estériles. Si esto no fuera posible, la reconstitución del polvo debe realizarse con agua estéril a temperatura entre 50 y 70°C, o calentar el biberón tras la reconstitución, algo que entra en conflicto con el respeto a la calidad nutricional u organoléptica del producto. Por este motivo, la aplicabilidad de los PEAI como alternativa al tratamiento térmico, tras la reconstitución de la PIFM, en hospitales, por ejemplo, debe ser considerada y

estudiada. Sería posible desarrollar un equipo de PEAI especialmente diseñado para hospitales por su facilidad de uso, capacidad de procesado, y efectividad en la inactivación de *E. sakazakii*. Este podría ser una gran avance que permitiría conseguir que un producto no estéril como la RPIFM fuese seguro, evitando la proliferación de *E. sakazakii* durante el almacenamiento del producto reconstituido (Gutler et al., 2005).

V.3.7 Conclusión

La formula infantil en polvo (PIFM) no es producto estéril. Por ello, y de acuerdo a los resultados del presente estudio, se plantea un posible futuro uso de los PEAI tras la reconstitución de la PIFM especialmente indicado para hospitales, como paso previo al almacenamiento refrigerado de los biberones, con el objetivo de evitar la multiplicación de *E. sakazakii* cuando las temperaturas de almacenamiento superan los 4 °C. Este estudio, puede contribuir al diseño, evaluación y optimización de procesos que, junto con estudios en profundidad sobre el crecimiento y la inactivación de *E. sakazakii*, contribuyan a reducir el riesgo y la incidencia asociadas a infecciones causadas por *E. sakazakii* en bebés alimentados con RPIFM

V.3.8 Referencias

Ananta, E., Heinz, V., Schlüter, O., Knorr, D. (2001). Kinetics studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2: 261-272.

Codex (2003) Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme. Committee on Food Hygiene. Thirty-fifth Session. Risk Profile of *Enterobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula. Orlando, Florida, United States of America, 27 January – 1 February 2003.

Bigelow, W. D. 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* 29:528–536.

Breuer, P., Lardeau, A., Peterz, M., Joosten, H.M. (2003). Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 967-973.

Castro, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1993). Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation* 17, 47-73.

De Paoli, P. (2005). Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 897-910.

Dutreux, N., Notermans, S., Witjzes, T., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (2000). Pulsed electric fields inactivation of attached and free living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *International Journal of Food Microbiology* 54, 91-98.

Eckner, K., Zottola, E. (1991). Potential for the low temperature pasteurization of dairy fluids using membrane processing. *Journal of Food Protection* 54(10), 793-797.

Evrendilek, G.A., Zhang, Q.H., Richter, E.R. (2004). Application of Pulsed Electric Fields to Skim Milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosystems Engineering* 87(2), 137-144.

Grahl, M., Märkl, H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Technology* 45, 148-157.

Gutler, J.B., Kornacki, J.L., Beuchat, L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology* 104, 1-34.

Ho, S.Y., Mittal, G.S., Cross, J.D., Griffith, M.W. (1995). Inactivation of *P. fluorescens* by high voltage electric pulses. *Journal of Food Science* 60(6), 1337-1340.

Hülshager, H., Potel, J., Niemann, E.G. (1983). Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics* 22, 149-162.

Hutchinson, T.P. (2000). Graphing the death of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 62, 77-81.

ICMSF (2002). *Microorganisms in Foods 2: Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2nd ed. University of Toronto Press. Toronto, Canada.

Iversen, C., Forsythe, S. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology* 14, 443-454.

Jayaram, S., Castle, G.S.P., Maragaritis, A. (1992). Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* by the application of high voltage pulses. *Biotechnology and Bioengineering* 40(11), 1412-1420.

Kindle, G., Busse, A., Kampa, D., Meyer-Koenig, U., Daschner, F.D. (1996). Killing activity of microwaves in milk. *Journal of Hospital Infections* 33, 273-278.

Lai, K.K. (2001). *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Medicine Baltimore* 80, 113-122.

Martín-Belloso, O., Zhang, Q., Castro, A.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1994). Pulsed electric fields of high voltage to preserve foods. *Microbiological and engineering aspects of the process*. *Spanish Journal of Food Science and Technology* 34, 1-34.

Martín-Belloso, O., Vega-Mercado, H., Qin, B.L., Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* suspended in liquid egg using pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation* 21, 193-208.

Muytjens, H.L., Kollee, L.A. (1990). *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? *Pediatric Infectious Disease Journal* 9, 372-373.

Nazarowec-White, M., Farber, J.M. (1997). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in a reconstituted dried-infant formula. *Letters in Applied Microbiology* 24, 9-13.

Nelson, W. (1972). Theory and application of hazard plotting for censored failure data. *Technometrics* 14, 945-966.

Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J., Wasserman, W. (1996). *Applied Linear Regression Models*. McGraw-Hill, Chicago.

Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. Microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. Question N° EFSA-Q-2003-111. Adopted on 9th September 2004. *The EFSA Journal* (2004) 113, 1-35

Peleg, M. (1995). A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67(1), 93-99.

- Pothakamury U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. 1995. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Research International* 28 (2) 167-171
- Reina, L.D., Jin, Z.T., Zhang, Q.H., Youself, A.E. (1998). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 61(9), 1203-1206.
- Rivas, A., Sanpedro, F., Rodrigo, D., Martínez, A., and Rodrigo, M. (2006). Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *European Food Research and Technology* 223 (4), 541-545.
- Rodrigo, D., Ruiz, P., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., Rodrigo, M. (2003). Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 81, 223-229
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.
- Simon, M., and A. P. Hansen. 2001. Effect of various dairy packaging materials on the shelf life and flavour of ultrapasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 84:784–791.
- Skaladal, P., Mascini, M., Salvadori, C., Zannoni, G. (1993). Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. *Enzyme Microbiology and Technology* 15, 508-512.
- Weibull, W., 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics* 51, 293–297.



*Capítulo V.4. ESTUDIO DEL DAÑO SUBLETAL
CAUSADO EN CÉLULAS DE Cronobacter sakazakii
TRATADAS POR PEAI EN FÓRMULA INFANTIL EN
POLVO RECONSTITUIDA (RIFM) Y MEDIO DE
REFERENCIA (BUFFERED PEPTONE WATER)*

Publicaciones

Food Control 20 (2009) 1145–1150



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Sub-lethal damage in *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii* cells after different pulsed electric field treatments in infant formula milk

M.C. Pina-Pérez, D. Rodrigo, A. Martínez López*

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Apdo correos 73, P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2008

Received in revised form 25 February 2009

Accepted 15 March 2009

Keywords:

Cronobacter sakazakii

Infant formula milk

PEF

Sub-lethal damage

ABSTRACT

A study was carried out to study the possible cell damage caused by Pulsed Electric Field (PEF) to *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii* suspended in different commercial Infant Formula Milk (IFM) after different treatment conditions (15 and 35 kV/cm) associated with a minimum, medium and maximum energy input values. Post-treatment, the growth of survivors and the possible presence, recovery or death of sub-lethally damaged cells was studied under refrigerated storage (8 °C) period of 24 h. A higher proportion of damaged cells were found at treatment conditions at which *C. sakazakii* shows higher resistance. PEF damaged a large proportion (80–90%) of *C. sakazakii* cells which then became sensitive to subsequent refrigerated storage in IFM.

The greatest *C. sakazakii* reduction of 2.30 log cycles was achieved after 15 kV/cm–3000 μ s PEF treatment followed by 24 h refrigerated storage (8 °C), primarily due to PEF but also the formation and subsequent death of damaged cells followed by 24 h refrigerated storage (8 °C) period, with consequent IFM safety applicability.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Congresos

Evaluation of *Cronobacter sakazakii* sub-lethal damage after Pulsed Electric Field applied in Infant Formula Milk

M.C. Pina-Pérez, F. Sampedro Parra, Dolores Rodrigo and A. Martínez López

¹Department of Preservation and Food Quality, Institute of Agrochemistry and Food Technology-CSIC, Campus de la Coma, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

CONGRESO: IFT 2009

V.4.1 Abstract

En el presente capítulo se llevó a cabo un estudio sobre el posible daño subletal causado por la tecnología de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) en células de *C. sakazakii* suspendidas en diversas fórmulas infantiles comerciales en polvo reconstituidas (RPIFM) para diferentes condiciones de tratamiento (15 y 35 kV/cm) asociadas con valores energéticos máximo, medio y mínimo. Tras el tratamiento, las células se almacenaron a 8°C, durante 24h y se estudió la presencia, recuperación y/o muerte de células subletalmente dañadas. Se detectó una elevada proporción de células subletalmente dañadas para las condiciones de tratamiento para las que *C. sakazakii* mostró una mayor resistencia. La tecnología de PEAJ produjo daño en un elevado porcentaje de células tratadas (70-92%), células que tras el tratamiento mostraron sensibilidad frente al posterior almacenamiento refrigerado.

El nivel más alto de inactivación para *C. sakazakii*, 2.30 log ciclos, se consiguió tras un tratamiento de 15kV/cm - 3000µs seguido de almacenamiento 24h-8°C; atribuido en primer lugar al tratamiento por PEAJ y a la posterior muerte de células subletalmente dañadas tras las 24h a 8°C.

Palabras clave: *C. sakazakii*, Reconstituted powdered Infant Formula Milk (RPIFM), PEAJ, daño subletal.

V.4.2 Introducción

Enterobacter sakazakii es un patógeno oportunista causante de meningitis y enteritis, principalmente en bebés y niños de corta edad (Farmer, Asbury, Hickman, y Brenner, 1980; Lai, 2000; Weaver y Chizmadzhev, 1996). Muchos son los casos publicados relativos a este microorganismo, siendo motivo de preocupación la elevada tasa de mortalidad que se le atribuye (40-80%) (Willis & Robinson, 1988). *E. sakazakii* se encuentra comúnmente en ambientes hospitalarios; por ejemplo, *E. sakazakii* se ha encontrado en utensilios de preparación en el área de biberonería, como cucharillas, licuadoras, y biberones (Bar-Oz, Preminger, Peleg, Block, y Arad., 2001). Recientemente, los aislados asociados con la meningitis neonatal han sido identificados como pertenecientes a la cepa *Cronobacter sakazakii* (ATCC 29544) (Iversen, y col, 2007).

Autoridades de salud pública e investigadores de todo el mundo están explorando formas de eliminar o controlar el crecimiento de esta bacteria tanto en ambientes de procesado de PIFM como en áreas de preparación de RPIFM en hospitales (FAO/OMS, 2004).

El uso de los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) en alimentos está siendo investigado como tecnología para garantizar la seguridad microbiológica de productos líquidos, prolongando la vida útil y evitando los efectos adversos que puede provocar el tratamiento térmico sobre el producto (Barbosa-Cánovas, Gongora-Nieto, Pothakamury, y Swanson, 1999).

Estudios realizados por Pina et al. (2007) analizan los efectos de la tecnología de PEAJ en células de *E. sakazakii* suspendidas en RPIFM consiguiendo niveles de inactivación en torno a $1.220 \log_{10}$ ciclos (40kV/cm, 360 μ s). Los tratamientos por PEAJ se aplican homogéneamente sobre el producto, y por tanto cada célula está sujeta al mismo nivel de estrés (Barbosa-Cánovas, Pothakamury, Palou, & Swanson, 1998). Para explotar completamente el potencial de esta tecnología, son necesarios muchos más esfuerzos en investigación que permitan clarificar los mecanismos de inactivación; la influencia de factores ambientales, así como la adaptación o aparición de daño subletal, aspectos de gran relevancia relacionados con la seguridad alimentaria (Knorr y col, 2001; Wouters y Smelt, 1997). Esta información es necesaria para

evaluar el riesgo de crecimiento de *C. sakazakii* en hospitales asociado a la fórmula reconstituida RPIFM durante el almacenamiento tras el tratamiento por PEAI, teniendo en cuenta la posible futura aplicación de esta tecnología para conseguir RPIFM semejante al producto natural destinado a la alimentación de recién nacidos por vía oral o nasogástrica.

Un mejor entendimiento de los mecanismos de inactivación microbiana por PEAI podrían ayudar a definir tratamientos que, solos o combinados con otros agentes de control puedan garantizar la seguridad y estabilidad de ciertos productos.

La inactivación microbiana por PEAI ha sido atribuida a los efectos que los PEAI producen en las membranas celulares. Esta tecnología puede causar la formación de poros, afectando la integridad y funcionalidad de la membrana (Hamilton y Sale, 1967). Estos poros pueden ser reversibles o irreversibles (implicando la muerte celular), dependiendo del grado de daño en la membrana (Weaver y col., 1996). La aparición de poros irreversibles progresará con la muerte de un mayor o menor porcentaje de células tras el tratamiento. Por otro lado, los microorganismos que sobreviven a los tratamientos pero quedan subletalmente dañados, podrían ser susceptibles a tratamientos combinados consiguiendo resultados sinérgicos. Como consecuencia a todo lo comentado, una población bacteriana sometida a tratamientos físicos de conservación, puede contener tras el tratamiento, células en 3 estados fisiológicos: células no dañadas que son capaces de crecer y multiplicarse tanto en medio selectivos como generales; células dañadas por el tratamiento capaces de multiplicarse en medio general pero no en selectivo; y células muertas que no son capaces de recuperarse en ningún medio o condición.

La generación de daño subletal en una población microbiana tratada está relacionada directamente con una mayor sensibilidad de estas células a condiciones estresantes tras el tratamiento, por lo que el éxito en la aplicación de “barreras” está correlacionado con el grado de daño subletal generado en las células tras el tratamiento por PEAI (Wuytack y col, 2003). Sin embargo, para condiciones adecuadas, las células débilmente dañadas podrían reparar el daño y recuperarse. Esta recuperación en ausencia de agentes antagonistas o en presencia de sustratos adecuados dará como resultado células con capacidad, resistencia y virulencia

coincidentes con las originales. Este aspecto resulta crucial para garantizar la seguridad de los productos tratados

Las condiciones de tratamiento por PEAI juegan un importante papel en la posible aparición de células subletalmente dañadas. Algunos autores sugieren la necesidad de estudios más profundos en este sentido (Knorr y col., 2001; Wouters y Smelt, 1997).

V.4.3 Objetivos

El objetivo de este trabajo es investigar la posible generación de daño subletal por PEAI en células de *C. sakazakii* suspendidas en RPIFM con el objetivo de optimizar la posible aplicación de esta tecnología a la RPIFM en hospitales previo al almacenamiento refrigerado considerando tanto la seguridad microbiológica del producto como el consumo. Para ello se utilizaron varias condiciones de tratamiento y niveles energéticos, procediendo al análisis de resultados tras el tratamiento y durante un periodo de almacenamiento refrigerado a 8°C, 24h.

V.4.4 Material y Métodos

V.4.4.1 Cepa. El cultivo puro del microorganismo *Cronobacter sakazakii* (29544 ATCC) fue proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 858)

El cultivo liofilizado fue rehidratado en 10 mL de Tryptic Soy Broth (TSB) (Scharlab Chemie, Barcelona, Spain) durante 20 min. La suspensión de células fue luego inoculada en 500 mL de TSB e incubada a 37 °C en agitación continuada a 200 rpm durante 24h para obtener células en fase estacionaria de crecimiento.

Las células en fase estacionaria se recogieron por centrifugación a 5000×g, 5°C, durante 15 min; posteriormente se resuspendieron en TSB y se procedió a una segunda centrifugación. El pellet obtenido de la segunda centrifugación se resuspendió en 15 mL de TSB, y fue dispensado en viales de 2mL incluyendo en cada vial, 1mL de suspensión celular + 1 mL de solución mezcla de glicerol (20%) y TSB (80%). Los viales así obtenidos se almacenaron a -80°C (Ananta, Heinz, Schlüter, y Knorr 2001; De Paoli, 2005; Pothakamury y col, 1995). Estos cultivos iniciales denominados viales

madre se almacenaron con concentración de 10^9 cfu/mL. A partir de estos cultivos se obtuvieron viales derivados que se utilizaron en las experiencias de PEAI y APH

V.4.4.2 Tratamiento por PEAI y detección de daño subletal

V.4.4.2.1 Preparación de suspensiones celulares para el tratamiento por PEAI.

Como sustratos se utilizaron 3 fórmulas infantiles comerciales para el estudio de células tratadas por PEAI. Estos productos se formulan para reproducir fielmente el perfil nutricional de la leche materna (Breeuwer, Lardeu, Peterz & Joosten, 2003) y son ricos en vitaminas y minerales (Mg, Ca, Fe, Zn, Na, K, Mn). Los valores de conductividad eléctrica y pH de los distintos sustratos fueron medidos a 25°C utilizando un conductímetro Crison 525 conductimeter (Crison instruments,S.A., Alella, Barcelona, Spain) y pH-metro Crison 2001 pH-meter (Crison instruments). Los valores de conductividad para las RPIFMs fueron de 0.258, 0.262 y 0.278 S/m; y los valores de pH fueron 6.4, 6.8 y 6.6.

Las PIFM fueron rehidratadas de acuerdo a las especificaciones del productor y agitadas a 1000 rpm en condiciones estériles. El sustrato se inoculó con 1 vial de 2 mL hasta concentración final de $1-3 \times 10^7$ cfu/mL.

V.4.4.2.2 Sistema de tratamiento por PEAI. Un sistema de tratamiento en continuo OSU-4D a escala de laboratorio, diseñado por la Universidad de Ohio (Columbus, OH 43210-1007, USA), se utilizó en el presente estudio para tratar las muestras. Se conectaron 8 cámaras de tratamiento en serie con un diámetro de 0.230 cm y distanciadas 0.293 cm. Las temperaturas de entrada en el primer par de cámaras, y salida, del último par, fueron medidas con termopares tipo K y registradas. La amplitud de pulso fue de 2.5 μ s. La forma de la onda pulsante, el voltaje y la intensidad de tratamiento se monitorizaron mediante un osciloscopio digital (Tektronic TDS 210, Tektronic Ins., OR).

Al comienzo de cada experiencia, el sustrato se hace pasar por el equipo con el objetivo de desalojar posibles burbujas. Cuando el sustrato se encuentra circulando por todo el sistema, se ajusta el flujo a la velocidad de 30 mL/min. El sustrato ya inoculado se bombea por el sistema durante 2 minutos para desplazar el medio no-

inoculado. La temperatura del sustrato a la entrada es de 5 °C. La intensidad de voltaje de los pulsos eléctricos se fija al igual que la frecuencia y la anchura de pulso a la que queremos trabajar

Antes y después del tratamiento por PEAI, se recogen 5mL de muestra inoculada en tubos graduados para posteriormente proceder al recuento de células viables. Estas muestras fueron diluidas seriadamente en agua de peptona estéril al 0.1%, y sembradas en placas petri de TSA e incubadas a 37 °C – 24h.

El consumo energético asociado a los tratamientos por PEAI, se utilizó como criterio de selección de las condiciones de tratamiento. En este sentido, se seleccionaron condiciones de tratamiento correspondientes a niveles de consumo energético mínimo (200kJ/mL), y máximos (1700kJ/mL), así como otros tratamientos con niveles de consumo energético equivalentes entre sí (tabla V.3.1).

Tabla V.4.1. Condiciones de tratamiento por PEAI (Intensidad de campo eléctrico (E, kV/cm) y tiempo de tratamiento (t, μ s) aplicados a la inactivación de células de *C. sakazakii*; y consumo energético correspondiente (kJ/mL) para cada combinación E-t.

E (kV/cm)	t (μ s)	Energía (kJ/mL)
15	60	40
	150	90
	240	150
	360	200
	860	500
	1660	1000
	3000	1700
35	60	200
	120	400
	180	550
	240	800
	320	1000
	460	1450
	500	1700

Los tratamientos equivalentes en cuanto a consumo energético son los siguientes: 35 kV/cm -500 μ s y 15 kV/cm – 3000 μ s, correspondientes al máximo consumo energético (1700kJ/mL); 35 kV/cm – 320 μ s y 15kV/cm – 1660 μ s (1000 kJ/mL); y tratamientos equivalentes con consumo energético mínimo son 35 kV/cm – 60 μ s y 15 kV/cm – 360 (200kJ/mL).

Todas las células tratadas se almacenaron a 8°C, 24h. Los experimentos se llevaron a cabo por quintuplicado.

V.4.4.2.3 Recuento de células viables y dañadas por PEAI.

En el presente estudio se utilizaron como medios selectivo y no selectivo los siguientes: Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) y Tryptic Soy Agar (TSA), coincidiendo con otros muchos autores que reconocen estos sustratos como medios selectivo/no-selectivo idóneos para el recuento de *Enterobacteriaceae* (Ray y Speck, 1978; Kilimann y col., 2005)

Tras los tratamientos por PEAI, las muestras se diluyeron seriadamente (agua de peptona tamponada BPW, 0.1%) y 0.1 mL de cada dilución se sembraron por duplicado en placas de TSA, para cada condición de tratamiento. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24h. El número de colonias identificadas (colony forming units, cfu) hace referencia a la población total superviviente tras el tratamiento, incluyendo células viables y posibles dañadas subletalmente. El medio de cultivo que se utilizó como selectivo (VRBGA) (Scharlab Chemie, Barcelona, Spain), es un sustrato en el que únicamente las células no dañadas subletalmente pueden crecer. Diluciones seriadas de las diferentes muestras tratadas por PEAI fueron sembradas en placas petri de VRBGA e incubadas 24 h a 37 °C. Estudios previos demostraron que periodos más prolongados de incubación no modifican los resultados de forma significativa (García y col., 2005).

Una muestra no tratada por PEAI se sembró en ambos sustratos y se utilizó como control con concentraciones iniciales de inóculo *C. sakazakii* de 10^7 cfu/mL comprobando la evolución de la RPIFM a 8 °C.

V.4.4.2.4 Cálculos. El número de células subletalmente dañadas se estima como diferencia entre el número de cfu obtenido tras la siembra de muestras tratadas por PEAI en medio TSA y la misma siembra en VRBGA (García y col, 2005).

El porcentaje de células subletalmente dañadas se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Injured cells (\%)} = I = \left(1 - \frac{\text{cfu/ml}_{\text{selective}}}{\text{cfu/ml}_{\text{nonselective}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación V.4.1}$$

Donde I es el % de células dañadas subletalmente (% injured cells); cfu/mL_{selective} son los recuentos en el medio VRBGA; y cfu/mL_{nonselective} son los recuentos en medio no selectivo TSA.

V.4.5 Resultados y Discusión

V.4.5.1 Inactivación de células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI

Los niveles de inactivación obtenidos por PEAI en células de *C. sakazakii* se muestran en la figura V.4.1. En máximo nivel de inactivación se alcanzó para las condiciones de 35kV/cm- 500 μ s (1.175 ciclos log₁₀). Este nivel de inactivación es equivalente al conseguido por Pina y col. (2007) para *C. sakazakii* en RPIFM a 40 kV/cm-360 μ s (1.20 ciclos log₁₀).

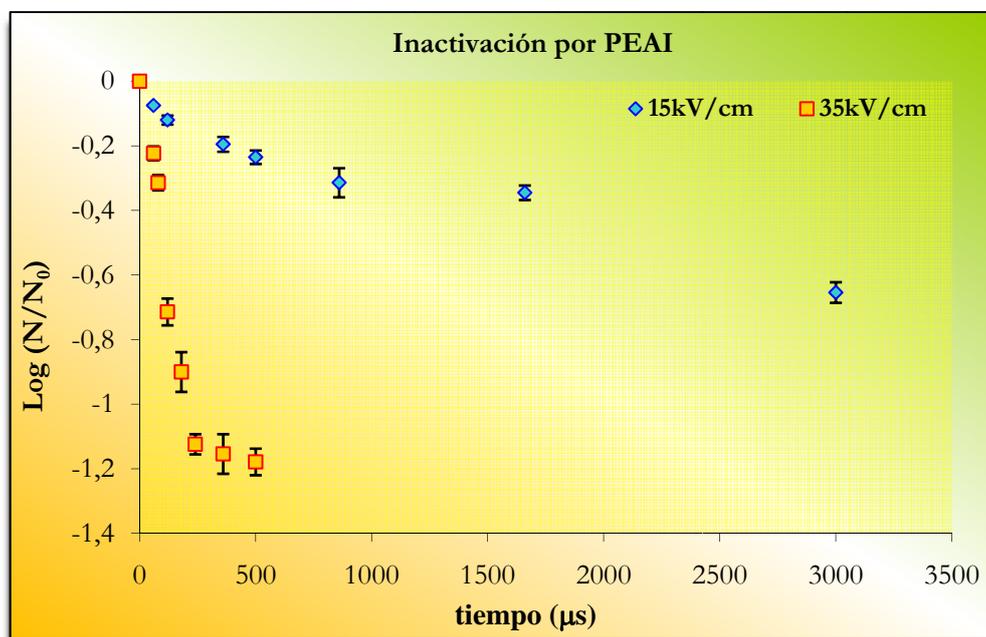


Figura V.4.1 Niveles de inactivación por PEAI para las condiciones de 15kV/cm y 35 kV/cm

Un análisis ANOVA se llevó a cabo con el objetivo de determinar la influencia que, los distintos factores de tratamiento por PEAI, ejercen sobre la inactivación de células de *C. sakazakii*. Del análisis se desprende que ambos parámetros, intensidad de campo eléctrico y tiempo de tratamiento, influyen significativamente en el nivel de inactivación ($P < 0.05$). Aumentando la intensidad de campo eléctrico ó el tiempo de tratamiento se producen niveles más elevados de inactivación.

V.4.5.2 Ocurrencia de daño sub-letal en células de *Cronobacter sakazakii* tras diferentes tratamientos por PEAI en RPIFM

En el supuesto de que los PEAI no produzcan daño subletal en las células sometidas a tratamiento, el número de células que pueden crecer en medio selectivo y no selectivo debería ser coincidente. Sin embargo, inmediatamente tras el tratamiento ($t = 0$), para una intensidad de campo eléctrico de 15 kV/cm y unos tiempos de tratamiento de 3000 y 60 μ s, entre un 85 y un 90% de células de *C. sakazakii* aparecieron como dañadas. A 35 kV/cm y tiempos de tratamiento de 500, 320 y 60 μ s, se obtuvieron porcentajes de daño del orden de 70, 75 y 87% respectivamente. Tanto la intensidad de campo eléctrico, como el tiempo de tratamiento, son factores que influyen significativamente en la generación de células dañadas ($P\text{-value} < 0.05$). Aumentos en el tiempo de tratamiento o intensidad de campo, se corresponden con porcentajes de células dañadas más bajos algo que puede ser explicado ya que intensidades mayores de tratamiento, darán como resultado niveles de inactivación también mayores. Este resultado coincide con estudios previos realizados por García y col. (2005) para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

No se han observado diferencias significativas entre las diferentes fórmulas comerciales estudiadas ($P > 0.05$) en lo que se refiere al porcentaje de células viables y dañadas por PEAI. Esto puede ser debido a las restrictivas normas que condicionan la formulación de la PIFM, de modo que no existen diferencias sustanciales en composición (vitaminas, grasas y sales minerales) y por tanto el posible efecto protector que ejercen los constituyentes de la PFIM (Dutreux, y col, 2000) frente a los PEAI, actúa por igual en los tres productos reconstituidos

La generación de células subletalmente dañadas por PEAI es una teoría que ha despertado gran controversia en la comunidad científica, mientras que ciertos autores asumen el mecanismo de inactivación como un “todo o nada”, otros muchos estudios revelan que la aparición o no de daño subletal depende del tipo de microorganismo (Gram positivo o Gram negativo) y del pH del medio, fundamentalmente. Para unas condiciones de pH en las que la bacteria puede mostrar su máxima resistencia, se observa una gran proporción de células dañadas. En el presente estudio, los valores de pH para todas las muestras son próximos al óptimo para *C. sakazakii* (aproximadamente pH 6.5), y por tanto las células exhibirán su máxima resistencia; además las diferencias entre los 3 RPIFMs comerciales no son significativas ($P > 0.05$). Por tanto, aunque el pH es un factor ambiental que puede influenciar la efectividad de los PEAI, en el presente estudio ejerció el mismo impacto para los 3 productos estudiados (RPIFMs comerciales).

V.4.5.3 Evaluación del daño subletal con el tiempo de almacenamiento.

Tras el tratamiento por PEAI, las muestras fueron almacenadas a 8 °C durante un periodo de 24 h, simulando en exceso el periodo durante el cual los biberones pueden permanecer almacenados en las salas de refrigeración-biberonería en hospitales, previo a la alimentación de los bebés (0-24h) (FAO/OMS, 2006).

Las células no-tratadas (blanco) no mostraron pérdida de viabilidad en RPIFM tras 24h almacenadas a 8°C. El tiempo de latencia y el ratio específico de crecimiento a esta temperatura se estimó mediante el modelo de Gompertz con valores de 139.610 ± 3.502 h $0.020 \pm 0.008 \log_{10}$ cfu/h, respectivamente.

La proporción de células dañadas de *C. sakazakii*, inmediatamente tras el tratamiento por PEAI, a las diferentes condiciones, y durante el almacenamiento refrigerado a 0, 4, 8, 12 y 24h, se muestra gráficamente en la figura V.4.2.

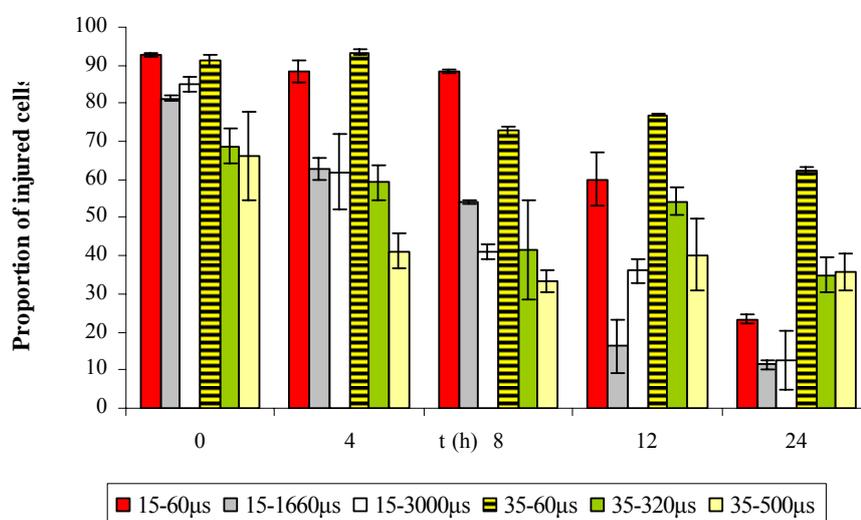


Figura V.4.2 Evolución de células tratadas por PEAI, a diferentes condiciones, durante el almacenamiento refrigerado para el periodo de 8°C-24h.

En función del tiempo de almacenamiento a 8°C, se vió afectada la evolución de las células dañadas (recuperación o muerte). Esta conclusión se observa a partir de diferencias significativas en los recuentos de células dañadas ($P\text{-value} < 0.05$) justo tras el tratamiento por PEAI ($t = 0$) y los recuentos obtenidos tras 4, 8, 12 y 24 h de almacenamiento refrigerado. La fracción de células dañadas durante el almacenamiento decrece progresivamente para tiempos crecientes en condiciones de refrigeración, dependiendo también de las combinaciones intensidad de campo aplicada (E) y tiempo de tratamiento (t).

Las células expuestas a bajas intensidades de tratamiento por PEAI, sometidas a intensidades de campo eléctrico mínimas, y/o tiempos de tratamiento mínimos mostraron una mayor proporción de células dañadas subletalmente que murieron progresivamente durante el almacenamiento posiblemente debido a una pérdida de la capacidad de reparar el daño bajo condiciones estresantes, como las bajas temperaturas. La muerte progresiva en refrigeración de las células dañadas fue mayor para tratamientos de baja intensidad en comparación con la evolución que mostraron las células sometidas a tratamientos más intensos. Este hecho puede ser atribuido a los mayores ratios de inactivación por PEAI obtenidos tras la aplicación de tratamientos

intensos, y a la menor proporción de células dañadas que aparecen tras estos tratamientos (García y col. 2005).

La figura V.4.3 muestra el efecto del tiempo de almacenamiento (t , h) sobre la evolución de las células dañadas por PEAI. A 15 kV/cm y 60 μ s, se produce un incremento en el nivel de muerte de 0.086 ciclos \log_{10} a tiempo 0 h (debido al tratamiento por PEAI) hasta un máximo de 1.210 ciclos tras 24 h de almacenamiento a 8°C. Para un tiempo de tratamiento de 3000 μ s (15 kV/cm) se obtuvo un nivel de inactivación de 0.895 ciclos \log_{10} a tiempo 0 h (debido al tratamiento por PEAI), y tras 24h de almacenamiento refrigerado se alcanzó un nivel de reducción de 2.300 ciclos \log_{10} (debidos a la muerte de células subletalmente dañadas), el mayor nivel de inactivación por PEAI alcanzado para células de *C. sakazakii* en RPIFM. La muerte de células dañadas ha sido atribuido por diversos autores a la no-reparación del daño subletal en células sometidas a condiciones de estrés (bajas temperaturas, baja a_w , acidez, adición antimicrobianos, etc) tras el tratamiento (Dutreux y col., 2000; Evrendilek, Zhang y Richter, 2004).

Un comportamiento similar fue observado para células tratadas a 35 kV/cm. Sin embargo, estas células revelan un menor nivel de muerte durante el almacenamiento, a pesar de que los niveles de inactivación inicial ($t=0$ h) son mayores. Este hecho puede ser explicado teniendo en cuenta que a 35kV/cm la generación de células subletalmente dañadas es menor que a 15kV/cm.

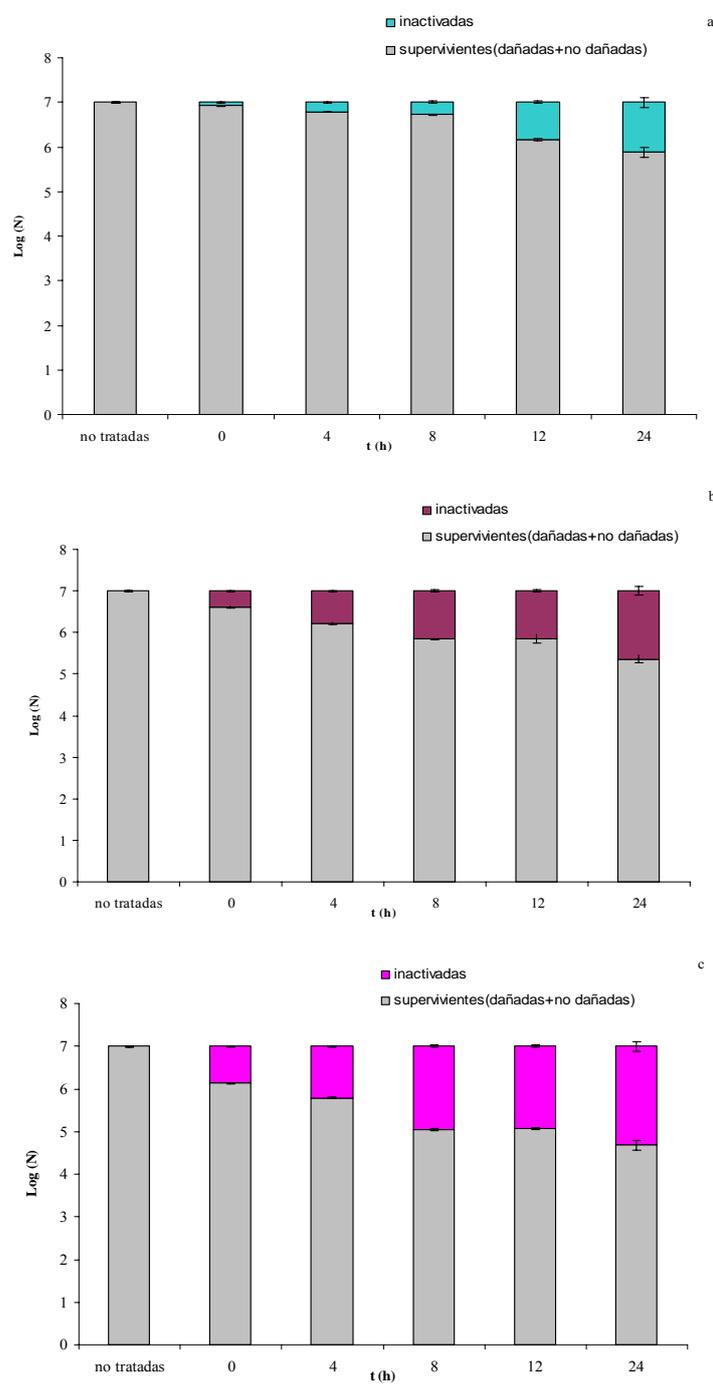


Figura V.4.3 Supervivencia e inactivación de células tratadas por PEAI a una intensidad de campo eléctrico de 15kV/cm tras diferentes tiempos de tratamiento: (a) 60 µs; (b) 1660 µs; (c) 3000µs; durante el almacenamiento refrigerado a 8°C – 24h.

V.4.5.4 Daño subletal en función del consumo energético del tratamiento

En el presente estudio se estableció una comparación de generación de células dañadas, y evolución en refrigeración de las mismas, para niveles energéticos equivalentes. La tabla V.3.1 muestra las condiciones de tratamiento que fueron aplicadas correspondientes a niveles energéticos máximos, mínimos y equivalentes.

El nivel energético máximo se corresponde con el máximo nivel de inactivación (1.175 ciclos \log_{10}) conseguido a tiempo $t = 0h$ de almacenamiento, para el tratamiento 35 kV/cm-500 μs ; y el mínimo nivel energético a 15 kV/cm-60 μs se corresponde con el mínimo nivel de inactivación a tiempo $t=0h$ de almacenamiento (0.084 ciclos \log_{10}).

Los mayores niveles de daño celular fueron observados inmediatamente tras el tratamiento por PEAI y se observaron para las condiciones de 15 kV/cm-60 (92% daño) μs y 35 kV cm-60 μs (87% daño) que corresponden con las menos intensas para cada campo eléctrico. Sin embargo, existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en la evolución de las células tratadas durante el almacenamiento refrigerado entre células sometidas a niveles energéticos equivalentes. Para el caso de 1700kJ/mL, en el tratamiento de 15 kV/cm-3000 μs las células dañadas subletalmente murieron de forma progresiva durante el almacenamiento, incrementando la efectividad del tratamiento por PEAI desde 0.895 a 2.30 ciclos, debido a una exposición prolongada a temperaturas bajas (8°C). Sin embargo, para las condiciones de 35 kV/cm y 500 μs (70% daño subletal), la inactivación conseguida a se vio incrementada en solamente 0.300 ciclos \log_{10} tras 24h de almacenamiento refrigerado. Por tanto, el mismo nivel energético (1700 kJ/mL) no mostró equivalencia en la proporción de células subletalmente dañadas inmediatamente tras el tratamiento ($t=0h$), ni en la evolución de las células dañadas durante el almacenamiento refrigerado (muerte o supervivencia).

Para niveles energéticos medios del orden de 1000 kJ/mL, que corresponden con condiciones de tratamiento de 35 KV/cm-320 μs y 15 kV/cm-1660 μs , se observaron niveles de células dañadas relativamente elevados inmediatamente tras el tratamiento, 75 % y 80%, respectivamente. A continuación se observa una caída en la proporción de células dañadas debida a una progresiva muerte durante el periodo de almacenamiento refrigerado, que fue mayor para el tratamiento a 15kV/cm. En el caso

del tratamiento a 15kV/cm-1660 μ s la inactivación alcanzada fue de 0.327 ciclos \log_{10} inmediatamente tras el tratamiento, incrementándose hasta 1.260 ciclos \log_{10} tras las 24h a 8°C; mientras que en el caso del tratamiento a 35 kV/cm-320 μ s la inactivación se vió incrementada de 1.10 ciclos \log_{10} hasta 1.35 ciclos \log_{10} tras 24h de almacenamiento a 8°C. Niveles energéticos más bajos, en torno a 200 kJ/mL, equivalentes a condiciones de tratamiento de 35 kV/cm -60 μ s y 15 kV cm-360 μ s, mostraron también diferencias significativas tanto en la proporción de daño tras el tratamiento, 87% y 83%, respectivamente, como en la evolución de células dañadas. Mientras los niveles de inactivación evolucionaron de 0.267 ciclos \log_{10} hasta 0.723 ciclos en el caso de 35 kV/cm, los niveles de inactivación para las células tratadas a 15 kV/cm – 360 μ s evolucionaron desde 0.234 ciclos \log_{10} hasta reducciones de 1.14 ciclos \log_{10} tras 24h a 8°C.

Parece que la intensidad de campo eléctrico es el factor más importante en la formación de células subletalmente dañadas tras el tratamiento por PEAI y en su posterior evolución refrigerada. La figura V.3.4 muestra los niveles de inactivación desde las 0 a las 24h del periodo refrigerado de acuerdo a los niveles energéticos aplicados (kJ/mL).

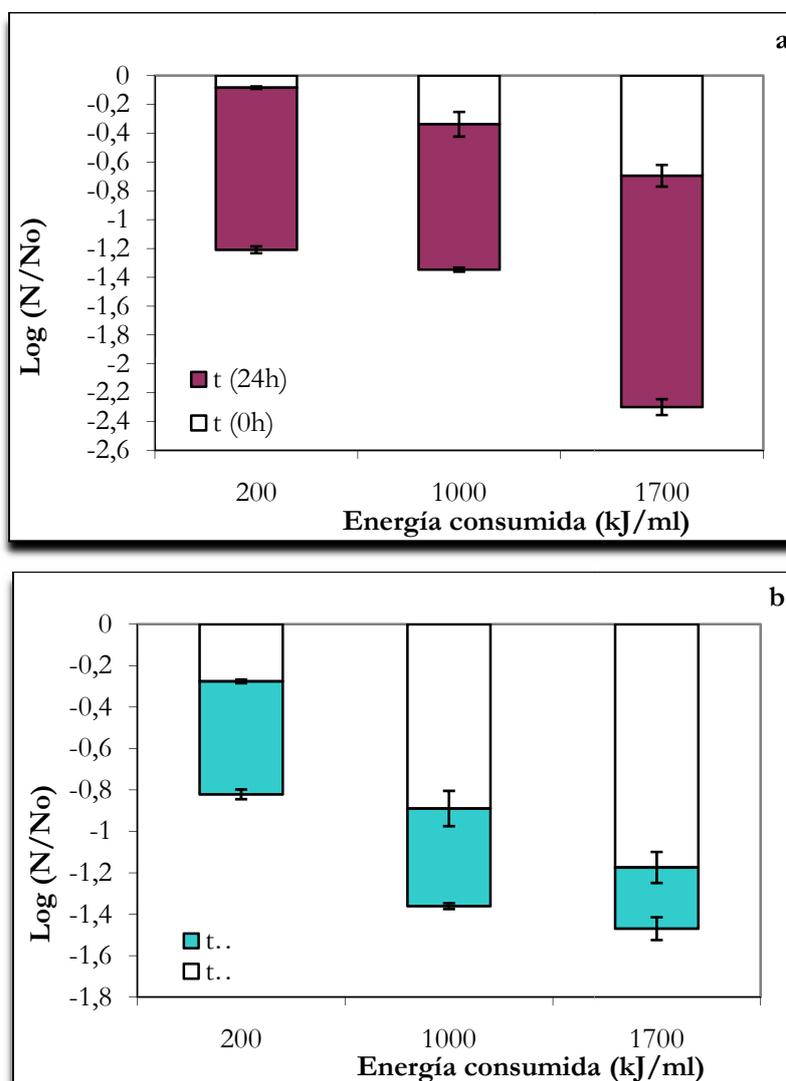


Figura V.4.4 Reducción decimal ($\log_{10} (N/N_0)$) alcanzada en los recuentos de *C. sakazakii*: (a) 15 kV/cm y (b) 35kV/cm debida (i) al efecto neto de la tecnología de PEAI ($t=0h$), donde N es la fracción de células supervivientes tras un tratamiento por PEAI correspondiente a los niveles energéticos de 200, 1000 y 1700 (kJ/mL), y N_0 el número inicial de células; (ii) y a la muerte de células dañadas tras 24h de almacenamiento donde N es la fracción de células supervivientes y N_0 corresponde al valor de N obtenido inmediatamente tras el tratamiento por PEAI.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, la combinación E-t necesaria para garantizar la seguridad microbiológica del producto inmediatamente tras el tratamiento y durante el almacenamiento, a temperaturas \leq

8°C, es de 15 kV/cm -3000 μ s. Este tratamiento proporciona niveles de inactivación iniciales en torno a 0.895 ciclos \log_{10} , niveles de daño subletal tras el tratamiento de 85%, y seguido de un almacenamiento a baja temperatura, causa la muerte de células subletalmente dañadas incrementando considerablemente el nivel de inactivación (2.30 \log_{10} ciclos). Este estudio contribuye a reducir el riesgo potencial asociado a prácticas inadecuadas en la reconstitución de la PFIM y el almacenamiento a temperaturas de abuso durante prolongados periodos de tiempo. Estos resultados deben ser tenidos en cuenta en estudios más profundos sobre evolución de células dañadas.

V.4.6 Conclusiones

La detección de daño subletal tras tratamientos por PEAI es un aspecto muy relevante a tener en consideración en lo que se refiere a la seguridad microbiológica de un producto pasteurizado por esta tecnología, como es en este caso la RPIFM. La generación de células subletalmente dañadas pone de manifiesto la necesidad de combinar tecnologías que tras el tratamiento actúen como “barrera” adicional de control incrementando de forma óptima los niveles de inactivación alcanzados fruto de un tratamiento y, una posterior refrigeración, por ejemplo. En el caso de células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI, un tratamiento a 15 kV/cm y 3000 μ s en combinación con una posterior refrigeración a 8 °C se alcanzarían niveles de 2.30 ciclos \log_{10} tras un periodo de almacenamiento de 24 h. En este caso, temperaturas de almacenamiento \leq 8 °C en combinación con tratamientos previos por PEAI podrían utilizarse para garantizar la seguridad de la RPIFM y prevenir infecciones neonatales en bebés alimentados mediante PFIM reconstituida y tratada mediante PEAI en hospitales, o comercializada como producto pasteurizado por esta tecnología.

V.4.7 Referencias

- Ananta, E., V. Heinz, O. Schlüter, and D. Knorr. 2001. Kinetics studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2: 261-272.
- Barbosa-Cánovas, G.V., M. Gongora-Nieto, U.R. Pothakamury, and B.G. Swanson. 1999. Preservation of foods with pulsed electric fields. San Diego, Academic Press.
- Bar-Oz, B., A. Preminger, O. Peleg, C. Block, and I. Arad.. 2001. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediat.* 90, 356-358.
- Breeuwer, P., Lardeu, A., Peterz, M. & Joosten, H.M. 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.*, 95: 967-973.
- De Paoli, P. 2005. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol. Reviews* 29, 897-910.
- Dutreux, N., S. Notermans, T. Witjzes, M.M. Góngora-Nieto, G.V. Barbosa-Cánovas, and B.G. Swanson. 2000. Pulsed electric fields inactivation of attached and free living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 91-98.
- Evrendilek, G.A., Q.H. Zhang, and E.R. Richter. 2004. Application of Pulsed Electric Fields to Skim Milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosyst. Eng.* 87(2), 137-144
- Farmer, J.J., M.A. Asbury, F.W. Hickman, and D.J. Brenner. 1980. The *Enterobacteriaceae* Study Group, 1980. *Enterobacter sakazakii*, new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int. Journal Syst. Bacteriol.* 30, 569-584
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization activities on microbiological risk assessment. 2004. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Meeting report. Microbiological risk assessment series: 6.
- García, D., N. Gómez, P. Mañas, S. Condón, and R. Pagán, R. 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J. Appl. Microbiol.* 99, 94-104.
- Hamilton, W.A., and A.J.H. Sale. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms: II Killing of bacteria and yeasts. *Biochem. Biophys. Acta* 148: 789-800.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., and Joosten, H. 2007. 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. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. Nov., *Cronobacter muytjensii* sp. Nov., *Cronobacter dublinensis* sp. Nov. and *Cronobacter* genomospecies I. *BMC Evolutionary Biology*, 7:64.
- Knorr, D., A. Angersbach, N. M. Eshtiaghi, V. Heinz, D. U. Lee. 2001. Processing concepts based on high intensity electric field pulses. *Trends Food Sci. and Technol.* 12: 129-135.

Lai, K.K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Medicine Baltimore* 80, 113-122.

Pina, M. C., D. Rodrigo, C. Ferrer, M. Rodrigo, and A. Martínez. 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk. *Int. Dairy J.* 17: 1441-1449.

Pina Pérez, M.C., Rodrigo Aliaga, D. and Martínez López Antonio. 2007. Evaluation for mathematical models for microbial growth of *Enterobacter sakazakii*. Predictive modelling in Foods. Conference Proceedings. Athens 2007. ISBN 978-960-89313-7-4. Pages, 373-377.

Pothakamury U.R., A. Monsalve-González, G.V. Barbosa-Cánovas, and B.G. Swanson. 1995. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Res. Int.* 28 (2) 167-171

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 501-508.

Tsong, T.Y. 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* 60, 297-306.

Weaver, J.C. and Y.A. Chizmadzhev. 1996. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem Bioenerg* 41: 135-160.

Willis, J., and J.E. Robinson. 1988. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediat. Infect. Dis. J.* 7, 196-199.

Wouters, P.C. and J.P.P.M. Smelt. 1997. Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields potential for food preservation. *Food Biotechnol* 22(3), 193-229.

Wuytack, E.Y., L.D.T. Phuong, A. Aertsen, K.M.F.A Reys, D. Marquenie, B. de Ketelaere, B. Masschalck, I. Van Opstal, A.M.J. Diels, and C. Michiels. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *J. Food Protect.* 66, 31-37.



*Capítulo V.5. EFECTO DEL POLVO DE CACAO EN LA INACTIVACIÓN DE *Cronobacter sakazakii* POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTA INTENSIDAD (PEIA) EN FÓRMULA LÁCTEA INFANTIL*

Publicaciones

Cocoa powder as a natural ingredient revealing a synergistic effect to inactivate *Cronobacter sakazakii* cells treated by Pulsed Electric Field in skim milk. 2010.
M. C. Pina-Pérez, D. Rodrigo, A. Martínez-López: FoodBorne pathogens and diseases. Under review

Congresos

AUTORES: Pina Pérez M.C, Rodrigo Aliaga D., y Martínez López A.

TÍTULO: “Efecto del polvo de cacao rico en polifenoles sobre la inactivación por PEAI de *Cronobacter sakazakii*”

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Presentación de Póster

CONGRESO International Conference on antimicrobial research- **Internacional**

LUGAR DE REALIZACIÓN Valladolid, Spain

AÑO Noviembre 2010

V.5.1 Abstract

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio del posible efecto de un polvo de cacao rico en polifenoles (CocoanOX 12%) en combinación con los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) en la inactivación de células de *C. sakazakii* inoculado en fórmula láctea (FL).

Este posible efecto se estudió para 3 concentraciones diferentes de polvo de cacao: 1%, 2.5% y 5 % (w/v), y para distintos momentos de adición del cacao 0, 2, y 4h previos y posteriores al tratamiento por PEA I (15, 25, y 35 kV/cm), para determinar así la influencia de ambos factores, tanto en inactivación, como en el estudio de la evolución en refrigeración de las células tratadas.

Los resultados indican que tanto la combinación PEA I -concentración de cacao, como el momento de adición del CCX afectan significativamente a la inactivación de *C. sakazakii* alcanzada y a su posterior evolución durante 12h-8°C (P < 0.05).

Palabras clave: *Cronobacter sakazakii*, ingredientes naturales, antimicrobianos, cacao, PEA I.

V.5.2 Introduction

A raíz de los últimos casos de toxiinfecciones alimentarias publicados en todo el mundo, cursando en ocasiones con la muerte de las personas afectadas, en muchos casos niños, organizaciones de salud pública a nivel internacional han puesto toda su atención y esfuerzos en prevenir y evitar potenciales riesgos alimentarios especialmente en bebés y niños de corta edad. Desde 2004, la FAO y la Organización Mundial de la Salud han recogido los peligros asociados a la posible presencia de patógenos en alimentos formulados en polvo como fórmulas infantiles, destacando la presencia de *Cronobacter sakazakii* (Urmenyi y Franklin, 1961). Desde entonces hasta Julio de 2008, la OMS/FAO (2008) han identificado alrededor de 120 casos documentados, en todo el mundo, de infección por *C. sakazakii* de en niños menores de 3 años, de entre los cuales 27 finalizaron con la muerte de los afectados

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, autoridades públicas, investigadores y productores lácteos trabajan unidos en la necesidad de desarrollar métodos alternativos al térmico para conservar de mejor manera las propiedades nutricionales de la leche y sus derivados (fórmula infantil y las bebidas lácteas, entre otros), por ejemplo vitaminas, de tanta importancia para el crecimiento infantil; y específicamente para evitar o reducir el riesgo de enfermedad para los niños. En este sentido, la tecnología de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) ha demostrado un elevado potencial como método de pasteurización no-térmico respetando los componentes más sensibles de la leche, y de una gran variedad de alimentos líquidos. Sin embargo, teniendo en cuenta los estudios de inactivación de *C. sakazakii* por PEAJ (capítulo III) se consiguen 1.21 reducciones logarítmicas, suficiente para su aplicación en el ámbito hospitalario descrito en el el citado capítulo, pero puede que no suficientes como método de conservación general. La adición de ingredientes naturales con efecto antimicrobiano podría ser una potencial alternativa aplicable para completar o reducir la intensidad de los procesos físicos de conservación que están siendo actualmente utilizados (tratamiento térmico, altas presiones hidrostáticas (APH), PEAJ, etc). A causa de la problemática legal que afecta a diversos antimicrobianos, se está despertando el interés por el uso de sustancias que además de

ingredientes que actúan en la formulación del alimento aporten un cierto carácter funcional y a su vez puedan actuar previniendo el desarrollo de microorganismos de riesgo (Marco y col., 2011). La gran ventaja que tiene usar ingredientes naturales con capacidad antimicrobiana es su estatus legal, su uso en alimentación está autorizado y aunque muchas veces su fin no es contribuir a la inocuidad del alimento, sí es interesante aprovechar su capacidad antimicrobiana como medida de control adicional (Pina-Pérez y col., 2009). En este sentido, la disponibilidad e interés reciente en cuanto a ciertos derivados/concentrados mínimamente procesados de cacao y extractos ricos en flavonoides, están potenciando el desarrollo de muy diversos productos con propiedades funcionales.

Estos ingredientes pueden presentarse formulados como líquidos o polvos (deshidratados) y podrían ser añadidos, en la industria láctea, a la leche o al agua en distintos momentos del proceso. Sobre la conveniencia en la adición de dichas sustancias, pre- o post- tratamiento, son diversos los estudios publicados referentes a la influencia del momento de adición (saborizantes, texturizantes, colorantes) sobre el posible efecto que ocurre entre ellas y el tratamiento de conservación pudiendo aparecer efectos aditivos o sinérgicos por combinación con distintas tecnologías de conservación (Miedema y Shildknecht, 2007; Hauben y col. 1996; Masschalck y col. 2001).

V.5.3 Objetivos

En el presente trabajo de investigación, se ha propuesto el estudio de la inactivación por PEAI de *Cronobacter sakazakii* en una bebida de leche desnatada suplementada con polvo de cacao (CCX) a distintas concentraciones. Los principales objetivos del presente estudio son: 1) determinar el posible efecto del polvo de cacao en la inactivación de *Cronobacter sakazakii* por PEAI; 2) determinar el efecto del momento de adición del polvo de cacao (0-2-4h), antes y después del tratamiento, en la sensibilidad de las células a la tecnología de PEAI; 3) comprobar el posible efecto/influencia del polvo de cacao en la evolución de las células tratadas, durante el

almacenamiento refrigerado. Con ello se pretende contribuir a una mayor conocimiento de la tecnología de barreras.

V.5.4 Material y Métodos

V.5.4.1 Cepa bacteriana y medio de crecimiento. El cultivo puro de *C. sakazakii* (equivalente a la cepa 29544 ATCC) fue proporcionado liofilizado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 858).

El cultivo liofilizado se rehidrató en 10 mL de caldo de triptosa-soja (Tryptic Soy Broth, TSB) (Scharlab Chemie, Barcelona, Spain) durante 20 min. Esta suspensión celular se inoculó después en 500 mL de TSB y fue incubada a 37 °C en agitación continua a 200 rpm durante 24 h para obtener células en fase estacionaria de crecimiento.

Las células en fase estacionaria se recogieron tras una doble centrifugación a 5000×g, 5°C, durante 15 min. El pellet obtenido en la segunda centrifugación fue resuspendido en 15 mL de TSB, y repartido en viales de 2 mL, con 1 mL de suspensión celular y 1 mL de una solución preparada a partir de glicerol (20%) y TSB. Estos viales fueron congelados a -80°C. La concentración de este cultivo inicial de células en fase estacionaria almacenadas a -80°C es de 10⁹ cfu/mL.

Estos viales se utilizaron en las experiencias por PEAI.

V.5.4.2 Sistema de tratamiento por PEAI

En el tratamiento de las muestras se utilizó un equipo en continuo a escala de laboratorio OSU-4D, diseñado por la Ohio State University. Se conectaron en serie 8 cámaras de tratamiento con diámetro de 0.23 cm. La temperatura del baño se fijó en 4°C. La forma del pulso, el voltaje y la intensidad de tratamiento fueron registradas mediante un osciloscopio digital (Tektronic TDS 210, Tektronic, OR). El flujo se fijó en 30mL/min mediante una bomba de engranajes (Cole-Parmer 75210-25, Cole – Parmer Instruments, IL). La duración del pulso de onda cuadrada bipolar fue de 2.5 μs. Los tiempos de tratamiento oscilaron entre 60 y 3000 μs, y la intensidad de campo eléctrico fue de 15, 25, 35 kV/cm. La temperatura final permaneció por debajo de los 25 ± 3°C para todas las condiciones de tratamiento. Las muestras fueron recogidas tras cada uno de los tratamientos y se diluyeron seriadamente en agua de petrona

estéril al 0.1%, y sembradas en agar TSA e incubadas a 37°C 24h. Las experiencias se repitieron por triplicado.

V.5.4.3 Polvo de cacao (CCX)

El cacao (*Theobroma cacao*) tiene múltiples usos en la industria alimentaria actual. Recientemente, los flavonoides del cacao han despertado un interés creciente por su capacidad antioxidante y su implicación en beneficios diversos sobre la salud humana (Cooper y col., 2007). En el presente estudio se ha utilizado un polvo de cacao comercializado como CocomanOX 12% (CCX), un polvo de cacao rico en polifenoles desarrollado tras un proceso industrial que conserva intacta una importante fracción de flavonoides originales del cacao (Naturex S.L., Spain). La comparación con el cacao en polvo convencional mostró que el CocomanOX 12% contenía 8 veces más epicatequina y procianidina B₂, que el polvo de cacao convencional. Además, este producto rico en flavonoides ha demostrado una elevada biodisponibilidad en humanos cuando se administra adicionado en leche (Cienfuegos y col., 2007; Tomas-Barberan et al., 2000).

V.5.4.4 Composición de la fórmula e Inoculación

En el presente trabajo se desarrolló una fórmula láctea (FL) mezcla de fórmula infantil en polvo reconstituida a la que se le incorporó polvo de cacao (CCX) a tres concentraciones diferentes: 1% (w/v) (FL-1%); 2.5 % (w/v) (FL-2.5%) y 5% (w/v) (FL-5%). Las fórmulas se trataron a las mismas condiciones de intensidad de campo eléctrico (E, kV/cm) – tiempo de tratamiento (t, μ s).

El efecto combinado de los PEAI y la concentración de cacao, en la inactivación de células de *C. sakazakii*, se estudió en profundidad considerando además, el momento de adición del polvo de cacao previo y posterior (0, 2 y 4h) al tratamiento por PEAI. En todo caso, la FL suplementada/no suplementada, previa/posteriormente al tratamiento, se mantuvo en refrigeración a 8°C (en condiciones de agitación a 250rpm) completando un tiempo total de almacenamiento de 12h.

La conductividad eléctrica y el pH de las diferentes fórmulas fue medido a temperatura ambiente (25 °C). La conductividad eléctrica fue medida con un conductímetro (Crison 525 conductimeter, Crison instruments,S.A., Alella, Barcelona, Spain). La medida del pH se realizó con un pH-metro (Crison 2001 pH-meter, Crison instruments). El valor de conductividad de la FL-0% comercial resultó de 0.278 S/m. El valor de pH para la FL-0 estudiada fue de 6.8. Los valores de pH y conductividad para las diferentes fórmulas fueron los siguientes: FL-1% (6.98±0.10; 0.620±0.10(S/m)); FL-2.5% (7.16±0.04; 0.618±0.05 (S/m)) y FL-5% (7.24±0.08; 0.632±0.07 (S/m))

Las diferentes fórmulas fueron inoculadas hasta concentración final de $1-3 \times 10^7$ cfu/mL, con los viales de 2 mL mantenidos en congelación a -80°C.

V.5.4.5 Recuentos de células viables de *C. sakazakii*. Las suspensiones celulares de cada muestra tratada se diluyeron seriadamente en agua de peptona estéril 0.1% y se sembraron a continuación en placas de agar triptosa-soja (TSA, Scharlab Chemie Barcelona, Spain) por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 24h y se procedió a la enumeración de unidades formadoras de colonias (Colony Forming Units). Las suspensiones de células no tratadas se utilizaron en la determinación de la carga inicial como cfu/mL.

V.5.4.6 Modelización de la inactivación de *C. sakazakii*.

V.5.4.6.1 Modelo de inactivación. Los datos experimentales del tratamiento por PEAI se ajustaron a la función de distribución de Weibull (1951) (ecuación V.4.1):

$$\log \frac{N}{N_0} = -bt^n \quad \text{Ecuación V.4.1}$$

donde $\log [N(t)/N_0]$ frente al tiempo t es el logaritmo decimal de S; siendo S la fracción de supervivientes $[N/N_0]$ al tiempo de tratamiento (t); b y n son los factores de escala y forma, respectivamente. Este modelo reúne las características de ser simple y suficientemente robusto como para describir tanto las curvas cóncavas (n >1) como convexas (n <1). Obviamente, el modelo incluye también el caso de curvas de supervivencia lineales (n =1) (Avsaroglu et al., 2006).

V.5.4.7 Análisis de datos y evaluación de modelos. El análisis estadístico de los datos y el ajuste del modelo de inactivación se llevaron a cabo mediante el programa statgraphics centurion XV, version 15.1.03 (Statpoint Inc, 2005, USA). Para comprobar la bondad de los ajustes realizados por el modelo se utilizan los siguientes coeficientes: coeficiente de regresión corregido (R^2 -corregido) y la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE) (López y col., 2004).

V.5.5 Resultados

V.5.5.1 Inactivación de *C. sakazakii* por PEAI en FL no suplementada/suplementada con CCX

El efecto de los PEAI en la inactivación de *C. sakazakii* se estudió en FL no suplementada (FL-0%) y FL suplementada con polvo de cacao a diferentes concentraciones: 1, 2.5 y 5% (w/v). Posteriormente las muestras tratadas y no tratadas, en todos los sustratos, se almacenaron en refrigeración 8°C-12h.

El nivel máximo de inactivación alcanzado en FL-0% fue de 1.12 \log_{10} ciclos alcanzado a 35 kV/cm-700 μ s.

La tabla V.5.1 recoge los niveles de inactivación por PEAI alcanzados en las diferentes fórmulas para las diferentes condiciones de tratamiento.

Tabla V.5.1. Niveles de inactivación de *Cronobacter sakazakii* por PEAI ($\text{Log}_{10}[\text{N}/\text{N}_0]$) en las diferentes fórmulas: FL-0%; FL-1%; FL-2.5%; y FL-5% a las diferentes condiciones de tratamiento.

		Fórmulas lácteas			
E (kV/cm)	t (μs)	FL-0%	FL-1%	FL-2.5%	FL-5%
15	60	0.045 \pm 0.003	0.071 \pm 0.005	0.084 \pm 0.013	0.092 \pm 0.008
	240	0.085 \pm 0.012	0.132 \pm 0.005	0.153 \pm 0.021	0.185 \pm 0.015
	500	0.235 \pm 0.023	0.292 \pm 0.033	0.325 \pm 0.093	0.365 \pm 0.085
	700	0.386 \pm 0.031	0.415 \pm 0.083	0.439 \pm 0.047	0.503 \pm 0.016
	1660	0.605 \pm 0.050	0.625 \pm 0.041	0.608 \pm 0.109	0.686 \pm 0.018
	3000	0.871 \pm 0.037	1.225 \pm 0.103	1.240 \pm 0.050	1.295 \pm 0.033
25	60	0.078 \pm 0.020	0.111 \pm 0.005	0.114 \pm 0.007	0.145 \pm 0.023
	180	0.145 \pm 0.022	0.209 \pm 0.009	0.236 \pm 0.017	0.268 \pm 0.033
	240	0.256 \pm 0.010	0.292 \pm 0.013	0.305 \pm 0.041	0.335 \pm 0.088
	500	0.415 \pm 0.044	0.415 \pm 0.052	0.438 \pm 0.028	0.463 \pm 0.021
	860	0.623 \pm 0.021	0.753 \pm 0.044	0.785 \pm 0.025	0.805 \pm 0.101
	1660	0.763 \pm 0.104	0.896 \pm 0.074	0.939 \pm 0.022	0.987 \pm 0.122
35	60	0.154 \pm 0.008	0.185 \pm 0.031	0.215 \pm 0.035	0.253 \pm 0.036
	240	0.198 \pm 0.010	0.256 \pm 0.022	0.387 \pm 0.024	0.475 \pm 0.019
	360	0.423 \pm 0.037	0.574 \pm 0.014	0.602 \pm 0.025	0.685 \pm 0.033
	420	0.674 \pm 0.033	0.695 \pm 0.045	0.701 \pm 0.074	0.784 \pm 0.111
	500	0.857 \pm 0.120	0.883 \pm 0.071	0.905 \pm 0.044	0.984 \pm 0.025
	700	1.126 \pm 0.098	1.199 \pm 0.152	1.299 \pm 0.110	1.399 \pm 0.171

Como puede apreciarse en la tabla para la FL-0% y FL suplementada, la presencia de CCX afecta significativamente los niveles de inactivación ($P \leq 0.05$). Cuanto mayor es la concentración de CCX, mayor es el nivel de inactivación alcanzado para cada condición de tratamiento.

La figura V.5.1 muestra la contribución neta de los PEAI y del efecto combinado (PEAI+CCX 5%) en la inactivación alcanzada en células de *C. sakazakii* tratadas a 15kV/cm.

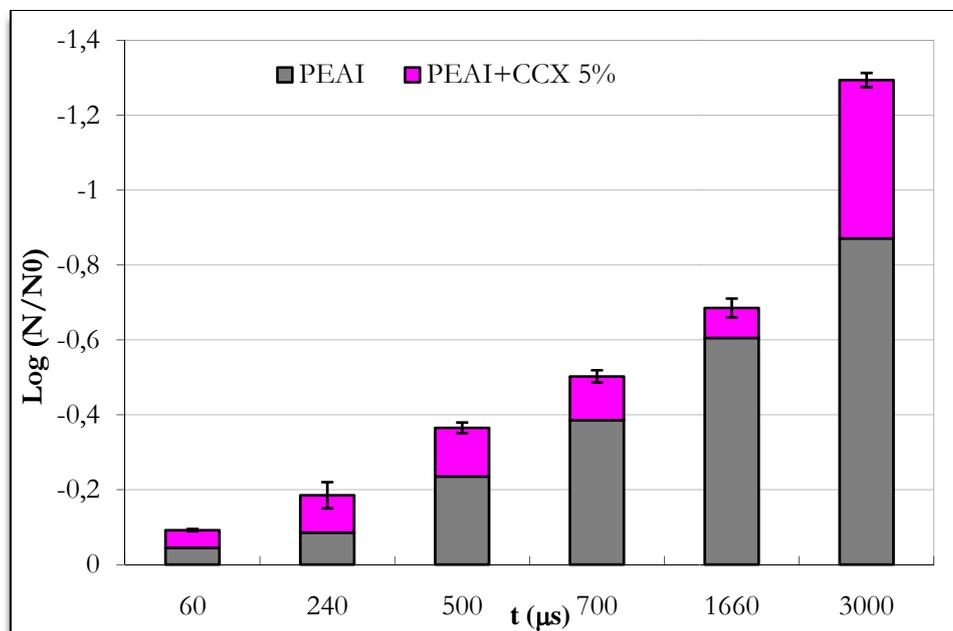


Figura V.5.1 Descomposición de la inactivación en efecto neto debido a la tecnología de PEAI ■ y efecto combinado de PEAI-CCX ■ a 15 kV/cm y para una concentración de CCX 5%

El máximo efecto combinado fue observado a 15kV/cm-3000 μs con valores de 0,354, 0,379 y 0,430 ciclos \log_{10} debidos a la combinación de PEAI y la adición de CCX al 1, 2,5 y 5% respectivamente. En cuanto a la utilización de este ingrediente natural en combinación con otras tecnologías no térmicas de conservación, se ha visto que tratamientos PEIA+CCX y APH+CCX manifiestan sinergismo en la inactivación de células vegetativas de *B. cereus* (Pina et al. 2009).

V.5.5.2 Efecto del momento de adición del polvo de cacao (CCX) en la inactivación por PEAI de células de *C. sakazakii* en FL/FL suplementada y en su evolución tras el tratamiento (8°C-12h)

La adición de polvo de cacao a la fórmula láctea se llevó a cabo antes y después del tratamiento por PEAI (0, 2, y 4h), con el objetivo de determinar la posible influencia que el momento de adición del antimicrobiano podría ejercer en la resistencia de las

células al tratamiento y en la posterior evolución de las mismas en refrigeración a 8°C-12h.

Se estudió en primer lugar la adición del CCX, justo antes (0h) y justo después (0h) del tratamiento por PEAI. Se observan diferencias significativas ($P \leq 0.05$) debidas al momento de adición de CCX, para concentraciones de CCX mayores de 1% y para todas las condiciones de tratamiento por PEAI. La figura V.5.2 muestra una comparación entre los niveles de inactivación de *C. sakazakii* alcanzados en este caso.

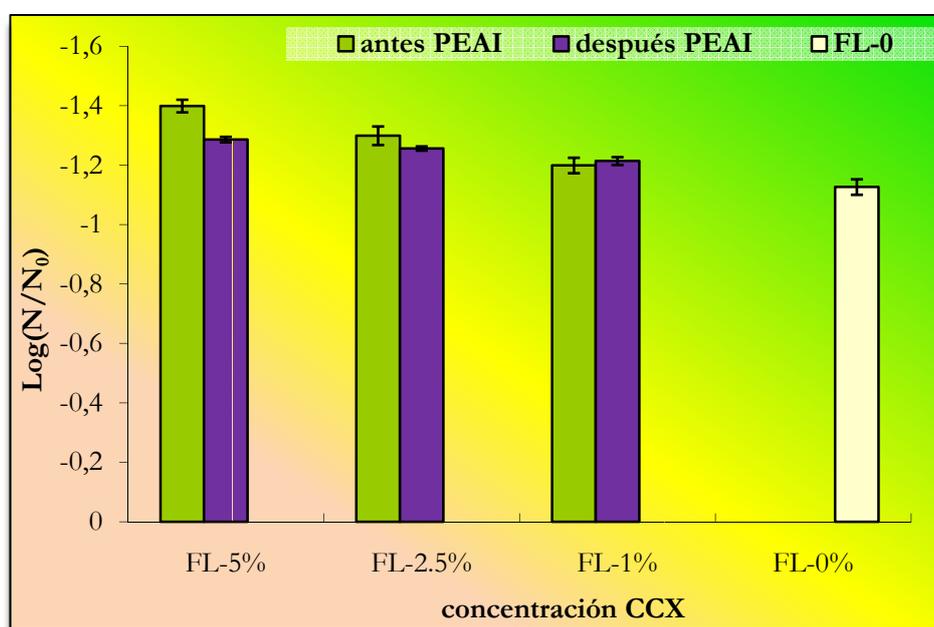


Figura V.5.2 Efecto del momento de adición del CCX, antes ($t=0h$) o después ($t=0h$) del tratamiento por PEAI (35kV/cm-700 μ s), en la inactivación de *C. sakazakii*.

Las curvas de supervivencia para *C. sakazakii* en FL-0% y FL-1%, FL-2.5%, y FL-5%, cuando el polvo de cacao se adicionó antes ó tras el tratamiento, se ajustaron al modelo de Weibull. Existen numerosos estudios recientes de cinéticas de inactivación, llevados a cabo en una extensa variedad de microorganismos y sustratos tratados por tecnologías no térmicas de conservación, como los PEAI o las APH, que avalan la bondad del modelo de Weibull para interpretar la inactivación de microorganismos

(Peleg y Cole 1998; Chen y Hoover, 2003; Rodrigo y col., 2003; Buzrul y col., 2009; Adekunle y col., 2010).

La tabla V.5.2 incluye los valores de los parámetros del modelo y los parámetros indicadores de la bondad del ajuste R^2 corregido y RMSE.

Tabla V.5.2 Valores de los parámetros b y n del modelo de Weibull para la inactivación de *C. sakazakii* en fórmula láctea (FL-0%), y FL suplementada con 3 concentraciones diferentes de CCX: FL-1%, FL-2.5%, y FL-5% (w/v). Valores de los parámetros que definen la bondad del ajuste para el modelo de Weibull: R^2 ajustado y RMSE.

¹ E	Bebida	b	n	R^2 corregido	RMSE
15	FL-0	0.0124	0.522	0.945	0.038
	FL-1% (A)	0.0128	0.549	0.919	0.107
	FL-1% (D)	0.0114	0.559	0.928	0.097
	FL-2.5% (A)	0.0148	0.532	0.903	0.107
	FL-2.5% (D)	0.0127	0.544	0.921	0.093
	FL-5% (A)	0.0184	0.512	0.919	0.100
	FL-5% (D)	0.0173	0.508	0.916	0.092
25	FL-0	0.0105	0.582	0.965	0.040
	FL-1% (A)	0.0106	0.604	0.969	0.043
	FL-1% (D)	0.0185	0.516	0.959	0.053
	FL-2.5% (A)	0.0136	0.574	0.963	0.042
	FL-2.5% (D)	0.0111	0.595	0.990	0.023
	FL-5% (A)	0.0144	0.575	0.972	0.036
	FL-5% (D)	0.0125	0.582	0.993	0.008
35	FL-0	0.0273	0.531	0.866	0.121
	FL-1% (A)	0.0393	0.505	0.895	0.102
	FL-1% (D)	0.0321	0.512	0.897	0.053
	FL-2.5% (A)	0.0421	0.486	0.974	0.123
	FL-2.5% (D)	0.0378	0.496	0.905	0.115
	FL-5% (A)	0.0513	0.479	0.905	0.123
	FL-5% (D)	0.0490	0.478	0.900	0.110

¹E: intensidad de campo eléctrico (kV/cm)

A: Adición del CCX antes del tratamiento D: Adición del CCX tras el tratamiento

Todas las curvas de supervivencia de *C. sakazakii* ajustadas al modelo de Weibull resultaron cóncavas ($n < 1$). El parámetro de escala (b) y el parámetro de forma (n) se estudiaron para determinar cómo influyen los distintos factores que controlan el proceso de inactivación. Como puede observarse en la tabla V.5.2, el parámetro de forma (n) no depende de la intensidad de campo eléctrico o de la concentración de CCX en las bebidas. Sin embargo, se puede observar como el parámetro b depende

de la intensidad de tratamiento por PEAI, y representa el ratio de inactivación. Cuanto mayor es la intensidad de campo eléctrico aplicada, mayor es el valor del parámetro A . Al mismo tiempo, el parámetro (b) se ve significativamente afectado por la concentración de CCX, siendo tanto mayor el valor de b cuanto mayor es el % de CCX añadido. La influencia del momento de adición del CCX en la inactivación de *C. sakazakii* se observa también en los valores que toma el parámetro b para las distintas condiciones, siendo los valores de b ligeramente superiores cuando la adición tuvo lugar antes del tratamiento por PEAI.

Se estudió a continuación el efecto de la adición del CCX 2 y 4 h antes y tras el tratamiento. En cuanto a la adición de CCX llevada a cabo 2 y 4 h antes del tratamiento por PEAI, no se observaron diferencias significativas entre la adición del CCX 0 y 2 h antes del tratamiento, viéndose ligeramente incrementada la inactivación, cuando la adición se llevó a cabo 4h antes.

Las células tratadas por PEAI se almacenaron en refrigeración a temperatura de 8°C-12h. Los resultados de inactivación obtenidos tras el periodo refrigerado se presentan en la figura V.5.3.

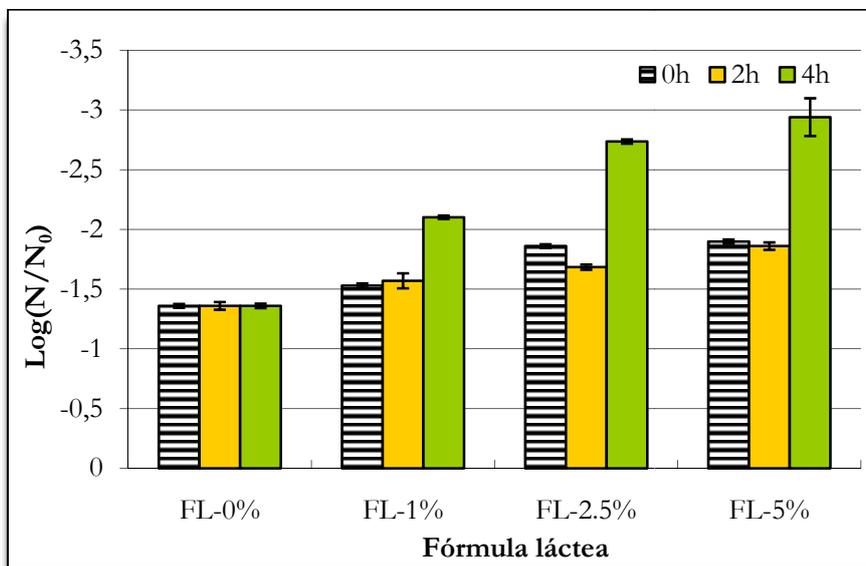


Figura V.5.3 Resultados de inactivación tras el periodo refrigerado de 12h-8°C cuando las células de *C. sakazakii* fueron tratadas por PEAI (15kV/cm-3000µs) en FL-0%, y en las fórmulas suplementadas con CCX 0, 2, y 4 antes del tratamiento por PEAI.

Como puede observarse, la evolución de las células tratadas y refrigeradas se vió significativamente afectada por la concentración de CCX adicionada. Cuanto mayor es la concentración de CCX, mayor es la muerte durante el almacenamiento de células tratadas. En cuanto al efecto del momento de adición aparecen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre 0 ó 2h y 4h. Esta afirmación se verifica para todas las condiciones de tratamiento por PEAI. Con respecto al efecto del momento de adición del CCX, se puede observar que los niveles más elevados de inactivación por PEAI y durante la etapa de almacenamiento suceden, para células que permanecieron en contacto con el CCX 4h antes del tratamiento por PEAI. Similares resultados han sido observados por otros investigadores, quienes atribuyen incrementos en los niveles de inactivación observados por tecnologías no térmicas de conservación al contacto entre el microorganismo y antimicrobianos naturales debido al efecto de sensibilización que estas sustancias ejercen a nivel celular (Masschalck y col. (2001a)).

En cuanto a la adición de CCX tras el tratamiento, las células de *C. sakazakii* inoculadas en FL-0% fueron tratada por PEAI bajo diferentes condiciones de tratamiento, y posteriormente almacenadas en refrigeración a 8°C un máximo de 12h. Tras diferentes tiempos de almacenamiento (0, 2 y 4h), se añadieron diferentes concentraciones de CCX (1, 2.5 y 5% (w/v)).

La figura V.5.4 muestra los niveles de inactivación alcanzados, para células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI a 35kV/cm-700µs cuando el CCX fue adicionado 0, 2 y 4 h tras el tratamiento por PEAI.

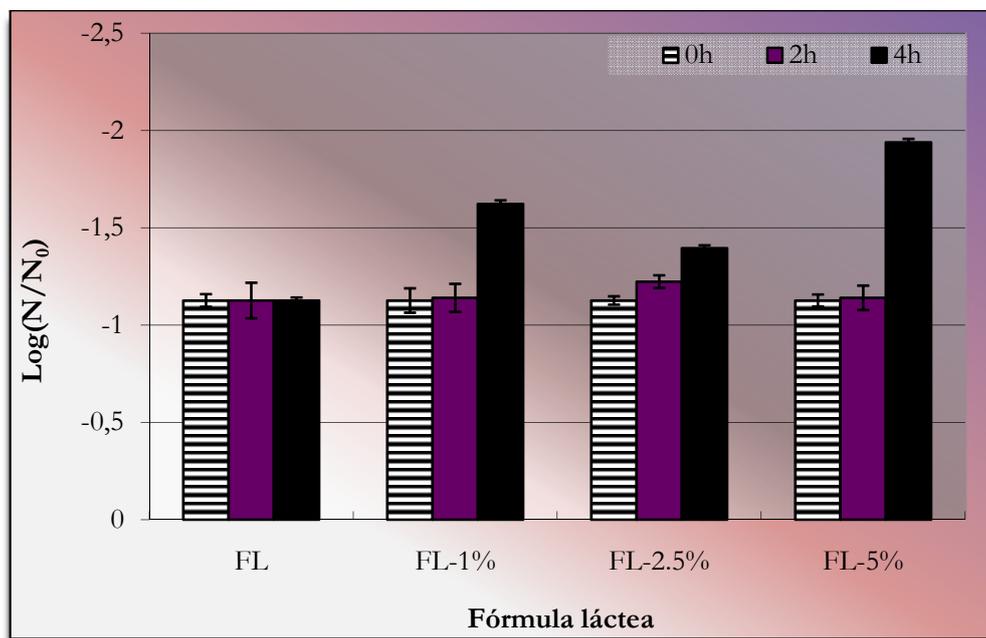


Figura V.5.4 Niveles de inactivación alcanzados para células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI a 35kV/cm-700µs y almacenadas a 8°C cuando el CCX fue adicionado 0, 2 y 4 h tras el tratamiento por PEAI

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas cuando se adiciona el CCX 0-2 h tras el tratamiento por PEAI, para las diferentes condiciones de tratamiento y concentraciones de CCX. Sin embargo, cuando el CCX fue adicionado sobre células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI en FL-0% y mantenidas en refrigeración 4h, los niveles de inactivación se incrementan de forma significativa ($P < 0.05$).

La figura V.5.5 recoge los niveles de inactivación alcanzados tras las 12h de almacenamiento refrigerado, cuando el CCX se adicionó antes ó tras el tratamiento por PEAI a 15 kV/cm- 3000µs.

De acuerdo a los resultados, se puede afirmar que siempre que el CCX está presente durante el almacenamiento refrigerado de las células tratadas hay un mayor control en el crecimiento de estas. Además, para todas las condiciones de tratamiento por PEAI, los niveles de muerte de las células se incrementaron progresivamente durante las 12h de almacenamiento. Los niveles máximos de inactivación, se producen

en el presente estudio, cuando el CCX se adiciona 4h tras el tratamiento por PEAI y posterior refrigeración de las células hasta completar las 12h a 8°C. Este hecho se cumple para todas las condiciones de tratamiento por PEAI y para todas las concentraciones de CCX en el rango de estudio [1% a 5%]. Además, se puede afirmar que la evolución de las células tratadas se ve significativamente afectada no solo por el tiempo de almacenamiento a 8°C (fig. 4.4 y fig 4.5), sino también por la concentración de CCX añadida, siendo el CCX al 5% la concentración más efectiva en el control de las células de *C. sakazakii*, algo que coincide con los resultados obtenidos cuando el CCX se adiciona previamente a los tratamientos por PEAI.

El nivel máximo de inactivación, 4,41 log₁₀ ciclos, se alcanza tras la adición de un 5% de CCX, 4h después de un tratamiento a 15kV/cm-3000μs, manteniendo las células tratadas en refrigeración, un máximo de 12h.

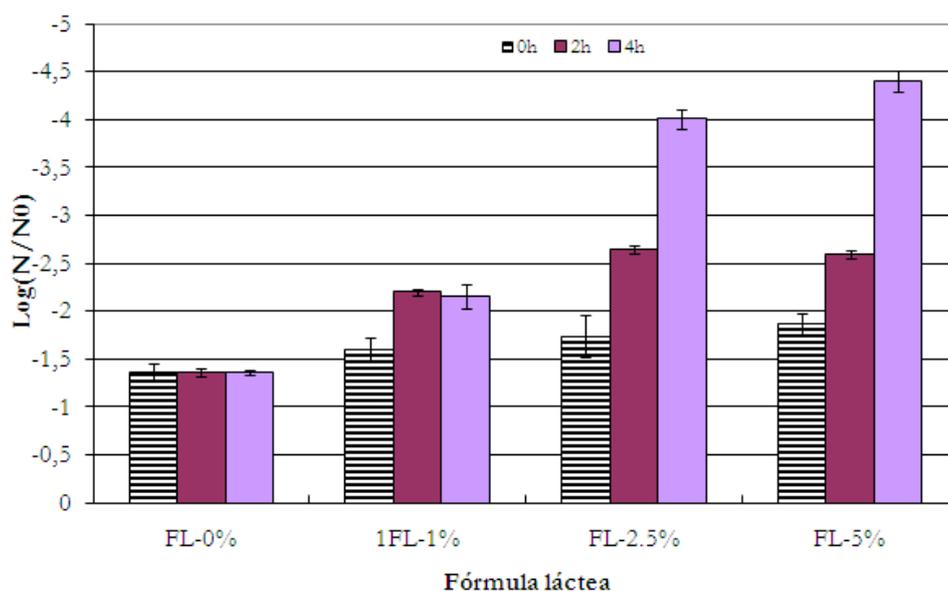


Figura V.5.5 Niveles de inactivación alcanzados tras las 12h de almacenamiento refrigerado, cuando el CCX se adicionó 0, 2 y 4 h tras el tratamiento por PEAI a 15 kV/cm, 3000μs

Este hecho puede ser atribuido a la posible aparición de daño subletal en células de *C. sakazakii* tratadas por PEAI (Pina y col., 2009), dejándolas sensibilizadas ante medidas adicionales de control (Somolinos y col., 2007; Saldaña y col., 2009), como

son en este caso los antimicrobianos y las bajas temperaturas. Esta teoría está de acuerdo con la propuesta por Morgan y col. (2000), quienes concluyeron que la acción de las sustancias antimicrobianas continuaba ejerciendo un efecto bactericida/inhibitorio en las matrices alimentarias tras el tratamiento por PEAI, inactivando e impidiendo la recuperación de las células subletalmente dañadas. Estudios realizados por Pina y col. (2009) para las mismas condiciones de tratamiento y almacenamiento de fórmula infantil en polvo reconstituida, muestran que el mayor porcentaje de células subletalmente dañadas comienzan a morir de forma significativa tras 4h de almacenamiento a 8°C, para tratamientos de 15kV/cm-1660µs; 15kV/cm-3000µs; 35kV/cm-320µs; y 35kV/cm-500µs, siendo máximo el % de células subletalmente dañadas tras el tratamiento a 15kV/cm-3000µs. Estas poblaciones dañadas continuaban muriendo progresivamente durante el periodo de 4 a 24h de almacenamiento refrigerado. Estos resultados pueden explicar en parte, los obtenidos en el presente estudio, siendo más efectiva la adición de CCX en el momento en que las células subletalmente dañadas son más sensibles a factores externos (4h en refrigeración tras el tratamiento). A la vez, el efecto antimicrobiano durante el almacenamiento, será tanto más efectivo cuanto mayor sea la concentración de CCX añadida.

En lo que se refiere a la adición de CCX previa al tratamiento, se verifica que los tiempos de contacto CCX-*C. sakazakii* más prolongados, se traducen en niveles de control más efectivos durante el almacenamiento refrigerado.

Aunque no se tiene todavía un amplio conocimiento sobre los mecanismos de resistencia de los microorganismos frente a ciertas sustancias antimicrobianas, estudios previos revelan que ciertos componentes antimicrobianos naturales actúan dañando la membrana celular, alterando su permeabilidad, responsable de muchas funciones celulares como el mantenimiento del nivel energético, el transporte de solutos, la regulación del metabolismo y el control de la presión intracelular (Brula y Cooteb, 1999; Cox y col., 2000). Masschalck y col. (2001a) concluyeron que una permeabilización reversible en la membrana externa de las células bacterianas inducida por presión o cualquier otra tecnología, permitía el acceso temporal de la nisina a la membrana citoplasmática o de la lisozima a la capa de peptidoglicano. Combinando la

tecnología de PEAI y antimicrobianos como la nisina, se observó un efecto aditivo en la inactivación de bacterias en matrices líquidas, cuando la nisina se añadió a la muestra previo al tratamiento por PEAI ó cuando fue añadida al medio de incubación antes de sembrar en placa las muestras tratadas por PEAI (Calderon-Miranda y col., 1999; Terebiznik y col., 2000).

Por otro lado, *E. coli* no mostró sensibilidad a la nisina o lisozima tras el tratamiento por APH (Hauben y col., 1996) Sin embargo, la adición de lisozima y nisina durante el tratamiento de presurización incrementó la letalidad del mismo de forma aditiva. Otros autores concluyeron que bajo intensidades leves de tratamiento, seguidas de la adición de nisina, existía un efecto aditivo en la inactivación de *Listeria innocua* en huevo líquido, sin embargo, el efecto fue sinérgico cuando la concentración de nisina se incrementó (Calderon-Miranda y col., 1999b).

Estudios previos a los recogidos en el presente trabajo con cacao confirman el efecto que los polifenoles pueden tener en la inhibición de *C. sakazakii*. Kim y col., (2009) investigaron la posible inhibición de *Enterobacter sakazakii* debida a la acción de polifenoles presentes en los extractos de semillas de moscatel (*Vitis rotundifolia*) solubles en agua. El tratamiento térmico aplicado a cada extracto de semilla no solo incrementó el total de ácidos fenólicos y tánicos sino que aumentó la actividad antimicrobiana frente a *E. sakazakii*. Estos estudios concluyeron que las fracciones polifenólicas fueron ligeramente inhibitorias ($P \leq 0.05$) frente a *E. sakazakii*. Otros autores hablan también de un efecto bacteriostático del cacao frente a microorganismos como *Streptococcus sanguinis* (Rimondia y col 2006) atribuido a polifenoles dimeros, tetrámeros y pentámeros. Sin embargo, este grupo de investigación no observó tampoco ningún efecto bactericida del cacao frente a *Streptococcus sanguinis*.

V.5.6 Conclusiones

Podemos concluir por tanto afirmando que el momento de adición de sustancias antimicrobianas y/ó el tiempo de contacto de éstas con las células, en la matriz alimentaria, afectan significativamente los niveles de inactivación alcanzados por PEAI, algo que pone de manifiesto la importancia del empleo de tecnologías barrera en cuanto a un posible incremento en la efectividad de los tratamientos, por ejemplo durante la vida útil del producto. Este hecho parece estar relacionado con la generación y muerte tras el tratamiento, de poblaciones de células subletalmente dañadas, algo que debe ser estudiado con mayor profundidad por la relevancia que presenta en términos de seguridad alimentaria

V.5.7 Referencias

- Adekunte A., Tiwari B.K., Scannell A., Cullen P.J., O'Donnell C. 2010. Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice. 2010. International Journal of Food Microbiology 137: 116-120.
- Avsaroglu, M. D., Buzrul, S., Alpas, H., Akcelik, M., & Bozoglu, F. (2006). Use of the Weibull model for lactococcal bacteriophage inactivation by high hydrostatic pressure. International Journal of Food Microbiology, 108, 78–83.
- Buzrul S. 2009. Modelling and predicting inactivation of *Escherichia coli* under isobaric and dynamic high hydrostatic pressure. Innovative food science and emerging technologies 10: 391-395.
- S. Brula, and P. Cooteb. 1999. Review: Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. International Journal of Food Microbiology 50 (1999) 1–17
- Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G., 1999a. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. International Journal of Food Microbiology 51, 19– 30.
- Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G., 1999b. Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. IFT Annual Meeting Book of Abstracts, 1999, Session 83A-5.
- Cienfuegos-Jovellanos, E.; Pasamar, M.A.; Fritz, J.; Arcos, J.; Ramón, D.; Castilla, Y. 2007. Method for obtaining polyphenol-rich cocoa powder with a low fat content and cocoa thus obtained. WO 2007/096449.
- Cooper, K.A.; Campos-Gimenez, C.; Alvarez, D.J.; Rytz, A.; Nagy, K.; Williamson, G. 2007. Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. *J. Agric. Food Chem.* 56, 260-265.
- Cox S.D., C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bellh, J.E. Gustafson, J.R. Warmington and S.G. Wyllie. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology 2000, 88, 170–175
- Gabis, D.A. and Langlois, B.E. (1967) Effect of cocoa powder used in chocolate milk on bacterial growth. J. Dairy Sci. 5(1), 945.
- Hauben, K.J.A., Wuytack, E.J., Soontjens, C.F., Michiels, C.W., 1996. High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. Journal of Food Protection 59, 350–355.
- Kim T.J., Silva J.L., Weng W.L., Chen W.W., Corbitt M., Jung Y.S., Chen Y.S. 2009. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by water soluble muscadine seed extracts. International Journal of Food Microbiology 129: 295-299
- Marco A., Ferrer C., Velas L.M., Rodrigo D., Muguerza B., and Martínez A. 2011. Effect of Olive Powder and High Hydrostatic Pressure on the Inactivation of *Bacillus cereus* spores in a reference médium. Foodborne pathogens and Diseases. Online March 2011

Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2001a. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 64, 325– 332.

Morgan, S.M., Ross, R.P., Beresford, T., Hill, C., 2000. Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology* 88, 414–420.

Mosqueda-Melgar, J. et al. Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella* ENTERITIDIS, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric. *International Journal of Food Microbiology* 117:192-200. 2007.

Pina-Pérez M.C., A.B. Silva-Angulo, D. Rodrigo, A. Martínez-López. 2009. Synergistic effect of Pulsed Electric Fields and CoccoanOX 12% on the inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a mixed beverage of liquid whole egg and skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 130: 196–204

Rimondia S.P., Deirdre A.D., Monty S.D., Sylvie C., Marsh P.D. 2006. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Eur. J. Oral Sci.* 114: 343-348.

Terebiznik, M.R., Jagus, R.J., Cerrutti, P., De Huerdo, M., Pilosof, A.M.R., 2000. Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 63, 741– 746.

Urmenyi, A.M.C., Franklin, A.W. (1961). Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1, 313-315.

Weibull, W. (1951). A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, 51, 293–297.

WHO/FAO. 2008. Overview of a Risk Assessment Model for *Enterobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula. Ottawa, Ontario, Canadá.



*Capítulo V.6. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN ASOCIADA A *Cronobacter sakazakii* EN HOSPITALES POR CONSUMO DE FÓRMULA INFANTIL EN POLVO RECONSTITUIDA (RPIFM) TRATADA POR PEAI*

Publicaciones

Cronobacter sakazakii exposure assessment in hospital area of reconstituted powdered infant formula milk (RPIFM) treated by pulsed electric fields (PEF). M.C. Pina Pérez, D. Rodrigo, A. Martínez. Submitted for publication *Int J Food Microbiol*

Congresos

FOODINNOVA 2010

Cronobacter sakazakii Exposure Assessment at industrial level of reconstituted powdered infant formula milk (RPIFM) treated by High Hydrostatic Pressure.

M.C. Pina Pérez, D. Rodrigo, and A. Martínez López.

Innovations in Food safety

October 2010 Valencia (SPAIN)

V.6.1 Abstract

En el presente estudio se lleva a cabo una evaluación de la exposición (Nf) a *Cronobacter sakazakii* por consumo de fórmula infantil en polvo reconstituida en hospitales, y tratada por pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) (40kV/cm, 360 μ s). Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto la efectividad de esta tecnología como medida de control adicional, previa al almacenamiento refrigerado, obteniendo un producto seguro incluso para elevados niveles de contaminación inicial. Herramientas como la simulación de Monte Carlo, el bestfit y el análisis de sensibilidad nos permiten obtener valores más probables de *C. sakazakii* en el momento del consumo de la RPIFM por bebés, integrando la modelización matemática obtenida en capítulos previos. Este hecho contribuye a la toma de decisiones y propuesta de medidas de control necesarias para reducir el riesgo asociado a este microorganismo.

Palabras clave: Análisis de riesgos, *Cronobacter sakazakii*, hospitales, PEA, fórmula láctea infantil.

V.6.2. Introducción

Las fórmulas infantiles en polvo para lactantes (PIFM) han sido asociadas a casos de enfermedad grave y muerte debidos a la infección por *Cronobacter sakazakii*.

Reconociendo la necesidad de hacer frente a esos riesgos que conllevan las PIFMs, el Codex Alimentarius solicitó el asesoramiento científico particular de la FAO y la OMS, a través de sendas reuniones celebradas en 2004 y 2006 sobre *Cronobacter sakazakii*. La reunión llevada a cabo en 2006 realizó una evaluación preliminar del riesgo asociado a este microorganismo, que determinó la necesaria aplicación de un tratamiento bactericida en la fase de preparación/reconstitución de la PIFM (por ejemplo, reconstituir la PIFM con agua a una temperatura no inferior a 70 °C), así como otras medidas adicionales de control como la reducción del tiempo de almacenamiento, ó la adición de algún tipo de inhibidor o bioconservante.

Uno de los ámbitos de mayor riesgo en los que puede darse la infección de bebés por *C. sakazakii*, es el ámbito hospitalario (Kandhai y col., 2004; EFSA, 2004). En hospitales, es un a práctica habitual la preparación de grandes volúmenes de PIFM reconstituida (RPIFM) por los servicios de biberonería del área de neonatos, y que son posteriormente almacenadas en refrigeración hasta su ingesta por los bebés. Actualmente, algunos hospitales utilizan un tratamiento con vapor aplicado sobre la RPIFM como método adicional de control, previo al almacenamiento refrigerado, atendiendo así a las directrices de la FAO/OMS (2006).

Sin embargo, se ha puesto en tela de juicio el uso de agua muy caliente para la reconstitución de PIFM ó el uso de tratamientos a elevadas temperaturas sobre la PIFM ya reconstituida porque preocupa la pérdida de nutrientes sensibles al calor, la activación de esporas de *Bacillus cereus* u otras bacterias, y la aglomeración del polvo (FAO/OMS, 2006; Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas, 2001). Por ello, tanto la FAO/OMS como otros organismos de salud pública (AEP, 2008; EFSA, 2004; WHO/UNICEF, 2003), recomiendan en este sentido, la investigación en cuanto a la posible aplicación de métodos bactericidas alternativos sobre la RPIFM para reducir el riesgo de infección por *C. sakazakii*.

Una de las herramientas disponible para que una empresa u organización industrial pueda gestionar la inocuidad alimentaria y reducir el riesgo de su producto es la evaluación de riesgos industrial, que consiste esencialmente en una evaluación de la exposición en diferentes etapas del proceso de producción con el objetivo de deducir el número de microorganismos más probable que puede sobrevivir a una determinada medida de control.

V.6.3 Objetivos

Si consideramos el área de biberonería de los hospitales como una pequeña planta de procesado, el objetivo general del presente estudio es la realización de una evaluación de la exposición a *C. sakazakii* por bebés que consumen fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM) en el ámbito hospitalario. Como objetivos específicos se plantean determinar los valores de exposición en el momento de consumo, así como profundizar en la sistemática y metodología básicas para este fin y que puedan ser de aplicación en futuras valoraciones del riesgo asociado a este microorganismo.

V.6.4 Material y métodos

V.6.4.1 Planteamiento Inicial. Estructura de la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico industrial (IQMRA)

El proceso básico de **evaluación cuantitativa del riesgo** (QMRA) consta de las siguientes etapas:

- ✓ Identificación del peligro.
- ✓ Caracterización del peligro.
- ✓ Evaluación de la exposición
- ✓ Caracterización del riesgo

En el caso del IQMRA la etapa que requiere una mayor aportación de datos experimentales por parte de la comunidad científica es la evaluación de la exposición. Si el IQMRA se lleva a cabo centrado en el ámbito hospitalario basada en la preparación/ reconstitución y almacenamiento de PIFM en el área de biberonería, la etapa a desarrollar con mayor profundidad en el presente capítulo sería la evaluación

de la exposición a *C. sakazakii* en el momento de consumo de los biberones por los bebés, para conocer cuantitativamente el número final más probable de microorganismos (N_f), en algún momento antes del consumo

Entre los factores que deben tenerse en consideración para la evaluación de la exposición figuran (a) la contaminación inicial del producto, (b) los datos relativos a crecimiento y proliferación del patógeno en el alimento (modelización matemática de crecimiento); y (c) los niveles de inactivación o respuesta del microorganismo al tratamiento (modelización matemática de inactivación).

V.6.4.1.1 Hipótesis de partida

Como hipótesis de partida consideraremos las siguientes:

V.6.4.1.1.1 Condiciones iniciales

a) Concentración inicial de *C. sakazakii* en PIFM (H_0). Dentro del conjunto de datos relativos a niveles de concentración de *C. sakazakii* detectados en PIFM y recogidos en bibliografía, encontramos valores muy heterogéneos. Sin embargo, consideraremos los valores más elevados de los recogidos bibliográficamente, situándonos en el caso más desfavorable [0.36-0.66 (cfu/g)] (FAO/OMS, 2006).

b) Límites críticos de temperatura y tiempo de almacenamiento: 8°C, 24h (ESPGHAN, 2004; EFSA, 2004; FAO/OMS, 2006)

c) Volumen de RPIFM ingerido por toma: 100mL de RPIFM (FAO/OMS, 2008)

d) PIFM/toma: 13.8 g PIFM/100mL biberón (Nutribén Natal[®], Alter Farmacia, S.A)

e) N_f crítico ≥ 0.03 cfu/g ~ 0.414 cfu/toma (Codex Alimentarius, 2008)

f) Dosis infectiva: 10^2 cfu/día (Richarson y col., 2009)

V.6.4.1.1.2 Evolución de la concentración.

Para determinar el valor N_f más probable de *C. sakazakii* al que pueden estar expuestos los bebés alimentados mediante RPIFM en hospitales, expresado como (cfu/g) se ha utilizado la ecuación propuesta por el ICMSF (2002):

$$N_f = H_0 - \sum R + \sum I \quad \text{Ecuación V.6.1}$$

Donde N_f es el número final de microorganismos en algún momento antes del consumo; H_0 es la concentración inicial de *C. sakazakii* en PIFM (cfu/g); $\sum R$ representa el sumatorio de reducciones debidas a posibles tratamientos sobre la fórmula reconstituída (calor, bioconservantes, PEAI, etc); y $\sum I$ representa posibles incrementos por almacenamiento refrigerado de la fórmula. Mediante la simulación de Monte Carlo se obtiene el valor de N_f en términos probabilísticos.

V.6.4.1.1.3 Concentración inicial en PIFM (H_0)

Dada la heterogeneidad documentada en cuanto a valores de contaminación de PIFM por *C. sakazakii*, se ha realizado una revisión bibliográfica completa con el objetivo de seleccionar los valores de H_0 más elevados, y obtener la distribución de probabilidad que lo define. Esta función de distribución se utilizará en cada uno de los escenarios previamente descritos.

Los valores máximos de H_0 son recogidos por la FAO/OMS (2004) y están comprendidos en el intervalo [0.36-0.66 cfu/g]. La figura V.6.1 muestra la función de distribución para H_0 tras aplicar la herramienta BestFit (Palisade Corporation, SA).

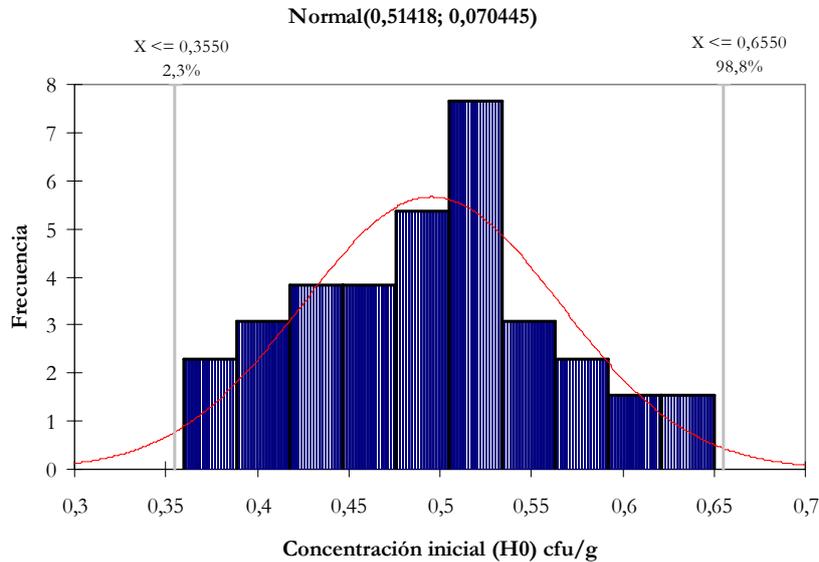


Figura V.6.1 Distribución de probabilidad proporcionada por la herramienta BesFit (@Risk Palisade Corporation, SA) que define la variable H_0 = concentración inicial (FAO/OMS, 2004)

Como se observa gráficamente la función de distribución que define el H_0 es una Normal con media 0.50 y desviación estándar 0.07, dónde la probabilidad de encontrar un $H_0 \leq 0.35$ es inferior al 2.3%, mientras la probabilidad de encontrar un valor en el intervalo 0.35 – 0.65 es del 96.5 %.

V.6.4.1.1.4 Reducciones en Hospitales. Inactivación de *C. sakazakii* por PEAI

El tratamiento por PEAI elegido para su posible aplicación en hospitales se corresponde con el que proporcionó el mayor nivel de inactivación, de acuerdo a los resultados del capítulo V.2: 40 kV/cm, 360 μ s con niveles de inactivación en torno a 1.24 ciclos logarítmicos

Se utiliza el modelo de Weibull (capítulo V.3) como modelo predictivo para determinar el número final de microorganismos tras el tratamiento. Como variables de entrada en el modelo se incluyen las definidas por distribuciones de probabilidad

obtenida mediante la herramienta BestFit (Palisade Corporation, S.A.), tal y como se presenta en la tabla 6.1.

Tabla V.6.1 Distribución de probabilidad que define la variable considerada para el tratamiento por PEAI

Variable	Distribución (Best Fit)
a (μs^{-1})	InvGauss(46.168; 88.287) Shift=+74,302

a = parámetro cinético de Weibull

V.6.4.1.2.5 Incrementos por almacenamiento de RPIFM a 8 y 10°C

En el presente estudio se han elegido temperaturas de almacenamiento de 8°C (temperatura crítica de refrigeración fijada por EFSA, 2004; ESPCHAN, 2004) y 10°C (en el caso de un posible almacenamiento a temperatura ligeramente superior a la crítica) y tiempos de almacenamiento no superiores a 24h, de acuerdo a las directrices de la FAO/OMS (2006).

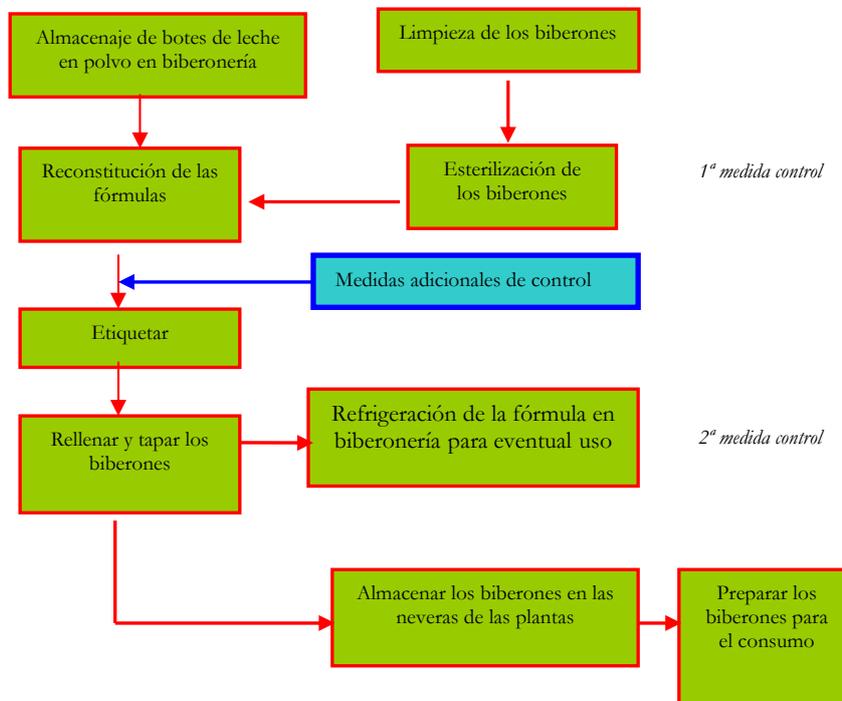
Se utiliza el modelo de crecimiento de Gompertz (capítulo V.1) para predecir el número final de microorganismos de *C. sakazakii*, en RPIFM, tras un periodo de incubación determinado. Las variables μ y λ del modelo de Gompertz, dependientes de la temperatura, se definen por distribuciones de probabilidad obtenida mediante la herramienta Bestfit, tal y como se presenta en la tabla V.6.2.

Tabla V.6.2 Distribuciones de probabilidad que definen las variables (inputs) consideradas en el crecimiento de *C. sakazakii* a diferentes temperaturas: 8 y 10°C.

Variable	Distribución (Best Fit)
μ (cfu/mL)/h	
8	RiskBetaGeneral(3.229; 2.075; 0.135; 0.170)
10	RiskBetaGeneral(1.753; 2.719; 0.623; 0.645)
λ (h)	
8	RiskExtvalue(77.655; 21.710)
10	RiskExtvalue(36.162; 8.318)

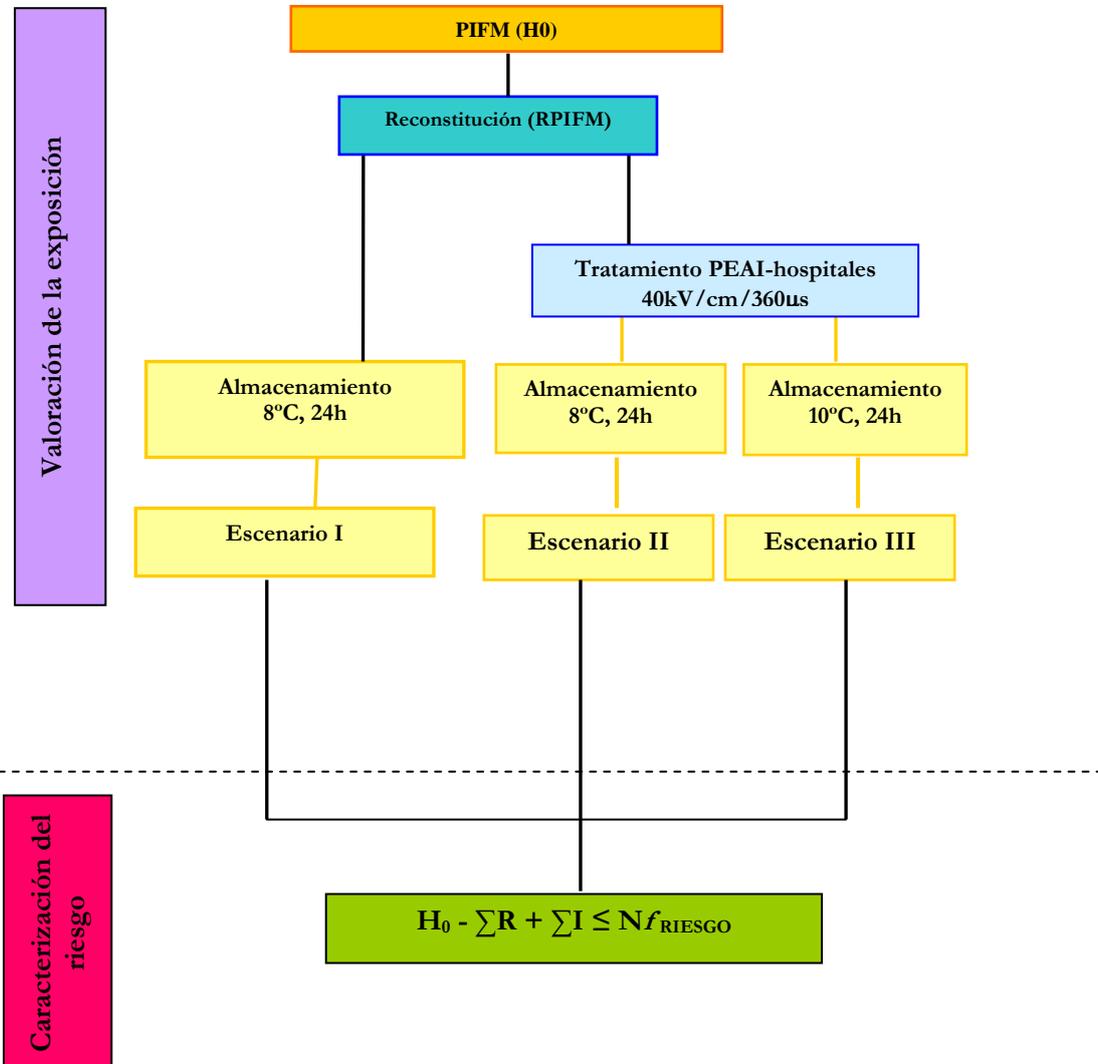
V.6.4.2 Escenarios de estudio

El esquema adjunto (esq. 6.1) representa un diagrama de flujo general de todas las actividades involucradas en la producción de las fórmulas infantiles en hospitales, desde el momento en que se reciben los envases de leche en polvo hasta que se obtiene el biberón con la fórmula lista para utilizarse (Vargás-leguás y col., 2009). En el diagrama se incluye el momento en el que se recomienda la aplicación de medidas adicionales de control (FAO/OMS, 2006), tras la reconstitución de la fórmula, y previo al almacenamiento refrigerado.



Esquema V.6.1 Diagrama representativo de reconstitución y procesado de PIFM en hospitales, hasta el momento de consumo (Vargás-leguás y col., 2009)

El esquema V.6.2 presenta un resumen de la evaluación a la exposición que llevaremos a cabo en el presente capítulo, y los escenarios que se proponen.



Esquema V.6.2 Escenarios de estudio en la evaluación de la exposición a *C. sakazakii* por consumo de RPIFM en hospitales

V.6.4.2.1 Escenario I. Reconstitución en hospital y almacenamiento 8°C, 24h

El presente escenario trata de reproducir las condiciones de reconstitución descritas por el Codex Alimentarius pero haciendo uso de agua temperatura ambiente para evitar los problemas asociados a la reconstitución a temperaturas > 70°C, y posteriormente, se almacena de acuerdo a las condiciones críticas de almacenamiento: 8°C, un máximo de 24h (EFSA, 2004).

V.6.4.2.2 Escenario II. Reconstitución en hospital, tratamiento por PEAI y almacenamiento 8°C, 24h

En el presente escenario se pretende determinar si la tecnología de PEAI podría resultar efectiva como medida de control alternativa a la reconstitución de la PIFM con agua caliente a > 70°C. Para ello la PIFM se reconstituye con agua estéril, a temperatura ambiente, y a continuación se trata por PEAI (40kV/cm-360µs), seguido del almacenamiento refrigerado a 8°C-24h (EFSA, 2004; Vargas-leguás, 2009).

V.6.4.2.3 Escenario III. Reconstitución en hospital, tratamiento por PEAI y almacenamiento 10°, 24h

Este escenario tiene como objeto evaluar el grado de repercusión que tiene un ligero aumento de temperatura sobre el valor final de la exposición a *C. sakazakii* en el momento de consumo, cuando la PIFM se reconstituye con agua estéril, a temperatura ambiente; se trata a 40kV/cm-360µs por PEAI; y se almacena a 10°C, 24h.

V.6.4.3 Software de análisis

En el presente estudio utilizaremos el software @Risk (Risk Analysis and Simulation Add-In for Microsoft® Excel Version 4.5. 2002, Palisade Corporation, USA). Mediante la herramienta BestFit podemos asignar distribuciones de probabilidad, que definan fielmente la incertidumbre de una variable. La simulación de Monte Carlo nos permite simular valores de N_f bajo diversas condiciones,

partiendo para ello de los modelos matemáticos que describen el crecimiento e inactivación del microorganismo. A través de la simulación de Monte Carlo y mediante el análisis de sensibilidad, se determinará la influencia que las variables de entrada del modelo (inputs) tienen en las variables de salida (outputs), expresando los resultados gráficamente mediante gráficos de “tornado”.

V.6.5 Resultados

V.6.5.2 Evaluación de la exposición en el escenario I

La tabla V.6.3 muestra el resultado de aplicar la simulación de Monte Carlo al producto reconstituido sin tratamiento bactericida o bacteriostático adicional, es decir $\Sigma R=0$.

Tabla V.6.3 Niveles de probabilidad (%) y valores N_f (cfu/g) obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario I para una RPIFM almacenada 8°C, 24h.

Escenario	Probabilidad	N_f (cfu/g)	Probabilidad	N_f (cfu/g)	Probabilidad	N_f (cfu/g)
ESCENARIO I	<5%	0.369	90%	0.51	>95%	0.659

Comparando los valores simulados con los recomendados como críticos por el Codex (2008) (N_f crítico = 0.03 cfu/g), se puede observar que los valores de N_f obtenidos superan el valor crítico recomendado, incluso para el percentil más bajo ($p < 5\%$).

El valor de la exposición neonatal por toma, en términos estocásticos, expresado como cfu/toma, para *C. sakazakii* en RPIFM se calculará de acuerdo a la ecuación propuesta por la FAO/OMS (2006):

$$\text{Exposición Neonatal / toma} = \text{PIFM (g/100mL)} * (100\text{mL/toma}) * N_f (\text{cfu/g}) \quad \text{Ec V.6.2}$$

donde PIFM es la cantidad de fórmula infantil en polvo expresada en g/toma; donde 1 toma son 100mL; y donde N_f es el número final de microorganismos, tras la

reconstitución y almacenamiento de la RPIFM, y en un determinado momento antes del consumo

La tabla V.6.4 muestra el resultado para el cálculo por toma.

Tabla V.6.4 Niveles de probabilidad (%) y valores de exposición por toma obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario I para una RPIFM almacenada 8°C, 24h.

Escenario	Probabilidad ad	Nf (cfu/toma)	Probabilidad ad	Nf (cfu/toma)	Probabilidad ad	Nf (cfu/toma)
ESCENARIO O I	<5%	4.98	90%	7.038	>95%	9.10

Considerando el valor crítico de exposición establecido por el Codex (2008) en 0.414cfu/toma, el resultado claramente indica que se sobrepasa en un mínimo de 10 veces (probabilidad < 5%) el valor recomendado. Estos resultados justifican la recomendación de la FAO/OMS en cuanto a la necesidad de aplicar medidas adicionales de tratamiento y control sobre la fórmula en polvo reconstituida, que permitan reducir la concentración de *C. sakazakii* a niveles inferiores al crítico.

V.6.5.3 Evaluación de la exposición escenario II.

En el presente escenario se utiliza PEAI como alternativa a la reconstitución a temperatura > 70°C.

La tabla V.6.5 muestra el resultado de aplicar la simulación de Monte Carlo tras el proceso de reconstitución, tratamiento y almacenamiento.

Tabla 6.5 Niveles de probabilidad (%) y valores Nf (cfu/g) obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario II para una RPIFM tratada por PEAI y almacenada a 8°C, 24h.

Escenario	Probabilidad	Nf (cfu/g)	Probabilidad	Nf (cfu/g)	Probabilidad	Nf (cfu/g)
ESCENARIO II	<5%	0.00079	90%	0.00829	>95%	0.0108

Comparando los valores de la simulación con los recomendados por el Codex (2008), se observa que con una probabilidad > 95% los valores de Nf (cfu/g) permanecen muy por debajo de 0.03 cfu/g.

La tala V.6.6 muestra el resultado cuando se aplica la ecuación V.6.2 para el cálculo de la exposición neonatal por toma (cfu/toma).

Tabla V.6.6 Niveles de probabilidad (%) y valores de exposición por toma obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario II para una RPIFM tratada por PEAI y almacenada a 8°C, 24h.

Escenario	Probabilidad	Valor exposición (cfu/toma)	Probabilidad	Valor exposición (cfu/toma)	Probabilidad	Valor exposición (cfu/toma)
ESCENARIO II	<5%	0.0108	90%	0.1146	>95%	0.149

Considerando el valor crítico de exposición establecido por el Codex (2008) en 0.03 cfu/g (414cfu/toma), podemos concluir del presente escenario, que se cumplen las recomendaciones en cuanto a N_f (cfu/g) y (cfu por toma), y que por tanto los PEAI resultan efectivos como método de control adicional.

Estos resultados abren la puerta a la introducción, en los servicios de biberonería de hospitales, de la tecnología de PEAI para pequeños volúmenes y condiciones fijas de tratamiento, ya que tendría una aplicación muy concreta. Aunque la EFSA (2004) propone la posible aplicación de nuevas tecnologías sobre la PIFM envasada, como por ejemplo la irradiación, no se han ensayado tratamientos por tecnologías no-térmicas de conservación como el propuesto, sobre el producto reconstituido y que tengan una posible aplicación en ámbitos tan expuestos a este riesgo potencial como son los hospitales

V.6.5.4 Evaluación de la exposición escenario III

La tabla V.6.7 muestra los resultados de la simulación de Monte Carlo en el supuesto de que la PIFM se reconstituya con agua estéril, a temperatura ambiente, sea tratada por PEAI y almacenada a 10°C, 3, 8, y 24h, con el objetivo de determinar cuánto tiempo puede una RPIFM permanecer almacenada a esa temperatura de ligero abuso, tras el tratamiento por PEAI, y cumpliendo los valores de N_f (cfu/g) recomendados por el Codex (2008).

Tabla V.6.7 Niveles de probabilidad (%) y valores N_f (cfu/g) obtenidos para *C. sakazakii* en el escenario III para una RPIFM tratada por PEAI y almacenada a 10°C, 24h.

Escenario	Probabilidad	N_f (cfu/g)	Probabilidad	N_f (cfu/g)	Probabilidad	N_f (cfu/g)
3h	<5%	0.011	90%	0.018	>95%	0.029
8h	<5%	0.157	90%	0.254	>95%	0.411
24h	<5%	3.265	90%	5.121	>95%	6.386

Los resultados de la tabla V.6.7 muestran que la tecnología de PEAI sería apta incluso en el caso de ligeros abusos de temperatura durante un tiempo de 3h. Es decir de 100 biberones tratados por PEAI y almacenados a 10°C – 3h, 95 de ellos tendrán un valor de N_f (cfu/g) \leq a 0.029. Sin embargo, los valores de N_f tras 24h de almacenamiento serán \leq 3.265 cfu/g con una probabilidad inferior al 5%, siendo $3.265 \leq N_f \leq 6.386$ en el 90% de los casos. Dichos valores se alejan en más de 100 veces de los recomendados como críticos para la RPIFM.

La tabla V.6.8 recoge los valores de exposición (Ec. V.6.2) calculados para RPIFM tratada por PEAI y almacenada 3 y 24h.

Tabla V.6.8 Valores de exposición (cfu/toma) a *C. sakazakii* en RPIFM tras un tratamiento a 40 kV/cm-360 μ s y posterior almacenamiento 10°C, 3 y 24h

Condición	Probabilidad	Valor exposición (cfu/toma)	Probabilidad	Valor exposición (cfu/toma)	Probabilidad	Valor exposición (cfu/toma)
PEAI+3h,10°C	<5%	0.152	90%	0.248	>95%	0.400
PEAI+24h,10°C	<5%	45.057	90%	70.668	>95%	88.1268

Teniendo en cuenta valores de H_0 elevados [0.36-0.66 (cfu/g)], ligeros aumentos en la temperatura de refrigeración, por encima de 8°C, con tiempos de almacenamiento de 24h, dan lugar a un producto reconstituido con valores muy elevados de exposición (cfu/toma) próximos a la dosis infectiva 10^2 cfu/día (Richardson y col., 2009). Este resultado pone de manifiesto la relevancia que tiene el realizar rigurosos controles de temperatura, ya que pequeños incrementos en este

factor, reducen considerablemente el tiempo de almacenamiento durante el cual se pueden garantizar niveles de *C. sakazakii* por debajo de los límites críticos.

V.6.5.5 Análisis de sensibilidad

Como ya se ha comentado en la presente tesis, mediante la herramienta de análisis de sensibilidad y gráficos de tornado, es posible obtener el efecto sobre la variable de salida (N_f), del valor de la variable de entrada, en nuestro caso: H_0 , tratamiento por PEAI, y temperatura de almacenamiento.

Los resultados del análisis de sensibilidad llevado a cabo para los escenarios II y III vienen recogidos en la figura V.6.2. Como puede apreciarse en los gráficos de tornado la variable que ejerce una mayor influencia sobre los valores finales de N_f es H_0 . Estudios previos (Reij et al., 2008, Pagotto and Farber, 2009) señalan que en el caso de RPIFM el factor de riesgo más influyente en una posible infección por *C. sakazakii*, es la concentración inicial del microorganismo, de ahí la importancia de aplicar algún tratamiento sobre la fórmula reconstituida, y adoptar las medidas y recomendaciones de la FAO/OMS (2006) en cuanto a manipulación, reconstitución y almacenamiento.

A continuación observamos que para el escenario II, cuando aplicamos un tratamiento de PEAI sobre la RPIFM, el tratamiento resulta ser el segundo factor de mayor influencia sobre el valor de N_f . Se ha demostrado que para las condiciones de almacenamiento consideradas como críticas, el tratamiento por PEAI resultaría efectivo en el control de *C. sakazakii* en hospitales. Cuanto más intenso es el tratamiento por PEAI, más bajos son los valores de N_f obtenidos. Finalmente, para el escenario III, se observa que un ligero aumento en la temperatura de refrigeración, hace que este factor adquiera una mayor influencia, por lo que serían necesarios tratamientos más intensos para contrarrestar posibles incrementos derivados de la proliferación del microorganismo. Si bien a 10°C, nos encontramos ante un almacenamiento en condiciones de abuso de temperatura, situación que es poco probable que se mantenga durante un periodo de tiempo prolongado en un hospital, a excepción de posibles fallos en los equipos.

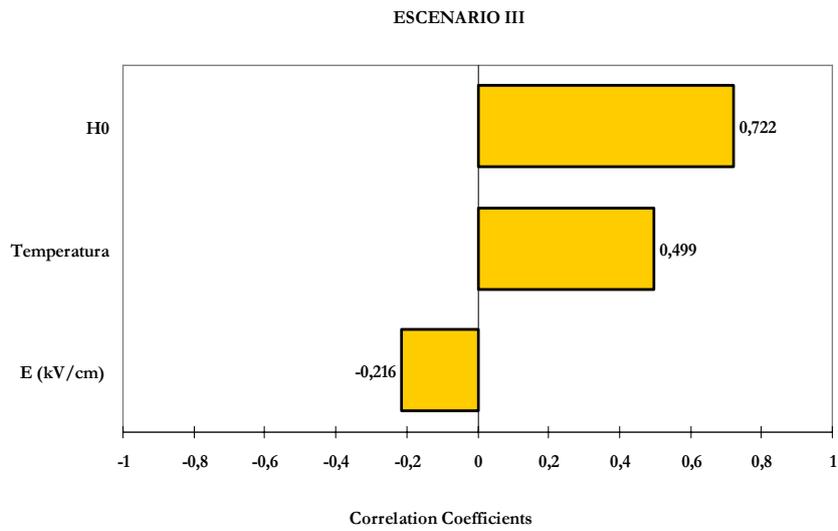
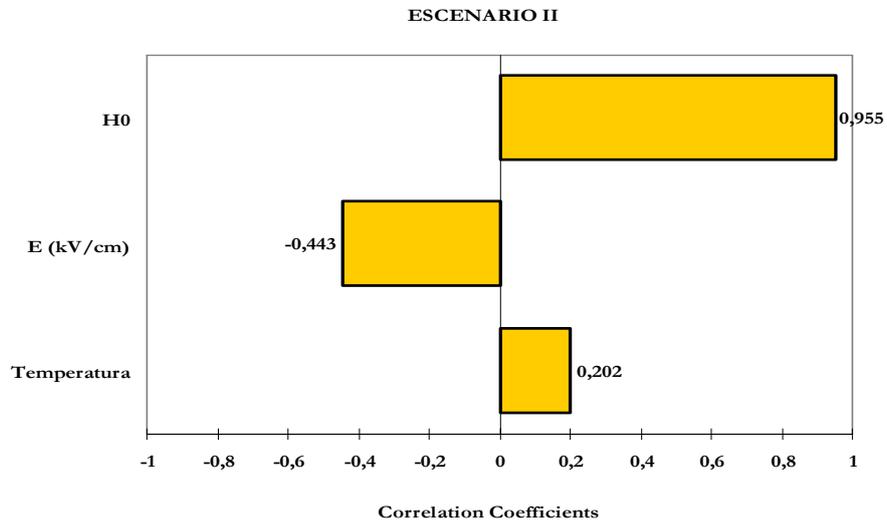


Figura V.6.2 Gráficos de tornado del análisis de sensibilidad llevado a cabo para los escenarios II y III estudiados.

V.6.6 Discusión

Debido a la búsqueda de tratamientos alternativos para garantizar no sólo la seguridad microbiológica de la RPIFM sino también la calidad nutricional de este producto, base de la alimentación de bebés en hospitales, en la presente tesis se ha estudiado el efecto de la tecnología de PEAI sobre *C. saakzakii*, desarrollando modelos de crecimiento e inactivación que expliquen la respuesta del microorganismo. Como colofón a estos estudios, en el presente capítulo se han llevado a cabo unos ejercicios de aplicación práctica de la información obtenida en capítulos previos (cap V.1 y cap. V.2) para profundizar en la metodología que nos pueda llevar a una evaluación cuantitativa de la exposición a nivel de proceso (reconstitución y almacenamiento) de la PIFM en hospitales.

El resultado del escenario I muestra la necesidad de aplicar un tratamiento sobre la RPIFM, tal como recomiendan las autoridades en salud pública, bien mediante un tratamiento térmico; ó mediante algún otro medio bactericida: adición de inhibidores, acidificantes, bioconservantes, entre otros, cuyas efectividades para este uso concreto, están todavía siendo estudiadas (FAO/OMS, 2006).

Para evitar los problemas de degradación de nutrientes que pueden aparecer como consecuencia de las elevadas temperaturas aplicadas sobre la RPIFM, y atendiendo así a la discusión de diversos organismos en este sentido (ESPGHAN, 2004; FAO/OMS, 2006; AEP, 2006) se planteó el uso de PEAI como sustituto del tratamiento térmico, situación que se analiza en el escenario II. Además, en el escenario III se plantea una situación límite en la que se almacena la fórmula a temperatura de 10°C, por ejemplo, por posibles fallos en los equipos de refrigeración

Como se ha comentado en el presente capítulo, los valores de dosis infectiva se sitúan en torno a 10² cfu/día (Richardson y col., 2009). Estos valores podrían ser letales en el caso de bebés inmunocomprometidos (Richardson y col., 2009). Teniendo en cuenta los datos publicados por la FAO/OMS (2008) en cuanto a ratios de consumo en hospitales, 8 tomas/día, para niños menores de 1 mes, y con valores medios de 100mL/toma, es posible realizar estimaciones del riesgo a partir de los resultados de la evaluación a la exposición obtenidos en el presente capítulo.

La tabla V.6.9 recoge una comparación de los valores de probabilidad de infección diaria, partiendo de los valores de N_f ($p = 90\%$) obtenidos en los diferentes escenarios estudiados, teniendo en cuenta la dosis infectiva, patrones de consumo, y la ecuación de infectividad propuesta por Reij y col (2009) para *C. sakazakii* en RPIFM.

Tabla V.6.9 Probabilidad de infección por *C. sakazakii* en bebés alimentados mediante 8 biberones diarios de RPIFM con valores de N_f (cfu/toma) obtenidos en la simulación de Monte Carlo para los escenarios estudiados

Escenario	Condiciones	N_f (cfu/g)	N_f (cfu/toma)	Exposición diaria (cfu)	Probabilidad Infección*
Escenario I	RPIFM+24h, 8°C	0.51	7.038	56.304	3.84%
Escenario II	RPIFM+PEAI+24h,8°C	0.00079	0.114	0.915	0.064%
Escenario III	RPIFM+PEAI+3h, 10°C	0.018	0.248	1.987	0.14%
Escenario III	RPIFM+PEAI+24h, 10°C	5.121	70.668	565.350	32.6%

* $P_{inf} = 1 - e^{-(r \cdot N_t)}$; siendo $N_t = N_f$ (cfu/toma) * 8 tomas/día; y r el factor de infectividad para *C. sakazakii* ($r = 0.0007$) obtenidos de acuerdo a modelos dosis- respuesta (Reij y col., 2009).

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla se observa que el uso de temperaturas superiores a la crítica ($>8^\circ\text{C}$) y/o el almacenamiento prolongado de la RPIFM (escenario III), que constituyen 2 prácticas relativamente frecuentes por ejemplo en ámbitos domésticos (Nazarowec-White y Farber, 1997), elevan considerablemente la probabilidad de infección por este microorganismo, superando incluso la dosis infectiva al cabo de 1 día (10°C- 24 h). Este resultado enfatiza las importantes recomendaciones de la FAO/OMS (2006) en cuanto a *tiempo y temperaturas de almacenamiento* (anexo II), siendo la temperatura recomendada de 5°C, con un valor crítico de 8°C; y el tiempo de almacenamiento máximo, para las RPIFM refrigeradas, de 24h.

Sin embargo, la reconstitución de la PIFM a temperatura ambiente y posterior tratamiento por PEA, permite obtener un producto cuyos valores de N_f (cfu/toma) y probabilidad de infección al cabo del día (6.4 casos/millón), son muy bajos, cumpliendo con los valores recomendados por las autoridades de salud pública (Codex, 2008). Por tanto, del presente capítulo se desprende la aplicabilidad de esta

tecnología como método alternativo al tratamiento térmico utilizado actualmente (tratamientos con vapor ó reconstituciones a $T^a > 70^{\circ}\text{C}$), para garantizar niveles de *C. sakazakii* que permanezcan por debajo de los valores críticos recomendados tras un almacenamiento a 8°C , 24h.

V.6.7 Conclusiones

En el presente capítulo se ha llevado a cabo una evaluación de la exposición a *C. sakazakii* en bebés alimentados mediante RPIFM. Para ello se han integrado los modelos matemáticos que definen el crecimiento y la inactivación del microorganismo, en simulaciones de Monte Carlo obteniendo el número final de microorganismos (N_f), en términos estocásticos, cuando la PIFM es reconstituida y almacenada en áreas de biberonería de hospitales, y teniendo en cuenta la posible aplicación de la tecnología de PEAI como alternativa al tratamiento térmico.

V.6.8 Referencias

- Asociación española de pediatría (AEP). 2008. Manual de lactancia materna. De la teoría a la práctica. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 9788479039721
- Bar-Oz, B., Preminger, A., Peleg O., Block, G., and Arad I. 2001. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. Acta Pediatr 90(3): 356-358.
- CAC (Codex Alimentarius Commission). 2004. Report of the 36th session of the Codex Committee on Food Hygiene ALINORM 04/27/13. Appendix III: Definitions to be included in the procedure manual.
- CAC. 2007 Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Management. Document CAC/GL 63 (2007). Available at www.codexalimentarius.net/download/standards/10741/CXG_063e.pdf
- CAC (Codex Alimentarius Commission). 2008. Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children' was adopted with Annex I and Annex II
- Drudy D., MullaneM., Quinn N.R., Wall T., Fanning P.G. 2006. Enterobacter sakazakii: an emerging pathogen in powdered infant formula. Clin Infect. Dis. 42: 996-1002.
- ESPGHAN Committee on Nutrition. Preparation and Handling of powdered Infant Formula: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. JPedGastroenterologyandNutrition. 2004;39:320-2.
- EFSA. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazard on the request from the Commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. EFSA journal 113, 1-35.
- FAO/WHO. 2004. Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Geneva. <http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/feb2004/en/>
- FAO/WHO. 2006. Meeting on *Enterobacter sakazakii* and Salmonella in powdered infant formula. Rome. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/>.
- FAO-WHO. Comisión del Codex Alimentarius. Anteproyecto de código de prácticas de higiene para la fórmula en polvo para lactantes y niños pequeños en el trámite 3. CX/FH 06/38/7. Septiembre de 2006.
- FAO/OMS. 2008. Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formula. Meeting report. Microbiological risk assessment series. FoodQuality and Standards Service. Rome, Italy
- Farber J.M. 2004. Enterobacter sakazakii-new foods for thought ? Lancet 363: 5-6.

- International Commission on Microbiological specification for foods. 2002. Selection of cases and attribute plans, chap 8. In *Micrroorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety*
- Iversen C., and Forsythe S. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, 14: 443-454.
- Kandhai M.C., Reij M.W. Gorris L.G.M., Guillaume-Gentil, O. and van Schothorst M. 2004. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *The Lancet*, 363: 39-40.
- Lai K.K. 2001. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. *Medicine*, Mar 80(2) : 113-122.
- Nazarowec-White M., and Farber J.M. 1997. *Enterobacter sakazakii*: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 34: 103-113.
- Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *J Food Prot* **2003**; 66:370-5.
- Pina-Pérez M.C., D. Rodrigo Aliaga, C. Ferrer Bernat, M. Rodrigo Enguidanos, A. Martínez López. 2007. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk *International Dairy Journal* 17: 1441-1449
- Reij MW., Jongenburger I., Gkogka E., Gorris L.G.M., Zwietering M.H. 2009. Perspective on the risk to infants in the Netherlands associated with *Cronobacter* spp. occurring in powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology* 136: 232-237.
- Richardson A.S., Lambere S., and Smith M.A. 2009. Neonatal mice as models for *Cronobacter sakazakii* infection in infants. *Journal of Food Portection* 72(11): 2363-2367.
- Simmons B.P., Gelfand M.S., haas M., Metts L and Feguson J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infectious in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infection Conrol and Hospital Epidemiology*, 10: 389-401.
- Trabazo R.L. y Tojo Sierra R. 2001. Guías prácticas sobre nutrición. Alimentación en el lactante. Series Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas, 54: 145-159.
- Van Acker J., de Smet F., MuyldeImans G., Bougatef A., Naessens A., Lauwers S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 293-297.
- Van Schothorst, M. 1998. Principles for the establishment of microbiological food safety objectives and related control measures. *Food Control*. 9:379-384.
- Vargas-Leguás H., Rodríguez Garrido V., Lorite Cuenca R., Pérez-Portabella C., Redecillas Ferreiro S. y Campins Martí M. 2009. Guía para la elaboración de fórmulas infantiles en polvo en l medio hospitalario. Sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico. *Anales de Pediatría* 70(6): 586-593.

Walls, I. 2006. Role of quantitative risk assessment and food safety objectives in managing *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Meat Sci* 74: 66-75.

WHO/UNICEF [United Nations Children's Fund]. 2003. Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño. OMS, Ginebra. Véase: http://www.who.int/nutrition/publications/gi_infant_feeding_text_spa.pdf



VI. DISCUSIÓN GENERAL

VI. DISCUSIÓN GENERAL

En la presente tesis se ha abordado la problemática del *Cronobacter sakazakii* en fórmulas lácteas infantiles, tanto bajo el punto de vista de la reconstitución partiendo de producto en polvo como de la fórmula líquida procesada en industria.

Como se ha indicado a lo largo de la tesis, *Cronobacter sakazakii* puede contaminar la fórmula infantil en polvo y su ingesta por el bebé en concentraciones no muy altas (hasta 0.36-0.66 cfu/g; FAO/OMS, 2006), produce problemas de salud importantes con un desenlace muchas veces fatal. Este problema como indicó EFSA en 2006 es particularmente importante en el ambiente hospitalario, ya que si el microorganismo está presente en la fórmula en polvo, y se dan las condiciones de temperatura adecuadas para el crecimiento ($> 8^{\circ}\text{C}$), crece con rapidez como se ha visto en el capítulo V.1 de la presente tesis, y sus tiempos de latencia relativamente cortos. Esta información es tremendamente valiosa como sustento a las recomendaciones realizadas por los organismos de salud pública con respecto al estricto cumplimiento de los periodos y temperaturas de almacenamiento de la fórmula infantil reconstituida (EFSA, 2004; Codex Alimentarius, 2008). Como medida de control adicional a la refrigeración, tanto FAO como WHO recomiendan que la fórmula infantil se rehidrate a una temperatura superior a 70°C con agua estéril. Sin embargo, de acuerdo a diferentes estudios bibliográficos (AEP, 2008; ESPGHAN, 2004), estos niveles de temperatura pueden ocasionar pérdidas importantes de nutrientes lo cual va en claro detrimento de la calidad nutricional del biberón.

En la búsqueda de alternativas al tratamiento recomendado y de acuerdo a los resultados del capítulo V.3, se ha visto que los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI) producen suficientes reducciones logarítmicas en el número de *C. sakazakii* inoculado en fórmula infantil en polvo reconstituida. Este es el primer estudio que se lleva a cabo con esta tecnología para este producto y microorganismo en concreto (Pina et al., 2007), y abre unas perspectivas interesantes para la introducción de la tecnología a nivel hospitalario. Debemos pensar que la sección de biberonería de un hospital es como una planta de procesado en miniatura en la que se deben seguir todas las buenas prácticas de higiene y procesado que rigen para cualquier planta de

procesado industrial. Un aspecto importante y que es necesario tener en cuenta cuando se pretende introducir una nueva tecnología sustituyendo a otra que está bien establecida, es la posibilidad de producir daño subletal. Los resultados del capítulo V.4 muestran que los PEAI cuando se aplican con intensidades bajas, son capaces de producir un elevado número de células dañadas. Además, cuando el producto tratado se almacenó a temperaturas de refrigeración se observó un incremento en la inactivación conseguida. Estas células dañadas se comportaron como especialmente sensibles ante medidas adicionales de control, como en este caso la refrigeración (temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$) post-tratamiento, incrementando los niveles de inactivación inicialmente conseguidos por PEAI, por el hecho de interponer otra barrera más al crecimiento del microorganismo.

Una variante de las fórmulas infantiles son las fórmulas de continuación “follow-up formulas” destinada a bebés que han sobrepasado los seis meses de edad. Entre los productos pertenecientes a este grupo, se encuentran diferentes fórmulas comerciales, en cuya formulación puede estar incluido el cacao. Estas fórmulas con cacao van dirigidas a bebés mayores de un año. El cacao, como ingrediente rico en polifenoles, ha mostrado una gran capacidad de inactivación de *Cronobacter sakazakii* cuando se combina con PEAI y de inhibición del microorganismo, sobre todo si la adición se lleva a cabo después de que el producto haya sido pasteurizado por PEAI. En consecuencia se puede considerar como una medida de control adicional en fórmulas líquidas, penadas para bebés a partir de los 6 meses.

En un estudio sobre fórmulas infantiles, como es el llevado a cabo en la presente tesis, es preciso pensar en alternativas para las fórmulas líquidas. La fórmula líquida se suele usar en hospitales en bebés que han de ser alimentados por vía nasogástrica. No es necesario comentar lo importante que es mantener unos niveles de *C. sakazakii* por debajo de los críticos en estos casos.

A nivel industrial se debe tener mucho cuidado en la preparación de la fórmula líquida garantizando un nivel de seguridad y un alto contenido nutricional, que en el caso de los productos comerciales obtenidos mediante tratamiento UHT se ve bastante comprometido. Con esta idea en mente se aborda la posibilidad de aplicar las altas presiones en la preparación de la fórmula líquida a nivel industrial. Los resultados

obtenidos han sido esperanzadores ya que se han conseguido reducciones importantes en el número de *C. sakazakii* inoculado, al mismo tiempo que se ha podido definir el modelo matemático que mejor interpreta las curvas de inactivación mediante esta tecnología.

De igual manera que para los PEAI se ha intentado ver la existencia de posible daño subletal pero mediante una aproximación proteómica, observándose cambios en la expresión proteica en función de la intensidad del tratamiento. En general estos cambios se han asociado a reparaciones de daño subletal (Aersten y col., 2004; Riedel y col., 2007). Este hecho abre la puerta a la necesidad de llevar a cabo estudios en los que se investigue sobre posibles variaciones de virulencia mediante una aproximación a la técnica de cultivos celulares.

Uno de los avances más interesantes que se han llevado a cabo en la presente tesis es una evaluación de riesgos al entorno industrial. La evaluación de riesgos ha sido tradicionalmente una herramienta que proporciona informes o datos que el gestor en seguridad alimentaria puede usar en la toma de decisiones. Sin embargo, como se ha podido ver en la presente tesis (capítulo V.6) es también una herramienta potente que permite la toma de decisiones a nivel de planta de procesado. Como se ha comentado con anterioridad la sección de biberonería de un hospital se puede considerar como una pequeña planta de procesado. A través de ella y mediante simulación de Monte Carlo se han podido ensayar diferentes escenarios y ver la repercusión que cada uno de ellos puede tener sobre la inocuidad de los biberones y el peligro de los bebés frente al *C. sakazakii* presente en fórmulas deshidratadas. Para ello ha sido necesario desarrollar un modelo de Evaluación de la exposición que integre los modelos matemáticos predictivos de inactivación y crecimiento identificados en capítulos anteriores. En base a los resultados de este análisis podemos concluir que el escenario de aplicación de PEAI como medida de control adicional sobre la fórmula reconstituida proporciona suficiente protección para el bebé alimentado en ámbito hospitalario. También refuerza la necesidad de que esta herramienta sea implantada en el entorno industrial.



VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

PRIMERA. La refrigeración es una medida muy efectiva para el control del crecimiento de *C. sakazakii*. Al pasar de 37 a 8°C de temperatura de almacenamiento los valores de λ aumentan de 0.834h a 113h y los valores de μ disminuyen de 0.924 a 0.027 (h⁻¹). La temperatura de 4°C inhibe la proliferación de este microorganismo durante al menos 25 días

SEGUNDA. El modelo matemático al que mejor se ajustaron los resultados de crecimiento de *C. sakazakii* en las distintas condiciones estudiadas fue el modelo de Gompertz.

TERCERA. En el caso de PEAI el modelo matemático predictivo que mejor ajustó las curvas de supervivencia fue el modelo de Weibull, ya que para la inactivación por esta tecnología las curvas presentaron colas. En el caso de la aplicación de APH, las curvas de supervivencia fueron sigmoidales, siendo el modelo matemático de Baranyi el que mejor ajustó los datos experimentales.

CUARTA. Existe una influencia del substrato en la efectividad de los tratamiento tanto por PEIA como por APH, siendo mayor la inactivación alcanzada en agua de peptona tamponada que en fórmula infantil reconstituida (RPIFM).

QUINTA. Independientemente del nivel energético aplicado, el tratamiento por PEIA de células de *C. sakazakii* da lugar a la aparición de células subletalmente dañadas, en un porcentaje que depende de la intensidad de campo eléctrico, siendo menor cuanto mayor es dicho campo eléctrico.

SEXTA. La máxima inactivación alcanzada por el tratamiento mediante PEAI de la RPIFM se consigue para la intensidad de campo que más daño subletal produce (15kV/cm, 3000 μ s) y tras un almacenamiento de 24h a 8°C.

SÉPTIMA. La adición de polvo de cacao (CCX) incrementó los niveles de inactivación por PEAI de *C. sakazakii* siendo máximo el obtenido para la concentración de 5% de CCX (1.399 ciclos log₁₀).

OCTAVA. El momento de adición de CCX, antes o después del tratamiento, influye significativamente en la inactivación final de *C. sakazakii* tratado por PEAI y

VII. CONCLUSIONES

almacenado 12h a 8°C, alcanzando los niveles de reducción máximos cuando se añadió el CCX 4h tras el tratamiento por PEAI.

NOVENA. La aplicación progresiva de barreras (tiempo y temperatura de almacenamiento, y adición de ingredientes naturales con capacidad antimicrobiana) de forma adecuada permite triplicar los niveles de inactivación para *C. sakazakii* conseguidos por PEAI en fórmulas lácteas infantiles.

DÉCIMA. Los resultados de la evaluación a la exposición, haciendo uso del BestFit y la simulación de Monte Carlo, ponen de manifiesto la aplicabilidad de la tecnología de PEAI como método de control alternativo a la recosntitución a temperaturas elevadas, permitiendo mantener los niveles de *C. sakazakii* por debajo de los críticos durante 24h a 8°C, y 3 h a 10°C.

UNDÉCIMA. Como conclusión general podemos decir que tanto los PEAI como las APH son tecnologías de conservación que podrían sustituir al tratamiento térmico de la fórmula infantil en polvo reconstituida (RPIFM), tanto en hospitales (PEAI) como en fórmulas líquidas elaboradas en industria (APH). La aplicación de estos procesos seguidos de una refrigeración adecuada permitiría disponer de productos estables durante un largo tiempo con un mínimo detrimento de las propiedades nutricionales tremendamente importantes considerando la población a la que va destinado el producto.



VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aleman, G.D., Ting, E.Y., Mordre, S.C., Hawes, A.C.O., Walker, M., Farkas, D.F. and Torres, J.A., 1996, Pulsed ultra high pressure treatments for pasteurization of pineapple juice. *J Food Sci*,61: 388–390.

American Academy of Paediatrics. Working group on breastfeeding.1997.*J Pediatr*. 100: 1.035-1.039.

Amialai, M. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg products using pulsed electric field. Tesis Doctoral. Department of Bioresource Engineering, MacDonald Campus, McGill University, Montreal, Quebec. Páginas 192

Amiali, M., Ngadi, M. O., Smith, J. P., & Raghavan, G. S. V. 2007. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering*, 79, 689–694.

Aronsson, K ; Lidgren, M ; Johansson, R ; Ronner, U. 2001. Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. [Innovative Food Science and Emerging Technologies](#), 2: 41-54

Arroyo, C., Cebrián G., Pagán R. y Condón S. 2010. Resistance of *Enterobacter sakazakii* to pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 314-321

Asociación Española de Pediatría. Lactancia materna: guía para profesionales. Comité de Lactancia materna de la. Monografía de ala AEP nº 5. ISBN: 84-8473-277-0 Barcelona, 2004.

Asociación española de pediatría (AEP). 2008. Manual de lactancia materna. De la teoría a la práctica. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 9788479039721

Baranyi, J., T. A. Roberts, and P. McClure. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10: 43–59.

Baranyi, J., and T. A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 23:277–294.

Baranyi, J., T. Ross, T. A. McMeekin, and T. A. Roberts. 1996. Effects of parameterization on the performance of empirical models used in “predictive microbiology.” *Food Microbiol.* 13:83–91.

Barbosa-Cánovas G.V., Pothakamury U.R., Palou E., Swanson B.G. 1999. *Nonthermal Preservation of Foods*, Marcel Dekker, New York, p 276.

VIII.BIBLIOGRAFÍA

- Barbosa-Cánovas G.V. and Q.H. Zhang.2001. *Pulsed Electric Fields in Food Processing: Fundamental Aspects and Applications*. Food Preservation Technology Series.Technomic Publishing Co., Inc. XXII 268 ppISBN 1-566767-83-
- Bar-Oz, B., Preminger, A., Peleg O., Block, G., and Arad I. 2001. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Pediatr* 90(3): 356-358.
- Barco, E. 2001. Tesis Doctoral. Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiano para *Escherichia coli* O157:H7. Validación en productos cárnicos cocidos envasados al vacío. Universidad de Córdoba.
- Berg, T.2000. Development of the Codex Standard for Contaminants and Toxins in Foods in *International Standards for Food Safety*, N. Rees and D. Watson, eds., Aspen publishers, Gaithersburg, Maryland
- Biering, G., Karlsson, S., Clark, N.C., Karlsson, Jonsdottir, K.E., Ludvigsson, P., & Steingrimsson, O. 1989. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**(9): 2054-2056.
- Bigelow, W.D., Esty, J.R., 1920. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *Journal of Infectious Diseases* 27, 602–617
- Block C, Peleg O, Minster N, et al. 2002. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*; 21:613–6.
- Bowen A.B. and Braden C.R. 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerg. Infect. Dis.* 12; 1185-1189
- Bozoglu F., Alpas H., and Kaletunç G. 2004. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 40, 243- 247.
- Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., Joosten, H.M. 2003) Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 967-973.
- Buchanan R. L. and Klawitter L. A. 1992.The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* vol. 9, nº3, pp. 185-196.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253
- Busta FF and Peck ML. Antimicrobial effect of cocoa on *Salmonellae*. *Appl Microbiol* 1968;16:424–425.

Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G., 1999. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 51, 19– 30.

Castillejo-Rodríguez, A.M., Barco-Alcalá E., García-Gimeno, R.M. y Zurera-Cosano, G. 2000. Growth modelling of *Listeria monocytogenes* in packaged fresh green asparagus. *Food Microbiol.*, 17, 421-427.

Ceylan E., Daniel Y. C. Fung, J. R. Sabah 2004. Antimicrobial activity and synergistic effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling "*Escherichia coli*" O157:H7 in apple juice. *Journal of food science*, ISSN 0022-1147, Vol. 69, 102-106

Chang, H.-W. 1995. Antibacterial effect of spices and vegetables. *Food Ind. (ROC)*, 27 (9), 53-61.

Chen H. and Hoover D. G. 2003. Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. *International Journal of Food Microbiology* 87: 161– 171

Codex Alimentarius. 1972. Codex standard for infant formula. Codex standard 72-1981. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp NOTE: This standard is in the process of being revised

Codex Alimentarius Commission (CAC) 1999. Principles and guidelines for the conduct of a microbiological risk assessment. FAO, Rome. CAC/GL-30.

CAC (Codex Alimentarius Commission). 2004. Report of the 36th session of the Codex Committee on Food Hygiene ALINORM 04/27/13. Appendix III: Definitions to be included in the procedure manual.

Codex Alimentarius Commission (CAC).2006. Draft principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management (MRM) at Step 8. Report of the 38th session of the Codex Committee on Food Hygiene, Alinorm 07/30/13 Appendix IV. FAO, Rome. <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp>

CAC/RCP 66 – 2008. Código de Prácticas de higiene para los preparados en polvo para lactantes y niños pequeños. Pág: 1-27.

CAC. Norma para preparados para lactantes y preparados para usos medicinales especiales destinados a los lactantes. STAN 72-108.

Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children was adopted with Annex I1 and Annex III2 at the 31st Session of the Codex Alimentarius commission (Geneva, 30 June–4 July 2008).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Cole, M.B., Davies, K.W., Munro, G., Holyoak, C.D., Kilsby, D.C., 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 232–237.

Cowan M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiologic Reviews*, 12(4): 564–582

Cramariuc R., Tudorache A., Popa M.E., Branduse E., Nisiparu L., Mitelut A., Turtoian M.O., and Fotescu L. 2008. Corona discharge in Electroporation of cell membranas. *Jorunal of Physics*, 142: 012062

Davidson, P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM, Washington, pp. 520–556.

Delgado B, Palop A, Fernandez PS, et al. 2004. Combined effect of thymol and cymene to control the growth of *Bacillus cereus* vegetative cells. *Eur Food Res Technol* ;218:188–193.

Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International of Dairy Journal*, 14, 273–285.

Dimler S.R., Bexley D.V., Waverly, D.D.V., Terrence, B.M., Reynoldsburg, D.L.M., Gahanna; Simpson, J.M., Ohio, W. 1995. Aseptic Processing of Infant Formula. U.S. Patent 5.378.488

Drudy D., Mallans N.R., Quinn T., Wall P.G., and Fanninn S. 2006. *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in Powdered Infant Formula. *Food safety*, 42: 996-1002.

Dutreux, N., Notermans, S., Witjzes, T., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (2000). Pulsed electric fields inactivation of attached and free living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions. *International Journal of Food Microbiology* 54, 91-98.

Edelson-Mammel, S.G. and Buchanan, R.L. 2004. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *Journal of Food Protection*, 67: 60-63.

European Food Safety Authority (EFSA). 2004. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *EFSA Journal* 113, 1-35.

http://www.efsa.europa.eu/en/science/biohaz/biohaz_opinions/691.html

Fabio A, Cermelli C, Fabio G, Nicoletti P, Quaglio P. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytother Res.* 2007;21: 374-377.

FAO/WHO.2004. *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes. Informe de la reunión. Serie de Evaluación de Riesgos Microbiológicos. n°6. ISBN: 92-5-305164-7. 2004.

FAO/WHO. 2006. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report, Microbiological Risk Assessment Series 10.

FAO/WHO. 2006. Paoli M.G. and Hartnett, E. Overview of a Risk Assessment Model for *Enterobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula. Decisionalysis Risk Consultants, Inc. Ottawa, Ontario, Canada K1H6S3.

FAO-WHO. Comisión del Codex Alimentarius. Anteproyecto de código de prácticas de higiene para la fórmula en polvo para lactantes y niños pequeños en el trámite 3. CX/FH 06/38/7. Septiembre de 2006.

FAO/OMS. 2006. Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes: directrices

Farmer JJ III, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ, the Enterobacteriaceae Study Group (USA) 1980. "*Enterobacter sakazakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens". *Int J Syst Bacteriol* 30: 569–84.

Fernández, A., J. Collado, L.M. Cunha, M.J. Ocio, and A. Martínez. 2002. Empirical model building base don Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperatura on termal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *Int. J. Food Microbiol* 77: 147-153.

Ferrer, C., Rodrigo, D., Pina, M.C., Klein, G., Rodrigo, M. and Martínez, A. 2006. The Monte Carlo simulation is used to establish the most influential parameters on the final load of pulsed electric fields *E.coli* cells. *Food Control* (18): 934-938.

Ferrer C., Ramón D., Mugüerza B., Marco A., and Martínez A. 2009. Effect of Olive Powder on the growth and inhibition of *Bacillus cereus*. *Foodborne pathogens and disease.* 6(1): 33-37.

Fetteman,JC 1923 The electrical conductivity method of processing milk. *Agriculture and Engineering* 9 (1928), pp. 107–108.

Financial food. Las ventas de los alimentos infantiles. Periódico mensual del comercio, distribución e industria de la alimentación y bebidas. N° 192, Abril, 2008.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- García, D., Gómez, N., Condon, S., Raso, J., Pagan, R., 2003. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 36, 140–144.
- García, D., Gómez, N., Manas, P., Condon, S., Raso, J., Pagan, R., 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology* 99, 94–104.
- García, D., Manas, P., Gómez, N., Raso, J., Pagan, R., 2006. Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *Journal of Applied Microbiology* 100, 428–435.
- Gibson, A., Bratchell, N. y Roberts, T. 1988. Predicting microbial growth : growth responses of salmonellae in a laboratory medium affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 155-178.
- Gásková D., Sigler K., Janderova B., and Plasek J. 1996. Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing killing efficiency. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 13: 195-202.
- Gill, A.O., Holley, R.A. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied Environmental Microbiology*. 70: 5750-5755.
- Gómez, A. 2004. Cap.6 Inconvenientes de la lactancia artificial. ISBN: 84-8473-277-0. Asociación española de pediatría. pp.:59-77.
- Góngora-Nieto, M. M., Sepúlveda, D. R., Pedrow, P., Barbarosa-Clanovas, G. V., & Swanson, B. G. 2002. Food processing by pulsed electric fields treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 375–388.
- Grahl, M., Märkl, H. 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiology and Technology* 45, 148-157.
- Griffin S. Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure. *Physic Bulletin*. 1979;30:262.
- Guide to Using @RISK. *Risk Analysis and Simulation Add-In for Microsoft® Excel* Version 4.5 February, 2002
- Hammer KA, Carson CF, and Rillea TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. *J App Microbiol* 86:985–990
- Hauben, K. J. A., E. Y. Wuytack, C. C. F. Soontjens, and C. W. Michiels. 1996. High-pressure transient sensitisation of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *J. Food Prot.* 59: 350–355.

Havelaar A.H. and Zwietering M. 2004. On the risk of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula. Letter to the editor. *Trends in Food Science & Technology* 15, 99-100.

Heinz, V., & Knorr, D. 2000. Effect of pH, ethanol addition and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus subtilis* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 151–159.

Herrero M., and Romero D. 2006. Innovaciones en el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas. *Revista Med Universidad de Navarra*, 50, n° 4: 71-74.

Himmelright, I., E. Harris, V. Lorch, and M. Anderson. 2002. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula—Tennessee, 2001. *JAMA* 287:2204–2205.

Hite, 1889. B.H. Hite, The effect of pressure in the preservation of milk. *W. Virginia Univ. Agric Exp. Sta. Morgantown Bull.* 58 (1889), p. 15.

Ho, S.Y., Mittal, G.S., Cross, J.D., Griffith, M.W. 1995. Inactivation of *P. fluorescens* by high voltage electric pulses. *Journal of Food Science* 60(6), 1337-1340.

Hülshager, H., Potel, J., Niemann, E.G. 1983. Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics* 22, 149-162.

Hurrell, R.F., and Carpenter, K.J. 1977. "Mechanisms of heat damage in proteins. 8. The role of sucrose in the susceptibility of protein foods to heat damage". *British J. Nutr.* 38

Indrawati, Arroqui, C., Messagie, I., Nguyen, M. T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. 2004. Comparative study on pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid in model systems and in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 485-492.

Iversen, C., and Forsythe, S.J. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant formula. *Trends in Food Science and Technology*. 14: 443-454.

Iversen, C., Druggan, P., and Forsythe, S.J. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*. *International Journal of Food Microbiology*. 96(2): 133-139.

Iversen C, Mullane N, Barbara McCardell, *et al.* 2008. "Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C.*

VIII. BIBLIOGRAFÍA

dublinensis sp. nov. subsp. lausannensis subsp. nov., and C. dublinensis sp. nov. subsp. lactaridi subsp. nov." *IJSEM*.

Jaeger H., Schutz A., Karapetkova N., Knorr D. 2009. Protective effect of milk constituents and sublethal injuries limiting process effectiveness during PEF inactivation of *Lb. rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology* 134: 154-162.

James S.J. 2003. Developments in domestic refrigeration and consumer attitudes *International Institute of Refrigeration Bulletin* 5: 5-17 ISSN 0020 69-70.

Jayaram, S., Castle, G.S.P., Maragaritis, A. (1992). Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* by the application of high voltage pulses. *Biotechnology and Bioengineering* 40(11), 1412-1420.

Jeantet et al., 1999 R. Jeantet, F. Baron, F. Nau, M. Roignant and G. Brulé, High intensity pulsed electric fields applied to egg white: effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation, *Journal of Food Protection* 62 (12) (1999), pp. 1381–1386.

Jeyamkondan, S., Jayas, D. S., & Holley, R. A. 1999. Pulsed electric field processing of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62, 1088–1096.

Jofré A., Champomier-Vergés M., Anglade P., Baraige F., Martín B., Garriga M., Zagorec M., and Aymerich T. 2008. Protein synthesis in lactic acid and pathogenic bacteria during recovery from a high pressure treatment. *Research in Microbiology* 158: 512-520.

Kajer R. 2009. Infant formula safety. *Pediatrics* 2002;110;833-835

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

Kalchayanand, N., A. Sikes, C. P. Dunne, and B. Ray. 1998. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.* 15:207–214.

Kalchayanand, N., A. Sikes, C. P. Dunne, and B. Ray. 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4174–4177.

Klotz B., Mañas P., and Mackey B.M. 2009. The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 137: 214-220.

- Kotzekidou P., Gianakidis P., Boulamatsis A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT* 41, 119-127.
- Lázaro A. Almarza y Marín-Lázaro Juan F.. 2008. Capítulo II. Alimentación el lactante sano. ISBN: 84-8473-277-0. Asociación española de pediatría. pp.:11-16.
- Lehner A, Riedel K, Eberel L, Breeuwer P, Diep B, Stephan R. 2005. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signalling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *J Food Prot* ; 68:2287-94.
- Linton, R. H., W. H. Carter, M. D. Pierson, and C. R. Hackney. 1995. Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. J. *Food Prot.* 58: 946-954.
- López-Malo A, Alzamora SM, and Guerrero SN. 2000. Natural antimicrobials from plants. In: Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental Aspects and Applications. Alzamora SM, Tapia MS, and López-Malo A (eds). MD: Aspen Publishers pp. 237-263.
- López LMT. 2006. Tomillo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Fitoterapia*, ;25(1): 74-77.
- Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, and I. Leguerinel. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 107-113.
- Maguna FP, Romero AM, Garro OA, Okulik NB. Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet). Facultad de Agroindustrias, UNNE, Argentina.2006. (Consultado: 9 oct 2008). Disponible en: http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas_/2006-E-057.pdf.
- Marquez V., Mittal G., Griffiths M. 1997. Destruction and inhibition of bacterial spores by pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 62: 399-401.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 64, 325- 332.
- McDonald, C.J., Lloyd, S.W., Vitale, M.A., Petersson, K., Innings, F., 2000. Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm. *J. Food Sci.* 65, 984-989

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- McMeekin, T.A., J.N. Olley, T. Ross, D.A. Ratkowsky, 1993. Predictive Microbiology: Theory and Application. Wiley, New York.
- Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. y McMeekin, T.A. 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. Int. J. Food Microbiol., 38, 133-142.
- Molinari P., Pilosof AM.R.R, Jagus R.J. 2004. Effect of growth phase and inoculum size on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in fruit juices, by pulsed electric fields. Food Research International 37, 793-798.
- Monforte G. P., Marti A. F. y Abizanda. S. S. 2005. Capitulo I. Alimentación del recién nacido pretérmino. ISBN: 84-8473-277-0. Asociación española de pediatría. pp.:11-16.
- Mosqueda-Melgar, J. et al. 2007. Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella* ENTERITIDIS, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric. International Journal of Food Microbiology 117:192-200.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., and Martín-Belloso, O. 2008. Combination of high intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivation pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. Food Microbiology 25: 479- 491
- Muytjens, H.L., H. Roelofs-Willemse, G.H. Jaspas, 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 26(4), 743-746.
- Muytjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, Kollee LA, Wachsmuth IK, Farmer JJ III. 1983. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. J Clin Microbiol ; 18:115-20.
- Nauta M., Hill A., Rosenquist H., Brynestad S., Festch A., van der Logt P., Fazil A., Christensen B., Katsma E., Borck B., and Havelaar A. 2009. Review: A comparison of risk assessment on *Campylobacter* in broiler meat. International Journal of Food Microbiology: 129: 107-123.
- Nazarowc-White, M. and Farber J.M. 1997A. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. Letters in Applied Microbiology, 24: 9-13.
- Nazarowec-White, M. McKellar, R.C., and Piyasena, P. 1999. Predictive modelling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. Food Research International, 32: 375-379.

Nerbrink, E., Borch, E. Blom, H. y Nesbakken, T. 1999. A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, Na Cl, Na-lactate and Naacetate. *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 99-109.

Ogihara H., Yatuzuka M., Horie N., Furukawa S., and Yamasaki M. 2008. Synergistic effect of high hydrostatic pressure treatment and food additives on the inactivation of *Salmonella enteritidis*. *Food Control*.

OMS/UNICEF [United Nations Children's Fund]. 2003. Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño. OMS, Ginebra. Véase: http://www.who.int/nutrition/publications/g5_infant_feeding_text_spa.pdf

Organización Mundial de la Salud en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes-Directrices. ISBN 9789243595412. Suiza, 2007.

Pagan, R. and Mackey, B. 2000. Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells : differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2829-2834.

Pagan, R., Jordan, S., Benito, A. and Mackey, B. 2001 Enhanced acid sensitivity of pressure-damaged *Escherichia coli* O157:H7 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1983-1985.

Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, Farber JM. 2003. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *J Food Prot* ; 66:370-5.

Pagotto F.J., and Farber J.M. 2009. *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): Advice, policy and research in Canada. *International Journal of Food Microbiology* 136: 238-245.

Patricio Talayero, J. M. 2004. Aspectos históricos de la alimentación al seno materno. Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. ISBN: 84-8473-277-0. Pág: 7-27.

Patricio Talayero, J. and Lasarte Velillas J.J. 2008. Guía rápida de lactancia materna. Comité de lactancia materna de la AEP. www.aesped.es

Patterson, M. F., and D. J. Kilpatrick. 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *J. Food Prot.* 61:432-436

Peleg, M. 1995. A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67(1), 93-99.

VIII.BIBLIOGRAFÍA

- Peleg, M., & Cole, M. B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 353–380.
- Peleg, M., and M. B. Cole. 2000. Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatments. *J. Food Prot.* 63: 190–195.
- Perni S., Chalise P.R., Shama G., Kong M.G. 2007. Bacterial cells exposed to nanosecond pulsed electric fields show lethal and sublethal effects. *International Journal of Food Microbiology* 120, 311-314
- Pin, C., García de Fernando, G.D., Ordoñez, J.A. Baranyi, J. 2002. Analysing the lag-growth rate relationship of *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 197-201.
- Pina, M.C., D. Rodrigo, E. Blesa, M.J. Pagan, and A. Martínez. Evaluation of mathematical models for microbial growth of *Enterobacter sakazakii*. Poster communication. 2007. Predictive modelling in foods 5th International Conference Predictive Modelling in Foods.ICPMF.September 16-19, 2007 ATHENS - GREECE
- Pina-Pérez, M.C., Silva-Angulo, A.B, Rodrigo, D., and Martínez A. 2009. Synergistic effect of Pulsed Electric Fields and CocoonOX 12% on the inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a mixed beverage of liquid whole egg and skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 196-204
- Pina-Pérez, M.C., Rodrigo D., Martínez A. 2009. Sub-lethal damage in *Cronobacter sakazakii* subsp. *Sakazakii* cells after different pulsed electric field treatments in infant formula milk *Food Control* 20: 1145-1159.
- Poschet F, Geeraerd A.H., Scheerlinck N., Nicola. B.M., Van Impe J.F. 2003. Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. *Food Microbiology*, 20: 285-295.
- Pothakamury U.R., Monsalve-González, A., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. 1995. Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Research International* 28 (2) 167-171
- Qin BL, Pothakamury UR, Vega H, Martín O, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. Food pasteurization using high-intensity pulsed electric field. *Food Technol* 1995;49:55– 60.
- Raso J and Barbosa-Canovas GV. 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit Rev Food Sci Nutr*;43:265–285.
- Ratkowsky, D.A., J. Olley, T.A. McMeekin, A. Ball. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol* Vol 149(1), 1-5.

- Reij M.W., Jongenburger I., Gkogka E., Gorris L.G.M. and Zwietering M.H. 2009. Perspective on the risk to infants in the Netherlands associated with *Cronobacter spp.* occurring in powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology* 136: 232-237.
- Real Decreto 1.408/92, de 20 de noviembre 1992, sobre la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y preparados de continuación (BOE de 13 de enero de 1993).
- Rivas, A., Sanpedro, F., Rodrigo, D., Martínez, A., and Rodrigo, M. 2006. Nature of the inactivation of *Escherichia coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *European Food Research and Technology* 223 (4), 541-545.
- Rodrigo, D., Ruiz, P., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., Rodrigo, M. 2003. Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 81, 223-229
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.
- Ross, T., and T.A. McMeekin. 1996. Predictive Microbiology. *Inter J Food Microbiol*, 23, 241-264.
- Ross, T., P. Dalgaard, and S. Tienungoon. 2000. Predictive modelling of the growth and 575 survival of *Listeria* in fishery products. *Inter J Food Microbiol*. 62: 231-245
- Russell, N.J., Colley, M., Simpson, R.K., Trivett, A.J., Evans, R.I., 2000. Mechanism of action of pulsed high electric field (PHEF) on the membranes of food-poisoning bacteria is an 'all-or-nothing' effect. *International Journal of Food Microbiology* 55, 133-136.
- Saldaña G., E. Puértolas, S. Condón, I. Álvarez and J. Raso. 2009. Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in media of different pH. *Innovative food science and emerging technologies*. In press
- Sampedro F., Rivas A., Rodrigo D., Martínez A., Rodrigo M. 2006. Effect of temperature and substrate on PEF Inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice–milk beverage. *Eur Food Res Technol* (2006) 223:30-34
- Sarriá Ruiz, Beatriz. Efectos del tratamiento térmico de fórmulas infantiles y leche de vaca sobre la biodisponibilidad mineral y proteica. Tesis Doctoral. Instituto de Nutrición y Bromatología. Facultad de Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. 1998

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Shaker R., Osaili T., Al-Omary W., Jaradat Z., Al-Zuby M. 2007. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* spp. from food and food production environments. *Food Control* 18 (2007) 1241–1245
- Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L. And Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 10: 398-401.
- Simpson R.K., Whittington R., Earnshaw R.G. and Russell N.J. 1999. Pulsed high electric field causes “all or nothing” membrane damage in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, but membrane H⁺ - ATPase is not primary target. *International Journal of Food Microbiology* 48: 1-10.
- Somolinos M., Mañas P., Condón S., Pagán R., and García D. 2008. Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* sublethally injured cells after Pulsed Electric Fields. *International Journal of Food Microbiology* 125: 352-356.
- Stewart C., Jewett F.F., Dunne P.C., and Hoover D.G. 1997. Effect of current high hydrostatic pressure acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, 17: 23-36.
- Sudjana AN, D’Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley TV, and Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:461–463.
- Suzuki, C. and Suzuki, K. 1962. The protein denaturation by high pressure. *J Biochem.* 52:67-71
- Torres, J. A., & Velazquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67, 95e112.
- WHO (World Health Organization). 2004. The global strategy for infant and young child feeding. Available at http://www.who.int/child-adolescent-health/new_publications/nutrition/gsiycf.pdf.
- USFDA (US Food and Drug Administration), Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2002. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. Available at <http://www.cfsan.fda.gov/comm/mmesakaz.html>. Accessed August 2002.
- US Food and Drug Administration. Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>. Accessed 13 January 2005.

- Urmenyi AMC, Franklin AW. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1961; 1:313–5.
- USFDA (US Food and Drug Administration), Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2002. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>. Consultado en agosto de 2002.
- Valero M and Salmeron MC. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int J Food Microbiol* 2003;83:73–81.
- van Boekel, M.A.J.S., 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 139–159.
- Van Impe, J.F., Bernaerts, K., Geeraerd, A.H., Poschet, F., Versyck, K.J., 2001. Modelling and prediction in an uncertain environment. In: Tjjskens, L.M.M., Hertog, M.L.A.T.M., Nicola, B.M. (Eds.), *Food Process Modelling*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 156–179.
- Vargas-Leguás H., Rodríguez Garrido V., Lorite Cuenca R., Pérez-Portabella C., Redecillas Ferreiro S. y Campins Martí M. 2009. Guía para la elaboración de fórmulas infantiles en polvo en el medio hospitalario. Sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico. *Anales de PEDIATRIA* 70(6): 586-593.
- Vose D. 2006. *Risk Analysis: A Quantitative Guide*. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons.
- Walls, I. 2006. Role of quantitative risk assessment and food safety objectives in managing *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Meat Sci* 74: 66-75.
- Willis J, Robinson JE. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7:196–9.
- Whiting, R.C., 1995. Microbial modeling in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 467–494.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L., 1997. Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid eggs. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 111–125
- Whiting R, Carrington, C., Hicks J., Dennis S., and Buchanan R. 2003. Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes*. Among Selected Categories of Ready-to-Eat-Foods.
- Wouters, P.C., Glaasker, E. and Smelt, J.P.P.M. (1998) Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to protein in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 509-514.

VIII.BIBLIOGRAFÍA

Xiong, R., G. Xie, A. S. Edmondson, R. S. Linton, and M. A. Sheard. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiol.* 16:269–279.

Zook, C. D., M. E. Parish, R. J. Braddock, and M. O. Balaban. 1999. High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juice. *J. Food Sci.* 64:533–535.

Zwietering, M.H., I. Jongenburger, F.M. Rombouts, and K. van't Riet, 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56, 1875-1881.



IX. ANEXOS



Anexo I. NORMATIVA DE APLICACIÓN

ANEXO I. NORMATIVA DE APLICACIÓN

Codex Alimentarius Commission. 1972. Codex standard for infant formula. Codex standard 72-1981. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp NOTE: This standard is in the process of being revised.

Codex Alimentarius Commission, 14th Session. 1981. *Report of the 17th Session of the Codex Committee on Food Hygiene*. Alinorm 81/13. Rome: Food and Agriculture Organization.

CAC (Codex Alimentarius Commission). 2004. Report of the 36th session of the Codex Committee on Food Hygiene ALINORM 04/27/13. Appendix III: Definitions to be included in the procedure manual.

CAC. 2007. Norma del Codex para Preparados para Usos Medicinales Especiales destinados a los Lactantes (CODEX ALINORM 07/30/26, Apéndice II). (se adoptará en julio de 2007).http://www.Codexalimentarius.net/download/report/669/al30_26s.pdf

Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children' was adopted with Annex I1 and Annex III2 at the 31st Session of the Codex Alimentarius commission (Geneva, 30 June–4 July 2008).

Directiva 2006/141/CE de la Comisión de 22 de diciembre de 2006 relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE

Directiva 2006/125/CE de la Comisión, de 5 de diciembre de 2006, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. Diario Oficial de la Unión Europea número L 339 de 6 de diciembre de 2006.

European Commission. Health & Consumer Protection. Guidance document on the implementation of procedures based on the HACCP, and on the facilitation of the implementation of the HACCP in certain food bussines. Brussels, 16 November 2005.

European Food Safety Authority. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from thE Commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. EFSA Journal 113, 1-35.

FAO. Código internacional de prácticas recomendado-principios generales de higiene de los alimentos. CAC/RCP 1-1969, Rev 4. 2003. 8.

FAO-WHO. Comisión del Codex Alimentarius. Anteproyecto de código de prácticas de higiene para la fórmula en polvo para lactantes y niños pequeños en el trámite 3. CX/FH 06/38/7. Septiembre de 2006. 9.

FAO/OMS. 2006. Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes: directrices. ISBN: 978 92 4 359541 2

FAO/WHO. Report of the second session of the codex ad hoc intergovernmental task force on antimicrobial resistance. July 2009. Rome.

ICMSF. 1988. *Microorganisms in Foods 4. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to Ensure Microbiological Safety and Quality*. London: Blackwell Scientific Publications.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (2002). *Microorganisms in Food 7. Microbiological Testing in Food Safety Management*. Kluwer Academic/Plenum, NY.

NACMCF. 1998. Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. *J. Food Protect.* 61:1246–1259.

OMS [Organización Mundial de la Salud]. 1981. Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna. Disponible en la dirección: <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241541601.pdf>.

REGLAMENTO (CE) No 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria

WHA [Asamblea Mundial de la Salud]. 2005. Resolución WHA58.32 sobre Nutrición del lactante y del niño pequeño

Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes

DIRECTRICES

El presente documento ha sido publicado por el Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria, de la OMS, en colaboración con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
E-mail: foodsafety@who.int
Sitio web: www.who.int/foodsafety

© Organización Mundial de la Salud, 2007



Organización
Mundial de la Salud

PREPARACIÓN, ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN EN CONDICIONES HIGIÉNICAS DE PREPARACIONES EN POLVO PARA LACTANTES (PPL) – DIRECTRICES

RECOMENDACIONES

Uso de preparaciones para lactantes

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

Requisitos generales

1. Cada institución dispondrá de directrices escritas sobre la preparación y la manipulación de PPL.
2. Se vigilará la aplicación de las directrices.
3. El personal encargado de preparar las PPL estará plenamente adiestrado en relación con las directrices y con los requisitos de higiene en la preparación de alimentos.
4. Las PPL preparadas en entornos asistenciales tendrán una trazabilidad completa.

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

Limpieza y esterilización del material de preparación y administración de PPL

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

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

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

3. Después de lavar el material, se enjuagará debidamente con agua limpia.

4. Esterilización: si se utiliza un esterilizador comercial, se seguirán las instrucciones del fabricante. Si se esteriliza el material por ebullición:

a. Se llenará un recipiente grande con agua y se sumergirá por completo todo el material, velando por que no queden burbujas de aire atrapadas en el interior.

b. Se cubrirá el recipiente con una tapadera y se dejará hervir el agua fuertemente, cuidando de que no llegue a evaporarse por completo.

c. Se mantendrá el recipiente cubierto hasta que se necesite usar el material.

5. Se lavarán las manos concienzudamente con agua y jabón antes de extraer el material del esterilizador o el recipiente en el que ha hervido. Se recomienda utilizar pinzas esterilizadas para manipular el material de preparación y administración esterilizado.

6. Para impedir la recontaminación, lo mejor es extraer el material justo antes de utilizarlo. Si no se utiliza inmediatamente, habrá que cubrirlo y guardarlo en un lugar limpio. Los biberones pueden ensamblarse por completo para evitar que se contaminen una vez esterilizados el interior de la botella y el interior y el exterior de la tetina.

Preparación de tomas a partir de PPL

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

1. Se limpiará y desinfectará la superficie sobre la cual vaya a prepararse el alimento.
2. Se lavarán las manos con agua y jabón y se secarán con un paño limpio o un paño de un solo uso.
3. Se hervirá un volumen suficiente de agua limpia. Si se utiliza un hervidor automático, habrá que esperar hasta que éste se desconecte; de lo contrario, habrá que asegurarse de que el agua hierva con fuerza. Nota: el agua embotellada no es estéril y debe hervirse antes de utilizarla. Nunca se usarán hornos microondas para preparar PPL, pues el calentamiento no es uniforme y puede dar lugar a “bolsas calientes” capaces de quemar la boca del bebé.
4. Cuidando de no quemarse, se verterá la cantidad apropiada de agua hervida, que se habrá dejado enfriar ligeramente, aunque no por debajo de 70 °C, en una taza o un biberón limpio y esterilizado. La temperatura del agua se comprobará mediante un termómetro esterilizado.
 - a. Si se prepara un lote en un recipiente grande, éste habrá sido limpiado y esterilizado. No tendrá más de 1 litro de capacidad, estará fabricado con un material compatible con los alimentos y soportará líquidos calientes.
5. Se añadirá al agua la cantidad exacta de PPL con arreglo a las instrucciones de la etiqueta. Usar más o menos cantidad de polvo de la indicada puede hacer enfermar al lactante.
 - a. Si se usan biberones: se ensamblarán las piezas limpias y esterilizadas de los biberones de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agitarán o moverán suavemente hasta que el contenido esté perfectamente mezclado, cuidando de evitar las quemaduras.
6. Se enfriarán rápidamente las tomas hasta la temperatura adecuada para su administración manteniéndolos bajo el chorro del grifo o colocándolos en un recipiente de agua fría o agua con hielo. Se cuidará de que el nivel del agua esté por debajo del de la tapadera de la taza o el biberón.

Preparación de tomas con antelación

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

1. Se seguirán los pasos de 1 a 6
2. Se introducirán las tomas previamente enfriadas en un frigorífico de uso exclusivo. La temperatura del frigorífico no superará los 8 °C y se controlará todos los días.
3. Las tomas podrán almacenarse en el frigorífico durante un máximo de 24 horas.

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

Tiempos de espera y de administración

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

La prolongación de los tiempos de administración suele estar asociada a un mayor riesgo, debido al posible crecimiento bacteriano. Ese riesgo aumenta cuando la temperatura ambiente es más cálida (30°C y 35°C). Sin embargo, cuando las PPL se reconstituyen con agua a 70°C o más, el riesgo se reduce espectacularmente. Esta conclusión tiene repercusiones prácticas para la reducción del riesgo de infección por *E. sakazakii* en el caso de los lactantes que se alimentan lentamente y el de los que viven en climas cálidos en los que la temperatura ambiente de la habitación puede hallarse en torno a los 35°C .



Anexo III. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Available online at www.sciencedirect.com

International Dairy Journal 17 (2007) 1441–1449

INTERNATIONAL
DAIRY
JOURNALwww.elsevier.com/locate/ijdair

Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk

M.C. Pina Pérez, D. Rodrigo Aliaga, C. Ferrer Bernat,
M. Rodrigo Enguidanos, A. Martínez López*

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, C.S.I.C., P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 15 June 2006; accepted 23 April 2007

Abstract

The effect of high-intensity pulsed electric field (PEF) treatment on the survival of *Enterobacter sakazakii* suspended in buffered peptone water (BPW) and powdered infant formula milk (IFM) was evaluated. Reference medium and IFM samples were treated with PEF. Electric field intensity and treatment time were varied from 10 to 40 kV cm⁻¹ and from 60 to 3895 μs, respectively. Samples of buffered peptone water (3 g L⁻¹) and IFM were inoculated with *E. sakazakii* (CECT 858) (10⁹ cfu mL⁻¹) and then treated with PEF. The inactivation data were adjusted to the Weibull frequency distribution function and Bigelow model, and constants were calculated for both substrates. A maximum 2.7 log (cfu mL⁻¹) reduction was achieved in BPW after exposure of *E. sakazakii* to PEF for 360 μs (2.5 μs pulse width) at 40 kV cm⁻¹. In IFM, exposure of *E. sakazakii* to PEF, with the same conditions, led to a 1.2 log (cfu mL⁻¹) reduction. The greater the field strength and treatment time, the greater the inactivation achieved in both substrates. Even though further research will be necessary, according to the results, there are good prospects for the use of PEF in hospitals to achieve safe reconstituted infant formula before storage at refrigerated temperatures.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Infant formula milk; Pulsed electric fields; *Enterobacter sakazakii*; Inactivation kinetics

1. Introduction

There are now many foods specifically manufactured for infants less than 1 year old and young children aged between 1 and 3. These foods which differ in compositions and manufacturing processes are intended to satisfy the specific nutritional requirements of these subgroups of the population.

Since infants and young children are known to be particularly vulnerable to food-borne infections, the microbiological safety of these products is of utmost importance.

Epidemiological studies have implicated *Enterobacter sakazakii* as an occasional contaminant of powdered infant formula milk (IFM) and this causes, on occasion, life-threatening sepsis, neonatal meningitis, bacteraemia,

necrotizing enterocolitis (NEC) and necrotizing meningitis after ingestion (Muytjens & Kollee, 1990).

Urmenyi and Franklin (1961) reported the first two known cases of neonatal meningitis and septicaemia caused by *E. sakazakii*, described at that time as a yellow pigmented *E. cloacae* strain. Jöker, Northolm, and Sjöbor (1965) reported an additional case of meningitis caused by a yellow-pigmented *E. cloacae* strain. In 1980, the name *E. sakazakii* was proposed for this new species by Farmer, Asbury, Hickman, and Brenner (1980).

While *E. sakazakii* has caused disease in all age groups, the great majority of cases are seen in infants less than 6 months old. Approximately, 50 cases have been reported world wide in infants less than 60 days old (Iversen & Forsythe, 2003), although under-reporting is suspected. The data for these infants are incomplete, but most of them were premature (gestation <37 weeks) and had a low birth weight, below 2500 g (Codex, 2003; Lai, 2001). Although premature infants and those with underlying medical

*Corresponding author. Tel.: +34 96 390 00 22; fax: +34 96 363 63 01.
E-mail address: conami@ata.csic.es (A.M. López).

Pressure Inactivation Kinetics of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula Milk

M. C. PINA PÉREZ,¹ D. RODRIGO ALIAGA,² D. SAUCEDO REYES,¹ AND A. MARTÍNEZ LÓPEZ^{1*}

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, C.S.I.C., P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain; and ²Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot, Valencia, Spain

MS 07-094: Received 21 February 2007/Accepted 9 May 2007

ABSTRACT

Survival curves of *Enterobacter sakazakii* inactivated by high hydrostatic pressure were obtained at four pressure levels (250, 300, 350, and 400 MPa), at temperatures below 30°C, in buffered peptone water (BPW; 0.3%, wt/vol) and infant formula milk (IFM; 16%, wt/vol). A linear model and four nonlinear models (Weibull, log-logistic, modified Gompertz, and Baranyi) were fitted to the data, and the performances of the models were compared. The linear regression model for the survival curves in BPW and IFM at 250 MPa has fitted regression coefficient (R^2) values of 0.940 to 0.700, respectively, and root mean square errors (RMSEs) of 0.770 to 0.370. For the other pressure levels, the linear regression function was not appropriate, as there was a strong curvature in the plotted data. The nonlinear regression models with the log-logistic and modified Gompertz equations had R^2 values of 0.960 to 0.992 and RMSE values of 0.020 to 0.130 within pressure levels of 250 to 400 MPa, respectively. These results indicate that they are both better models for describing the pressure inactivation kinetics of *E. sakazakii* in IFM and BPW than the Weibull distribution function, which has an R^2 minimum value of 0.832 and an RMSE maximum value of 0.650 at 400 MPa. On the other hand, the parameters for the Weibull distribution function, log-logistic model, and modified Gompertz equation did not have a clear dependence on pressure. The Baranyi model was also analyzed, and it was concluded that this model provided a reasonably good fit and could be used to develop predictions of survival data at pressures other than the experimental pressure levels in the range studied. The results provide accurate predictions of survival curves at different pressure levels and will be beneficial to the food industry in selecting optimum combinations of pressure and time to obtain desired target levels of *E. sakazakii* inactivation in IFM.

Epidemiological studies have implicated *Enterobacter sakazakii* as an occasional contaminant of powdered infant formula milk (IFM) that can cause a rare but life-threatening form of sepsis, neonatal meningitis, bacteremia, necrotizing enterocolitis, and necrotizing meningoencephalitis after ingestion (34, 36). The first outbreak of *E. sakazakii* linked to powdered infant formula from a previously unopened can was in 2001 (11, 24). Reported outcomes are often severe: seizures, brain abscess, hydrocephalus, developmental delay, and death in as many as 40 to 80% of cases. Premature infants are thought to be at greater risk than more mature infants, other children, or adults, and outbreaks of disease have occurred in hospital units for newborns. Although *E. sakazakii* has caused disease in all infant age groups, the great majority of cases are seen in infants less than 2 months old. Approximately 50 cases have been reported worldwide in infants younger than 60 days old (26). Most of them were premature (<37 weeks' gestation) and had a low birth weight, below 2,500 g (28, 48). Milk substitute infant formulas are among the sources associated with infections (24).

In November 2004, the European Food Safety Authority's Scientific Panel on Biological Hazards published an opinion (37) on microbiological risks in infant and follow-on formulas. The panel concluded that *Salmonella* and *E.*

sakazakii are the microorganisms of greatest concern in infant formulas, in the home and in hospitals. *Salmonella* and *E. sakazakii* can grow in the reconstituted product if stored above 5°C for a sufficient time, and they multiply very rapidly at room temperature.

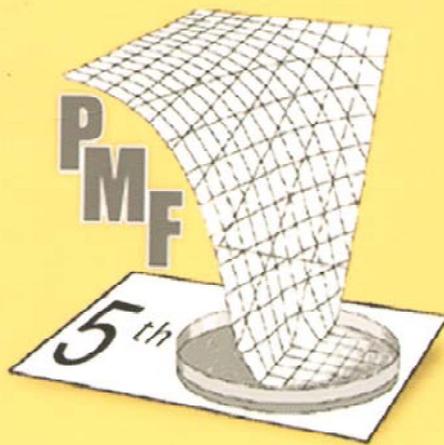
Breast milk substitutes are needed when, for various reasons, infants do not have access to breast milk. A wide variety of infant formulas is available, with compositions adapted to different infant needs. Infant formula is also available in different physical forms, such as powder and liquid (concentrate or ready-to-feed), and in a wide variety of package sizes. In the United States and Canada, liquid formula is most commonly used, whereas in most other countries, powdered formula is generally used. Ready-to-feed formulas must be sterile, and therefore, they receive extensive heat treatment (19). Treatment intensities (combination of temperature and time) vary among manufacturers and products. Recently, ultrahigh-temperature–short-time processing of infant formula was introduced in Europe. This process is very short in duration (3 to 10 s) but uses high temperatures (130 to 150°C) (31).

From the nutritive and physicochemical quality viewpoint, heat can irreversibly modify milk components; for example, it can cause a decrease in Ca^{++} , denaturation of serum proteins, and degradation of vitamins. Heating also disrupts the physicochemical equilibrium of milk components (16). The processing of formulas at high temperatures

* Author for correspondence. Tel: +34-96-390-00-22; Fax: +34-96-363-63-01; E-mail: conaml@iata.csic.es.

Predictive Modelling in Foods

Conference Proceedings



*Fundamentals, State of the Art
and New Horizons*

September 16-19, 2007 Athens, Greece



Agricultural University
of Athens (AUA)



Aristotle University
of Thessaloniki (AUTH)



National Technical University
of Athens (NTUA)

EDITORS

Nychas, G.-J.E., Taoukis, P., Koutsoumanis, K., Van Impe, J., Geeraerd, A.

ORGANISING COMMITTEE

Honorary Chairman

Genigeorgis, C. (GR/USA)

Chairman

Nychas, G.-J.E. (GR)

Co-Chairman

Van Impe, J. (BE)

Members

Baranyi, J. (UK), Biliaderis, C. (GR), Gorris, L. (NL), Koutsoumanis, K. (GR), Mafart, P. (FR), Panagou, E. (GR), Ross, T. (AU), Skandamis, P. (GR), Sofos, J. (USA), Tamplin, M. (AU), Taoukis, P. (GR), Whiting, R. (USA)

SCIENTIFIC COMMITTEE

Honorary Chairman

Roberts, T. (UK)

Chairpersons

Taoukis, P. (GR), Van Impe, J. (BE), Geeraerd, A. (BE), Koutsoumanis, K. (GR)

Members

Baranyi, J. (UK), Bakalis, S. (UK), Brocklehurst, T. (UK), Dalgaard, P. (DK), Delignette-Muller, M. (FR), Devlieghere, F. (BE), Gorris, L. (NL), Jakobsen, M. (DK), Juneja, V. (USA), I.abuza, T. (USA), Mafart, P. (FR), McMeekin, T. (AU), Membre, J. (FR), Nychas, G.-J.E. (GR), Panagou, E. (GR), Pin, C. (UK), Ross, T. (AU), Schaffner, D. (USA), Skandamis, P. (GR), Tamplin, M. (AU), Thuault, D. (FR), Whiting, R. (USA), Zwietering, M. (NL)

CONFERENCE SECRETARIAT

Dourou, D. (GR), Nisiotou, A. (GR)

<http://pmf2007.chemeng.ntua.gr>

All papers appearing in the ICPMF2007 Proceedings were Peer Reviewed for acceptance to the Conference by at least two independent reviewers from the Scientific Committee.

Copyright © Agricultural University of Athens
ATHENS 2007
ISBN 978-960-89313-7-4

PRINTING: Cosmosware, 53, Agiou Ioannou St., Agia Paraskevi, Athens (Greece)
Tel. +30 210/6013922 -cosmosware@ath.forthnet.gr