



**TRABAJO FIN DE GRADO**

**“SUPERVIVENCIA DE  
*CRONOBACTER SAKAZAKII*  
EN LECHE MATERNIZADA A  
10 Y 15°C”**

**AUTORA: ESTHER TRIGUEROS ANDRÉS**

**TUTOR: EMILIANO QUINTO**

4º Curso, GRADO NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

Facultad de Medicina, Valladolid.

# ÍNDICE:

RESUMEN .....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
- Descripción <i>Cronobacter sakazakii</i> .....	4
- Presencia de <i>C. sakazakii</i> en las fórmulas de leche en polvo para lactantes.....	4
- Manifestaciones clínicas de la infección causada por <i>C. sakazakii</i> .....	5
- Condiciones de refrigeración y crecimiento de <i>C. sakazakii</i> .....	6
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	9
- Temporalización .....	9
- Material empleado.....	10
- Cepas y medios de cultivo utilizados .....	11
- Obtención de las muestras objeto de estudio .....	11
- Incubación a diferentes temperaturas.....	12
- Realización del muestreo.....	12
- Siembra en placas .....	12
- Cálculos y análisis estadístico .....	13
4. RESULTADOS .....	13
5. DISCUSIÓN.....	14
6. CONCLUSIONES.....	18
7. REFERENCIAS .....	19
ANEXOS.....	21

## RESUMEN:

*“Cronobacter sakazakii es un patógeno oportunista implicado en una serie de enfermedades transmitidas por los alimentos causando brotes de meningitis, especialmente en recién nacidos y lactantes, cuya tasa de mortalidad oscila del 50 al 75%. Se ha demostrado una correlación epidemiológica entre C. sakazakii y las fórmulas infantiles en polvo.*

*Numerosos estudios sugieren la capacidad de la bacteria de crecer a temperaturas de refrigeración. Tareas como la limpieza y el llenado de los refrigeradores, y las condiciones de cierre o la antigüedad, pueden contribuir a un incremento de la temperatura constituyendo una oportunidad para el deterioro de los alimentos y el crecimiento de C. sakazakii.*

*El objetivo del estudio fue analizar el crecimiento de Cronobacter sakazakii en leche para lactantes reconstituida, a 10 y 15°C, planificando seis tiempos de observación.*

*Se utilizó una cepa de C. sakazakii CECT 858 reconstituida en TSB y contenida en leche para lactantes, a partir de la cual se obtuvieron las seis muestras que se incubaron a la temperatura de estudio, para proceder a realizar la siembra en placas rellenas previamente con TSA. Se incubaron nuevamente y se procedió al recuento.*

*A la temperatura de estudio de 10°C, una densidad de población media inicial de 2,534 UFC/ml logró desarrollarse hasta conformar 3,937 UFC/ml, con un crecimiento del 55% respecto a la población inicial. A 15°C y partiendo de una densidad media de población de 2,359 UFC/ml, se llegó a alcanzar 6,615 UFC/ml, lo que supone un aumento de 2,8 veces la población que se tenía inicialmente.*

*Cronobacter sakazakii es capaz de crecer contaminando las fórmulas infantiles que lo contienen, suponiendo un riesgo para aquellos que las consumen, cuando no se lleva a cabo una correcta preparación ni se mantiene un riguroso control de la temperatura del refrigerador en el que se conserva el preparado.”*

**PALABRAS CLAVE:** *Cronobacter sakazakii, Fórmula infantil, Lactante, Leche maternizada, Meningitis neonatal*

## 1. INTRODUCCIÓN:

### Descripción *Cronobacter sakazakii*:

*Cronobacter sakazakii*, designada de tal forma desde el año 2007, es una bacteria perteneciente al género *Cronobacter*, de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Anteriormente era denominada “*Enterobacter cloacae* amarillo-pigmentada” debido a la similitud que compartía con ésta, resaltando su pigmentación amarilla como única diferencia visible, y pasando a ser tratada como especie única a partir de 1980.

La bacteria se caracteriza por ser un bacilo gram-negativo no formador de esporas, que ha sido hallada en el intestino humano y animal y en el medio ambiente.

Así mismo, se le considera un patógeno oportunista por su propiedad de producción de endotoxinas, habiendo estado implicado en una serie de enfermedades transmitidas por los alimentos, causando brotes de meningitis, enteritis, sepsis y enterocolitis necrotizante, especialmente en recién nacidos y lactantes.

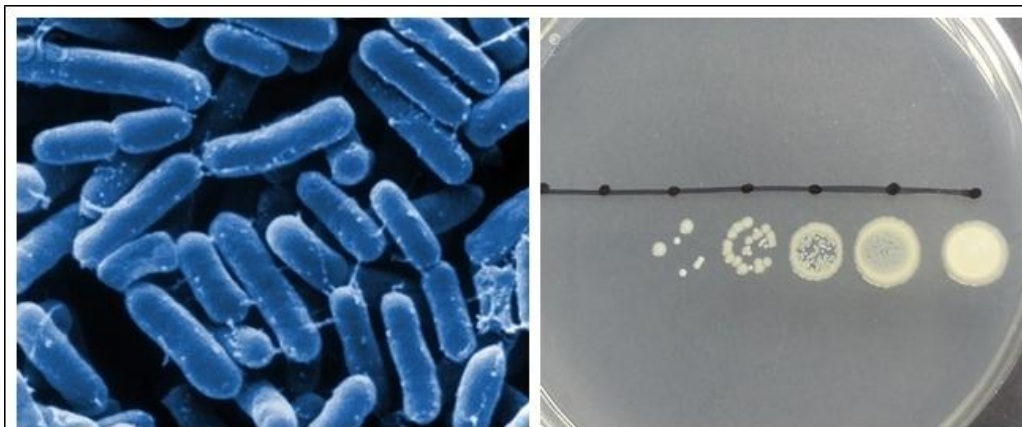


Figura 1. *Cronobacter sakazakii*

### Presencia de *C. sakazakii* en las fórmulas de leche en polvo para lactantes:

Hasta ahora, *C. sakazakii* ha sido hallado en una amplia gama de alimentos, incluyendo queso, carne, verduras, hierbas y especias, y leche UHT, pero la mayor parte de la investigación y los estudios científicos se han centrado en la presencia del organismo en las fórmulas en polvo para lactantes, puesto que aunque se ha detectado en diversos tipos de alimentos, sólo las fórmulas en polvo para lactantes han sido relacionadas con brotes de la enfermedad<sup>1</sup>.

Resulta muy importante señalar y divulgar que los preparados en polvo para lactantes no son productos estériles y en ocasiones pueden contener patógenos, a pesar de cumplir la normativa actual.

*C. sakazakii* es una bacteria capaz de sobrevivir y crecer a temperaturas extremas, tanto que Skladal et al. identificaron a dicho organismo como una de las principales bacterias contaminantes en los cartones de leche UHT, lo que implica la capacidad de éste de sobrevivir a temperaturas de pasteurización<sup>2</sup>.

Muytjens et al. estudiaron 141 sustitutos de leche materna en polvo comercializados en 35 países con el objetivo de determinar la presencia de enterobacterias. Tras el análisis, hallaron miembros de esta familia bacteriana en el 52,2% de las muestras analizadas. La tercera especie bacteriana más frecuentemente hallada fue *C. sakazakii*, aislado en 20 de las 141 muestras, es decir, en muestras procedentes de 13 de los 35 países, con unos niveles de contaminación que oscilaron entre 0,36 y 66,0 UFC por cada 100 gramos<sup>3</sup>.

En 1990, Clark et al.<sup>4</sup> fueron los primeros en demostrar una correlación epidemiológica clara entre *C. sakazakii* y las fórmulas infantiles en polvo, lo que constituye un hito en materia de salud pública ligado a las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Se ha considerado que incluso niveles bajos de contaminación por *C. sakazakii* en los preparados en polvo para lactantes constituyen un factor de riesgo debido al potencial de multiplicación durante la preparación y la conservación del producto antes de ser consumido<sup>5</sup>.

### **Manifestaciones clínicas de la infección causada por *C. sakazakii*:**

Es especialmente relevante destacar la relación entre *C. sakazakii* y la meningitis en el lactante, puesto que este organismo ha sido implicado como el agente causal de una forma grave de meningitis neonatal que desemboca en ventriculitis, absceso cerebral e hidrocefalia, cuya tasa de mortalidad oscila del 50 al 75%<sup>6</sup>.

Por ello y por la distribución por edades de los casos notificados, se puede deducir un riesgo particular asociado a los lactantes, sobre todo a aquellos recién nacidos con una edad menor o igual a 28 días, a los prematuros, a los inmunodeprimidos, y a aquellos con un bajo peso al nacer<sup>5</sup>.

Existen numerosas referencias científicas en la literatura que estudian y abordan el papel de *C. sakazakii* en diferentes brotes graves, y en ocasiones letales, de meningitis neonatal.

Fueron Urmenyi y Franklin<sup>7</sup> en 1961, los que informaron acerca de los dos primeros casos conocidos de meningitis en recién nacidos causadas por infección de *C. sakazakii*.

Lucas y Cole descubrieron que la enterocolitis necrotizante es 10 veces más común en los bebés alimentados con fórmula que en los alimentados sólo con leche materna<sup>8</sup>.

### **Condiciones de refrigeración y crecimiento de *C. sakazakii*:**

Numerosos estudios sugieren la capacidad de la bacteria de crecer a temperaturas de refrigeración; hecho al que hay que sumarle la existencia de una serie de actividades que implican una elevación en las temperaturas de funcionamiento de los refrigeradores.

La temperatura óptima de funcionamiento de los frigoríficos localizados en los hogares se sitúa entre los 0°C y 5°C. El mantenimiento de esta temperatura óptima dentro de los refrigeradores es importante para minimizar el crecimiento bacteriano, responsable, en muchas ocasiones, del deterioro de los alimentos así como de intoxicaciones alimentarias.

Ciertas tareas como la limpieza y el llenado de los refrigeradores con productos o restos de alimentos, y otras características como las condiciones de cierre o los años de antigüedad, pueden contribuir a una elevación de la temperatura de los refrigeradores. Esto, ligado a las temperaturas de funcionamiento inexactas e irregulares de gran parte de los frigoríficos domésticos, activa una alarma silenciosa en lo que a materia de salud pública se refiere.

En 2009, la Autoridad de alimentos de Nueva Gales del Sur (*NSW Food Authority*)<sup>9</sup>, registró las temperaturas de 57 refrigeradores domésticos a lo largo de dos días. Para ello se colocó un controlador de la temperatura y se registró la temperatura del aire cada diez minutos.

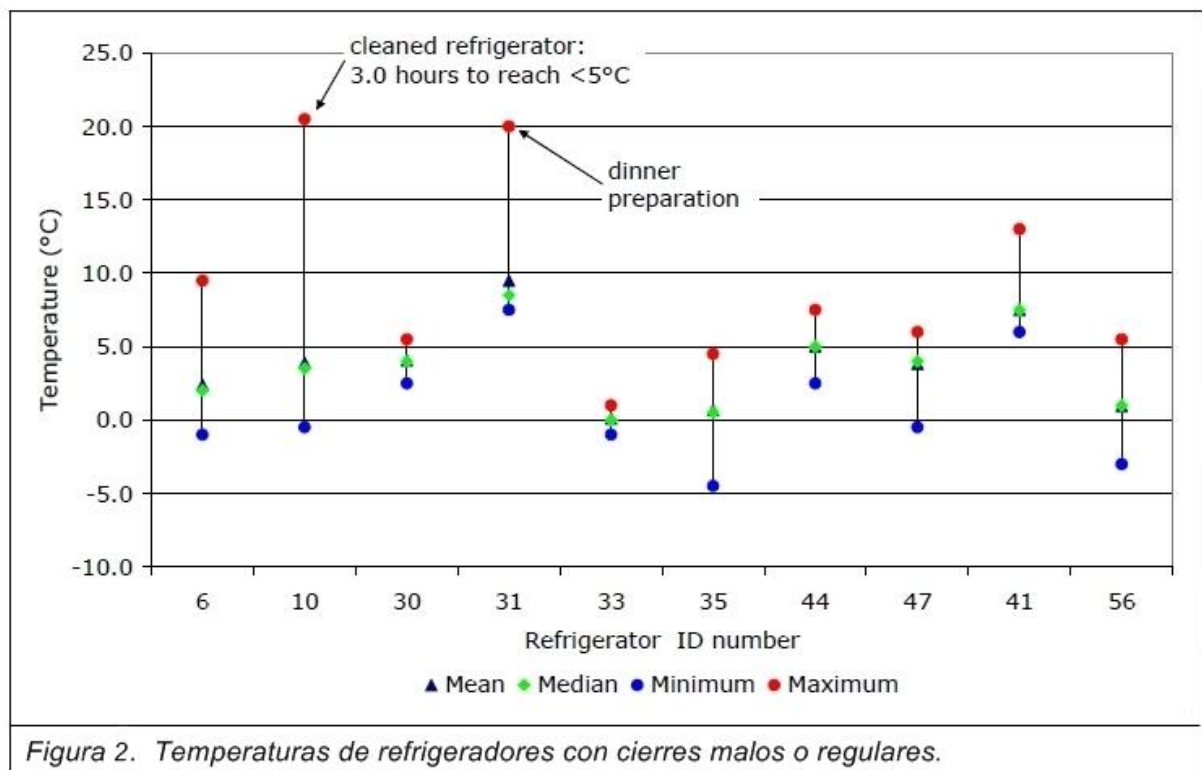
Algunos frigoríficos tuvieron que trabajar muy duro para mantener las temperaturas adecuadas, y otros tuvieron grandes picos de temperatura y tardaron mucho tiempo en volver a la temperatura adecuada, o incluso nunca llegaron a enfriarse lo suficiente.

Trece refrigeradores (22,8%) alcanzaron una temperatura media superior a 5,0°C. Cinco (8,8%) de ellos tuvieron una temperatura media superior a 6,0°C.

De aquellos frigoríficos con una antigüedad comprendida entre los cinco y diez años, doce superaron los 5,0°C (75%), y dos sobrepasaron los 10,0°C (12,5°C). Entre aquellos de más de diez años, fueron diez los que alcanzaron una temperatura superior a 5,0°C (62,5%), y tres los que superaron los 10,0°C (18,75%).

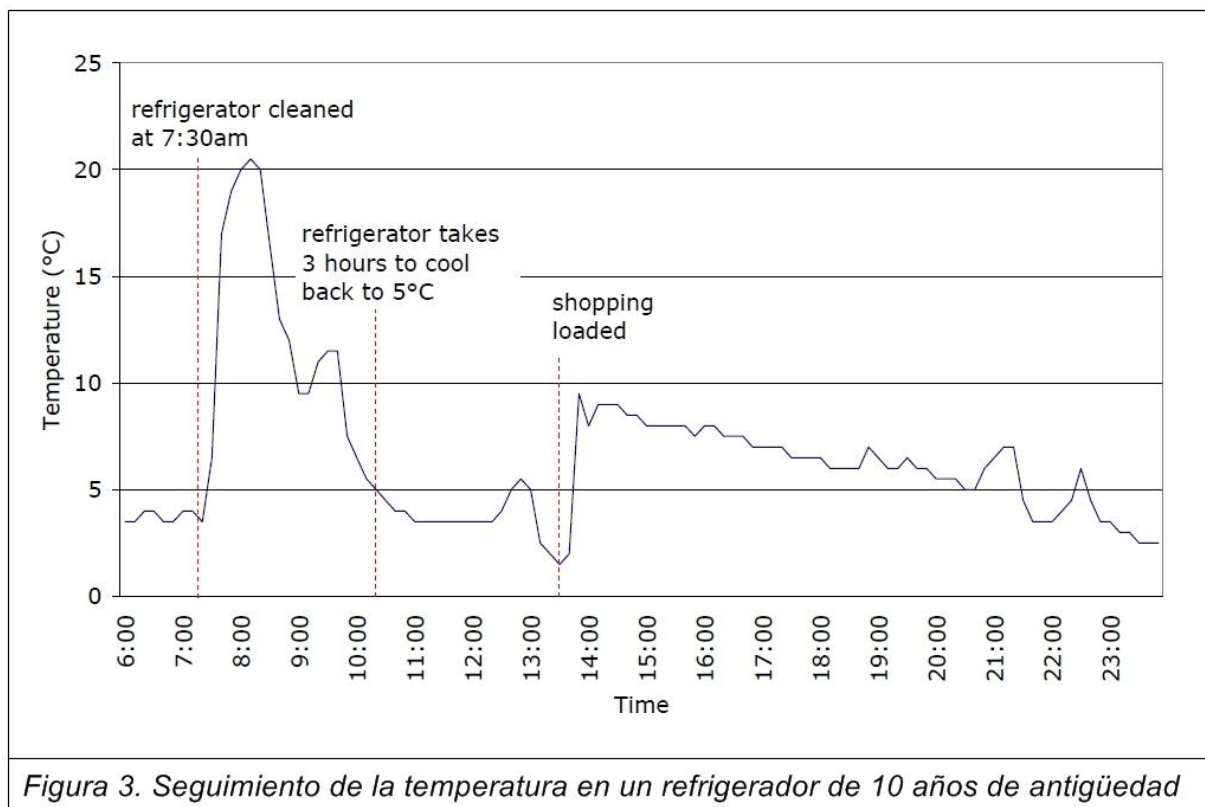
Como consecuencia de la rápida elevación de la temperatura, se necesitó un tiempo mayor para lograr alcanzar de nuevo una temperatura de trabajo óptima. Y es que al superar los 10,0°C y los 20,0°C, se necesitan dos horas y media y tres horas, respectivamente, para lograr temperaturas inferiores a 5,0°C.

Otra característica muy influyente en la temperatura de trabajo de los refrigeradores, son los cierres de éstos y sus condiciones. De los diez refrigeradores estudiados con cierres malos o regulares, cinco de ellos superaron los 5,0°C (50%), uno superó los 10,0°C (10%), y dos superaron los 20,0°C (20%), lo que sugiere la existencia de una relación entre el incremento de la temperatura y las malas condiciones de sellado del refrigerador (*Figura 2*).



Como se ha citado anteriormente determinadas actividades que cursan con el mantenimiento de la puerta del refrigerador abierta de manera prolongada, como ocurre durante la preparación de las comidas, la limpieza y la carga o llenado de la nevera, constituyen una amenaza en lo que a elevación de la temperatura se refiere, pudiendo causar temperaturas por encima de los niveles de seguridad durante largos períodos de tiempo.

Al llevar a cabo la limpieza de frigoríficos que funcionan a una temperatura óptima, se produce una elevación de la temperatura de más de 15,0°C en treinta minutos, alcanzando cifras de más de 20,0°C. Esto supone una tardanza de más de tres horas en volver a recuperar los 5,0°C. Cuando se procede a la carga del refrigerador con alimentos, la temperatura sufre un aumento hasta los 9,5°C en un período de 30 minutos, que requerirá al menos siete horas para funcionar de nuevo a una temperatura óptima (< 5,0°C) (Figura 3).



La preparación de las comidas, así como la conservación de los restos o sobras, también suponen un momento crítico en el registro de temperatura, que puede llegar a aumentar más de 10,0°C.



En otro estudio realizado por Van Garde y Woodburn<sup>10</sup>, encontraron que las temperaturas de los refrigeradores en el 21% de los hogares estudiados fueron iguales o superiores a 10,0°C, temperaturas que permitirían crecer a *C. sakazakii*.

Este pobre control de la temperatura puede dar lugar a que los alimentos conservados aumenten su temperatura a cifras superiores a los 5,0°C durante varias horas, lo que proporciona una ventana de oportunidad para el deterioro de los alimentos y el crecimiento de bacterias patógenas como *C. sakazakii*.

## 2. OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio es analizar y describir el crecimiento de la bacteria *Cronobacter sakazakii* inmersa en leche para lactantes reconstituida, a las temperaturas de 10,0 y 15,0°C.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS:

Vamos a estudiar el comportamiento de la bacteria *Cronobacter sakazakii* a dos temperaturas diferentes (10 y 15°C), observando su crecimiento en 6 tiempos distintos. Para ello vamos a partir de una concentración de 10<sup>2</sup> UFC/ml que nos permita visualizar adecuadamente el crecimiento de la bacteria desde su inicio.

### Temporalización:

Se planificó un período de 5 días para estudiar cada una de las dos temperaturas, con un período ideal estimado de 10 días.

Se establecieron los siguientes tiempos de estudio: 0 horas, 3 horas, 24 horas, 27 horas, 48 horas y 51 horas.

### **Material empleado:**

Para la realización del estudio experimental se necesitaron los siguientes materiales e instrumentos:

- Olla a presión para la esterilización de los medios de cultivo, la leche, y los materiales de laboratorio
- Campana de flujo laminar para realizar el experimento en condiciones de esterilización completa
- Agitador vórtex, con placas calefactoras para la reconstitución del TSA
- Mechero Bunsen, para realizar el llenado de las placas de petri de forma estéril
- Incubador que permita mantener las muestras a la temperatura de estudio
- Estufa de secado, para secar y esterilizar el material de vidrio y metal empleado
- Estufa para mantener las placas y los cultivos a 37°C
- Baño María, para reducir la temperatura del TSA y proceder a realizar al llenado de las placas
- Cultivo de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 (población 10<sup>9</sup> UFC/ml)
- Medio de cultivo TSB (*Caldo de Soja Trypticaseína*)
- Medio de cultivo TSA (*Agar de Soja Trypticaseína*)
- Leche infantil (*Nestlé Nativa 1 Proexcel*)
- Agua destilada
- Placas de Petri

Además de estos instrumentos, se necesitaron materiales de laboratorio como pipetas, rack de puntas, gradillas para tubos, marcador, guantes, botellas de vidrio, probetas, tubos de rosca y *ependorf*.

### Cepas y medios de cultivo utilizados:

Para llevar a cabo el estudio se ha utilizado una cepa de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 obtenida de la *Colección Española de Cultivos Tipo*, reconstituida previamente en un medio de cultivo TSB.

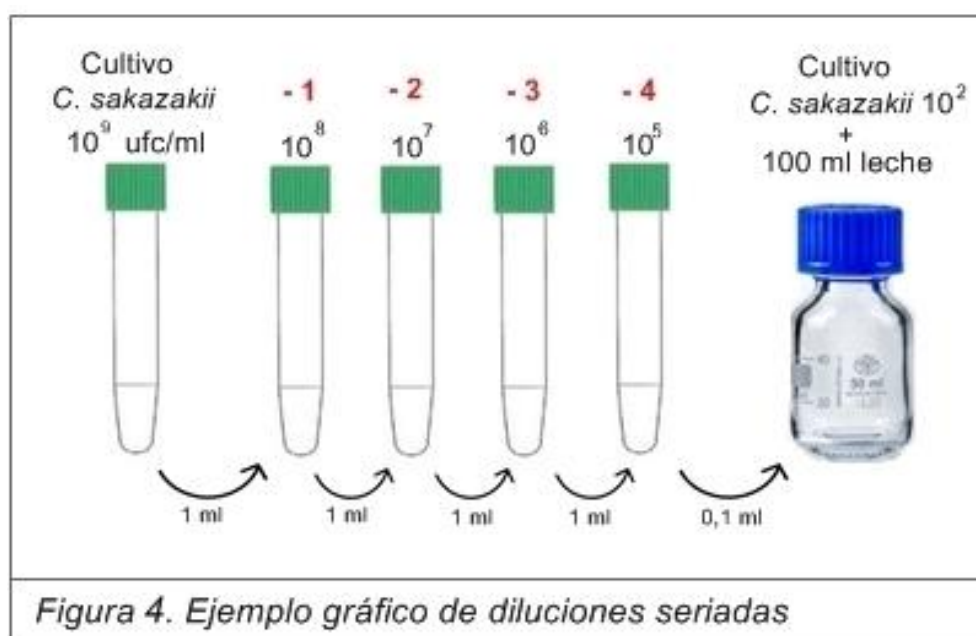
El experimento se va a realizar por triplicado con el objetivo de poder minimizar u obviar los resultados que puedan ser debidos al azar.

Partiendo del cultivo inicial, se obtuvieron tres cultivos idénticos para lo cual se inocularon alícuotas de 1 ml del cultivo en un preparado de 9 ml de TSB, siendo posteriormente incubado a 37°C durante 18-24 horas.

Así mismo, se empleó el medio TSA para rellenar las placas de Petri en las que se realizó la siembra de la bacteria.

### Obtención de las muestras objeto de estudio:

Pasado el tiempo de incubación se recuperan los tres cultivos iniciales y se llevaron a cabo diluciones seriadas como indica la *Figura 4*, con el fin de obtener una población de *C. sakazakii* de  $10^2$  UFC/ml sobre la cual se pueda observar el crecimiento.



*Figura 4. Ejemplo gráfico de diluciones seriadas*

Dicha población estará contenida en 100 ml de leche para lactantes (*Nestlé Nativa 1 ProExcel*), reconstituida en agua destilada según las indicaciones del fabricante para niños recién nacidos entre 1 y 2 semanas.

A partir de ese preparado, alícuotas de 1 ml del cultivo de población  $10^2$  UFC/ml fueron inoculados en seis tubos *ependorf*, destinando cada uno de ellos a uno de los seis tiempos en los que se va a observar el crecimiento del cultivo utilizado.

### **Incubación a diferentes temperaturas:**

Cada uno de los seis tubos *ependorf* se introdujeron en un incubador a la temperatura de 10°C (primer período de estudio) y 15°C (segundo período de estudio) durante un máximo de 51 horas, en función del tiempo perteneciente a cada tubo.

### **Realización del muestreo:**

Se observó el crecimiento de la bacteria en seis tiempos diferentes, partiendo del tiempo inicial de 0 horas, y continuando progresivamente hasta el cultivo a tiempo final de 51 horas.

Para realizar cada muestreo se prepararon siete tubos *ependorf* con 900 µl de TSB cada uno. Seguidamente se llevaron a cabo siete diluciones a partir del cultivo inicial que corresponda al tiempo que se va a estudiar.

Una vez que se obtuvieron las siete diluciones del tiempo correspondiente, se procedió a realizar la siembra en las placas de Petri, previamente rellenas con el medio de cultivo TSA.

### **Siembra en placas:**

Habiendo delimitado la superficie de la placa en ocho secciones se dispuso a realizar las siembras de los tubos preparados y del cultivo de origen a partir del cual se llevaron a cabo las siete diluciones.

Para ello se agregan 10  $\mu$ l de cada uno de los ocho tubos *ependorf* a la sección de la placa que corresponda.

Una vez se llevan a cabo las siembras de las placas por triplicado, se introducen en la estufa a 37°C durante 24 horas, para después proceder al recuento.

Este proceso se repitió para cada uno de los seis tiempos diferentes.

#### **Cálculos y análisis estadístico:**

Pasado el tiempo anteriormente especificado, se realizó el contaje de las placas, obteniendo resultados de UFC por cada 10  $\mu$ l adicionados en las placas.

Para realizar los cálculos se empleó el programa Excel.

#### **4. RESULTADOS:**

A partir del recuento realizado sobre las placas se calculó la densidad de población de cada muestra y se obtuvo la media de cada cultivo, especificando la desviación estándar para cada caso.

Los datos que se recogieron aparecen reflejados en la *Gráfica 1* y la *Gráfica 2*, donde quedan señalados los seis tiempos en los que se observó el crecimiento de la bacteria y la medida de crecimiento de la misma.

A la temperatura de estudio de 10°C, una densidad de población media inicial de 2,534 UFC/ml logró desarrollarse hasta conformar 3,937 UFC/ml, con un crecimiento del 55% respecto a la población inicial (*Gráfica 1*).

Por otro lado, a la temperatura de estudio de 15°C y partiendo de una densidad media de población de 2,359 UFC/ml, se llegó a alcanzar 6,615 UFC/ml, lo que supone un aumento de 2,8 veces la población que se tenía inicialmente (*Gráfica 2*).

La desviación estándar calculada para la densidad de población media a los diferentes tiempos no superó en ningún caso 0,707 UFC/ml y 0,581 UFC/ml, a la temperatura de 10 y 15°C, respectivamente.

En ambas gráficas se puede observar un crecimiento exponencial a medida que aumenta el número de horas transcurridas, variando el grado de crecimiento en función de la temperatura de estudio a la que fue sometida la bacteria.

Las diferencias generadas por la aplicación de una temperatura u otra se pueden observar en la *Gráfica 3*, donde se presenta la correlación entre la densidad de población (UFC/ml) y las horas transcurridas desde la incubación hasta el momento en el que se realizó el contaje. Como podemos ver, todos los puntos mantienen un buen ajuste a la recta de regresión estimada [ $R^2 = 0,896$  (10°C);  $R^2 = 0,979$  (15°C)].

Las dos series de datos representadas son diferentes ( $p = 0,0957$ ), y ambas explican el efecto de aplicar la temperatura de estudio correspondiente sobre el crecimiento de *C. sakazakii*.

Nuevamente se ve cómo existe una tendencia lineal creciente ( $r = 0,9081$ ) a ambas temperaturas en relación con el aumento del tiempo transcurrido.

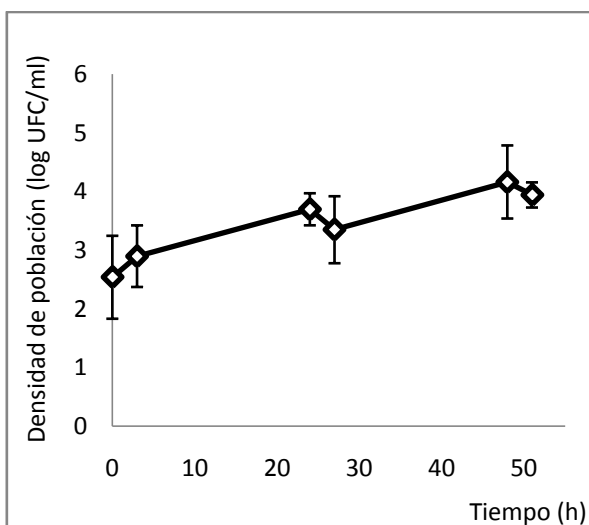
## 5. DISCUSIÓN:

En la actualidad, son numerosos los trabajos que relacionan *Cronobacter sakazakii* y leche de fórmula para lactantes, así como con la meningitis neonatal en aquellos que la consumen. Sin embargo, el crecimiento de la bacteria a temperaturas inferiores a los 20°C es un aspecto importante poco estudiado y desarrollado aún.

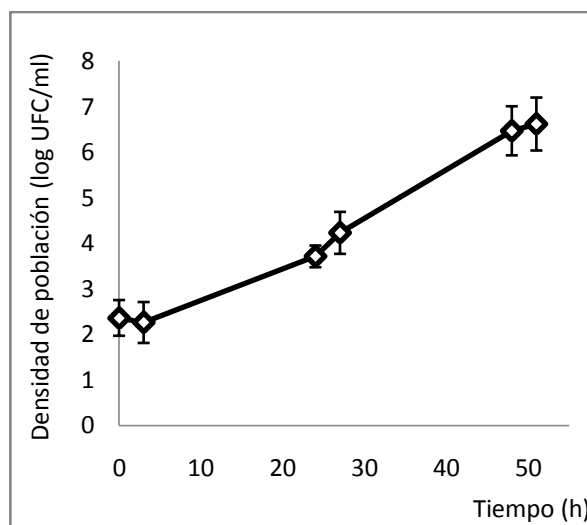
Los resultados del presente estudio demuestran que *Cronobacter sakazakii* es capaz de crecer incluso a las bajas temperaturas de 10 y 15°C, aun partiendo de una densidad de población inicial pequeña (*Gráfica 1* y *Gráfica 2*).

Tanto si se somete a la bacteria a 10°C como si se hace a 15°C, la recta de crecimiento estimada presenta una relación lineal creciente, lo que implica que cuanto

mayor sea el tiempo que la bacteria permanece a dicha temperatura, mayor capacidad tendrá para crecer y mayor densidad de población se observará en el producto estudiado.



**Gráfica 1. Crecimiento *C. sakazakii* a 10°C**



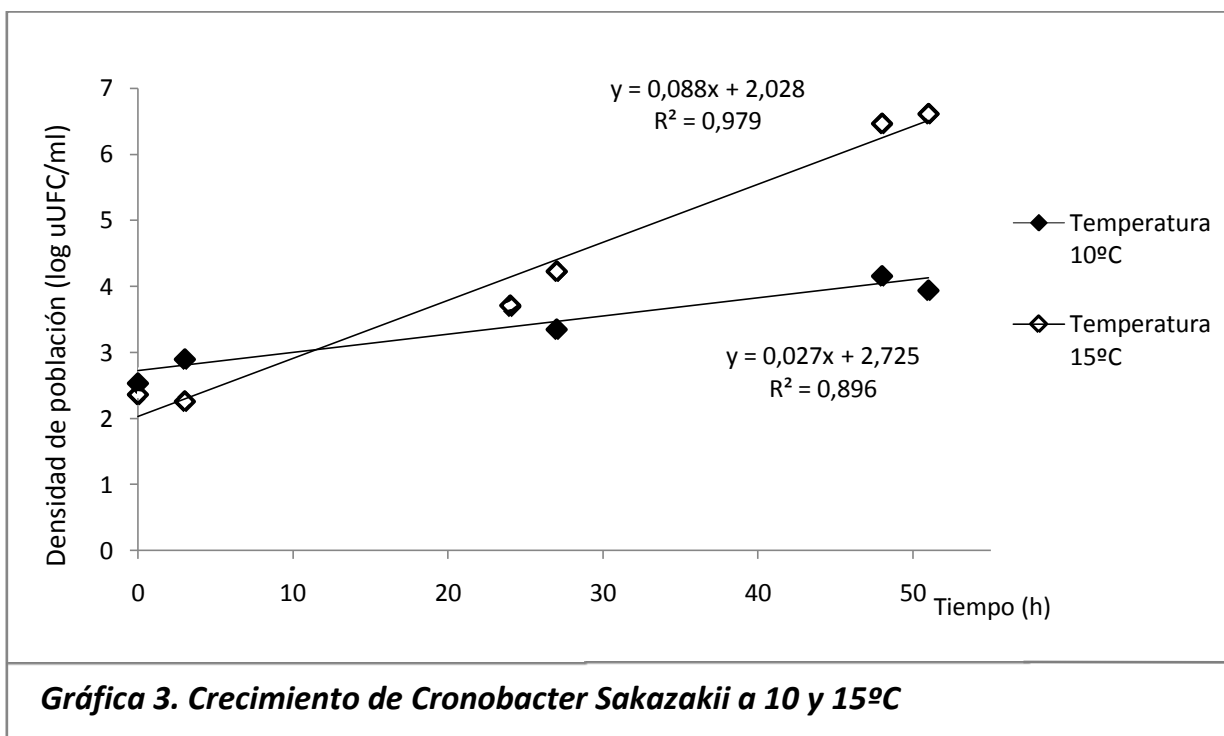
**Gráfica 2. Crecimiento *C. sakazakii* a 15°C**

La diferencia de efecto de someter a la bacteria a 10 o 15°C de temperatura radica en una mayor pendiente de la recta de crecimiento estimada, lo que se traduce en un mayor crecimiento de la bacteria cuando es mantenida a 15°C (Gráfica 3).

Y es que aunque *Cronobacter sakazakii* es capaz de desarrollarse a 10°C, el crecimiento que se observa a esta temperatura no es tan intenso como ocurre cuando se le mantiene a 15°C.

Con estos resultados se puede deducir que *Cronobacter sakazakii* no se mantiene inactiva a estas temperaturas, si no que ya es capaz de crecer a la temperatura de 10°C, aumentando la velocidad de crecimiento a medida que se incrementa la temperatura y el tiempo de mantenimiento a dicha temperatura.

A partir de estos datos, se deduce que cuando *Cronobacter sakazakii* está presente en este tipo de fórmulas para lactantes y se le somete a una temperatura de 10 o 15°C, la bacteria es capaz de crecer y desarrollarse contaminando el alimento.



En un estudio realizado con leche de fórmula, se observó una temperatura mínima de crecimiento de entre 5,5°C y 8,0°C, lo que implica que *C. sakazakii* no crecería a una temperatura de refrigeración de 4°C, siempre que los refrigeradores mantengan una temperatura de funcionamiento óptima.<sup>4</sup>

En otro estudio realizado por A. Lehner y R. Stephan, las cepas utilizadas de *C. sakazakii* crecieron a una temperatura de entre 6 y 45°C. Las temperaturas más bajas registradas que permitieron el crecimiento fueron 5,7°C, 5,5°C y 3,4°C. Los resultados de este estudio, por tanto, y a diferencia del anterior, sugieren la posibilidad de que la bacteria es capaz de crecer a temperatura de refrigeración, incluso cuando los refrigeradores mantienen un adecuado funcionamiento.<sup>1</sup>

Estos resultados confirman la importancia de una correcta preparación, así como de unas temperaturas de refrigeración adecuadas durante la conservación de la fórmula infantil en polvo tras la reconstitución, para asegurarse de que la bacteria no dispone de las características idóneas para crecer y desarrollarse.

Las fórmulas en polvo para lactantes no son productos estériles, característica por la cual se debe tener muy en cuenta el riesgo potencial de contaminación que existe durante



su elaboración, haciendo necesario desarrollar estrategias para reducir estos riesgos, como minimizar el tiempo de almacenamiento y manipulación de la fórmula infantil reconstituida.

Por tanto, se debe educar a las personas encargadas de cuidar a los niños sobre el alto riesgo de utilizar estos preparados no estériles, y aconsejar el uso, siempre que sea posible y viable, de preparados líquidos comerciales estériles o preparados que hayan sido sometidos a un proceso de esterilización, usando agua hirviendo para la reconstitución del preparado o calentando el producto ya reconstituido.

Además, se debe mantener un riguroso control del refrigerador y de su temperatura de funcionamiento, para mantenerla en el rango óptimo de 0 a 5°C y evitar que aumente por encima de niveles a los que *C. sakazakii* es capaz de crecer y contaminar el producto.

No sólo se debe educar y concienciar a las personas a cargo de los niños, sino también se debe alentar a la industria de la alimentación infantil a reducir la concentración y la prevalencia de *C. sakazakii* tanto en el entorno de fabricación como en los preparados en polvo para lactantes.

En la presente investigación se ha desarrollado un estudio experimental de corta duración para conocer los aspectos básicos sobre el comportamiento de *C. sakazakii* a las temperaturas de estudio de 10 y 15°C.

Sería apropiado realizar estudios de investigación sobre estas líneas, observando el desarrollo de la bacteria desde el momento en el que se introduce a la temperatura de estudio concreta y de forma continuada en el tiempo.

No se dispone de mucha información sobre el riesgo exacto que supone la presencia de *Cronobacter sakazakii* en las fórmulas infantiles en polvo, lo que hace explícita la necesidad de realizar más estudios de investigación para determinar la dosis infecciosa, los factores de competitividad, la evaluación exacta del riesgo, así como de la virulencia de *C. sakazakii* y el medio para reducir su concentración en los preparados lácteos en polvo para lactantes.

Aunque no se conoce la prevalencia exacta de meningitis neonatal causada por *C. sakazakii*, la gravedad de la infección, la alta tasa de mortalidad, y la falta de información sobre las características de crecimiento de la bacteria hace necesario estudios de evidencia.

## 6. CONCLUSIONES:

*Cronobacter sakazakii* es capaz de crecer a las temperaturas de 10 y 15°C, contaminando las fórmulas infantiles en polvo que lo contienen, lo que supone un importante peligro y un riesgo potencial para aquellos niños que las consumen, cuando no se lleva a cabo una correcta preparación y conservación, ni se mantiene un riguroso control de la temperatura de funcionamiento del refrigerador en el que se conserva el preparado previamente reconstituido.

## 7. REFERENCIAS:

- [1] Lehner A., and Stephan R. *Microbiological, Epidemiological, and Food Safety Aspects of Enterobacter sakazakii*. JFP. 2004;67(12):2850-2857.
- [2] Skladal, P., M. Mascini, C. Salvadori, and G. Zannoni. 1993. *Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk as L-Lactate biosensor*. Enzyme Microb. Technol. 15:508-512.
- [3] Muytjens, H. L., H. Roelofs-Willemse, and G. H. J. Jasper. 1998. *Quality of powdered substitutes for breast mil with regard to members of the family Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. 26: 367-370.
- [4] Clark, N. C., B. C. Hill, C. M. O'Hara, O. Steingrimsson, and R. C. Cooksey. 1990. *Epidemiologic typing of Enterobacter sakazakii in two neonatal nosocomial outbreaks*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 13:467-472.
- [5] FAO, OMS. *Evaluación de Riesgos Microbiológicos. Enterobacter sakazakii y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes*. Ginebra: OMS; 2004. Evaluación de riesgos microbiológicos 6.
- [6] Willis J., and J. E. Robinson. 1988. *Enterobacter sakazakii meningitis in neonates*. Pediatr. Infect. Dis. J. 7:196-199.
- [7] Urmenyi, A. M., and A. W. Franklin. 1961. *Neonatal death from pigmented coliform infection*. Lancet 1:313-315.
- [8] Lucas, A., and T. J. Cole. 1990. *Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis*. Lancet 336:1519-1523.
- [9] *Domestic Fridge Survey*. NSW Food Authority; 2009.
- [10] Van Garde, S. J., and M. Woodburn. 1987. *Food discard practices of householders*. J. Am. Diet. Assoc. 87:322-329.

[11] Nazarowec-White M., and Farber JM. *Incidence, Survival, and Growth of Enterobacter sakazakii in Infant Formula*. JFP.1997;60(3):226-230.

[12] *Home fridge temperatures*. NSW Food Authority; 2015.

## ANEXOS:

### FOTOGRAFÍAS DE LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO:



*Fotografía 1. Instrumentos de trabajo (Campana de flujo laminar)*



**Reservado**  
 Los datos proporcionados son solo orientativos. Siempre consulte a su pediatra antes de preparar la leche materna o de introducir cualquier otro alimento.

**Hablémoslo**  
 Servicio de información al consumidor NESTLÉ  
 C/ El Encanto de Ginebra 1494  
 08000 Barcelona  
 902 110 110  
 NUTRICIONAL COMPASS®

**¿Sabías que?**  
 Aproximadamente el 85% de los niños entre 2 y 5 años tienen intolerancia y alergia. NATIVA 1 PROEXCEL ayuda a proporcionar los nutrientes que la leche materna aporta, pero no los 2 meses de vida para el óptimo desarrollo. Consulta el Centro de Investigación Infantil, siempre más para ti y la leche una solución rápida y específica.

**Tabla de Alimentación**

Si la leche parece necesitar cantidades mayores o menores que las recomendadas en la siguiente tabla de alimentación consulta a tu médico.

Edad del niño	Agua hervida ml	Nº de medidas*	Tomas diarias
1 y 2 semanas	90	3	6
3 y 4 semanas	120	4	6
A partir de 1 mes	150	5	5
A partir de 2 meses	180	6	5
A partir de 3 meses	210	7	5
A partir de 5 meses	240	8	5**

\* Una cucharadita de medida incluida en el paquete que contiene, solo y sin compresas, 6,2 g. Una buena preparación de leche materna a los 6 meses del alimento adecuado y una preparación mejor para prevenir la deshidratación.

\*\* A partir de los 6 meses se suele recomendar la introducción paulatina de otros alimentos, empezando por una vez al día. Por ejemplo: papillas, NATIVA 2, de cereales y lácteos frescos, verduras, carnes y pescados, que de los 18 meses se convierten en leche para lactantes.

**Calidad Nestlé**  
 con una fórmula exclusiva  
 calidad-precio

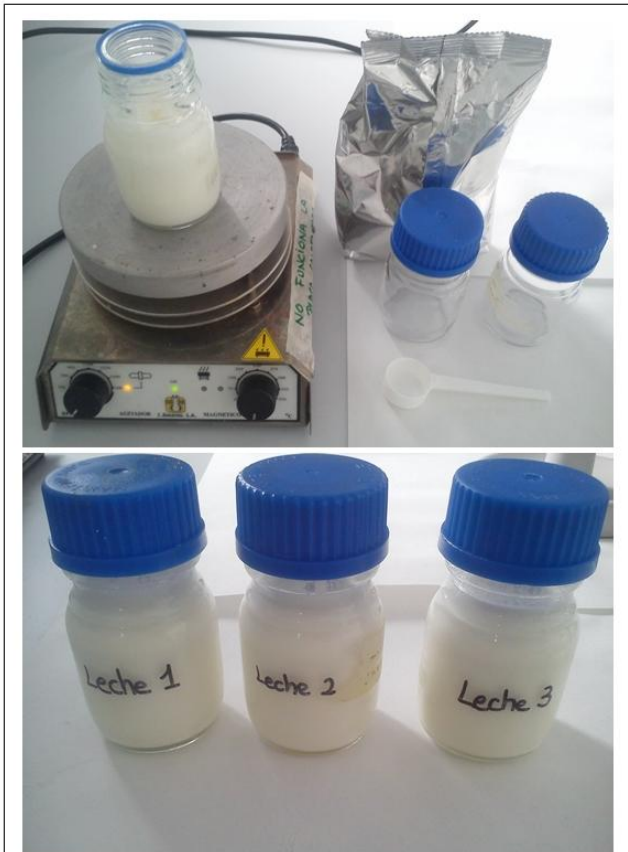
**e 600g** (incluye medida)

Leche para lactantes en polvo  
 Elaborado en un ambiente profesional. Lata y contenido perfectamente esterilados por los estándares de la leche.

Nestlé España, S.A. de Páramo Cerrado, 20-21  
 48900 Páramo de Candamo (León)  
 © Nestlé España, S.A. 2014. Todos los derechos reservados.

Edad del niño	Agua hervida ml	Nº de medidas*	Tomas diarias
1 y 2 semanas	90	3	6
3 y 4 semanas	120	4	6
A partir de 1 mes	150	5	5
A partir de 2 meses	180	6	5
A partir de 3 meses	210	7	5
A partir de 5 meses	240	8	5**

Fotografía 2. Leche infantil empleada y pauta de alimentación

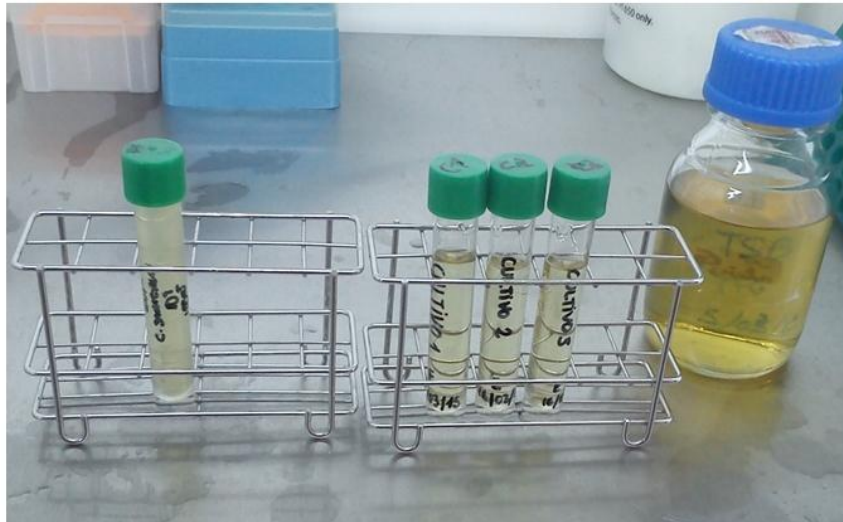


Fotografía 3. Reconstitución de leche para lactantes (Nestlé Nativa 1)



Fotografía 4. Medios de cultivo empleados en el estudio (TSA y TSB)

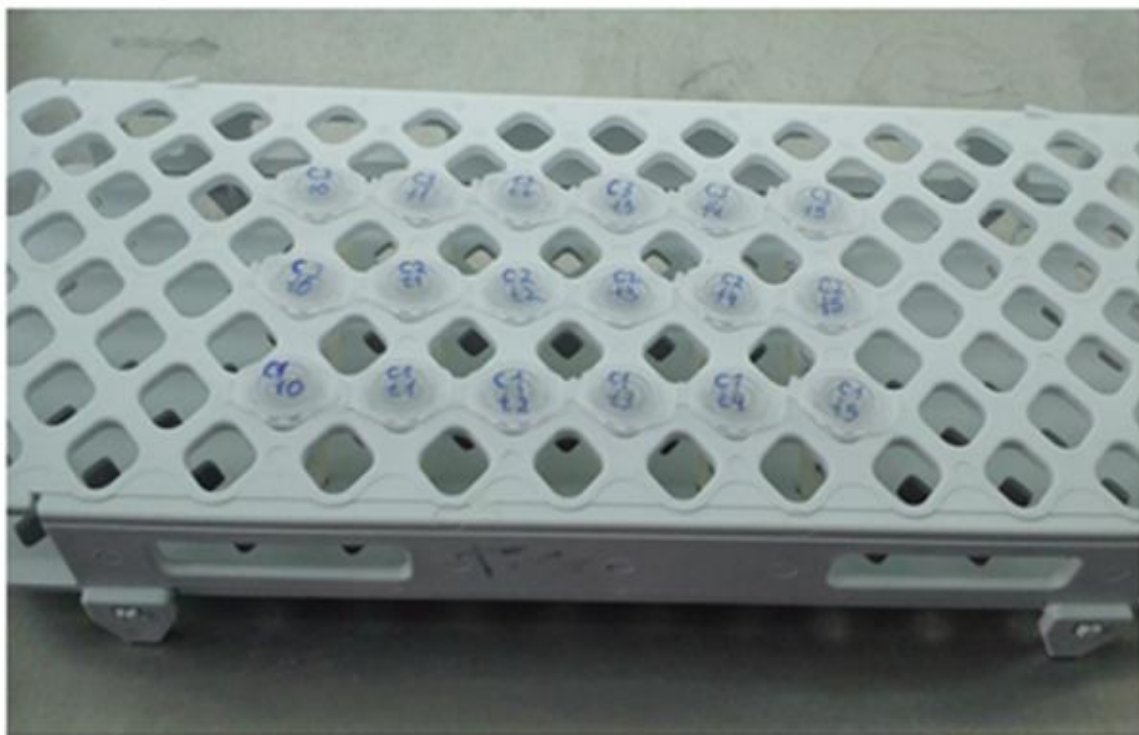




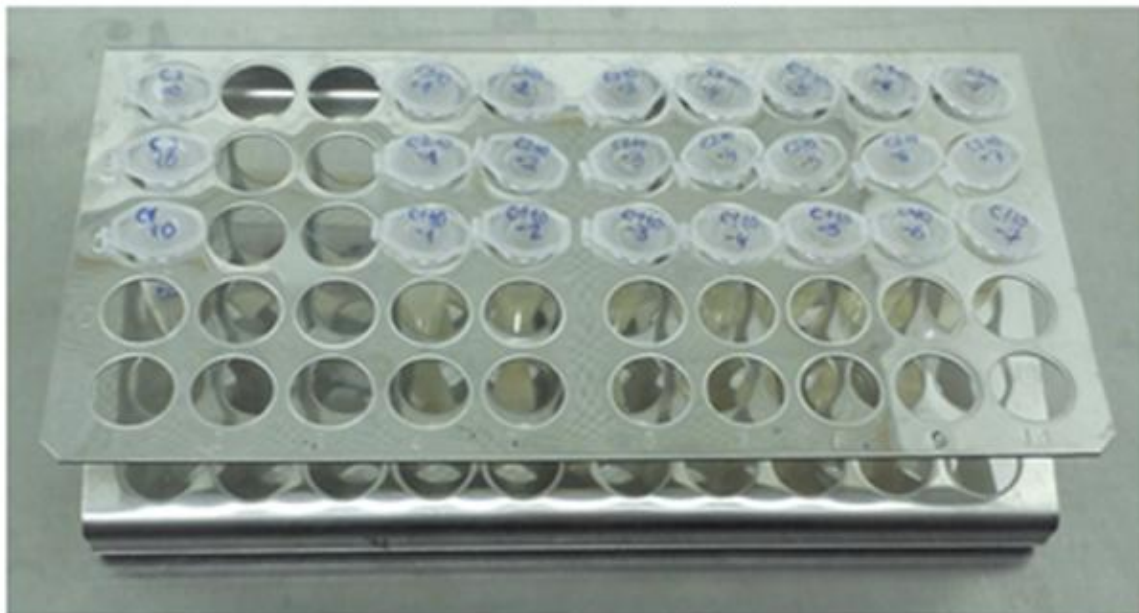
*Fotografía 5. Obtención del cultivo de estudio y realización de las diluciones seriadas*



*Fotografía 6. Diluciones seriadas*

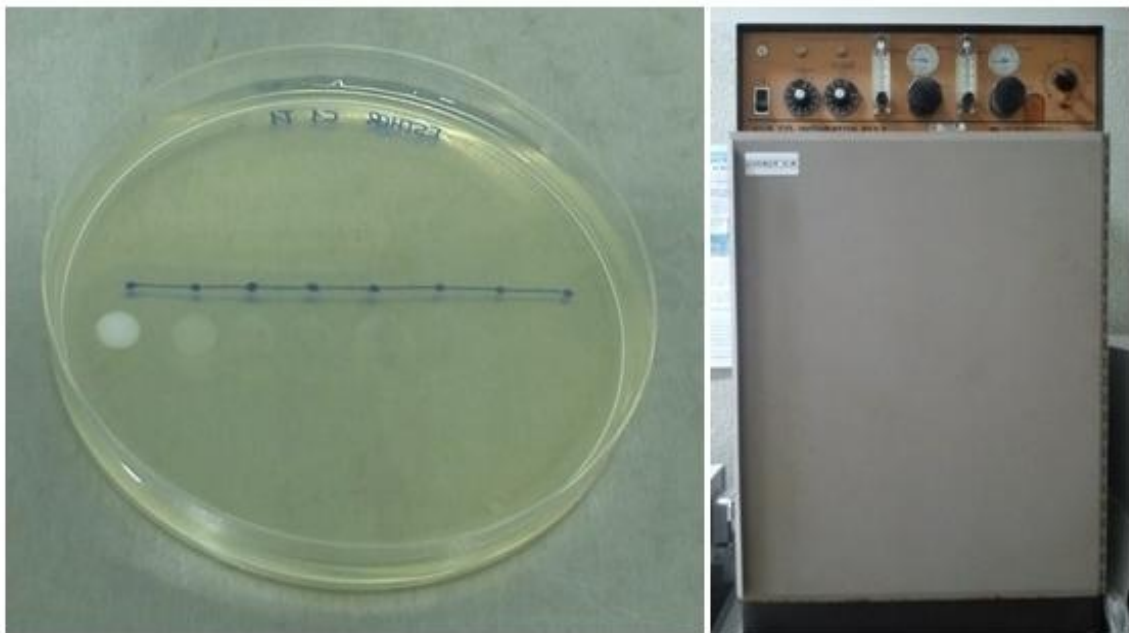


*Obtención de las muestras para la siembra*

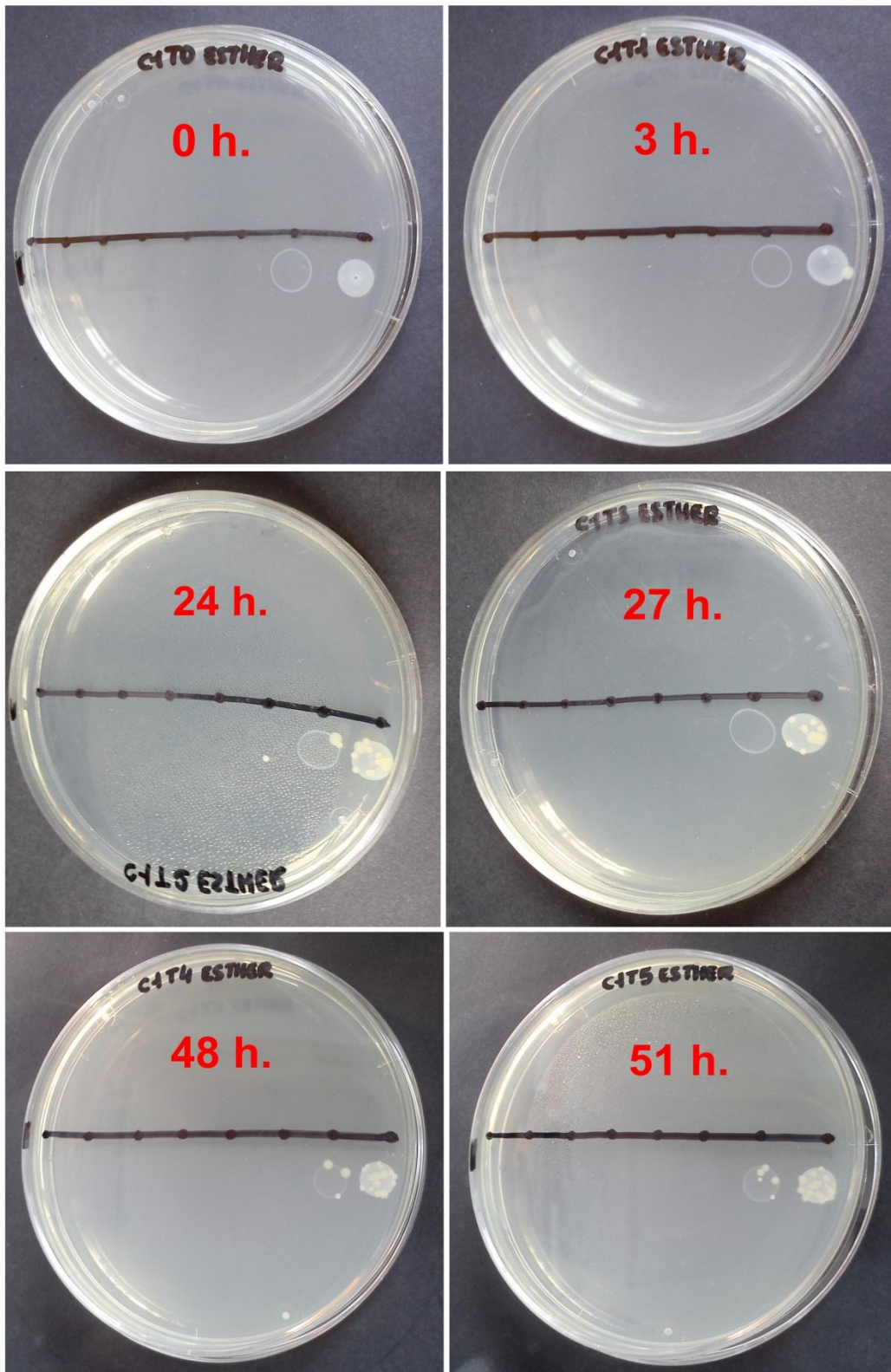




*Fotografía 7. Incubación de las muestras a temperaturas de estudio*

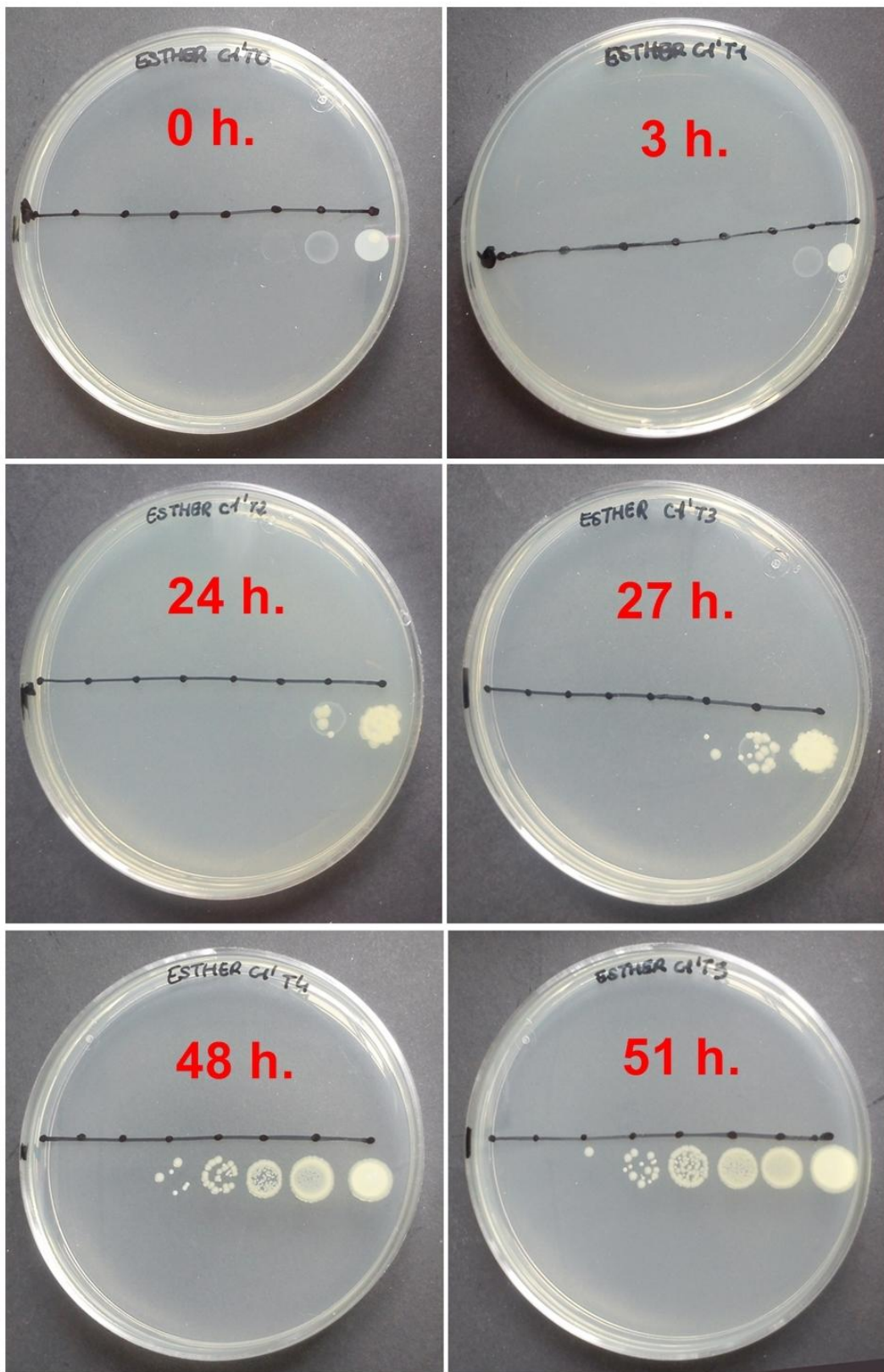


*Fotografía 8. Siembra en placa e incubación a 37°C durante 24 horas*



*Fotografía 9. Crecimiento de C. sakazakii (Cultivo1 - 10°C)*





*Fotografía 10. Crecimiento de C. sakazakii (Cultivo1 - 15°C)*