



Universidad de Valladolid

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y
DIETÉTICA

TRABAJO FIN DE GRADO

**“Estudio de *Cronobacter sakazakii*, estresada
térmicamente, mediante citometría de flujo y
técnicas clásicas”.**

Presentado por Ana Mata Román para optar al Grado en
Nutrición Humana y Dietética

TUTOR: Dr. Emiliano José Quinto Fernández¹

¹Departamento de Nutrición y Bromatología

FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

CURSO 2019/2020

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	4
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Género <i>Cronobacter</i>	6
1.2. Descripción <i>Cronobacter sakazakii</i>	7
1.3. <i>Cronobacter sakazakii</i> y su presencia en la leche en polvo.....	7
1.4. Manifestaciones clínicas de infección por <i>C. sakazakii</i>	8
1.5. Citometría de flujo.....	9
1.5.1. Fundamento.....	10
1.5.2. La FCM y el recuento de microorganismos.....	10
1.5.3. Parámetros medibles mediante FCM.....	11
1.6. Justificación.....	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. Diseño.....	12
3.2. Material.....	12
3.3. Metodología.....	14
3.3.1. Recuperación de la cepa de <i>Cronobacter sakazakii</i>	15
3.3.2. Obtención de las muestras de estudio.....	15
3.3.3. Tratamientos térmicos.....	16
3.3.4. Siembra en placa y recuento.....	16
3.3.5. Preparación de las muestras para introducir al citómetro.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5. CONCLUSIONES	23
6. LIMITACIONES	23
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	24
ANEXOS	30

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Cronobacter sakazakii* es un patógeno oportunista asociado a brotes alimentarios, causantes de casos graves de meningitis, así como enterocolitis necrotizante en recién nacidos y bebés inmunodeprimidos cuya tasa de mortalidad oscila entre el 50 y el 80%. Existe evidencia de la correlación epidemiológica entre *C. sakazakii* y las fórmulas infantiles en polvo, constituyendo estas la principal fuente de transmisión del patógeno.

OBJETIVO: analizar el crecimiento de la bacteria *Cronobacter sakazakii* en fórmula infantil reconstituida, mediante citometría de flujo y técnicas clásicas con el fin de detectar células viables comprometidas pero no cultivables y evaluar el impacto de los diferentes tratamientos térmicos.

MÉTODOS: se trata de un estudio experimental en el que se ha utilizado una cepa de *C. sakazakii* ATCC 29544, reconstituida en TSB e inoculada en fórmula de leche maternizada, a partir de la cual se obtuvieron 5 muestras a las que se les aplicó un tratamiento térmico concreto, con temperaturas que iban de 55 a 95°C, en rangos de 10°C. Se utilizaron las técnicas de citometría de flujo y recuento en placa con TSA.

RESULTADOS: tras someter a la suspensión de células a los tratamientos térmicos, se esperaba que el número de células comprometidas aumentara, ya que estas temperaturas no serían efectivas para matar a todas las células pero sí para desplazarlas de la región de “eventos vivos” a la región de “eventos comprometidos”.

CONCLUSIÓN: los tratamientos térmicos no serían adecuados para garantizar la seguridad de la fórmula. La CMF sería capaz de detectar células de *C. sakazakii* comprometidas que no podrían ser detectadas mediante métodos clásicos de recuento en placa. Además, nos serviría como prueba de detección para disminuir el riesgo derivado de la presencia de células viables patógenas.

Palabras clave: *Cronobacter sakazakii*; fórmula infantil en polvo (PIF); neonatos; enterocolitis necrotizante; estrés térmico; citometría de flujo; células viables comprometidas.

ABREVIATURAS

DNA: “deoxyribonuclein acid”, ácido desoxirribonucleico.

FAO: “food and Agriculture Organization of the United Nations”, Organización de las naciones unidas para alimentación y la agricultura.

FC: citometría de flujo.

FCM: “flow cytometry”, citometría de flujo molecular.

NEC: enterocolitis necrotizante.

OMS: organización mundial de la salud.

PI: Ioduro de Propidio.

PIF: “powered infant formulae”, fórmulas infantiles reconstituidas.

RNA: “ribonuclein acid”, ácido ribonucleico.

RPM: revoluciones por minuto.

TSA: caldo de Soja Trypticaseína.

TSB: Agar de Soja Trypticaseína.

UCI: unidad de cuidados intensivos.

UCIN: unidad de cuidados intensivos neonatales.

UFC: Unidad formadora de colonias.

UHT: “Ultra high temperature”, ultrapasteurización.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Género *Cronobacter*

El género *Cronobacter* es perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*.

Cronobacter spp. (*Enterobacter sakazakii*) fue definida en 1980 como una especie nueva por Farmer et al. (1). Actualmente, este género engloba siete especies y tres subespecies; *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. dublinensis subesp.dublinensis*, *C. dublinensis subesp. Lausannensis*, *C. dublinensis subesp. Lactaridi*, *C. condimenti*, *C. universalis*, *C. muytjensii* y la especie *C. sakazakii*, que será nuestra bacteria en estudio (2, 3).

Las especies de *Cronobacter* son un grupo de patógenos oportunistas ubicuos, que causan infecciones potencialmente mortales en recién nacidos y bebés inmunocomprometidos, habiendo sido implicado como agente causante de meningitis y enterocolitis necrotizante.

Ha sido aislado de una amplia variedad de alimentos, incluidos productos como el queso, cereales infantiles, alimentos secos, frutas, verduras, carnes, agua, plantas medicinales, hierbas, especias, pan, arroz y PIF (“powered infant formulae”, fórmulas infantiles reconstituidas), aunque también se deben considerar otras fuentes ambientales de infección (4).

Las infecciones neonatales por *Cronobacter* se asocian principalmente con la contaminación de la fórmula infantil y de los equipos de limpieza y preparación.

El género *Cronobacter* es capaz de sobrevivir con bajos niveles de humedad, soportando niveles de actividad de agua muy bajos 0,14-0,27.

En cuanto a la temperatura, la que más optimiza el desarrollo y el crecimiento de los microorganismos oscila entre 37°C y 43°C.

1.2. Descripción *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter sakazakii, perteneciente al género *Cronobacter*, es un bacilo gram-negativo no esporulado y móvil, oxidasa negativo y catalasa positivo. Es una bacteria anaerobia facultativa sin cápsula.



Ilustración 1. *Cronobacter sakazakii*

C. sakazakii fue denominada de esta manera por primera vez en el año 2007, ya que anteriormente era conocida como “*Enterobacter cloacae* amarillo-pigmentado”, debido al color que presentaba en los cultivos.

Este patógeno oportunista, ubicuo y termotolerante, tiene capacidad para crecer entre 5,5°C- 47°C, además de ser resistente en un ambiente con poca actividad de agua (0,14-0,27).

Es precisamente esta resistencia al estrés osmótico, lo que le va a permitir desarrollarse en las fórmulas en polvo.

Por otra parte, *C. sakazakii* es capaz de formar biofilms que favorecen la captación de nutrientes para su crecimiento. Estos biofilms, cuando maduran, protegen a la bacteria frente agentes físicos como la temperatura o agentes químicos como los antibióticos o desinfectantes.

1.3. *Cronobacter sakazakii* y su presencia en la leche en polvo

C. sakazakii, se ha conseguido aislar de una gran variedad de alimentos, anteriormente citados, además de en otros ambientes como son el ser humano o el intestino de animales.

La PIF reconstituidas para lactantes son el vehículo de transmisión más asociado a este patógeno, lo que puede corresponder a una contaminación intrínseca o extrínseca a la fabricación (5), así como al propio proceso de reconstitución de esta (6, 7).



Ilustración 2. Fórmula infantil en polvo.

Ya en 1988, Muytjens et al. realizaron un estudio para determinar la presencia de enterobacterias en sustitutos de la leche materna en polvo. Se analizaron 141 fórmulas infantiles comercializadas en 35 países. Tras su análisis, hallaron especies de la familia de las enterobacterias en el 52,2% de las muestras analizadas, siendo la que hoy ya se conoce como *C. sakazakii* la tercera especie que se aisló más frecuentemente, hallándose en 20 de las 141 muestras en estudio (8).

Las PIF se han visto implicadas en brotes de enfermedad grave en neonatos, es por esto, que en la mayoría de la literatura científica se centra la presencia de *C. sakazakii* en las fórmulas para lactantes (9,10).

Además, conviene recordar que las leches maternizadas en polvo no son productos estériles y pueden por ello contaminarse fácilmente, lo que constituye un factor de riesgo por el potencial de multiplicación durante la reconstitución de la fórmula (11). En los hospitales, la contaminación ambiental y el abuso de temperatura en la reconstitución de la fórmula han sido factores contribuyentes para el desarrollo de infecciones en neonatos (12).

C. sakazakii es capaz de sobrevivir a temperaturas extremas, sobreviviendo incluso a temperaturas de pasteurización. Como se ha indicado en la literatura científica, Skladal et al. identificaron a este patógeno como una de las principales bacterias contaminantes en los envases de leche UHT (13).

La FAO/OMS recomienda enfriar la temperatura del agua hervida por debajo de 70°C para la preparación segura de PIF (14). El estrés por aplicación de calor daña la pared celular bacteriana y causa la ruptura del DNA genómico y un plegamiento proteico incorrecto (15). Por el contrario, se ha demostrado que *Cronobacter spp.* puede sobrevivir al estrés por calor subletal, pudiendo adaptarse, al inducir una respuesta ante su sometimiento a altas temperaturas. (16).

1.4. Manifestaciones clínicas de infección por *C. sakazakii*

Cronobacter sakazakii es un patógeno oportunista asociado a brotes de enterocolitis necrotizante, meningitis y sepsis en neonatos y lactantes (17, 18).

La tasa de morbilidad y mortalidad como resultado de infección por *C. sakazakii* dependen del estado inmunitario, por tanto, los recién nacidos y los bebés inmunocomprometidos hasta los 12 meses de edad serán una población con mayor riesgo de contraer la infección por este patógeno (19, 20, 21).

En 1961 Urmenyi y Franklin fueron los que informaron de los primeros casos de meningitis en neonatos asociados a infección por *C. sakazakii* que aparecieron en Inglaterra (22).

Uno de los casos más severos de infección por *C. sakazakii* registrado hasta la fecha, tuvo lugar en Francia en 1994, en una unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN). Se infectaron 17 niños recién nacidos, de los cuales 7 fueron afectados por enterocolitis necrotizantes, 1 por septicemia y 1 por meningitis. En los 8 lactantes restantes no se identificaron síntomas clínicos. Sin embargo de todos los casos se produjeron 3 muertes por la infección (20).

El patógeno recibió atención mundial, tras un brote de meningitis en Tennessee en 2001.

En la literatura científica, hay numerosas referencias que abordan el papel de *C. sakazakii* en diferentes brotes de infección potencialmente mortal en recién nacidos y bebés inmunocomprometidos (23, 24, 25).

Se ha visto que *C. sakazakii* puede causar bacteriemia y sepsis, acumulación de líquido cefalorraquídeo, abscesos cerebrales, enterocolitis necrotizante (NEC), meningitis e infartos cerebrales (26, 27).

La NEC se caracteriza por inflamación y muerte del tejido intestinal, constituyendo una de las afecciones gastrointestinales más comunes en neonatos. Este patógeno es responsable de hasta el 80% de las muertes infantiles producidas por NEC (23).

1.5. Citometría de flujo

La citometría de flujo molecular (FCM, "Flow cytometry") es un método óptico útil para el análisis de células individuales en matrices complejas.

Es una técnica sencilla, que permite medir y analizar múltiples propiedades de células individuales dentro de una población heterogénea. El uso de métodos de recuento en placa no proporciona información directa sobre el estado fisiológico de bacterias estresadas (28). Sin embargo, la citometría de flujo proporciona información sobre la heterogeneidad fisiológica de las poblaciones bacterianas (29).

1.5.1. Fundamento

La citometría de flujo consiste en hacer pasar los microorganismos en suspensión en un líquido, ante una haz de luz láser.

La luz es tanto reflejada (dispersada) como absorbida por los microorganismos. Esta dispersión es una propiedad intrínseca, que puede ser analizada para estimar el número, tamaño y forma de los microorganismos.

La alta sensibilidad de la técnica permite detectar cantidades pequeñas de microorganismos (30). La FCM utiliza detectores electrónicos para medir la intensidad de la luz o la fluorescencia dispersada con una longitud de onda concreta. Mediante el uso de filtros, se puede separar la luz de diferentes longitudes de onda, lo que permite realizar mediciones de distintas características celulares. Estas medidas multiparamétricas resultan de gran utilidad, ya que permiten correlacionar las diferentes características y así definir subpoblaciones y/o distinguir entre diferentes tipos de células. En los últimos tiempos se han publicado excelentes revisiones sobre la FCM y la microbiología (31, 32, 33, 34).

1.5.2. La FCM y el recuento de microorganismos

En el laboratorio se necesita a menudo determinar el número de células viables en una muestra o cultivo de interés. Tradicionalmente esto se obtiene mediante la siembra de la muestra en placas que contienen agar de cultivo. Sin embargo, esta técnica conlleva una serie de problemas, que en la mayoría de los casos se asocia a la cantidad excesiva de tiempo necesario para obtener resultados; además, otra desventaja significativa de los métodos de cultivo tradicionales es su incapacidad para aislar organismos viables pero no cultivables (35). Por este motivo, se han propuesto otras técnicas como alternativa con el fin de disminuir el tiempo necesario para determinar el número de células viables en la muestra de interés (32). La FCM permite realizar un recuento directo mediante la determinación del número de partículas presentes en un volumen conocido de muestra. Las células se incuban con un colorante fluorescente adecuado y la viabilidad de estas, estará en función de la adquisición o exclusión del colorante. De esta manera se puede obtener un recuento total y un recuento de viables de forma simultánea (36).

1.5.3. Parámetros medibles mediante FCM

A través del uso de las medidas de luz, fluorescencia y absorbancia de células teñidas o no, se pueden obtener una gran cantidad de parámetros. Estos son: tamaño y forma celulares, viabilidad, pH intracelular, potencial de membrana, así como diversos componentes celulares: DNA, RNA, proteínas, lípidos, actividad enzimática (33).

En el caso de la fluorescencia, los parámetros celulares pueden caracterizarse como intrínsecos o extrínsecos según la necesidad de reactivos. Para el ensayo de la fluorescencia intrínseca no es necesario un pretratamiento, a diferencia de la fluorescencia extrínseca, la cual, requiere que la tinción, con colorantes fluorescentes de los componentes celulares, sea realizada con anterioridad al análisis. La concentración de células viables en un cultivo es una de las mediciones más importantes para la evaluación de procesos biológicos. La forma más común para valorar la viabilidad es la detección de la integridad de la membrana celular, la cual puede detectarse por inclusión o exclusión de un colorante. Los colorantes de exclusión tiñen los ácidos nucleicos de células con la membrana dañada (consideradas células muertas). Dentro de estos tendríamos el Propidio de yodo y Etidio de bromuro, que tiñen el DNA y el RNA. Además, también se ha utilizado para monitorizar la viabilidad bacteriana el colorante fluorescente Sytox Green (36). Por el contrario, los métodos de retención de colorantes utilizan sustratos no fluorescentes que sirven como pruebas de viabilidad. El colorante es degradado por las enzimas intracelulares (presentes solo en células vivas) dando lugar a productos fluorescentes.

1.6. Justificación

Este trabajo surge de la necesidad de analizar el comportamiento de *C. sakazakii* en las fórmulas de leche infantil, ya que como he dicho anteriormente se trata de un patógeno oportunista, que tiene gran correlación con las fórmulas de leche en polvo y a su vez se asocia a casos graves de infección en neonatos. El modo de reconstitución de la fórmula, así como su recalentamiento serán puntos que requieran especial atención.

Por otro parte, se ha visto que el modelo de recuento en placa conlleva una gran cantidad de tiempo para obtener resultados y con ello no es posible determinar células viables comprometidas, lo que si se logra mediante su análisis por citometría de flujo.

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de este estudio es analizar la recuperación de la bacteria *Cronobacter sakazakii* en PIF tras ser sometida a temperaturas entre 55°C y 95°C a intervalos de 10°C, utilizando métodos clásicos y citometría de flujo.

Como **objetivos específicos** se plantea el detectar células viables comprometidas pero no cultivables y evaluar el impacto de los tratamientos térmicos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño

El diseño del presente estudio es de tipo experimental, basándose en primer lugar en una búsqueda bibliográfica y en segundo lugar desarrollándolo de manera experimental, con parámetros controlados.

3.2. Material

Para la realización del estudio, se utilizaron los siguientes materiales e instrumentos:

- Medio de cultivo TSA (Caldo de Soja Trypticaseína)
- Medio de cultivo TSB (Agar de Soja Trypticaseína)
- Fórmula infantil en polvo ó PIF (Hero Baby 1)
- Cultivo de *Cronobacter sakazakii*, cepa ATCC 29544 (población 10⁹ UFC/ml)
- Agua destilada
- NaCl 0,9%
- Glicerol
- Tritón X-100 al 1%
- Kit de recuento y viabilidad bacteriana Live / Dead BacLight (Molecular Probes, Invitrogen, CO, EE. UU.)
- Agitador vórtex, con placa calefactora
- Báscula
- Mechero Bunsen
- Micropipetas
- Puntas
- Asa de siembra

- Matraz Erlenmeyer
- Probeta
- Placas de Petri
- Frasco de vidrio con tapón roscado
- Tubos Falcom (5 y 10ml)
- Tubos eppendorf de 1ml
- Tubos FC
- Parafilm
- Gradillas
- Autoclave
- Estufa a 37°C
- Centrifuga
- Baño María
- Citómetro de flujo (Cytomics FC 500 -Beckman Coulter Brea, CA, EE.UU.)

Además, se utilizaron otros materiales propios del trabajo en laboratorio, como guantes, bata y marcador.

3.3. Metodología

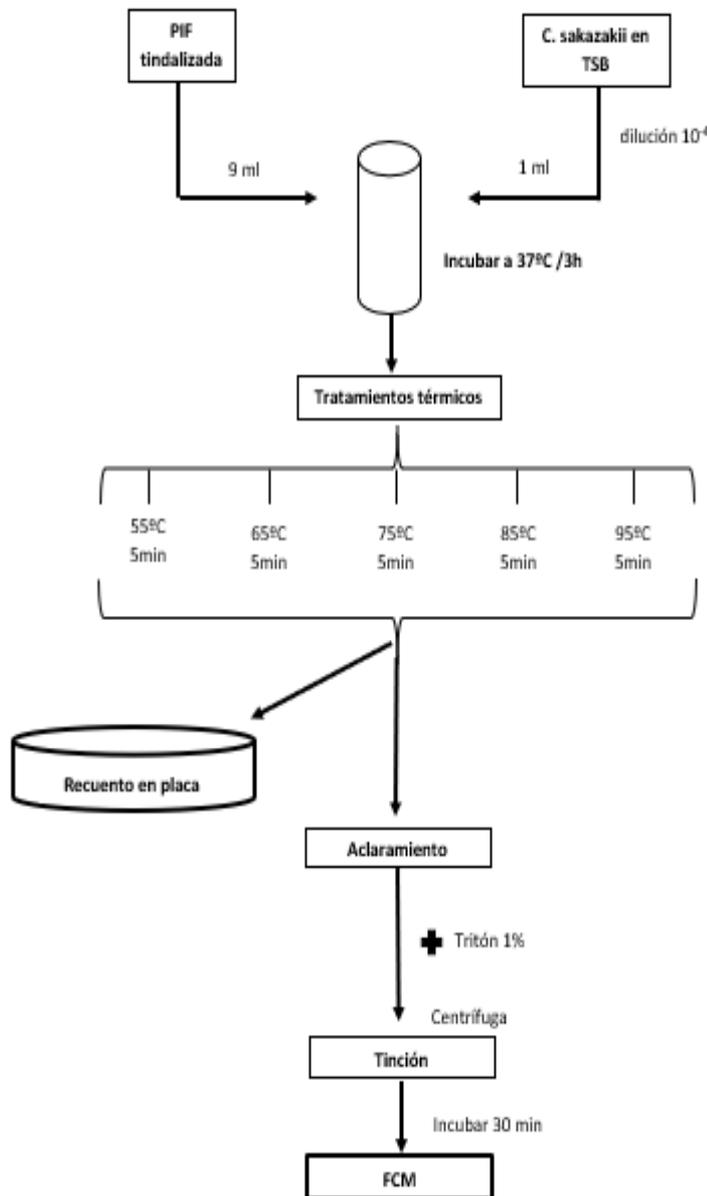


Ilustración 3. Diagrama de flujo

Con respecto a la metodología, me gustaría indicar que esta fue planificada en su totalidad, tal como se muestra en la Ilustración 3.

Debido a la situación de pandemia ocasionada por la Covid-19, que nos ha afectado en los últimos meses, esta metodología no pudo llevarse a la práctica en su totalidad.

No obstante, como el planteamiento de esta estuvo programado y se pudo llegar a iniciar, a continuación me referiré a ella como si se hubiera podido llevar a la práctica por completo.

3.3.1. Recuperación de la cepa de *Cronobacter sakazakii*

En el presente estudio se utilizó la cepa *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 conservada a -40°C. Se recuperó en medio de cultivo TSB. Se realizó el experimento por duplicado. Para ello se prepararon 10 alícuotas, cada una de las cuales contenía 1 ml del cultivo con 9 ml de caldo TSB.

Al mismo tiempo se recuperó sembrando en superficie de agar TSA, dispuesto en placas de Petri.

Tanto las cepas inoculadas en medio TSB como las sembradas en TSA, se incubaron a 37°C durante 24 horas.

3.3.2. Obtención de las muestras de estudio

Tras 24 hora de incubación, se realizó la dilución de los dos cultivos, hasta una concentración de 10^{-4} . De esta manera se obtuvo un cultivo con una población de 10^5 UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro), sobre la que poder realizar el estudio.

Se necesitó que el cultivo tuviera esa concentración para que en fases posteriores fuera posible realizar el recuento de las poblaciones bacterianas.

Posteriormente, se reconstituyeron 100 ml de PIF Hero Baby 1, al 10% en agua destilada, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Esta misma fue sometida a un proceso de tindalización en el autoclave, con un programa de 100°C, durante 5 minutos. Tras este primer proceso de tindalización, se incubó la PIF en estufa a 37°C, durante 24 horas.

A continuación, se sometió a un segundo proceso de tindalización (100°C/ 5 minutos) con el fin de eliminar las posibles esporas que habrían sido activadas (germinación) durante el proceso de incubación.

A partir de la PIF previamente preparada, se dispusieron las 10 alícuotas, dos por cada temperatura a las que se va a someter el cultivo. En cada una de estas alícuotas, se inocularon 9 ml de la PIF más 1 ml de la dilución 10^{-4} , del cultivo de *C. sakazakii*. Se incubaron a 37°C, durante 3 horas.

3.3.3. Tratamientos térmicos

Cada una de las alícuotas previamente preparadas se introdujeron, de una en una, en un baño termostático, a las temperaturas de 55°C (primer tratamiento), 65°C (segundo tratamiento), 75°C (tercer tratamiento), 85°C (cuarto tratamiento) y 95°C (quinto tratamiento). Cada alícuota se mantuvo durante 5 minutos a su temperatura correspondiente.

3.3.4. Siembra en placa y recuento

Tras someter a las muestras a las temperaturas ya descritas, se llevaron a cabo diluciones seriadas de hasta 10^{-7} , de cada una de las muestras anteriores.

Cada muestra se sembró en TSA mediante la técnica de aislamiento por gota. Esta técnica se realizó dividiendo en cuatro secciones cada placa, de manera que se dispusieron dos placas por muestra. En cada sección, previamente nombrada con su dilución correspondiente, se pusieron 3 gotas de 10 μ l del cultivo. Se realizó la siembra por duplicado.

Tras la realización de la siembra en placa, fueron incubadas en la estufa a 37°C durante 24 horas.

Se procedió de la misma manera, con cada una de las muestras para cada temperatura en estudio.

Tras el tiempo de incubación, se pudieron observar las colonias de *C. sakazakii*, tal como se muestra en la ilustración 4.

Se realizó el recuento de colonias en cada una de las secciones de las placas y a partir del mismo y mediante los cálculos pertinentes, se obtuvieron las UFC/ml de muestra.

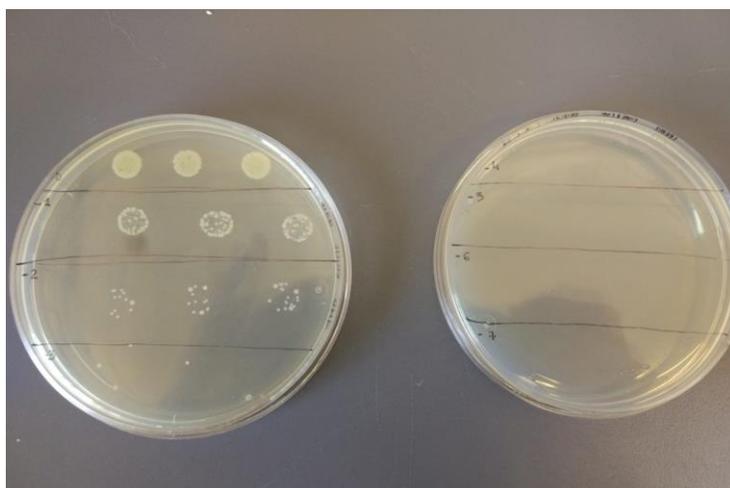


Ilustración 4. Placa con medio TSA en la que se observa el crecimiento de *C. sakazakii*.

3.3.5. Preparación de las muestras para introducir al citómetro

La técnica usada en la preparación de las muestras para su posterior análisis en el citómetro fue desarrollada y utilizada con anterioridad en el equipo de trabajo de manera que se siguió el mismo protocolo.

Aclaramiento:

Tras someter cada alícuota al tratamiento térmico, se procedió a realizar un aclaramiento de las muestras. Para ello fue necesario realizar la preparación de Tritón X-100 al 1%.

Se preparó una batería de tubos Eppendorf, en los cuales se dispuso 1ml de cada muestra sometida a tratamiento térmico. Cada tubo fue nombrado con la temperatura a la que había sido sometida la muestra previamente.

A cada tubo se le añade 50 µl de Tritón 1% y se dejó incubar a 37°C durante 40 minutos.

Transcurrido este tiempo, se sometió a las muestra a centrifugación a 14000 rpm, durante 10 minutos. De esta manera, tras terminar la centrifugación, obtuvimos dos fases en el tubo, siendo el sobrenadante, la capa de grasa. Esta la retiramos con ayuda de una pipeta desechable.

Una vez eliminada la capa de grasa, añadimos a cada uno de los tubos 998,5 µL de NaCl al 0,9%. Posteriormente, fueron llevados al vórtex para su homogenización.

Tinción:

El contenido de los tubos se trasvasó cuidadosamente a tubos FC.

La suspensión de células se tiñó usando el kit de conteo bacteriano y viabilidad Live / Dead BacLight (Molecular Probes, Invitrogen, CO, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los reactivos que contenía el kit fueron:

- SYTO9 tinción de ácido nucleico fluorescente verde; tiñe todas las células y nos sirve para hacer un recuento total de células.
- Ioduro de Propidio (PI) tinción de ácido nucleico fluorescente rojo; solo tiñe aquellas células que tienen las membranas citoplasmáticas dañadas.

Se tomaron 10 μL de la suspensión de bacterias, añadiéndole 987 μL de NaCl 0,9%, 1,5 μL de 30mM de Ioduro de Propidio (PI) tinción de ácido nucleico fluorescente roja y 1,5 μL de 3,34Mm de tinción de ácido nucleico fluorescente verde SYTO9.

El volumen total en cada tubo FC fue de 1000 μL .

Se dejó incubar los tubos en oscuridad, tapándolos con papel de aluminio y almacenándolos en un armario, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este proceso fue repetido para cada una de las muestras sometidas a los distintos tratamientos térmicos.

Mediciones:

Los análisis de FC para cada una de las muestras se realizaron utilizando un Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.). Con una longitud de onda de excitación de 488 nm a partir de un láser de argón azul.

Cada célula o evento, estuvo caracterizada por dos parámetros que median la emisión de fluorescencia: canal FL1 para la emisión de la fluorescencia verde y canal FL3 para la emisión de fluorescencia roja.

El SYTO9 fluorescente verde puede ingresar a todas las células, lo que permite evaluar el recuento total de eventos, mientras que el fluorescente rojo (IP) solo ingresa a las células con membranas citoplasmática dañadas.

Los filtros ópticos de paso de banda fueron configurados para medir la fluorescencia verde a 525/40nm (FL1; SYTO9 FL1 Log) y la fluorescencia roja de PI a 620/30nm (FL3; PI FL3 Log).

Las mediciones se realizaron a una velocidad de flujo baja (10 $\mu\text{L}/\text{min}$), hasta identificar 500000 eventos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo las pautas previamente establecidas en el grupo de investigación (37), la figura del citómetro obtenida tras la introducción de células muertas de *C. sakazakii* sería la mostrada en la Figura 1. Los eventos o células se distribuyen de acuerdo con la intensidad de la fluorescencia a las dos longitudes de onda estudiadas. De esta forma, se fija una ventana de eventos en la que siempre encontraremos las células muertas, utilizando así esta zona como control en futuros ensayos diferenciando con claridad entre células vivas y muertas.

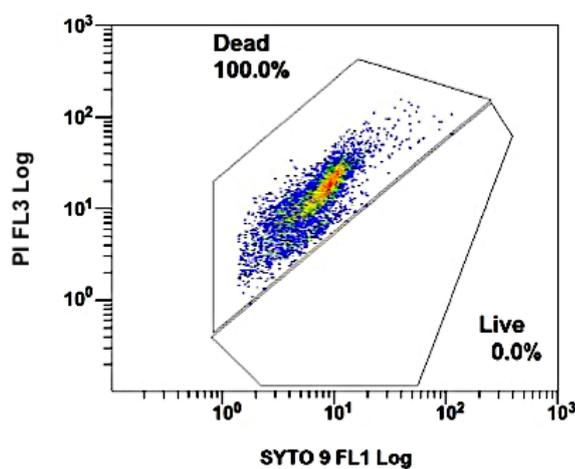


Figura 1. Células muertas de *Cronobacter sakazakii* (37).

El presente estudio se planteó con el objetivo de someter a las bacterias a distintos tratamientos térmicos, esto es, 55, 65, 75, 85 y 95 °C. Los datos esperados tras dichos tratamientos mostrarían una progresiva disminución del número de células vivas con un incremento de los eventos presentes en la zona de las células muertas (ver *Figura 1*).

En la *Figura 2*, (37) se observan los eventos (células) obtenidos tras la introducción al citómetro de una población de *C. sakazakii* sin haber sido sometida a tratamiento térmico (control). Se observa un porcentaje de células muertas mínimo, estando el mayor porcentaje de eventos en la zona clasificada como células vivas.

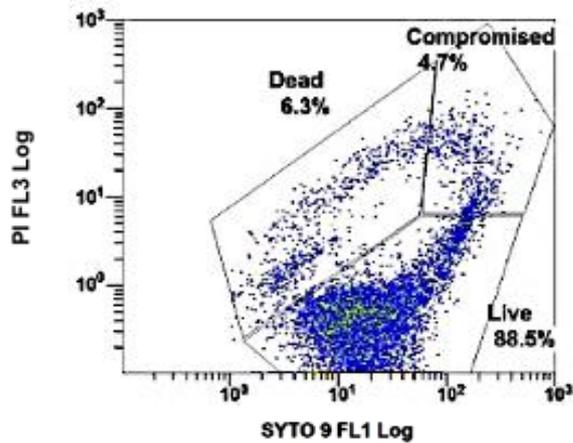


Figura 2. Células no sometidas a tratamiento térmico (37).

La identificación de las áreas de células vivas y muertas permitiría la identificación de una tercera área en la que se situarían las células con membranas comprometidas (han sido teñidas con ambos colorantes). Las células comprometidas son células dañadas que, aunque metabólicamente activas, no son capaces de crecer en un cultivo convencional, es decir, no formarían colonias visibles.

En la Figura 3 y en la Figura 4 se muestra la distribución de los eventos observados en el citómetro tras someter a las bacterias a los tratamientos térmicos de 60 y 65 °C durante 5 min (37).

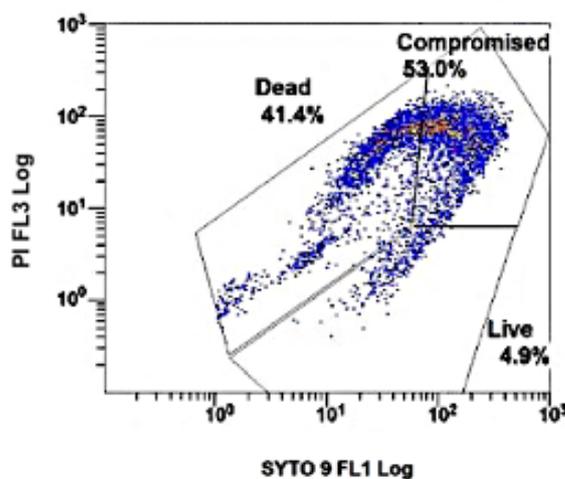


Figura 3. Células sometidas a 60 °C durante 5 min (37).

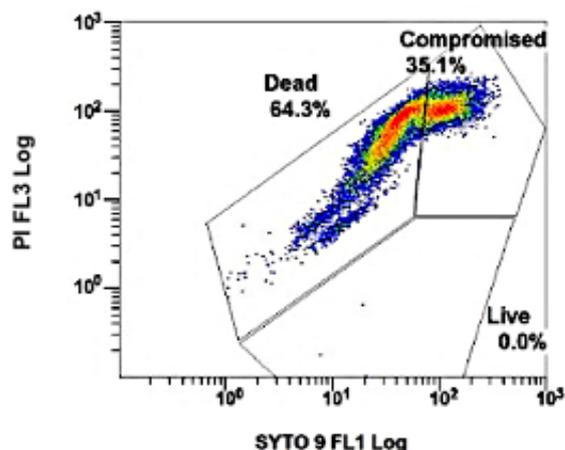


Figura 4. Células sometidas a 65 °C durante 5 min (37).

Al igual que en el trabajo de Paloma et al. se esperaría un aumento de eventos en la región denominada como “eventos comprometidos” tras el sometimiento de la muestra a un tratamiento térmico suave. Por otra parte, a mayor incremento de la temperatura, se esperaría que la nube de eventos comprometidos se fuera desplazando progresivamente hacia la “región de eventos muertos” (37).

C. sakazakii es una bacteria patógena, capaz de producir biopelículas, que suelen ser patógenas, causando con ello infección por transmisión alimentaria o infecciones nosocomiales (38). Además, esta característica permite al microorganismo resistir ante condiciones ambientales adversas, pudiendo así desarrollarse en productos de la industria alimentaria o material hospitalario. En el presente estudio se pretendían usar cinco tratamientos térmicos diferentes para analizar la viabilidad de *C. sakazakii* y poder así determinar las células bacterianas comprometidas viables pero no cultivables tras el sometimiento de estas al estrés térmico, así como las bacterias muertas. Además, se sembrarían posteriormente en agar con el fin de analizar su capacidad para formar colonias. Según paloma et al. cabría esperar una fuerte correlación entre células vivas por FC y recuentos en placa de agar TSA (37).

Hasta la fecha, la naturaleza de las bacterias comprometidas de *C. sakazakii* no esta aclarada. Recientemente, Paloma et al. pudieron detectar este estado intermedio vinculando a las propiedades fisiológicas de las células bacterianas (37). Además, observaron un patrón distintivo de fluorescencia en forma de curva, para una suspensión de células de *C. sakazakii* sometida a tratamiento térmico. La nube de eventos siguió un patrón en forma de curva, reflejando los

diferentes estados fisiológicos de las bacterias a medida que avanza el daño celular. Pasarían por una primera fase de daño de membrana externa sin afectarse la membrana citoplasmática, pues el PI no podría penetrarla y en una segunda fase en la que se produciría el daño de la membrana citoplasmática.

Varios autores (39, 40, 41) han declarado que la integridad de la membrana depende de las condiciones ambientales (temperatura, tiempo y diferentes compuestos) como del estado fisiológico de la célula. Arku et al. (41) mostró una menor supervivencia de *C. sakazakii* ante un aumento de temperatura de 52 a 67°C durante 30 minutos, Choi et al. (42) encontró que la proporción de células de *C. sakazakii* en la región de fluorescencia PI, aumento bajo la influencia de compuestos antimicrobianos en tiempos de 5, 10 o 30 minutos.

Las fórmulas de leche en polvo pueden estar contaminadas por *C. sakazakii*. Al reconstituir la fórmula, el patógeno podría sobrevivir a tratamientos térmicos suaves (43). La FAO/OMS propuso una serie de recomendaciones para la reconstitución de PIF en UCI de neonatos o en el hogar asegurando así una correcta manipulación que garantice la seguridad de PIF (14). Sin embargo, hay otras instrucciones para la reconstitución de PIF que sugieren enfriar el agua hasta 40°C con el fin de evitar quemaduras o pérdidas de propiedades nutricionales y organolépticas en la fórmula (43, 44).

Se ha de tener en cuenta que un recalentamiento de la PIF (35-40°C) previamente preparada así como un tratamiento térmico suave (40-70°C), del agua para reconstituir la fórmula, supondrían un riesgo para los niños pues como se ha visto las células no tratadas o tratadas con calor suave pueden recuperarse y crecer durante el tiempo de retención (44).

Para el presente estudio podríamos esperar que a los tratamientos de 75°C, 85°C y 95°C no se observara crecimiento en placa ni células vivas al citómetro. Por el contrario, con los tratamientos de temperatura más suaves de 55°C y 65°C, al igual que Paloma et al. (37) cabría esperar que no se eliminaran todas las bacterias en recuentos de agar ni en citómetro de flujo. Esto nos muestra que la aplicación de temperaturas suaves en la reconstitución o recalentamiento de la fórmula no garantizan la seguridad alimentaria.

Además, el periodo de enfriamiento ha de realizarse en condiciones estériles, de manera que nos garantice llegar de manera segura a la temperatura de consumo.

5. CONCLUSIONES

Los tratamientos térmicos suaves aplicados a la reconstitución de PIF, no son adecuados para garantizar la seguridad de la fórmula. Se ha de remarcar la importancia que tiene el llevar el agua que se utilice para su reconstitución a temperaturas de ebullición. El uso de temperaturas suaves en el momento de reconstitución de la fórmula o para un recalentamiento, aumentan de forma clara el riesgo de contaminación por *C. sakazakii*. Como mostró Paloma et al., a temperaturas de 60 o 65°C no se eliminaron todas las bacterias y se mostró un porcentaje alto de bacterias comprometidas que pueden dar lugar a células viables patógenas, ya que este estado fisiológico intermedio mantiene las características patógenas (37). Gracias a la FCM se pudo determinar las células comprometidas viables pero no cultivables, lo cual no podría haberse determinado mediante agar en placa.

Como prevención en UCI neonatal y bebés inmunodeprimidos, sería conveniente el análisis mediante citometría de flujo, de las fórmulas infantiles, antes de la administración al neonato, con el fin de detectar células comprometidas que puedan suponer un riesgo para el bebé.

6. LIMITACIONES

La principal y gran limitación para el desarrollo del presente estudio, ha sido la pandemia sufrida a nivel mundial por el Covid-19.

Aunque se pudo desarrollar el planteamiento de la metodología, no fue posible llevar a cabo el desarrollo completo de la parte analítica.

Por este motivo, los resultados del estudio han tenido que ser estimados en base al estudio realizado por Paloma et al. (37), ya que no se pudo llegar a realizar la parte experimental del proyecto en su totalidad.

La coyuntura actual no ha permitido completar el trabajo de la manera deseada.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Farmer JJ, III, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. The Enterobacteriaceae Study Group *Enterobacter sakazakii*: a new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens. Int J Syst Bacteriol 1980; 30:569-84. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-30-3-569>
- (2) Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N. et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. BMC Evol Biol 2007; 7, 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-64>
- (3) Joseph S, Desai P, Ji Y, Cummings CA, Shih R, Degoricija L, et al. Comparative Analysis of Genome Sequences Covering the Seven *Cronobacter* Species. PLoS ONE 2012; 7(11): e49455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049455>
- (4) Mullane, N., Iversen, C., Healy, B., Walsh, C., Whyte, P., Wall, P., Quinn, T. and Fanning, S. *Enterobacter sakazakii*: an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. Minerva Pediatr 2007; 59, 137-148. <https://doi.org/10.21427/krf1-v746>
- (5) Mullane, N.R., Drudy, D., Whyte, P., O'Mahony, M., Scannell, A.G.M., Wall, P.G. and Fanning, S. *Enterobacter sakazakii* biological properties and significance in dried infant milk formula (PIF) powder. Int J Dairy Technol 2006; 59, 102-111. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00252.x>
- (6) Barron JC, Forsythe SJ. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. J Food Prot 2007; 70:2111-7; PMID:17900090. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2111>

- (7) Riedel, K. and Lehner, A. Identification of proteins involved in osmotic stress response in *Enterobacter sakazakii* by proteomics. *Proteomics* 2007; 7, 1217-1231. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600536>
- (8) Muytjens HL, Roelofs-Willemse H, Jaspars GH. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(4):743-746. <https://doi.org/10.21427/krf1-v746>
- (9) Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Lemons JA, for the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr* 2004; 144:821. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.02.045>
- (10) Van Acker J, de Smet F, Muyldermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol.* 2001;39(1):293-297. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.293-297>.
- (11) Koletzko B, Shanir R, Ashwell M, and early Nutrition academy. Quality and Safety Aspects of Infant Nutrition. *Ann Nutr Metab.* 2012; 60: 179-84.
- (12) Bar-Oz, B.; Preminger, A.; Peleg, O.; Block, C.; Arad, I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr.* 2007, 90, 356–358. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2001.tb00319.x>
- (13) Skladal, P., Mascini, C. Salvadori, and G. Zannoni. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk as L-Lactate biosensor. *Enzyme Microb. Technol* 1993; 15:508-512.
- (14) (WHO; FAO. Safe Preparation, Storage and Handling of Powdered Infant Formula. https://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf

(15) Arku, B.; Fanning, S.; Jordan, K. Flow cytometry to assess biochemical pathways in heat-stressed *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *J. Appl. Microbiol.* 2011, 111, 616–624.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05075.x>

(16) Arku, B.; Fanning, S.; Jordan, K. Heat adaptation and survival of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *Foodborne Pathog. Dis.* 2011, 8, 975–981. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0819>

(17) Mullane NR, Iversen C, Healy B, et al. *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. *Minerva Pediatr.* 2007;59(2):137-148.<http://doi.org/10.21427/krf1-v746>

(18) Proudly I. *Cronobacter* spp. ("*Enterobacter sakazakii*" sensu lato): implication dans la contamination des préparations en poudre pour nourrissons et enfants en bas âge [*Enterobacter sakazakii* in powdered infant food formulas]. *Can J Microbiol.* 2009;55(5):473-500. <https://doi:10.1139/w08-131>

(19) Joseph S, Forsythe SJ. Predominance of *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 4 in Neonatal Infections. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17(9):1713-1715. <https://doi:10.3201/eid1709.110260>.

(20) Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend S, Cheetham P, Loc-Carrillo C, Fayet O, Prère M-F, Forsythe SJ. Genotypic and phenotypic analysis of *enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3979-85; PMID:17928419; <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01075-07>

(21) Liu H, Cui JH, Cui ZG, Hu GC, Yang YL, Li J, Shi YW. *Cronobacter* carriage in neonate and adult intestinal tracts. *Biomed Environ Sci: BES* 2013; 26:861-4; PMID:24215882; <http://dx.doi.org/10.3967/bes2013.011>

(22) Urmenyi, A. M., and A. W. Franklin. Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* 1961; 1:313-315.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(61\)91481-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(61)91481-7)

- (23) Lai KK. Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Medicine* 2001; 80:113-22; PMID:11307587; <http://dx.doi.org/10.1097/00005792-200103000-00004>
- (24) Willis J, Robinson JE. Enterobacter sakazakii meningitis in neonates. *Pediatr Infect Dis J*. 1988;7(3):196-199. <https://doi:10.1097/00006454-198803000-00012>
- (25) Feeney A, Kropp KA, O'Connor R, Sleator RD. Cronobacter sakazakii: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. *Gut Microbes*. 2014;5(6):711-718. <https://doi:10.4161/19490976.2014.983774>
- (26) Townsend S, Hurrell E, Forsythe S. Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiol* 2008; 8:64; PMID:18423002; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-64>
- (27) Bowen AB BC. Invasive Enterobacter sakazakii disease in infants. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(8):1185-9. <https://doi.org/10.3201/eid1208.051509>
- (28) Arku, B.; Fanning, S.; Jordan, K. Flow cytometry to assess biochemical pathways in heat-stressed Cronobacter spp. (formerly Enterobacter sakazakii). *J. Appl. Microbiol.* 2011, 111, 616–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05075.x>
- (29) Ambriz-Aviña, V.; Contreras-Garduño, J.A.; Pedraza-Reyes, M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. *BioMed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/461941>
- (30) Boer, E.; Beumer, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 1999; 50:119-130. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00081-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00081-1)

- (31) Álvarez-Barrientos, A.; Arroyo, J.; Cantón, R.; Nombela, C.; Sánchez-Pérez, M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13:167-195. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.2.167-195.2000>
- (32) Davey, H.M. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci.* 2002; 24:91-97. <https://doi.org/10.1023/A:1024106317540>
- (33) Rieseberg, M.; Kasper, C.; Reardon, K.F.; Scheper, T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 56:350-360. <https://doi.org/10.1007/s002530100673>
- (34) Veal, D.A.; Deere, D.; Ferrari, B.; Piper, J.; Attfield, P.V. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol.* 2000; *Methods* 243:191-210. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00234-9)
- (35) Davey, H.M.; Kell, D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations – the importance of single-cell analyses. *Microbiol.* 1996; *Rev.* 60:641-696. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8987359/>
- (36) Davey, H.M.; Kaprelyants, A.S.; Weichart, D.H.; Kell, D.B. Approaches to the estimation of microbial viability using flow cytometry. In: *Current Protocols in Cytometry*. New York: Wiley, 1999; pp 11.3.1-11.3.20 <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1103s07>
- (37) Cal-Sabater, P.; Caro, I.; Castro, M.J.; Cao, M.J.; Mateo, J.; Quinto, E.J. Flow Cytometry to Assess the Counts and Physiological State of *Cronobacter sakazakii* Cells after Heat Exposure. *Foods* 2019, 8, 688. <https://doi.org/10.3390/foods8120688>
- (38) Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Nawaz, M.A.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Kamil, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018, 81, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

- (39) Arku, B.; Fanning, S.; Jordan, K. Heat adaptation and survival of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *Foodborne Pathog. Dis.* 2011, 8, 975–981. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0819>
- (40) Baatout, S.; De Boever, P.; Mergeay, M. Temperature-induced changes in bacterial physiology as determined by flow cytometry. *Ann. Microbiol.* 2005, 55, 73–80. <https://doi.org/10.3390/foods6120107>
- (41) Arku, B.; Fanning, S.; Jordan, K. Flow cytometry to assess biochemical pathways in heat-stressed *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *J. Appl. Microbiol.* 2011, 111, 616–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05075.x>
- (42) Choi, M.J.; Kim, S.A.; Lee, N.Y.; Rhee, M.S. New decontamination method based on caprylic acid in combination with citric acid or vanillin for eliminating *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 166, 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.011>
- (43) Parra-Flores, J.; Juneja, V.; de Fernando, G.G.; Aguirre, J. Variability in cell response of *Cronobacter sakazakii* after mild-heat treatments and its impact on food safety. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00535>
- (44) Forsythe, S.J. FSA Project B13010. Bacteriocidal Preparation of Powdered Infant Formula, Final Report. 2009. https://www.researchgate.net/publication/248707161_FSA_UK_Bacteriocidal_preparation_of_infant_formula

ANEXOS

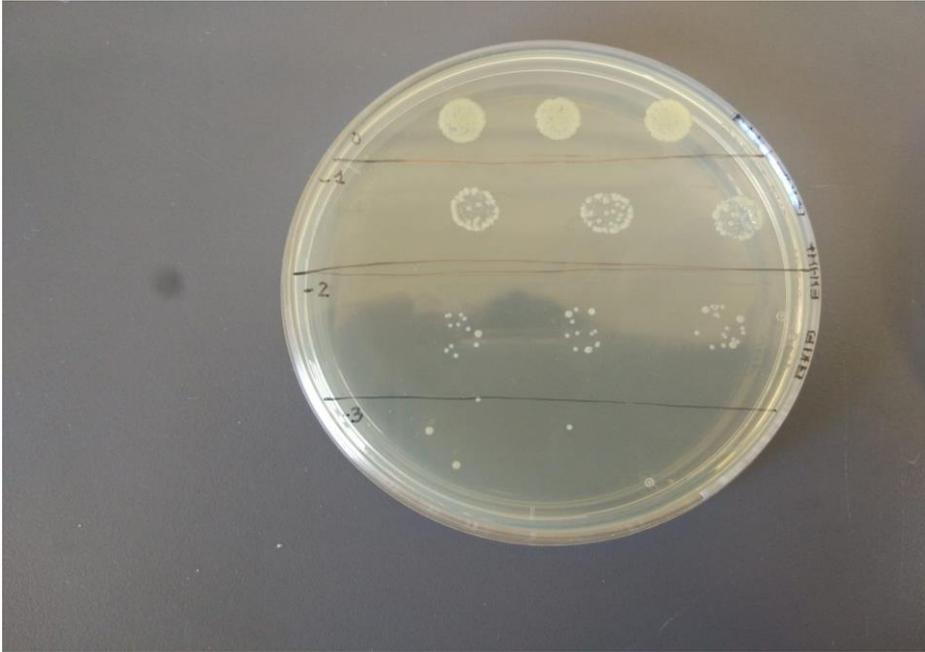


Ilustración 5. Placa TSA en la que se observan las colonias de *C. sakazakii*.



TABLA NUTRICIONAL		Por 100 ml de fórmula*	
Valores medios			291/69
VALOR ENERGÉTICO			
NUTRIENTES			
Grupos	g	3,4	
de los cuales saturados	g	1,2	
Ac. Linoléico	mg	5,18	
Ac. α-Linolénico (ALA)	mg	57	
Ac. Docosahexaénico (DHA)	mg	1,4	
Ac. Araquidónico (ARA)	mg	3,5	
Hidratos de carbono	g	81,1	
de los cuales azúcares	g	7,9	
lactosa	g	8,0	
Fibra alimentaria	g	0,2	
Galactooligosacáridos (GOS)	g	0,2	
Proteínas	g	1,4	
caseína	g	0,5	
suero	g	0,9	
MINERALES			
Sodio	mg	24	
Potasio	mg	84,0	
Cloruro	mg	47,0	
Calcio	mg	60,1	
Fósforo	mg	36,0	
Balancedo Ca/P		1,7	
Magnesio	mg	7,70	
Hierro	mg	0,42	
Zinc	mg	0,42	
Cobalto	µg	50	
Yodo	µg	16,9	
Selenio	µg	2,5	
Manganeso	µg	11	
Fluoruro	µg	<69	
VITAMINAS			
Vitamina A	µg	63,0	
Vitamina D	µg	1,5	
Tiamina	µg	52	
Riboflavina	µg	97	
Niacina	mg	0,50	
Ac. pantoténico	mg	0,34	
Vitamina B6	µg	52	
Biotina	µg	1,2	
Folato	µg	17,0	
Vitamina B12	µg	0,22	
Vitamina C	mg	13	
Vitamina K	µg	5,2	
VITAMINA E			
α-tocoferol	mg	1,5	
taurina	mg	4,8	
inositol	mg	3,7	
Colina	mg	19	
Nucleótidos	mg	0,81	

*100 ml = 14 g de Hero Baby Leche para Lactantes 1 + 90 ml de agua

MODO DE PREPARACIÓN

Para una correcta alimentación es importante seguir las siguientes instrucciones:

- Lavarse y secarse bien las manos antes de preparar el biberón.
- Estérilizar los biberones, tetinas y demás utensilios a utilizar en la preparación de Hero Baby Leche para Lactantes 1.
- Poner en el biberón la cantidad de agua hervida indicada en la tabla de dosificación y dejar enfriar hasta 40°C.
- Añadir en el biberón los correspondientes cacitos. Utilizar para ello el envasador del bote de Hero Baby Leche para Lactantes 1.
- Utilizar solamente el cacito dosificador adjunto para añadir la medida justa de leche.
- Cerrar el biberón, agitar hasta su completa disolución. Comprobar la temperatura antes de dárselo al bebé.

Seguir las medidas indicadas en la tabla de dosificación, teniendo el cacito envasado y sin comprimir. Una incorrecta dosificación o preparación del biberón puede poner en riesgo la salud del bebé.

TABLA DE DOSIFICACIÓN			
Edad	ml Agua hervida	Nº Cacitos	Tomos diarios
1º y 2º semana	90	3	6
3º y 4º semana	120	4	6
1 y 2 meses	150	5	6
3 meses	180	6	5
4-5 meses	210	7	4-5

Este table es orientativo. No ha preocuparse si tu bebé no se toma todo el biberón ya que cada uno tiene unos requerimientos nutricionales específicos. Es importante estar atento a sus señales de saciedad. Se recomienda seguir las indicaciones del pediatra de la salud. Para saber más sobre los puntos de alimentación de tu bebé, contacta con tu especialista (a visita www.herobaby.es o llama al teléfono de atención al consumidor 900 180 332).

Conservar bien tapado en lugar fresco y seco. Una vez abierto el bote, consumir en el plazo máximo de 1 mes. Envasado en atmósfera protectora. Preparar solo en biberón a la vez. Alimentar inmediatamente y seguir exactamente las instrucciones. No guardar biberones inachados. Siempre soplar en el mismo momento se le alimenta. Dejar el nido descartado puede causar alergia. No consumir si hay indicios de que el envase ha sido abierto o manipulado.

Ingredientes: Leche desnatada, lactosa, aceites vegetales (girasol, nabino, coco), grasa láctea, extracto de proteínas vegetales, glicéridos poliglicéridos (lactosa), minerales (cloruro potásico, lactato cálcico, cloruro magnesio, cloruro sodio, citrato sodio, carbonato cálcico, sulfato de hierro, sulfato de zinc, sulfato de cobre, yoduro potásico, selenio sodio, sulfato de manganeso, aceite de pasiflora, vitaminas (C, niacina, ácido pantoténico, A, taurina, riboflavina, B6, ácido fólico, K, D), biotina, B12), cloruro de colina, emulgente (lecitina de soja), aceite de Montserrat alpina, taurina, inositol, L-carnitina, nucleótidos (adenina 5-monofosfato, uracilo 5-monofosfato, adenosina 5-monofosfato, guanosina 5-monofosfato, inosina 5-monofosfato), antimoldes (extracto rico en tocoferoles).

Aviso importante: La leche materna es el mejor alimento para el bebé. La alimentación con leches de fórmula solo debe iniciarse cuando la lactancia materna no sea posible o resulte insuficiente y siempre por consejo médico.

Ilustración 6. Leche infantil empleada e instrucciones del fabricante para su reconstitución y administración.