



Trabajo Fin de Grado

---

# **DETECCIÓN DE *CRONOBACTER SAKAZAKII* EN LECHE DE FÓRMULA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

---

**NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

Junio 2021

---

Presentado por **Lucía Izquierdo Burgos**

Tutelado por **Emiliano J. Quinto Fernández**

Departamento de Pediatría e Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología,  
Psiquiatría e Historia de la Ciencia.

## RESUMEN

*Cronobacter sakazakii* es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* recientemente descubierta. Esta bacteria supone un riesgo para determinados grupos de población que son: lactantes, niños inmunodeficientes, recién nacidos pretérmino y personas de edad avanzada. Los principales brotes que han producido en los últimos años están relacionados con los preparados para lactantes, debido a la capacidad de la bacteria de sobrevivir en ambientes poco húmedos durante largos períodos de tiempo. Estos brotes han llevado a la organización de reuniones por parte de la OMS y la FAO, con el fin de estudiar la bacteria y establecer una serie de pautas.

En este estudio se inoculó la bacteria en la leche y se le aplicaron diversos tratamientos térmicos. La finalidad principal del estudio era conseguir detectar la bacteria en la leche mediante citometría de flujo. A partir de un protocolo inicial, al cual se le realizaron diversos ajustes, se consiguió eliminar las partículas de mayor tamaño (lípidos y proteínas) y obtener una adecuada lectura en el citómetro. En segundo lugar, una vez inoculada la bacteria en la leche, y ajustado el método para una adecuada identificación, se aplicaron diversos tratamientos térmicos. La finalidad era conocer cómo le afectan temperaturas por encima de su rango óptimo de crecimiento. Se observó que a 55 y 65°C la bacteria seguía viva, y aquellas cuya estructura se dañaba eran capaces de recuperarse. En temperaturas iguales o superiores a los 75°C las bacterias se inactivan, los daños producidos por las altas temperaturas impedían su recuperación y desarrollo. Por último, se estudió la curva de crecimiento de la bacteria en leche. Se observó un periodo de latencia superior a las 2 horas. En la práctica, los datos obtenidos nos permiten realizar recomendaciones para la preparación de los biberones sin riesgo de desarrollo de la bacteria.

Palabras clave: *Cronobacter sakazakii*, leches de fórmula, citometría de flujo, tratamientos térmicos.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i> ; Género <i>Cronobacter</i> .	4
1.1.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .	4
1.1.2 Género <i>Cronobacter</i> .	5
1.1.3 <i>Cronobacter sakazakii</i> .	6
1.2 Leches de fórmula para lactantes.	7
1.3 Citometría de flujo.	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1 Material.	14
3.2 Protocolo completo detallado.	14
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>20</b>
4.1 Aplicación de los tratamientos técnicos.	20
4.2 Curva de crecimiento en leche.	22
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
<b>6. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>24</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>26</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

*Cronobacter sakazakii* es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, concretamente al grupo *Cronobacter*, que ha sido identificado como grupo recientemente. Es un patógeno oportunista que puede causar meningitis, encefalitis, septicemia y enterocolitis necrosante en infantes, aunque también se han diagnosticado casos en adolescentes, adultos y personas mayores.

Recientemente se ha convertido en un patógeno de preocupación para la industria alimentaria, los gobiernos y la comunidad científica. La mayor parte de la información de esta bacteria se ha obtenido en los últimos 15 años. Uno de los puntos donde se ha puesto especial atención es en los alimentos deshidratados, concretamente las leches de fórmula infantil, donde debido a sus características, esta bacteria es capaz de sobrevivir durante largos períodos de tiempo (hasta 2 años).

Teniendo en cuenta que uno de los grupos de riesgos son los niños menores de 1 año, la OMS ha prestado especial atención al desarrollo de esta bacteria en las fórmulas para lactantes, reuniéndose en diversas ocasiones y desarrollando un protocolo para reducir al mínimo el riesgo de contaminación.

A continuación, se desarrolla la parte teórica de los tres puntos más importantes de la investigación que se realizó con la finalidad de explicar el marco teórico en el que se basó el estudio.

## 1.1 FAMILIA ENTEROBACTERICEAE; GENERO CRONOBACTER

### 1.1.1 Familia *Enterobacteriaceae*

Es una familia que comprende más de 200 géneros y más de 2.000 especies. Tienen un tamaño medio de 0,3 a 1,0 x 1,0 a 6,0  $\mu\text{m}$ . La denominación *Enterobacteriaceae* hace referencia a que forman parte de la flora intestinal, pero pueden estar presentes también en otros órganos del ser humano, en otras especies animales, en el suelo y en el agua. Los microorganismos que pertenecen a esta familia cumplen una serie de requisitos. Son:

(1)

- Bacterias Gram negativas.
- De fácil cultivo.
- Oxidasa negativa; la prueba de la oxidasa determina la presencia de citocromo C que oxida al NNN'N', tetrametil, 1-4, fenilendiamina. (2)
- Catalasa positiva; la catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. (3)
- Capaces de reducir nitrato en nitrito, lo que permite la respiración anaerobia de las bacterias.
- Anaerobios facultativos.
- Capaces de fermentar hidratos de carbono en condiciones anaeróbicas.

La clasificación de los microorganismos se basa en ordenar los mismos en conjuntos y subconjuntos resultado del estudio de caracteres, comparándolos con propiedades de cepas tipo:

- Morfológicos.
- Culturales.
- Bioquímicos.
- Antigénicos.

En principio los géneros y las especies se definían analizando las propiedades bioquímicas y antigénicas. Posteriormente con el desarrollo de nuevas técnicas como la hibridación (combinación de dos cadenas simples de ácidos nucleicos -ADN o ARN – formando una molécula única de doble cadena por apareamiento de bases) y la secuenciación de los ácidos nucleicos (determinación de la secuencia de nucleótidos que componen una molécula de ADN o ARN y determinada por las bases nitrogenadas que la componen.), se determinaron relaciones evolutivas entre los microorganismos de la familia. Además, el uso de hibridación ADN-ADN supuso el descubrimiento de nuevas especies y la reclasificación de algunas ya existentes (*Cronobacter*).<sup>(1)</sup>

La familia *Enterobacteriaceae* se subdivide en géneros, dentro de los cuales se haya el género *Cronobacter* (Tabla 1):

### Familia *Enterobacteriaceae*

GÉNERO	ESPECIE		
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		
<i>Shigella</i>	<i>Dysenteriae, flexneri, boydii, sonnei</i>		
<i>Salmonella</i>	<i>Enterica</i>	Subespecies <i>enterica</i> otras	Serovars (2400) Typhi Paratyphi A Paratyphi B Cholerasuis Enteritidis
<i>Citrobacter</i>	<i>Freundii, koseri, amalonaticus, otros</i>		
<i>Enterobacter</i>	<i>Cloacae, agglomerans, aerogenes, otros</i>		
<i>Klebsiella</i>	<i>Pneumoniae, ozaenae, rhinoscleromatis, oxytoca, terrigena, planticola</i>		
<i>Erwinia</i>	17 especies		
<i>Serratia</i>	<i>Marscencens, liquefaciens, otras</i>		
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>		
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>		
<i>Proteus</i>	<i>Vulgaris, mirabilis penneri, otros</i>		
<i>Providencia</i>	<i>Alcalifaciens, stuartii, rettgeri</i>		
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>		
<i>Yersinia</i>	<i>Pestis, pseudotuberculosis, enterocolitica, intermedia, otras</i>		
<i>Cronobacter</i>	<i>sakazakii, malonaticus, muytjensii, turicensis, dublinensis, universalis, condimenti.</i>		

Tabla 1: Clasificación (Bergey’s manual of systematic bacteriology, 2009)

### 1.1.2 Género *Cronobacter* (4)(5)

*Cronobacter* es una palabra de origen griego: Cronos, joven Titán hijo de Urano que devoraba a sus hijos nada más nacer y Bacter, que significa báculo, bastón, vara o varilla, por lo tanto, la palabra *cronobacter* viene a significar; aquel bastón que puede producir daño o enfermedad a los recién nacidos.

El género *Cronobacter* está formado por un grupo de bacterias oportunistas Gram negativas relacionadas con importantes riesgos para la salud y enfermedades en el ser humano.

Este grupo de bacterias son ubicuas, pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo en ambientes poco húmedos (hasta dos años con aw; 0,14 – 0,17), y su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 37 y los 43°C, pudiendo sobrevivir a temperaturas entre 4 y 60°C.

Hasta hace poco este género era clasificado como una única especie, *Enterobacter sakazakii*. Fue en 2007 cuando se incluyó el género *Cronobacter* dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Esto fue posible gracias a la mejora de las técnicas de identificación y secuenciación genómica que ha permitido diferenciar este género e identificar 7 especies diferenciadas dentro de éste.

La primera infección identificada de *Cronobacter* fue en 1961, por Urmenyi y Franklin, aunque en este momento no era reconocida como tal, sino que se pensaba que era una variante con pigmentación amarilla de *Enterobacter colacae*. Hasta los años 80 no se clasificó como *Enterobacter sakazakii*. No fue hasta el 2007 que se introdujo el género *Cronobacter*, dentro del cual se encuentra *Cronobacter sakazakii*.

A excepción de *C. condimenti* todas las especies de este grupo se han asociado a infecciones, y *C. sakazakii* y *C. malonaticus* son las responsables de causar la mayor parte de las enfermedades que causan meningitis y enteritis neonatal.

### 1.1.3 *Cronobacter sakazakii* (5)

Como ya se ha dicho, *Cronobacter sakazakii* es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Antes de la nueva clasificación del género *Cronobacter* se llamaba *Enterobacter sakazakii*. Como el resto de las bacterias de este género es ubicua y capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ambientes muy poco húmedos, hasta períodos de dos años, como son los alimentos deshidratados. Se caracteriza por la pigmentación amarilla que producen en agar tripticosa de soja (TSA), pudiendo formar colonias lisas o rugosas y de consistencia viscosa.

Su ambiente natural no se conoce con exactitud, pero se ha encontrado en ambientes completamente diversos; agua, tierra y plantas, además de en productos frescos y conservados tanto de origen animal como vegetal.

### Transmisión(5)(6)

Esta bacteria no se encuentra normalmente en el intestino de los mamíferos. Solamente se ha identificado una vez en la vagina humana, por tanto, es muy difícil que tenga lugar la contaminación vertical (de la madre al hijo antes del nacimiento). La forma más común de transmisión e infección de esta bacteria es a través del consumo de alimentos contaminados. Durante la producción de los alimentos esta bacteria puede contaminar los alimentos por falta de higiene e inadecuadas prácticas de envasado y manipulación durante:

- Adición de materias primas y nutrientes sensibles al calor tras la pasteurización (vitaminas, minerales, etc.).
- Contacto directo con el equipo y líneas de procesado, que pueden portar enterobacterias.
- Personas: los manipuladores de los alimentos pueden ser portadores de *Cronobacter sakazakii* y, al manipular los alimentos sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene, éstos se contaminan.

Las fuentes más frecuentes de contaminación por *Cronobacter* son los alimentos deshidratados, especialmente las leches en polvo. Es por esto por lo que las infecciones se asocian mayoritariamente al consumo de preparados infantiles en polvo.

### Contaminación y riesgos<sup>(7)</sup>

La contaminación por esta bacteria supone un riesgo para determinados grupos de población, que son: niños menores de 2 meses, que son los más vulnerables en el posible desarrollo de meningitis, recién nacidos pre-término, y personas con el sistema inmune debilitado (enfermos de VIH, trasplantados o personas con cáncer). La sintomatología de la infección varía en función de la persona:

Menores de 1 año:

- En menores de 1 año normalmente la enfermedad comienza con fiebre, reducción de la alimentación, lloro y baja energía, y algunos bebés pueden llegar a tener convulsiones.
- En niños menores de 2 meses la bacteria normalmente llega a la sangre o invade la médula espinal y/o el cerebro produciendo meningitis. En estos casos se pueden desarrollar problemas cerebrales a largo plazo y 4 de cada 10 bebés con meningitis producida por *C. sakazakii* mueren.

Personas de cualquier edad:

- Problemas en la piel.
- Puede invadir el tracto urinario.
- En personas mayores y/o personas con el sistema inmunitario debilitado puede llegar a la sangre.

## 1.2 LECHE DE FÓRMULA PARA LACTANTES<sup>(8)(9)(10)</sup>

La indicación de alimentación tras el nacimiento es: “Todos los recién nacidos tienen derecho a recibir leche de su madre, y todas las madres que lo deseen a recibir soporte para sus lactancias”.

Tras el nacimiento la madre produce el alimento óptimo para el niño, y que se adapta a las necesidades del niño. Es capaz de suplir y estimular el desarrollo del sistema inmunitario del neonato, que durante los primeros meses de vida es incompleto.

Sus componentes, junto con el intercambio de estímulos físicos y afectivos entre madre e hijo, logran el máximo potencial de desarrollo. Los recién nacidos (RN) alimentados con lactancia materna logran puntuaciones superiores en algunos ítems en las escalas de desarrollo psicomotor que los alimentados con fórmulas de inicio (FI).

Las recomendaciones actuales para la alimentación del recién nacido son: lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses. Posteriormente introducir de forma progresiva todos los alimentos, manteniendo la lactancia materna el máximo tiempo posible.

Ya se ha visto que la alimentación idónea para el lactante la leche materna, pero en determinadas ocasiones no es posible. Las causas que imposibiliten la lactancia materna pueden ser:

- Falta de reflejo de succión en el bebe prematuro.
- Lactancia muy dolorosa para la madre.
- Falta de producción de leche por parte de la madre.
- Alteraciones en el metabolismo del bebe que impiden la alimentación natural.

Existen 3 tipos distintos de preparados para estos casos: listas para tomar, concentradas y en polvo. Los preparados en polvo son los más utilizados. Hay distintos tipos de leches en polvo atendiendo a las necesidades de cada bebe:

1. Fórmulas preparadas a base de leche de vaca.
2. Fórmulas a base de soja.
3. Leches especiales.

### Fórmulas preparadas a base de leche de vaca

La leche de vaca no es adecuada para los lactantes, por lo que se modifican las proteínas de la leche de vaca, facilitando la digestión y se agregan los nutrientes necesarios para una adecuada alimentación del lactante.

### Fórmulas a base de leche de soja

No contienen la proteína de la leche ni lactosa (casos de alteraciones metabólicas como intolerancia a lactosa o alergia a la proteína de la leche). Estas fórmulas están hechas con una proteína vegetal que, así como las proteínas de la leche de vaca, es modificada para que los bebés puedan digerirla fácilmente. Si bien pueden funcionar para familias veganas, no se recomiendan para los bebés prematuros que pesen menos de 1,8 kg y solo hay unas pocas razones médicas para usarlas, entre ellas:

- Deficiencia transitoria de lactasa.
- Inmunoglobulina E asociada a la alergia a leche de vaca.
- Galactosemia.
- Deficiencia congénita de lactasa.

### Leches especiales

Son preparados especiales para cubrir las necesidades nutritivas de lactantes con algún tipo de trastorno metabólico. Para su elaboración se parte de leches infantiles convencionales sobre las que se realizan diferentes modificaciones en base a la patología a tratar y sus necesidades, como pueden ser:

- > Fórmulas sin lactosa.
- > Fórmulas para bebes prematuros y de bajo peso al nacer: mayor contenido calórico, proteico y de triglicéridos de cadena media.
- > Fórmulas total o parcialmente hidrolizadas: las proteínas son descompuestas y separadas en sus componentes básicos.
- > Fórmulas antirregurgitación: llevan un espesante para evitar la regurgitación.

La indicación de sustitutos de la leche materna ha de ser hecha por el pediatra, y valorando previamente la posibilidad o no de lactar.

### Leches de fórmula infantil/Preparados para lactantes (PPL) y *C. sakazakii*<sup>(11)</sup>

Las leches de fórmula son productos no estériles; con los procesos actuales de fabricación es imposible producir PPL estériles, lo que conlleva a la posibilidad de que contengan microorganismos patógenos capaces de causar enfermedad. La contaminación de estos productos puede darse de forma intrínseca o proceder de fuentes extrínsecas. La contaminación extrínseca puede producirse cuando se emplean utensilios contaminados para la preparación o administración de las PPL, o también

puede proceder del medio en el que se toma o incluso de la persona que prepara la toma.

*C. sakazakii* no es capaz de multiplicarse en las PPL pero sí puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo, hasta un año o más. Por el contrario, la PPL reconstituida supone un medio idóneo para la proliferación. El almacenamiento de la PPL reconstituida a temperaturas inferiores a 5°C impedirá el crecimiento, mientras que a temperaturas superiores (como la temperatura ambiente) existe potencial de proliferación de la bacteria, especialmente si es mantenida durante periodos prolongados.

### Antecedentes normativos<sup>(11)</sup>

En 2004 la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) se reunieron con el fin de determinar posibles microorganismos presentes en las preparaciones de leches para lactantes (PPL).

De esta reunión se concluyó que *C. sakazakii* y *Salmonella* son los microorganismos cuya presencia en las PPL resulta de mayor riesgo. En esta misma reunión se discutió sobre posibles pasos que pueden aumentar o disminuir el riesgo de contaminación y desarrollo de las bacterias, lo que conllevó a organizar en 2005, por parte de la Asamblea Mundial de la OMS, las directrices de la preparación, la manipulación y el almacenamiento de las PPL en condiciones higiénicas con el fin de reducir al mínimo el riesgo para los lactantes.

En 2006 se organizó una segunda reunión de los expertos FAO/OMS para aplicar un modelo cuantitativo de evaluación del riesgo microbiológico para *C. sakazakii* en las PPL.

### Legislación<sup>(6)</sup>

El Reglamento (CE) 2073/2005, DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios determina los criterios de seguridad alimentaria relativos a *Cronobacter sakazakii* que deben cumplir las empresas alimentarias que tratan con alimentos de mayor riesgo:

Alimento	Límite microbiológico máximo permitido	Fase en la que se aplica el criterio
Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses.	Ausencia en 10 g.	Productos comercializados durante su vida útil.

### Medidas de control y prevención<sup>(6)</sup>

#### a. En la cadena alimentaria

En la transformación de alimentos es importante aplicar adecuadamente buenas prácticas de higiene y el sistema APPCC (análisis de peligros y puntos de control crítico).

#### b. Tratamientos de inactivación

La pasteurización en los preparados deshidratados inactiva la bacteria, pero debido a la posibilidad de una contaminación posterior es esencial:

- Controlar la calidad microbiológica de las materias primas añadidas tras la pasteurización.

- Reducir los niveles de enterobacterias en el entorno y ambiente de proceso (equipos y líneas de procesado) mediante aplicación de programas de vigilancia medioambiental.
- Informar en las etiquetas, que los preparados en polvo para lactantes no son estériles y pueden estar contaminados con patógenos que pueden causar toxiinfecciones.

c. En el hogar

Gran parte de las contaminaciones tienen lugar en el hogar. Se deben seguir buenas prácticas de higiene y manipulación en la preparación y conservación de dichos preparados alimenticios:

- Limpieza de las manos antes de manipular cualquier alimento.
- Desinfección de los utensilios, superficies y biberones.
- Evitar la contaminación cruzada de alimentos crudos con cocinados.
- Reconstituir el preparado en polvo con agua potable a una temperatura de 70°C (evitar el uso del microondas, porque la distribución de la temperatura no es uniforme).
- Consumir inmediatamente el preparado reconstituido o mantenerlo a temperatura de 5°C (en agua fría o en la nevera) hasta su consumo un máximo dos horas.
- Utilizar preparados líquidos estériles para los lactantes inmunodeprimidos y prematuros, por tener mayor riesgo de infección.

### 1.3 CITOMETRÍA DE FLUJO – CMF<sup>(12)(13)</sup>

Cito: célula    Metría: medición; por tanto, la citometría es el estudio, caracterización y recuento de las células.

La CMF es una tecnología que permite analizar y cuantificar de manera simultánea múltiples características celulares, a medida que las células o bacterias, son transportadas en un fluido e incididas por un haz de luz. El citómetro mide el tamaño y el grado de granulado interno de la célula, así como la fluorescencia relativa de la misma. Estas características se determinan usando un sistema óptico acoplado a un procedimiento electrónico que graba la manera en que la célula dispersa el haz de luz y emite la fluorescencia. Es un método rápido, específico y sensible ( $10^{-4}$  o  $10^{-5}$ ) que realiza un análisis objetivo y reproducible.

Funcionamiento: El láser pasa a través de la lente de enfoque. Al rebotar el haz de luz en la célula, los rayos son difractados en todas las direcciones o son bloqueados. La luz dispersada es filtrada, recolectada y enviada a fotodetectores que las convierten en señales electrónicas y después den datos digitales.

La citometría realiza medidas cualitativas y cuantitativas de más de 15 parámetros simultáneamente y de cualquier célula o partícula suspendida desde 0,2 hasta 150 micras. Se estudia por separado cada célula o partícula y se obtiene información simultánea de varios parámetros, así como la relación entre ellos. La CMF es útil para:

- Identificar y definir células-
- Detectar anomalías genéticas debido al reconocimiento de fenotipos aberrante.
- El seguimiento de la enfermedad mínima residual y el seguimiento de los pacientes con terapias específicas.

El citómetro está constituido de tres sistemas:

1. Sistema hidráulico; con una sección neumática y otra de fluidos.
2. Sistema óptico, que incluye;

- a. Sección de excitación (láser), lentes y prismas.
  - b. Sección colectora que genera y recoge las señales.
3. Sistema informático; convierte las señales ópticas en señales electrónicas y las digitaliza para su análisis.

### Sección hidráulica

La parte fluidica consta de dos fluidos, uno que contiene las células de la muestra en suspensión, un segundo fluido denominado fluido envolvente o vaina que envuelve y da estabilidad a la muestra. Estos dos fluidos circulan a distintas presiones de manera que no se mezclan, siendo mayor la presión de la muestra y por tanto siendo mayor su velocidad. Al aumentar la presión aumenta el diámetro del flujo dando mayor velocidad. Esto se regula mediante el regulador de presión que controla el caudal cambiando la presión del fluido de la muestra.

La sección neumática está compuesta por la cámara de flujo que se sitúa en el centro del citómetro y en los citómetros de análisis. Normalmente es de cuarzo. En esta zona entran en contacto el líquido envolvente y la muestra. El fluido envolvente con la suspensión celular en el centro es impulsado para salir a gran velocidad por un orificio de la cámara que los dirige hacia la fuente de luz para la caracterización. Las células cruzan el rayo de luz láser de una en una y a una velocidad que oscila entre 1.000 y 1.000.000 de células por minuto. Aquí se produce el enfoque hidrodinámico, es decir, se enfoca el haz de luz que rebota en cada célula dispersándose. La funcionalidad del fluido envolvente es centrar las células para que atraviesen este haz de luz y puedan ser detectadas.

### Sección óptica

El sistema óptico se encarga de iluminar las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados. Cuando la luz incide en las células en función de su tamaño y granularidad la luz se dispersará de una manera concreta.

Se compone de dos partes:

1. Óptica de excitación: compuesta por láser(s) y las lentes para dirigirlo y enfocararlo.
2. Óptica de lectura: recogen la luz emitida después de la interacción con las partículas y un sistema de espejos y filtros que la dirigen hacia los detectores correspondientes.

La mayor parte de los citómetros llevan una fuente emisora láser con luz monocromática, es decir, misma longitud de onda y frecuencia. Normalmente emplean una luz azul de 488nm, pudiendo haber otro láser de luz verde cuya longitud de onda oscila entre 315 y 335nm. La razón son los principales fluorocromos usados en CMF, que aunque excitables con luz azul, poseen un máximo con luz verde. Los citómetros de investigación suelen tener más de un láser.

Un concepto importante en citometría es la fluorescencia. ¿Qué es la fluorescencia? Cuando un compuesto absorbe luz, y por tanto energía, los electrones ascienden de su estado basal a un estado excitado. Posteriormente, los electrones vuelven al estado fundamental a través de una serie de transiciones, que implican la emisión de un cuanto de luz (transición radiactiva). La transición de absorción consume más energía que la que se desprende en la emisión, por tanto, la luz emitida es de menor energía y de mayor longitud de onda que la luz excitante. El retorno de la molécula a un estado de energía más bajo se acompaña de la emisión de luz (fluorescencia) y de pérdida de energía. El funcionamiento del citómetro de flujo se basa, en la detección de señales de fluorescencia, que proceden de complejos antígenos/anticuerpo marcados con un fluorocromo. El fluorocromo es una sustancia que marca anticuerpos u otras moléculas,

tiene la propiedad de emitir luz de una determinada longitud de onda cuando incide sobre este un foco de luz láser o luz ultravioleta. Algunos fluorocromos típicos son FITC, PE, PerCP, APC y Pacific Blue. El espectro de absorción o excitación es el rango sobre el que un fluorocromo absorbe luz, y el espectro de emisión es el rango en el que emite luz. La señal de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula.

Los CMF tienen cinco sistemas ópticos de medida: dos de dispersión de luz (uno hacia delante y otro en ángulo recto) y tres de fluorescencia. La luz de las emisiones fluorescentes se recoge en ángulos de 90° junto con la dispersión de la luz, el sistema óptico debe separar la dispersión de estas dos señales. Recoge dos tipos de dispersión

- Dispersión frontal (forward scatter, FSC); es la luz dispersada frontalmente, es decir, en la misma dirección que incide el láser.
- Dispersión lateral (side scatter, SSC); es la luz dispersada en un ángulo recto respecto al eje de luz láser incidente.

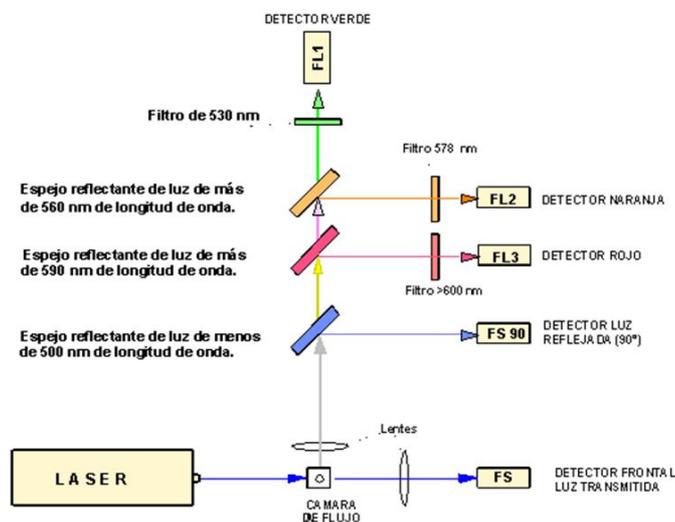


Figura 1: Esquema sección óptica de un citómetro de flujo

La información obtenida a partir de la dispersión de la luz permite obtener simultáneamente parámetros intrínsecos – relacionados con las características intrínsecas de la partícula o célula; tamaño y complejidad – y extrínsecos – relacionados con las distintas fluorescencias asociadas a la partícula –.

Para recoger los pulsos de luz se utilizan tres tipos de detectores:

- Fotodiodos, detectores de estado sólido que se emplean para recoger señales de luz de gran intensidad, como la luz del FSC. Transforman la señal luminosa en un pulso y su intensidad es proporcional al número de fotones que llegan en cada pulso. Las señales de luz golpean el fotodiodo y se convierten en un número proporcional de electrones.
- Fotomultiplicadores, multiplican los electrones obtenidos en el fotodiodo, creando una corriente eléctrica que se convierte en el pulso de tensión. Constan de un tubo en cuyo interior se encuentran varias placas, situadas secuencialmente, es decir, una detrás de otra. Las placas están recubiertas por compuestos muy excitables por la luz, de manera que multiplican la señal.
- Detectores monocromáticos.

Para procesar y enviar las señales es necesario establecer un umbral que recoja solamente las señales de igual o mayor intensidad y omita señales de desecho o ruido

electrónico. Normalmente este umbral se fija en base a uno o dos parámetros. Es habitual utilizar solo la dispersión de la luz FSC como discriminador para establecer el umbral. El área, altura y anchura de los pulsos electrónicos son proporcionales a la cantidad total de luz, la intensidad máxima y la duración de la señal luminosa respectivamente. Todos estos parámetros se relacionan con las características de las células.

### Sistema electroinformático

Una vez que la señal luminosa es generada cuando el haz de luz incide en la célula, ésta debe traducirse en señales electrónicas. El sistema electrónico consta de sensores luminosos; fotodiodos y fotomultiplicadores, que tienen la finalidad de convertir los fotones en electrones

y éstos, a su vez, en corriente eléctrica. De este modo, la señal eléctrica es recibida por la computadora y traducida en gráficos e histogramas.

Los histogramas muestran la intensidad de expresión de un marcador versus el número de eventos. El desplazamiento de la curva hacia la derecha indica mayor expresión del marcador, mientras que la altura del pico indica la frecuencia de las células capturadas. En este sentido, es importante recalcar que el área bajo la curva contiene a las células que se están analizando.

El escategrama o gráfico de puntos (dot plot) es un gráfico donde se enfrenan dos parámetros. Cada punto representa una célula según sus medidas asociadas, de esta manera pueden asociarse cualquier pareja de parámetros.

## 2. OBJETIVOS

1. Detectar *Cronobacter sakazakii* en leche de fórmula infantil mediante citometría de flujo.
2. Estudiar cómo afecta el tratamiento térmico con altas temperaturas en el desarrollo de *C. sakazakii* en leches de fórmula infantil.
3. Estudiar la capacidad de desarrollo de *C. sakazakii* tras la aplicación del tratamiento térmico con altas temperaturas.
4. Conocer la curva de crecimiento de *C. sakazakii* en leches de fórmula infantil.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Material

- Leche de fórmula infantil Hero Baby+1
- Microondas
- Baño María
- Incubadora
- Tubos eppendorf
- Tubos Falcon
- Vortex
- TSB
- TSA
- Autoclave
- Tritón X-100 al 0,1%
- Savinasa
- Proteínasa K
- NaCl
- Placas Petri
- Pipetas
- Puntas de pipeta
- SYTO 9
- IP
- Citómetro Gallios IBGM, Universidad de Valladolid
- SORTER

### 3.2 Protocolo completo detallado

Leche de fórmula; Preparamos los 5 botes con 120 ml de agua y añadimos los cazos de leche de fórmula siguiendo las instrucciones. Una vez preparados los tindalizamos (3 días x 30 min a 80°C).

Cultivo de *C. sakazakii*: 12 horas antes de realizar el protocolo completo se inoculan en un tubo Falcon 10 µl de un cultivo anterior, siempre lo más reciente posible, de *C. sakazakii* en TSB, en 10 ml de TSB. Se agita con el vortex. Se deja en la incubadora durante 12 h a 37°C.

En un tubo Falcon añadimos 5 ml de leche y 5 ml de cultivo de *C. sakazakii* en TSB, se aplica uno de los tratamientos térmicos. Tras el tratamiento térmico cogemos 100 µl con la pipeta y se realiza el aclaramiento de la leche.

A continuación, se realiza la tinción con SYTO-9 e IP y la metemos en el citómetro. Después del citómetro, el Sorter separará las bacterias muertas, vivas, estresadas y desconocidas. Las recogemos en tubos Eppendorf para posteriormente realizar la siembra en placa en TSA.

A modo de control, se realiza la siembra en placa en distintas partes del proceso con la finalidad de conocer la cantidad de bacterias de las que partimos, como afecta el tratamiento térmico y si el aclaramiento influye sobre las bacterias.

Por tanto, se siembra en placa en los siguientes pasos:

- De la muestra inicial en TSB.
- De la leche con TSB después de la aplicación del tratamiento térmico.
- De la leche después del aclaramiento.
- De las bacterias obtenidas del SORTER.

Por último, para estudiar la curva de crecimiento de *Cronobacter sakazakii* en leche se realizó

de la siguiente manera:

Se prepara un tubo Falcon con 10 ml de leche tindalizada y se añaden 10 µl de TSB con la bacteria. Se agita en el vortex y se realiza la primera siembra. A continuación, se lleva a la incubadora, de donde se sacará cada 2 horas para realizar una siembra en placa. Se incuba de 8:00 a 20:00 horas y a las 24 horas se hacen los recuentos en placa para poder obtener la curva de crecimiento.

### Leche de fórmula tindalizada

Utilizamos la leche de fórmula Hero Baby +1, indicada para lactantes desde los 0 a los 6 meses de vida. Las instrucciones de preparación para la leche vienen indicadas en la parte posterior del envase, y es de vital importancia seguirlas para evitar posibles contaminaciones al preparar los biberones. Las instrucciones para la preparación de los biberones son las siguientes: (14)

1. Lava bien tus manos con agua y jabón para limpiar después los biberones. Usa un cepillo para el interior, y si hay leche pegada, puedes eliminarla con sal gorda. Luego, esterilízalo según el método que hayas elegido.
2. Llena el biberón con agua. Si la de tu localidad es apta para el consumo humano, hiévela menos de dos minutos. De lo contrario, usa embotellada. Si utilizas agua templada, no será necesario que lo calientes después.
3. Nivelas los cacitos de leche en polvo con un cuchillo o con el borde del envase, pero sin comprimir el contenido para que entre más, pues hay que respetar las proporciones de agua y leche. No prepares biberones con concentraciones distintas a las indicadas por el fabricante o por tu pediatra, ya que, si pones más agua de lo normal, disminuirá el aporte alimenticio, y si pones más leche, puedes causar problemas digestivos al niño.
4. Añade el número de cacitos que necesites al agua, coloca la tetina sin tocarla y agítalo bien para que se mezcle.
5. Calienta el biberón, bien en un calentador de biberones o en un cazo con agua caliente, si no has usado agua templada al principio.

Preparación 4 botes de 120 ml:

- 30 ml agua a 1 cazo leche en polvo.
- En cada bote de 120 ml de agua añadimos 4 cazos enrasados de leche en polvo.

Preparación botes (instrucciones en la lata):

1. Hervir 120 ml de agua.
2. Esperar a que se temple.
3. Añadir 4 cazos enrasados de leche de fórmula.

Una vez preparados le aplicamos el proceso de la tindalización para evitar su contaminación durante el experimento. La tindalización es un método de esterilización fraccionada a vapor fluente, que consiste en calentar el material, en este caso la leche, a 80°C durante 30 minutos en días sucesivos, dejando un período de incubación de 24 h entre ellos.

El período de incubación tiene como finalidad favorecer el crecimiento de las endoesporas vegetativas y facilitar su posterior eliminación en la repetición del proceso.

## Cultivos

Como cultivo de *C. sakazakii* partimos de un cultivo más o menos reciente de investigaciones previas, perteneciente al Área de Nutrición y Bromatología (Departamento de Pediatría, etc.) de la Facultad de Medicina de Valladolid.

A partir de este cultivo preparamos uno nuevo doce horas antes de realizar el experimento.

Se quiere llegar a una concentración de  $1 \times 10^9$  ufc/ml de *C. sakazakii* en TSB para posteriormente inocular en la leche.

## Medios

TSB, Caldo Soja Trypticaseína<sup>(15)</sup>; medio líquido/caldo de cultivo:

Es un medio muy rico en nutrientes para uso general en laboratorio de microbiología. Permite el crecimiento de neumococos, estreptococos, Neisseriae, etc. Se utiliza en muchos procedimientos de investigación diagnóstica y microbiológica. Contiene dos peptonas como fuentes ricas de nitrógeno obtenidas por la hidrólisis enzimática de caseína y proteínas de soja. Este medio soporta el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, incluyendo aerobios exigentes y anaerobios. La peptona de soja también contiene azúcares naturales que promueven el crecimiento bacteriano. La glucosa es una fuente de carbohidratos y carbono. El cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico, y el hidrogenofosfato de dipotasio es un agente tamponador.

Fórmula en g/L:

Glucosa monohidratado	2,5	Digerido pancreático de caseína	17
Cloruro sódico	5	Digerido papaico de soja	3
Hidrogenofosfato dipotásico	2,5		

Preparación: Suspender 30 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Dispensar en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Grandes cantidades de medio requieren un mayor tiempo de esterilización, pero la temperatura no se debe aumentar. Almacenamiento: T min.: 2°C – T máx.: 25°C.

### Test microbiológico

De acuerdo a Farmacopea Europea, USP. Recuento total de aerobios mesófilos:  
Condiciones de incubación: (30-35 °C / <=3 días: bacterias / <=5 días: fungi).  
Condiciones de inoculación:(<=100 CFU).

De acuerdo a ISO 11133 TSPB:  
Condiciones de incubación: ( 30±1 °C/ 48±4 h).  
Condiciones de inoculación: Productividad cualitativa (<= 100 CFU) / Selectividad (10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> CFU).

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
Bacillus cereus ATCC 11778	Turbidez en TSPB. > 10 colonias en PEMBA o MYP	Colonias azul turquesa con halo de precipitado en PEMBA. Colonias rosas con halo de precipitado en MYP.
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibición total en TSPB. Inhibición total en TSA.	
Staphylococcus aureus ATCC 6538	Buen crecimiento, turbidez	
Bacillus subtilis ATCC 6633	Buen crecimiento, turbidez.	
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Buen crecimiento, turbidez.	

TSA, Agar Soja y Trypticaseína<sup>(16)</sup>; medio sólido, para siembra en placa:

Medio de uso general muy rico en nutrientes para uso general en laboratorios microbiológicos y para el cultivo y aislamiento de microorganismos fastidiosos o no fastidiosos, o para el mantenimiento de cultivos en stock. Es compatible con el crecimiento abundante de organismos fastidiosos como neumococos, estreptococos, Neisseria, etc. a partir de muestras clínicas. Con dos peptonas como fuentes ricas en nitrógeno, obtenidas por la hidrólisis enzimática de las proteínas de la caseína y la soja, este medio apoya el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, incluidos los

aerobios y los anaerobios. La peptona de soja también contiene azúcares naturales que promueven el crecimiento bacteriano. El cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico. El agar bacteriológico es el agente solidificante. Como carece de carbohidratos, es muy útil en el estudio de las reacciones hemolíticas y también en la preparación de agar chocolate. Si se desea, los antibióticos se pueden incorporar fácilmente, así como otros suplementos o agentes inhibidores. En este caso no le añadimos nada, lo utilizamos tal cual.

Fórmula en g/L:

Agar bacteriológico	15	Digerido pancreático de caseína	15
Cloruro sódico	5	Digerido papaico de soja	5

Preparación: Suspender 40 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta su completa disolución. Dispensar en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Las grandes cantidades pueden requerir un tiempo de esterilización más largo, pero la temperatura no debe incrementarse. Almacenamiento: T.min.: 2°C – T.máx.: 25°C

### Tratamientos térmicos

Se aplicaron los siguientes tratamientos térmicos, una vez inoculada la bacteria en la leche, durante 5 minutos, en baño maría:

- 55°C
- 65°C
- 75°C
- 85°C
- 95°C

Se comprueba la temperatura con un termómetro de mercurio antes y después de introducir el tubo Falcon en al baño maría.

### Aclaramiento

La función de este proceso es eliminar las partículas de mayor tamaño que se encuentran en la leche y que impedirían una adecuada lectura de las bacterias en el citómetro. Las partículas que queremos eliminar son, principalmente, proteínas y grasas. Se utilizaron:

Savinasa: Es una enzima proteolítica que convierte las proteínas en péptidos.

Proteinasa K: Es una enzima proteolítica

Tritón X-100: Es un compuesto químico tensoactivo no-iónico con gran cantidad de aplicaciones. En este caso sirve para la permeabilización de las membranas. (17)

El proceso de aclaramiento de la leche consiste en:

- Introducir 100 µl de leche inoculada con *C. sakazakii* en un tubo Eppendorf.
- Añadir las enzimas y el detergente:
  - o Savinasa 50 µl.
  - o Proteinasa K 2,5 µl.
  - o Tritón 5 µl.
- Incubar 1 h a 37°C.
- Añadir 900 µl NaCl y mezclar por inversión.
- Centrifugar 14 g – 20 min a 4°C.
- Eliminar el NaCl en el que se encuentran las proteínas y las grasas con la pipeta.

- Añadir 900 µl NaCl y mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14 g durante 5 min a 4°C.
- Eliminar el NaCl en el que se encuentran las proteínas y las grasas con la pipeta.
- Añadir 900 µl NaCl y mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14 g durante 5 min a 4°C.
- Eliminar el NaCl en el que se encuentran las proteínas y las grasas con la pipeta.

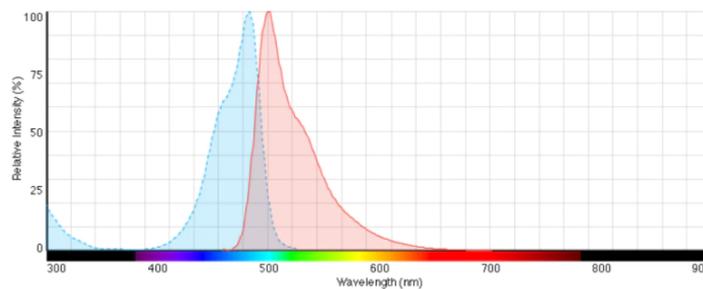
Durante la centrifugación bajamos la temperatura a 4°C para cristalizar las grasas y facilitar su proceso de eliminación. Este método final, fue obtenido realizando ajustes a partir de un protocolo inicial de Thusitha S. et al. (2.000).

## Tinción

SYTO 9: Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (Figura 2).

Colorante permanente de los ácidos nucleicos de las células que muestra gran fluorescencia uniéndose a los ácidos nucleicos. Se puede utilizar para teñir ADN o ARN en célula vivas o células muertas, siempre que sean eucariotas, y también en bacterias Gram negativas y Gram positivas. Cuando se une a los ácidos nucleicos, la coloración fluorescente del tinte provoca excitación y emisión espectral similar a la fluorescencia producida por los fluorocromos FITC y puede ser visto utilizando filtros ópticos apropiados a la fluorescencia emitida.

Este colorante tiñe tanto células vivas como células muertas. (17)

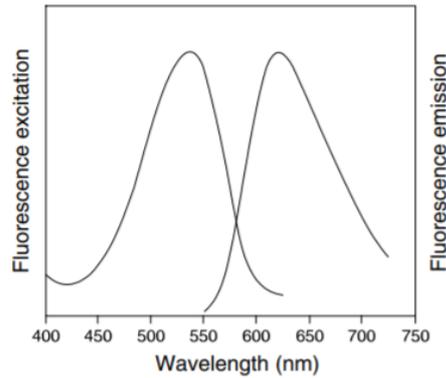


**Figura 2: Perfiles de fluorescencia de excitación y emisión de SYTO9**

La zona azul corresponde con la excitación. La zona roja se corresponde con el área en la que produce la emisión, cuya máxima longitud de onda es sobre los 500 nm. Como se observa SYTO 9 emite una fluorescencia de color verde.

IP, yoduro de propidio (Figura 3).

Este colorante tiñe solamente las células con las membranas comprometidas, es decir, células dañadas o muertas y por lo tanto, permite hacer la distinción con las células vivas. (18)



**Figura 3: Perfiles de fluorescencia de excitación y emisión de IP.**

### Citómetro

La función del citómetro es el análisis y cuantificación de la de la bacteria mediante la aplicación de luz láser. La metodología viene ya explicada en la introducción.

### Sorter<sup>(19)</sup>

La separación celular por citometría de flujo o “Cell Sorting” es el proceso de separación física de partículas en base a la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por técnicas de citometría de flujo analítica.

La finalidad en este caso de la obtención y separación de las bacterias es estudiar su comportamiento en placa para:

- Confirmar que las divisiones realizadas en el citómetro son adecuadas.
- Conocer si las bacterias metabólicamente estresadas pueden desarrollarse posteriormente.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Aplicación de los tratamientos térmicos

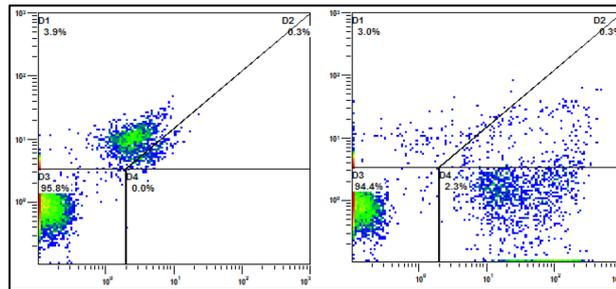


Figura 4: Localización bacterias muertas y vivas en leche

Como se puede observar (figura 4), gracias al método aplicado para el aclaramiento de la leche conseguimos detectar sin problema las bacterias en el citómetro, lo que implica unos resultados ampliamente satisfactorios para el primer objetivo del estudio.

Tras el ajuste del proceso de aclaramiento de la leche inoculamos la bacteria. Se realizaron dos pruebas, una con la bacteria viva y otra matándola previamente. La finalidad era identificar el lugar de la gráfica donde iban a ser detectadas las bacterias.

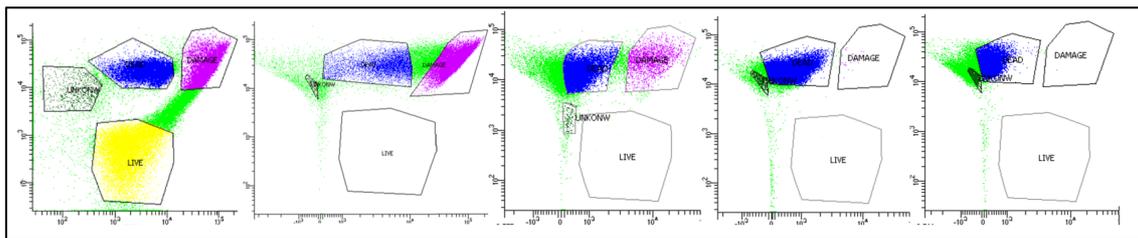


Figura 5: Localización de las bacterias después de los tratamientos térmicos

La figura 5 refleja cómo afecta el aumento de la temperatura. Las imágenes están ordenadas horizontalmente de 55 a 95°C, y como se observa conforme aumenta la temperatura las nubes se desplazan hacia arriba y hacia la izquierda, es decir con la aplicación de altas temperaturas las bacterias son dañadas y se mueren, en mayor cantidad conforme aumenta la temperatura.

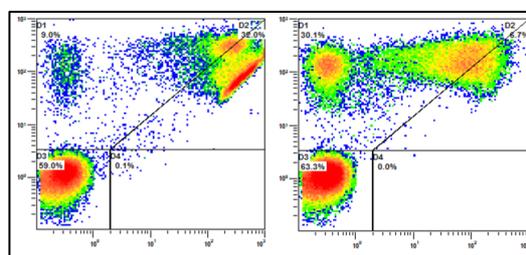


Figura 6: Bacterias en TSB tratadas a 65 y 75°C

En la figura 6 se ve el comportamiento de las bacterias después de ser tratadas a 65 y 75°C en TSB. Estas dos pruebas se realizaron para comprobar que los datos en estas dos temperaturas, las dos más cercanas a la temperatura establecida como límite, 70°C, (OMS, 2004), es igual a su comportamiento en la leche.

Tratamiento	RECUENTOS							
	VIVAS		MUERTAS		ESTRESADAS		DESCONOCIDAS	
	SORTER	PLACAS	SORTER	PLACAS	SORTER	PLACAS	SORTER	PLACAS
55X	326.973	3,2E+04	218.378	0	331.355	1,63E+01	15.436	1,03E+01
55Y	168.937	7,00E+04	142.670	0	345.716	3,73E+01	6.492	2,67E+01
65X	399	9,00E+00	313.224	0	1.768.810	3,17E+01	39.877	0
65Y	2.169	5,23E+01	378.012	0	1.263.257	1,70E+04	46.404	0
75X	199	0	849.748	0	87.913	0	5.980	0
75Y	136	0	992.235	0	28.897	0	4.127	0
85X	16	0	1.301.622	0	14.033	0	2.841	0
85Y	25	0	984.485	0	1.689	0	1.301	0
95X	20	0	1.465.087	0	62	0	27.058	0
95Y	7	0	840558	0	146	0	31.580	0

**Tabla 1: comparación de los recuentos de eventos obtenidos en el SORTER con los recuentos obtenidos en la siembra en placa de las bacterias recuperadas.**

En la tabla 1 se encuentra la comparación de los datos obtenidos por la citometría respecto a la cantidad de eventos de cada una de las temperaturas, confrontando con los datos obtenidos del recuento en placa. Esto permite suponer el comportamiento de las bacterias estresadas en base a la temperatura aplicada.

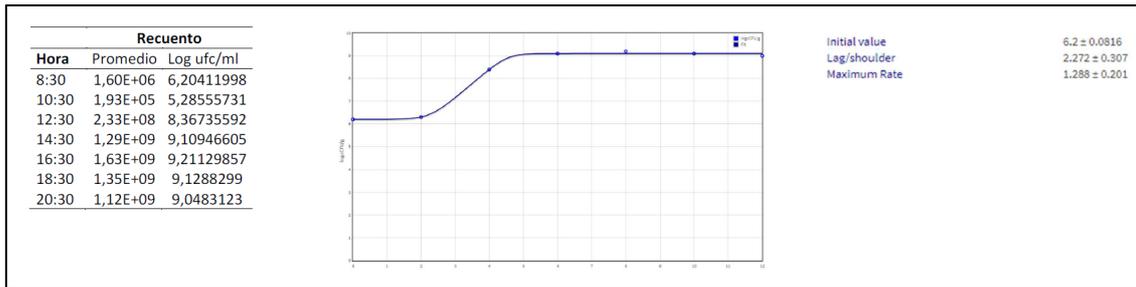
Si se contrastan los datos de las nubes obtenidas en el SORTER con los posteriores datos de la siembra en placa se podría decir que:

- A 55°C se mueren parte de las bacterias, pero la mayor parte siguen vivas o dañadas. Las bacterias que han sido dañadas por la aplicación de esta temperatura son capaces de recuperarse.
- A 65°C la cantidad de bacterias vivas es muy reducida y la nube de células muertas se ha alargado un poco, son las bacterias dañadas las que han aumentado su cantidad, pero éstas siguen siendo capaces de desarrollarse.

Es importante recordar la temperatura óptima para el desarrollo de la bacteria, 37 - 43°C, pudiendo desarrollarse a temperaturas entre los 4 y los 60. La temperatura de 70°C ha estado definida como la temperatura límite, a partir de la cual se inactiva la bacteria (20). Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en este estudio. A temperaturas inferiores a 70°C (55 y 65°C), siguen apareciendo bacterias vivas y las estresadas son capaces de recuperarse. A 75°C no quedan bacterias vivas y las bacterias dañadas no son capaces de recuperarse lo que implica que, a esta temperatura, aunque no llegue a matar a la bacteria le produce daños irreversibles que imposibilitan su recuperación. En las dos temperaturas restantes, por tanto, ya no hay posibilidad de desarrollo de la bacteria. Además, conforme aumenta la temperatura se puede ver como la nube de bacterias muertas se va juntando hasta formar una nube circular final en la parte superior izquierda.

La zona en la que aparecen posicionadas las bacterias en la gráfica depende de cómo se refracta el láser en la célula en base a los colorantes y las estructuras de la bacteria. Como consecuencia, podría deducirse que conforme aumenta la temperatura la estructura de las bacterias se va alterando de manera desigual dependiendo de la resistencia térmica de la bacteria.

## 4.2 Curva de crecimiento en leche



**Figura 7: Tabla y gráfica del crecimiento de *Cronobacter sakazakii* en leche**

Se decidió estudiar la curva de crecimiento de la bacteria en la leche porque durante los primeros pasos del estudio, incubándose la bacteria en leche durante 3 horas previas al aclaramiento de ésta, no se observó su crecimiento tras la siembra en placa. La concentración obtenida pasadas las 3 horas era igual a la inicial. En el anexo 1 se encuentra la tabla completa con todos los datos.

Según un estudio de Nazarowec-White y Feber (22), que estudiaba el crecimiento de *C. sakazakii*, a temperaturas de 23°C el tiempo de inicio del desarrollo de la bacteria a esta temperatura oscilaba entre 1,76 y 3,4 horas, y a 25° el tiempo del periodo de latencia es de, al menos, 2 horas. Teniendo en cuenta que la temperatura de incubación en este caso es la óptima (37°C) para su crecimiento, la hipótesis era que la fase exponencial comenzase en menos tiempo.

Con el estudio se ha comprobado que, a pesar de incubarse a una temperatura óptima, el desarrollo no se inicia antes. Una de nuestras hipótesis frente a este hecho es que es posible que la complejidad de la matriz de la leche ralentice el desarrollo de la bacteria. Una segunda hipótesis se basa en la composición de la leche utilizada, compuesta en un 60% de hidratos de carbono (HCO), lo que puede ser un exceso de HCO para permitir un adecuado desarrollo de la bacteria.

## 5. CONCLUSIONES

En conclusión, el método utilizado para el aclaramiento de la leche es el adecuado, eliminando las posibles partículas de mayor tamaño que dificultarían, o incluso impedirían, el estudio mediante la citometría.

La aplicación de los tratamientos térmicos confirma la temperatura de 70°C como temperatura límite para el desarrollo, ya sea en TSB como en leche, siendo la temperatura que inactiva a la bacteria. Podría ser clasificada como temperatura de seguridad para la preparación de biberones.

La curva de crecimiento muestra el peligro que supondría la preparación de una toma de leche para horas más tarde en caso de que no vaya a ser calentada ni refrigerada a temperaturas por debajo de los 4°C, dando lugar a la posibilidad del desarrollo de la bacteria cuando se mantuviese a temperaturas entre 4 y 70°C. Esto evidencia el peligro de mantener las tomas preparadas a temperatura ambiente durante periodos de tiempo superiores a 3 h.

Si juntamos los datos de temperatura y curva de crecimiento podemos concluir que el método ideal para la seguridad de los lactantes sería ingerir la toma al momento de ser preparada y que se hubiese preparado con agua calentada por encima de los 70°C.

## 6. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

1. Guía de Trabajos prácticos: Microbiología. Universidad nacional de San Luis. ISSN 2545-7683. [http://www.fqbf.unsl.edu.ar/documentos/mde/micro/Microbiologia\\_Biol\\_Mol\\_2019.pdf](http://www.fqbf.unsl.edu.ar/documentos/mde/micro/Microbiologia_Biol_Mol_2019.pdf)
2. Universidad de Granada (s.f). Catalasa y oxidasa. [https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-catalasa\\_oxidasa.htm](https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-catalasa_oxidasa.htm)
3. Universidad de Granada (s.f). Prueba de reducción de nitratos y nitritos. [https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-reduccion\\_nitratos\\_nitritos.htm](https://www.ugr.es/~pomif/pom-bac/pb-v/pb-v-3-reduccion_nitratos_nitritos.htm)
4. Weisbecker, A. (27 de septiembre de 2009). The Naming of Cronobacter Sakazakii. Food Safety News. [https://www.foodsafetynews.com/2009/09/the-naming-of-cronobacter-sakazakii/#.U6GJ1pR\\_u0i](https://www.foodsafetynews.com/2009/09/the-naming-of-cronobacter-sakazakii/#.U6GJ1pR_u0i)
5. Blackwood, B. P., & Hunter, C. J. (2016). Cronobacter spp. Microbiology spectrum, 4(2), 10.1128/microbiolspec.EI10-0002-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0002-2015>
6. Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria (28 de febrero de 2019). Cronobacter. <https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/Copia-de-10.Cronobacter.pdf>
7. Center for Disease Control and Prevention (21 de mayo de 2020). Cronobacter. <https://www.cdc.gov/cronobacter/definition.html>
8. Muñoz Guillen, A y Dalmau Serra, J (2008). Alimentación del recién nacido sano. Protocolos de Neonatología. [https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/5\\_2.pdf](https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/5_2.pdf)
9. Asociación Española de Pediatría (10 de abril de 2013). Leches especiales. <https://enfamilia.aeped.es/vida-sana/leches-especiales>
10. Babycenter (s.f). Cómo escoger la leche de fórmula. <https://espanol.babycenter.com/a4500055/c%C3%B3mo-escoger-la-leche-de-f%C3%B3rmula#ixzz48L2WR56c>
11. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2007). Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes: directrices. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
12. Pérez-lorca, J.C, Santiago-Cruz, W, Romero-Ramírez, H y Rodríguez-Alba, J.C (2018). Fundamentos de citometría de flujo: su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. Revista Médica de la Universidad Veracruzana, 18 (2) <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2018/muv182d.pdf>
13. Purdue University Cytometry Laboratories. Lecture Slides. 2021. <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>

14. Hero Baby (s.f). 6 pasos para preparar el biberón. <https://www.hero.es/baby/6-pasos-para-preparar-el-biberon>
15. Condalab (s.f). Caldo Soja Trypticaseína (TSB) EP/USP/ISO. <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-preparados/1527-12490-caldo-soja-tripticaseina-tsb-ep-usp-iso.html>
16. Condalab (s.f). Agar Soja y Trypticaseína (TSA) EP/USP/ISO. <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/87-12355-agar-soja-y-tripticaseina-tsa-ep-usp-iso.html>
17. ThermoFisher Scientific (s.f). SYTO 9 Green fluorescent nucleic acid stain. [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S34854?ef\\_id=CjwKCAjwtpGGBhBJEiwAyRZX2kjRg-Agnc1YsshwYJ6JYD\\_bZyETYIUlchW2QWUtKNd7CTY6oG-nAxoCbJQQA vD\\_BwE:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!447292198736!b!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw\\_dy\\_pur\\_con&gclid=CjwKCAjwtpGGBhBJEiwAyRZX2kjRg-Agnc1YsshwYJ6JYD\\_bZyETYIUlchW2QWUtKNd7CTY6oG-nAxoCbJQQA vD\\_BwE#/S34854?ef\\_id=CjwKCAjwtpGGBhBJEiwAyRZX2kjRg-Agnc1YsshwYJ6JYD\\_bZyETYIUlchW2QWUtKNd7CTY6oG-nAxoCbJQQA vD\\_BwE:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!447292198736!b!!g!!&cid=bid\\_pca\\_iva\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw\\_dy\\_pur\\_con&gclid=CjwKCAjwtpGGBhBJEiwAyRZX2kjRg-Agnc1YsshwYJ6JYD\\_bZyETYIUlchW2QWUtKNd7CTY6oG-nAxoCbJQQA vD\\_BwE](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S34854?ef_id=CjwKCAjwtpGGBhBJEiwAyRZX2kjRg-Agnc1YsshwYJ6JYD_bZyETYIUlchW2QWUtKNd7CTY6oG-nAxoCbJQQA vD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!447292198736!b!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&gclid=CjwKCAjwtpGGBhBJEiwAyRZX2kjRg-Agnc1YsshwYJ6JYD_bZyETYIUlchW2QWUtKNd7CTY6oG-nAxoCbJQQA vD_BwE#/S34854?ef_id=CjwKCAjwtpGGBhBJEiwAyRZX2kjRg-Agnc1YsshwYJ6JYD_bZyETYIUlchW2QWUtKNd7CTY6oG-nAxoCbJQQA vD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!447292198736!b!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&gclid=CjwKCAjwtpGGBhBJEiwAyRZX2kjRg-Agnc1YsshwYJ6JYD_bZyETYIUlchW2QWUtKNd7CTY6oG-nAxoCbJQQA vD_BwE)
18. Molecular Probes, Inc. (2006). Propidium Iodide Nucleic Acid. [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01304.pdf?\\_ga=2.128508492.1769842470.1623948451-325553373.1623948451](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01304.pdf?_ga=2.128508492.1769842470.1623948451-325553373.1623948451)
19. Moreno-Ortiz, M.C. (2008). Servicio de Citometría de Flujo. Centro Nacional de Biotecnología. <http://wwwuser.cnb.csic.es/~citometria/introduccion.html>
20. Edelson-Mammel, S. G., & Buchanan, R. L. (2004). Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *Journal of food protection*, 67(1), 60–63. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.1.60>
21. World Health Organization. (2006). *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43547>
22. Nazarowec-White, M., & Farber, J. M. (1997). Incidence, Survival, and Growth of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. *Journal of food protection*, 60(3), 226–230. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.3.226>

## 7. ANEXOS

Recuento placas							
Hora	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio	tiempo	Promedio	Log ufc/ml
8:30	C	C	1,60E+06	1,60E+06	0	1,60E+06	6,20411998
10:30	1,93E+05	C	C	1,93E+05	2	1,93E+05	5,28555731
12:30	C	2,33E+08	C	2,33E+08	4	2,33E+08	8,36735592
14:30	1,30E+08	2,13E+09	1,60E+09	1,29E+09	6	1,29E+09	9,10946605
16:30	5,80E+08	2,10E+09	2,20E+09	1,63E+09	8	1,63E+09	9,21129857
18:30	6,96E+08	1,67E+09	1,67E+09	1,35E+09	10	1,35E+09	9,1288299
20:30	6,93E+08	1,33E+09	1,33E+09	1,12E+09	12	1,12E+09	9,0483123

Anexo 1: Tabla recuento en placa de la siembra de *C.Sakazakii* para el estudio de la curva de crecimiento