



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Nutrición Humana y Dietética

Crecimiento de *Cronobacter sakazakii* en condiciones de pH y concentración de sales biliares similares al intestino del neonato.

Autor:

Pablo Simón Caicoya

Tutor:

EMILIANO JOSE QUINTO FERNANDEZ

Contenido

1. Resumen.....	2
2. Abstract	2
3. Introducción	3
3.1. Taxonomía.....	3
3.2. Identificación de la bacteria	4
3.3. Infección por <i>Cronobacter sakazakii</i>	4
3.4. Presencia en alimentos	4
3.5. Condiciones de crecimiento del <i>Cronobacter sakazakii</i>	4
3.5.1. Temperatura.....	4
3.5.2. Humedad.....	5
3.5.3. Resistencia al envasado al vacío.....	5
3.5.4. Resistencia a la acidez	5
3.6. Condiciones en el tracto intestinal del neonato	5
3.6.1. Tiempo de tránsito	5
3.6.2. pH.....	5
3.6.3. Concentración de sales biliares.....	6
3.6.4. Osmolaridad	6
4. Objetivos	6
5. Material y métodos	6
5.1. Recuperación de la bacteria	6
5.2. Identificación en MALDI-TOF	6
5.3. Preparación de las disoluciones y materiales	7
5.4. Supervivencia a diferentes pH.....	7
5.4.1. pH 1,4 y 2,5.....	9
5.4.2. pH 7,5; 7,8 y 8,5.....	9
5.4.3. pH 4,5	9
5.5. Supervivencia a diferentes concentraciones de sales biliares	10
6. Resultados y discusión	10
6.1. Crecimiento a diferentes concentraciones de sales biliares.....	10
6.2. Crecimiento a diferentes pH	12
6.2.1. pH ácido.....	12
6.2.2. pH básico.....	14
7. Conclusiones.....	18
8. Bibliografía	19

1. Resumen

El *Cronobacter sakazakii* es una bacteria oportunista, gram negativa, anaerobia facultativa. La infección por esta bacteria puede tener consecuencias muy graves en neonatos como la meningitis o la sepsis. Además, en esta población, tiene una elevada tasa de mortalidad. Los bebés de menos de 28 días y los nacidos pesando menos de 2500g son el grupo de mayor riesgo.

Esta bacteria es un microorganismo muy resistente a la desecación y sobrevive temperaturas muy bajas (hasta 5°C) y muy elevadas (hasta 50°C). Se puede encontrar el *C. sakazakii* en productos de origen vegetal, entre otros, y, también, en leches maternizadas.

En este estudio se analiza el crecimiento del *Cronobacter sakazakii* en las condiciones de pH y de concentraciones de sales biliares del intestino del neonato. Para ello se revisó la literatura que estudiaba las condiciones del intestino del neonato. Se tomó como pH de estudio los siguientes: 1,4; 2,5; 4,5; 7,5; 7,8 y 8,5. Como concentraciones de sales biliares se tomaron 1mM y 4,7mM. Mediante el cultivo durante 4 horas de la bacteria en medios de tryptic soy broth (TSB) con las condiciones indicadas se analizó el crecimiento de la bacteria.

El *C. sakazakii* no sobrevivió ni al pH 1,4 ni al 2,5. El crecimiento a pH 4,5 fue mínimo y comparado con el crecimiento a los pH 7,5; 7,8 y 8,5, siendo el pH 8,5 en el que se observó un mayor crecimiento.

En los experimentos a las concentraciones de sales biliares de 1mM y 4,7 mM se observó que tras las 4 horas el crecimiento había sido superior en el medio con una concentración de 4,7mM.

En los medios en los que el *C. sakazakii* proliferó se pudo observar un “periodo de adaptación” de entre 30 y 90 minutos durante el cual la bacteria no proliferó. Tras este “periodo de adaptación” la proliferación comenzó.

Más estudios son necesarios para conocer verdaderamente el crecimiento del *Cronobacter sakazakii* en el intestino del neonato.

Palabras clave

Cronobacter sakazakii, crecimiento, sales biliares, pH, intestino del neonato, leches maternizadas.

2. Abstract

Cronobacter sakazakii is a gram-negative, facultatively anaerobic, opportunistic bacterium. Infection by this bacterium can have very serious consequences in newborns such as meningitis or sepsis. In addition, in this population, it has a high mortality rate. Babies under 28 days or born under 2500kg are at the most risk.

This bacterium is a microorganism that is very resistant to desiccation and survives very low temperatures (up to 5°C) and very high temperatures (up to 50°C). *C. sakazakii* can be found in plant-based products, among others, and also in infant formula.

In this study, the growth of *Cronobacter sakazakii* in the conditions of pH and concentrations of bile salts in the intestine of newborn babies is analyzed. To do this we reviewed the literature that studied the conditions of the intestine of the newborn. The following pH values were chosen for the study: 1.4; 2.5; 4.5; 7.5; 7.8 and 8.5. As concentrations of bile salts, 1mM and 4.7mM were taken. The growth of the bacteria was analyzed by culturing the bacteria for 4 hours in tryptic soy broth (TSB) media with the indicated conditions.

C. sakazakii did not survive at pH 1.4 or 2.5. Growth at pH 4.5 was minimal and compared to growth at pH 7.5; 7.8 and 8.5, being the pH 8.5 in which a greater growth was observed.

In the experiments at bile salt concentrations of 1mM and 4.7mM, it was observed that after 4 hours growth was higher in the medium with a concentration of 4.7mM.

In the media in which *C. sakazakii* proliferated, an "adaptation period" of between 30 and 90 minutes could be observed during which the bacteria did not proliferate. After this "adaptation period" proliferation began.

Further studies are necessary to truly understand the growth of *Cronobacter sakazakii* in the intestine of the newborn.

Key words

Cronobacter sakazakii, growth, bile salts, pH, newborn intestine, infant formula.

3. Introducción

Cronobacter sakazakii antiguamente llamado *Enterobacter sakazakii* es una bacteria del género *Enterobacter*, de la familia *Enterobacteriaceae*. Farmer et al. (18) distinguieron esta bacteria del *Enterobacter cloacae* en 1980. Es una bacteria oportunista, gram negativa, anaerobia facultativa.

Es un microorganismo emergente ya que su identificación por Farmer et al. (17) es reciente y supone actualmente un riesgo para la salud pública. Se puede hallar en el suelo, en diferentes vegetales y animales y en el agua. Se puede encontrar en comida seca como es la leche maternizada, leche en polvo o almidones. En las leches en polvo puede permanecer activa hasta dos años por su resistencia a los ambientes secos (7).

3.1. Taxonomía

El *Cronobacter sakazakii* está clasificado, como se ha mencionado anteriormente, dentro del género *Enterobacter*, de la familia *Enterobacteriaceae*. Antiguamente se conocía a esta bacteria como *Enterobacter cloacae* con pigmento amarillo. Farmer et al. la denominaron *Cronobacter sakazakii* y estudios taxonómicos más recientes permitieron crear el nuevo género *Cronobacter* que incluye ahora 7 especies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, and *C. condimenti*. (20, 21)

3.2. Identificación de la bacteria

Esta bacteria se puede identificar mediante PCR en tiempo real o el sistema de identificación bioquímica VITEK2 así como por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight) (9,10)

3.3. Infección por *Cronobacter sakazakii*

Las infecciones por *Cronobacter sakazakii* son poco comunes pero pueden ser letales, sobretodo en niños menores de 2 meses. También están en riesgo elevado los bebés prematuros, los que tienen problemas de salud que afectan al sistema inmune ya sean adultos o bebés y las personas mayores de 65 años.

Los grupos de mayor riesgo son los neonatos de bajo peso (<2500g), los prematuros y los menores de 28 días. En estos casos las probabilidades de consecuencias graves tras la infección son superiores en comparación con los bebés con un desarrollo mayor. (3)

Las consecuencias de infección por *Cronobacter sakazakii* pueden ser muy graves y entre ellas están la meningitis, bacteremia, sepsis, enterocolitis necrotizante, retraso del crecimiento y muerte en un 40%-80% de las ocasiones. Esto resalta la relevancia del presente estudio y de todos los que intenten arrojar luz sobre los mecanismos de infección y características de este microorganismo.

El tiempo de colonización de esta bacteria puede comprender entre 2 semanas hasta 8 semanas. Los síntomas de infección por *Cronobacter sakazakii* en bebés menores de 1 año son: fiebre, ingesta reducida, llantos o baja energía. (12)

3.4. Presencia en alimentos

El *C. sakazakii* se encuentra en las leches maternizadas y leches en polvo. También se encuentra en otros productos, principalmente de origen vegetal (23). Se ha podido aislar esta bacteria en cereales, hierbas aromáticas, ya fuesen frescas o desecadas y legumbres. También se ha podido encontrar en productos animales como carne, pescado o leche, así como en productos procesados.

Su gran resistencia a la desecación es la principal característica que le permite proliferar en medios diversos y que le va a permitir mantenerse activa en las leches en polvo y leches maternizadas durante largos períodos de tiempo.

Las leches maternizadas son el principal vector de infección en neonatos, que a su vez son la población más vulnerable a la infección por *C. sakazakii*. En estos medios secos la bacteria puede sobrevivir hasta 2 años por el control de seguridad alimentaria en los procesos de producción de estos productos es crucial para evitar las infecciones.

3.5. Condiciones de crecimiento del *Cronobacter sakazakii*

3.5.1. Temperatura

El *Cronobacter sakazakii* crece en un rango de temperaturas muy amplio. Puede crecer desde los 5°C hasta a una temperatura de 45-50°C. A temperatura ambiente (21°C), su tiempo de duplicación es de 40 a 94 minutos. Al ser un microorganismo muy termotolerante, el

almacenamiento de productos en los que haya riesgo de encontrarlo debe ser muy cuidadoso. Se recomienda mantenerlos a temperaturas inferiores a 5°C para evitar la proliferación del organismo. (13, 14, 15, 16, 3)

3.5.2. Humedad

Esta bacteria puede ser encontrada tanto en el agua como en ambientes secos, por ejemplo, las leches maternizadas. Puede sobrevivir en estos ambientes secos períodos de hasta dos años y crecer rápidamente cuando se den las condiciones adecuadas. El *Cronobacter spp.* tiene un biofilm hecho de celulosa que podría servirle para protegerse en medios secos. (17)

3.5.3. Resistencia al envasado al vacío

Se evaluó la supervivencia del *Cronobacter sakazakii* a diferentes temperaturas (4°C, 10°C, 25°C y 50°C); en condiciones que simulan el flujo gástrico (pH 3,5) y en un medio con sales biliares. Se sometieron a estas condiciones colonias envasadas al vacío y el envasadas con aire. Se encontró una mayor reducción en la supervivencia en todos los casos en las envasadas al vacío. (16)

En este estudio se demuestra que, a pesar de ser un microorganismo anaerobio facultativo, el envasado al vacío provoca una reducción de la supervivencia de las colonias frente al envasado con aire.

3.5.4. Resistencia a la acidez

Se ha estudiado la supervivencia del *Cronobacter sakazakii* en medios con diferentes pH. En estudios anteriores (3) se ha establecido que esta bacteria no sobrevive a pHs inferiores a 2,5. Se ha observado, también un crecimiento similar entre las sembradas a un pH de 5,5 y aquellas que se sembraron a pH 7,2.

3.6. Condiciones en el tracto intestinal del neonato

3.6.1. Tiempo de tránsito

Nos interesa el tiempo de tránsito porque ese tiempo es el que va a pasar el bolo en el tracto intestinal del neonato. Se ha establecido que el tiempo de medio vaciamiento gástrico es de 48 ± 15 minutos cuando se alimenta al recién nacido con leche materna y de 78 ± 14 minutos cuando se le alimenta con leches maternizadas.

El tiempo total de tránsito intestinal del neonato se estima que es parecido al del adulto que es de aproximadamente 4 horas. Este tiempo es el que nos servirá de referencia para el estudio.

3.6.2. pH

El pH del tracto ingestivo del neonato varía dependiendo, entre otras cosas, de si se mide en estado pre o postprandial y de la zona del tracto intestinal en la que lo midamos.

En el estómago del neonato el pH es de 3.5 ± 1.0 en estado de ayunas y de 6.4 ± 0.6 tras la ingesta. Este cambio se debe a que la ingesta neutraliza los ácidos del estómago. En el intestino delgado el pH varía ligeramente dependiendo de la sección pero se mantiene cerca de 6,7.

3.6.3. Concentración de sales biliares

Las sales biliares son sintetizadas en el hígado, almacenadas en la vesícula biliar y secretadas a la segunda porción del duodeno. Son un elemento crucial en la digestión de las grasas ya que sirven para descomponerlas en ácidos grasos.

La concentración de sales biliares, al igual que el pH, varían dependiendo de si se encuentra en un estado pre o postprandial. Vamos a encontrar una concentración de $4,7 \pm 1$ mM antes de la ingesta y de $1 \pm 0,3$ mM tras la ingesta.

3.6.4. Osmolaridad

La osmolaridad en el tracto digestivo del neonato es de 298 en el estómago en ayunas y 308 tras la ingesta y en el intestino es de 291 y 296 antes y después de la ingesta respectivamente. La osmolaridad no varía mucho con la ingesta ni en las diferentes secciones del tracto digestivo.

4. Objetivos

Conocer la supervivencia del patógeno *Cronobacter Sakazakizakii* en condiciones de pH y concentración de sales biliares del intestino del neonato.

5. Material y métodos

5.1. Recuperación de la bacteria

En el laboratorio teníamos diferentes cepas de *Cronobacter sakazakii* congeladas. Lo primero que debíamos hacer era recuperar esas bacterias para poder confirmar que eran *Cronobacter sakazakii* y empezar el experimento.

Para este paso tomamos los tubos eppendorf con las cepas y sembramos por agotamiento en una placa de Petri con TSA. Estas placas las dejamos incubar a 37°C en la estufa durante 24h. Las colonias que creciesen en estas placas serían las que utilizaríamos para la identificación de las cepas.

Es importante identificar las cepas con las que se va a trabajar ya que cometer un error en este paso supondría el fracaso de todo el proyecto.

5.2. Identificación en MALDI-TOF

Para la identificación de la bacteria utilizamos la técnica MALDI-TOF. Esta técnica obtiene, mediante espectrometría de masas, el espectro del microorganismo que queremos identificar y lo compara con la base de datos que posee indicándonos la especie y el género de nuestro microorganismo. Se utilizó el Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

- Sembrar muestras y coger con palillos estériles sin coger agar en el proceso y extendemos la muestra en los pocillos de la placa de MALDI-TOF; añadir 1uL de ácido fórmico; dejar secar el ácido fórmico; añadir 1uL de matriz y dejar secar.
- Identificamos la cepa de *Cronobacter sakazakizakii* y a partir de ahí trabajamos con esa cepa. La puntuación de una de nuestras muestras fue de 2,086. Esta puntuación nos indica que fue identificada a nivel de género y que la identificación de especie es

probable. Decidimos trabajar con esta cepa ya que fue la que mejores resultados dio de todas de las que disponíamos.

5.3. Preparación de las disoluciones y materiales

Las bacterias se sembrarán en TSB a diferentes pHs y a diferentes concentraciones de sales biliares. Preparación de TSB: En un recipiente de vidrio Pyrex de tapón roscado añadir 3g de TSB por cada 100mL de agua destilada; mezclar con una mosca hasta que esté completamente disuelto.

Para obtener un pH más ácido que el del TSB añadimos HCl al 10% al TSB hasta que el pHímetro nos indica el pH adecuado. En caso de necesitar un pH más básico, añadimos NaOH hasta que el pHímetro nos indica el pH que buscamos.

Uso del pHímetro: Se usó el pHímetro Basic 20 CRISON. Para calibrar el pHímetro se debe aclarar filamento con agua destilada; secar cuidadosamente con papel; introducir el filamento en el tampón de pH7; cuando el aparato lo indique, aclarar otra vez e introducir el segundo tampón de pH4 y esperar a que nos indique que está calibrado. Para usarlo debemos aclararlo, introducirlo en el líquido cuyo pH queremos medir y esperar a que nos indique el pH, si queremos que el pH sea más ácido añadiremos HCl gota a gota y esperaremos a que nos indique el nuevo pH; si queremos un pH más básico añadiremos NaOH y del mismo modo esperaremos a que nos indique el nuevo pH.

En el caso de las concentraciones biliares utilizamos un bote de vidrio Pyrex de tapón roscado con 50cL de TSB preparado como se indica anteriormente. Posteriormente añadimos las sales biliares "Bile Salts nº 3" de OXOID. Para la concentración de 1mM añadimos 0,042255g de producto y para 4,7mM añadimos 0,1986g de producto

Durante el ensayo sembraremos las bacterias en Tryptic Soy Agar (TSA) Preparación de tryptic soy agar (TSA): En un recipiente de vidrio Pyrex de tapón roscado añadir 4g de TSA por cada 100mL de agua destilada; mezclar con una mosca y calentar en el microondas hasta que el polvo está completamente disuelto.

Las diluciones se harán en agua de peptona. Preparación de agua de peptona: Añadir 0,65g de NaCl y 0,1g de proteosa peptona por cada 100mL de agua destilada y mezclar con una mosca hasta que está completamente disuelto.

Antes de cada experimento se prepararon los materiales necesarios para el mismo con el objetivo de asegurar que fuesen estériles y tener un mayor control del material

5.4. Supervivencia a diferentes pH

El día anterior al ensayo pusimos a cultivar las bacterias añadiendo a un tubo eppendorf 0,9mL de TSB y 0,1mL de TSB con la bacteria. Agitamos el tubo en el vórtex y lo dejamos en la estufa a 37°C durante 24h.

Para empezar el experimento tomamos el tubo cultivado durante 24h y comprobamos si habían crecido las bacterias (se puede ver que se depositan al fondo del tubo).

Agitamos el tubo en el vórtex y en un tubo eppendorf con 0,9mL de agua de peptona diluimos 0,1mL del contenido del tubo cultivado. A partir de esta primera dilución hacemos 5 diluciones más del mismo modo hasta llegar a la dilución -6. Antes de extraer los 0,1mL de cada tubo para el siguiente agitamos en el vórtex para asegurarnos de que está bien hecha la dilución. Sembramos estas diluciones por el método de siembra en gota en placas de Peyer con TSA, con tres gotas de 10uL por dilución.

Posteriormente tomamos el tubo que estuvo cultivando 24h y extraemos 0,5mL para añadirlos al bote de TSB que tuviésemos preparado para ese día. La concentración objetivo era de 6log ufc/mL. Después de añadir la bacteria al bote extraemos del mismo 0,1mL y los diluimos en un tubo eppendorf con 0,9mL de agua de peptona y, del mismo modo que anteriormente, diluimos hasta la dilución -6. Estas diluciones las sembramos de la misma manera que anteriormente.

El bote con la bacteria lo metemos en la estufa a 37°C y cada media hora comprobamos el crecimiento. En total se hicieron 8 comprobaciones de crecimiento bacteriano, es decir, 4 horas en total.

Al terminar el experimento o cuando las placas estaban completamente secas, se introducían en la estufa a 37°C, con el agar en la parte de arriba, durante 24h. Al cabo de 24 horas se hacía el recuento de colonias.

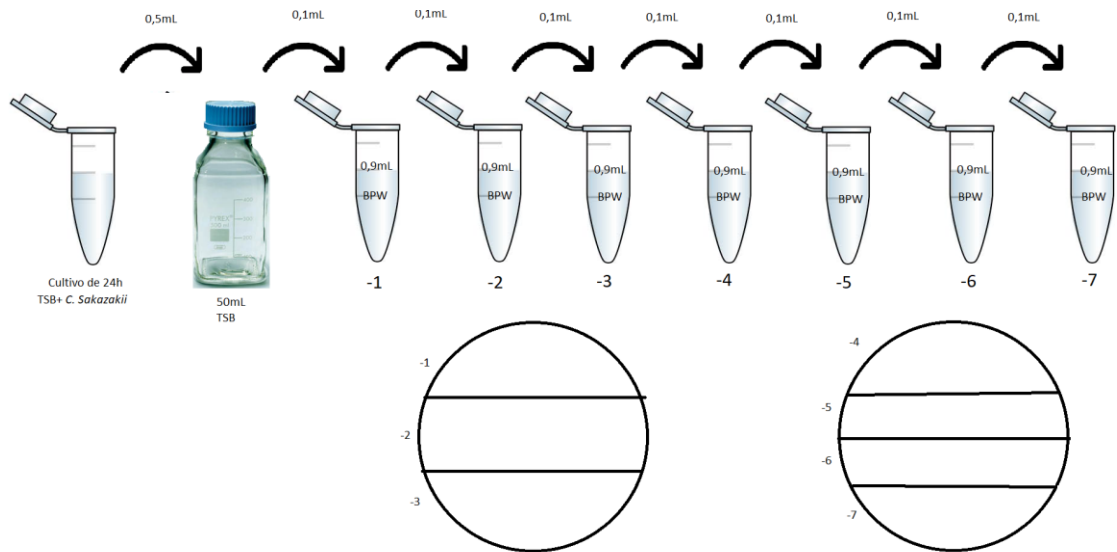


Ilustración 1. Proceso de dilución en tubos eppendorf y siembra en gota.

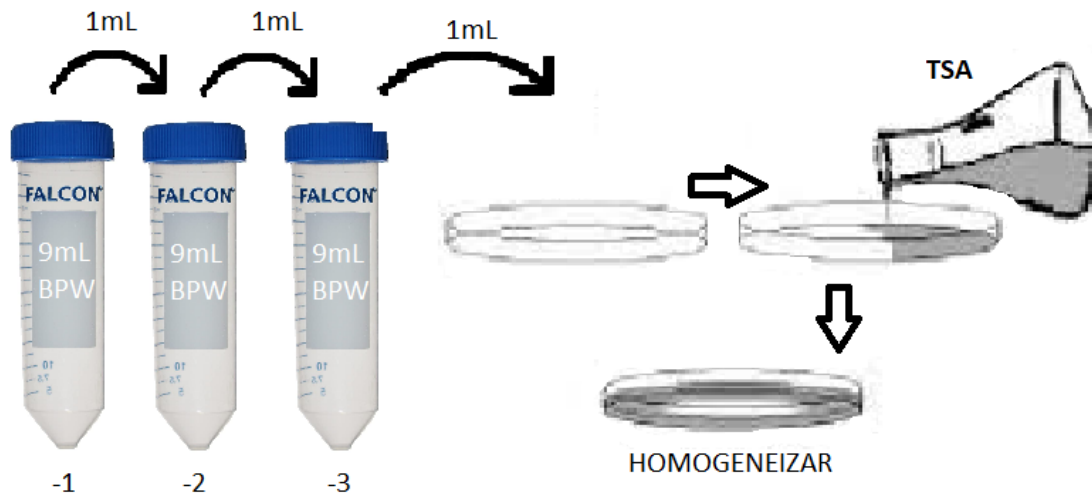


Ilustración 2 Proceso de dilución en tubos falcon y siembra en profundidad.

5.4.1. pH 1,4 y 2,5

A estos pH sabemos, por experimentos anteriores que hemos llevado a cabo nosotros o se han llevado a cabo en otros estudios, que las bacterias morirán rápido, por lo tanto desde el tiempo 1 utilizamos el método de siembra en profundidad. Tomamos 1mL de la muestra que deseamos sembrar y lo añadiremos a una placa de Peyer vacía; añadimos 20mL TSA a una temperatura de 54°C y removemos cuidadosamente haciendo círculos y formando ochos de modo que se mezclen la muestra y el TSA. Por último dejamos que se seque junto al mechero.

En este caso se extrajo del bote con las bacterias 1mL para diluirlo en 9mL de agua de peptona en un tubo falcon. Del mismo modo que con los tubos eppendorf se diluyó la muestra hasta la dilución -3 y se sembró en profundidad haciendo dos siembras por cada dilución con el fin de tener una copia en caso de que una de las dos muestras se contaminase

5.4.2. pH 7,5; 7,8 y 8,5

A estos pH sabíamos que las bacterias proliferarían y, por lo tanto, la siembra se hizo en gota. Se sembró al principio hasta la dilución -6 y a partir del tiempo 4 hasta la dilución -7, de este modo nos aseguramos de que podríamos contabilizar las colonias en, al menos, una dilución.

5.4.3. pH 4,5

El pH 4,5 se sembró en gota del mismo modo que los anteriores pero en este caso se mantuvo la siembra hasta la dilución -6 hasta el tiempo 8 ya que sabíamos, por otros ensayos que tuvimos que hacer, que a este pH no habría una proliferación muy grande.

5.5. Supervivencia a diferentes concentraciones de sales biliares

Para comprobar el crecimiento a diferentes concentraciones de sales biliares se siguió el mismo método que con el crecimiento a diferentes pH. Se añadieron 50mL del cultivo de 24 horas de la bacteria al bote deseado y se sembró en gota las diluciones hasta la dilución 10^{-6} desde el tiempo 0 hasta el 8.

6. Resultados y discusión

En este apartado se expondrán las gráficas con las curvas de crecimiento del *C. sakazakii* en las diferentes condiciones a las que se expuso. Estas gráficas se hicieron con el programa Excel en el que se introdujeron manualmente los datos. Las gráficas muestran en el eje vertical la concentración de unidades formadoras de colonias expresada en log ufc/mL y muestran en el eje horizontal el tiempo siendo cada punto una medición. Como se ha mencionado antes las mediciones se realizaron cada 30 minutos.

6.1. Crecimiento a diferentes concentraciones de sales biliares

El crecimiento de *Cronobacter sakazakii* se estudió a dos concentraciones de sales biliares diferentes. Estas concentraciones son 1mM y 4,7mM, y corresponden a los resultados que se obtuvieron en (4) y corresponden a la concentración de sales biliares del intestino del neonato antes y después de la ingesta respectivamente.

De acuerdo con (3) sobrevivieron a unas concentraciones de sales biliares de 5% sobrevivieron todas las cepas de saka que se examinaron. Una concentración de 1mM equivale a un 0,187% en masa y una de 4,7mM equivale a un 0,8789% en masa.

A pesar de que las concentraciones de sales biliares que se estudiaron en el presente trabajo son inferiores a aquellas estudiadas por (3), nos pareció relevante estudiar el crecimiento del *Cronobacter sakazakii* en estas condiciones ya que son las que más se asemejan a las del intestino del neonato y de este modo tendremos una imagen más real de cómo es el crecimiento de la bacteria una vez se encuentra en este medio.

El crecimiento de la bacteria a la concentración de sales biliares 1mM se puede observar en la Figura 1. Hemos podido observar que se produce una proliferación de las colonias con un aumento medio 0,6298 ufc/mL. Se observó un decrecimiento de ufc (unidades formadoras de colonias) durante la primera hora de siembra. Tras este decrecimiento se produjo un aumento constante de ufc/mL. Esto nos puede sugerir que las bacterias se adaptaron al medio tras esa primera hora y comenzaron a proliferar.

En la Figura 2 se puede ver el crecimiento de la bacteria a una concentración de sales biliares de 4,7mM. En esta ocasión, se produjo un aumento medio de 1,513 ufc/mL tras las 4 horas. Durante los primeros 90 minutos, el crecimiento es muy reducido (un promedio de 0,0225 log ufc/mL) y tras estos 90 minutos la proliferación es más rápida (aumentan en 1,49 log ufc/mL desde el minuto 90 hasta el 240). Esto, al igual que en el caso de 1mM, nos sugiere que la bacteria necesita un tiempo de adaptación de alrededor de 90 minutos tras el cual comienza a proliferar más rápidamente.

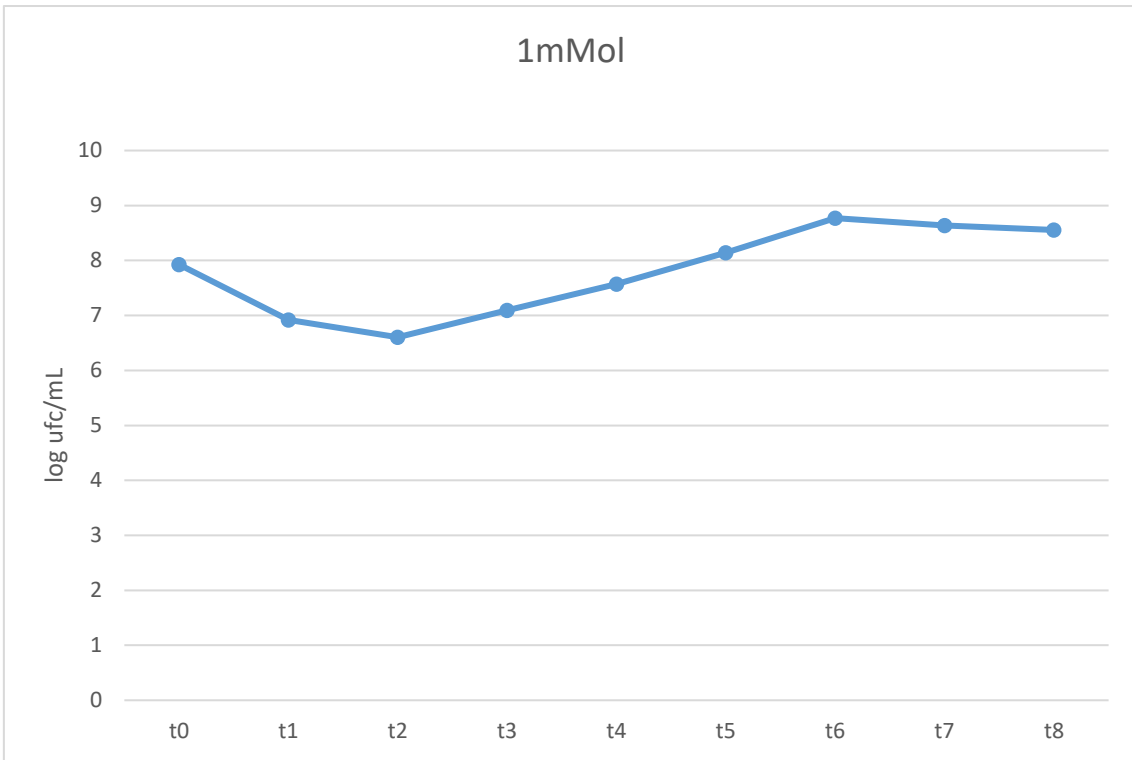


Figura 1 Crecimiento de Cronobacter ssp. en un medio con una concentración de 1mM de sales biliares

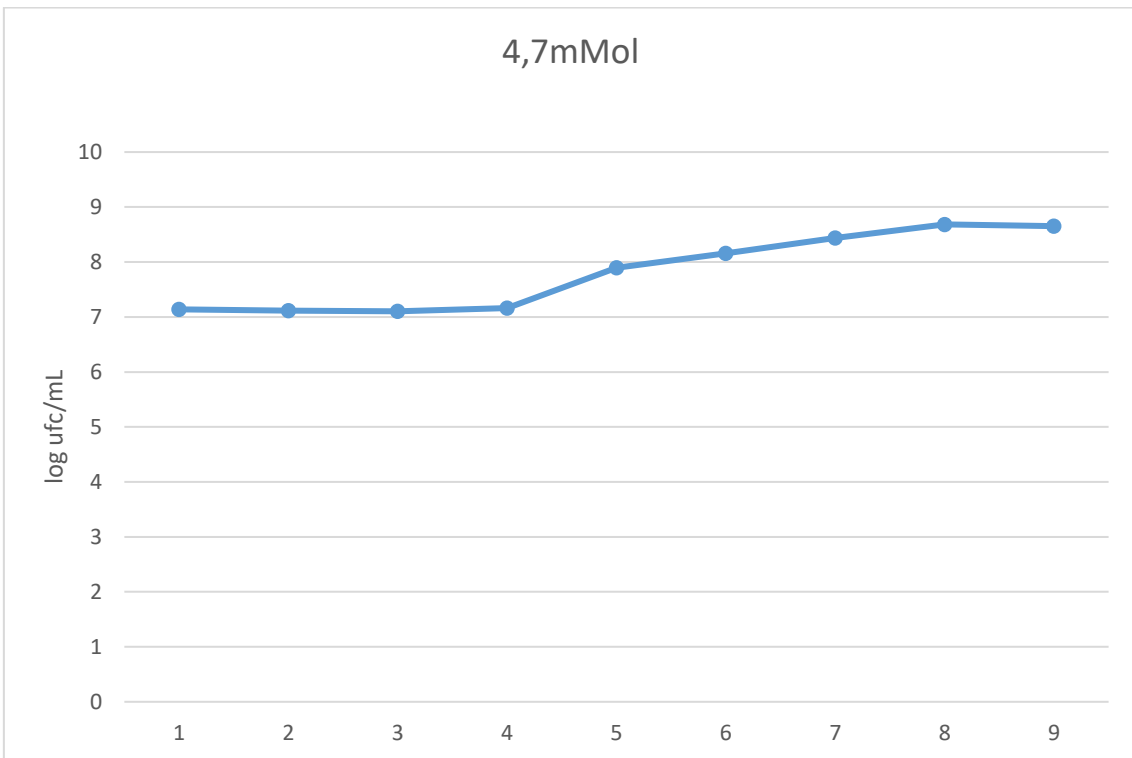


Figura 2 Crecimiento del Cronobacter ssp. en un medio con una concentración de 4,7mM de sales biliares

6.2. Crecimiento a diferentes pH

Se estudió el crecimiento de *Cronobacter sakazakii* en medios con una serie de pH que se pueden encontrar en el tracto intestinal del neonato. Se estudiaron algunos pH de fuera de los rangos establecidos por (4) con el fin de abarcar los pH que se pueden encontrar en el tracto digestivo de neonatos con alguna patología que provoque una acidificación o una alcalinización del contenido del tracto digestivo.

La resistencia del *Cronobacter sakazakii* a la acidez se ha estudiado en diversos estudios como (3) y (16) Compararemos nuestros datos con los de estos estudios.

6.2.1. pH ácido

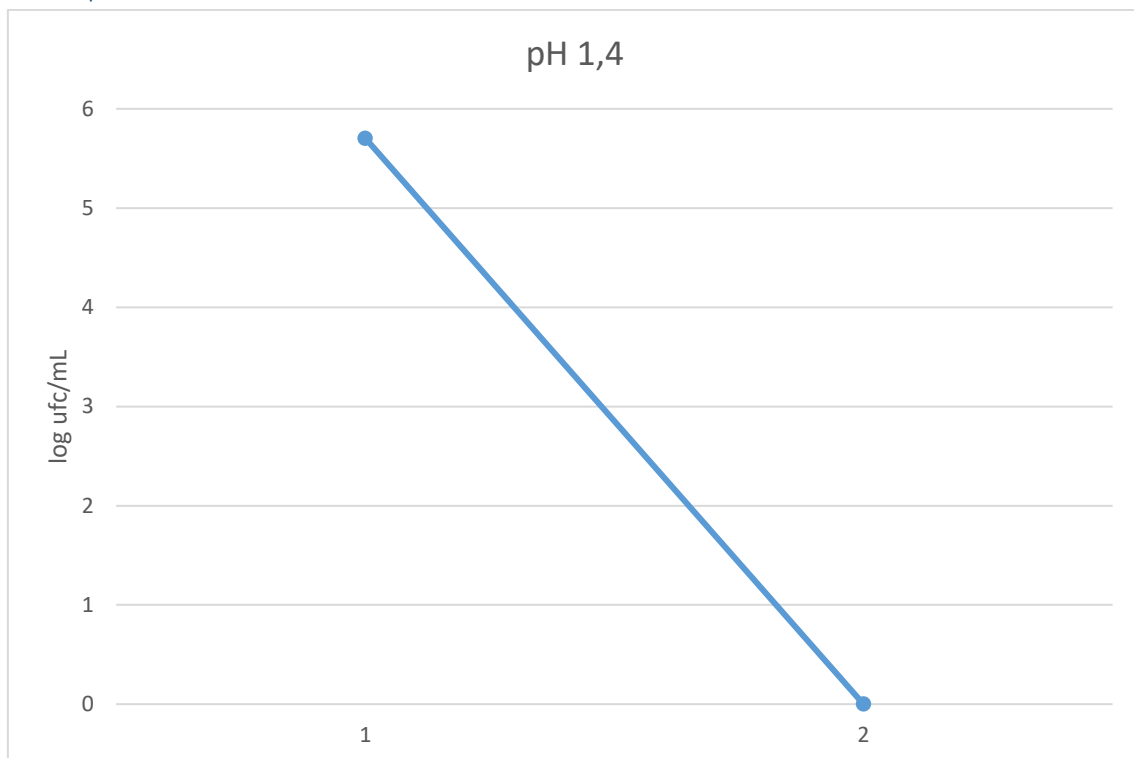


Figura 3 Crecimiento del *Cronobacter ssp.* en un medio de TSB con un pH de 1,4

En la Figura 3 se puede observar cómo, en un medio con un pH de 1,4 las colonias *Cronobacter sakazakii* no llegan a sobrevivir al primer tiempo de recuento (30 minutos) con un descenso promedio de 5,7 log ufc/mL. De los estudiados, este pH es en el que se produce una muerte más rápida de las bacterias.

En la Figura 4 se puede ver la supervivencia del *Cronobacter sakazakii* en un medio de pH 2.5. A este pH no quedan, en el segundo tiempo de recuento (1 hora), suficientes colonias para poder contarlas.

De acuerdo con Fakruddin et al. (3) a pHs ácidos, inferiores a 2.5 el *Cronobacter sakazakii* no va a sobrevivir. En nuestros experimentos hemos podido observar estos mismos resultados y, al haber hecho el experimento durante 4 horas en todos los casos hemos aprendido que no se

produce en la bacteria ninguna adaptación que pueda provocar una proliferación posterior en estos medios ácidos.

En estos medios ácidos la concentración de ufc en el tiempo 0 es inferior a aquella que encontramos en los medios más básicos. Esto puede ser debido a que desde el momento de introducir la bacteria en el medio hasta que se hicieron las diluciones pasaron unos segundos durante los cuales el número de ufc se vio reducido.

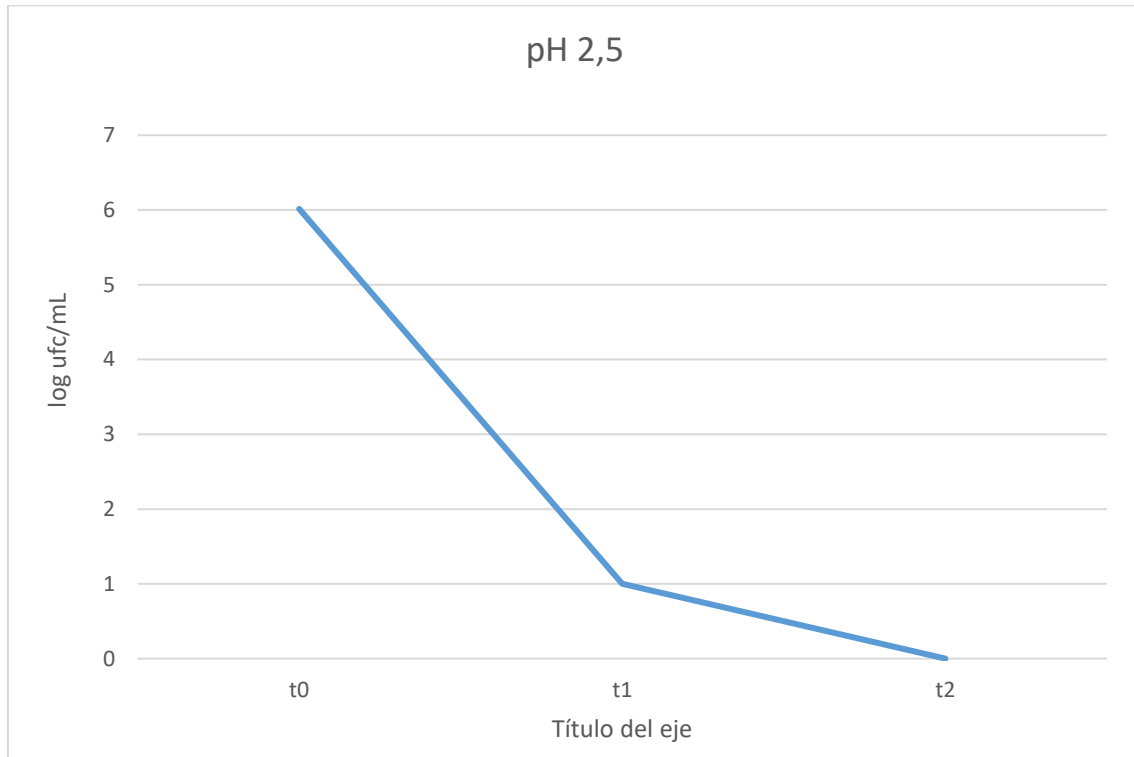


Figura 4. Crecimiento del *Cronobacter ssp.* en un medio de TSB con un pH de 2,5.

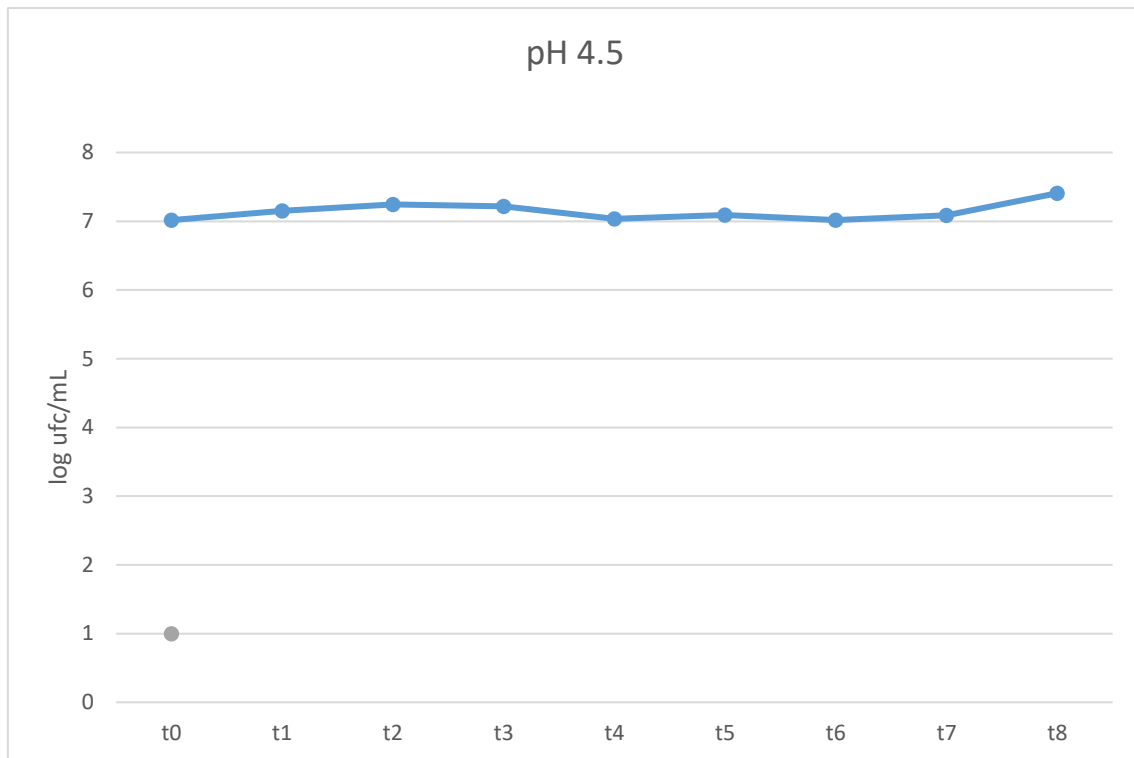


Figura 5. Crecimiento del *Cronobacter ssp.* en un medio de TSB con un pH de 4,5

En la Figura 5 podemos observar un aumento de 0,389 log ufc/mL tras el cultivo de 4 horas en un medio con pH 4,5. Según (3) en este pH se produce cierta proliferación bacteriana. Sus resultados indican que es significativamente menor que a un pH de 5,5 ($P < 0.05$) pero no significativamente superior a 3,9 ($P < 0.05$).

Nuestros resultados muestran, también, un ligero aumento en log ufc/mL al cabo de las 4 horas. Lo cual nos indica que es un medio en el que el *Cronobacter sakazakii* puede sobrevivir e incluso proliferar.

Estos pH los podemos encontrar en el estómago del neonato en un estado preprandial. El *C. sakazakii* entra en el cuerpo normalmente a través de alimentos. Al ingerir alimentos el pH del tracto intestinal del neonato aumenta, por lo tanto, la bacteria entrará en contacto con estos medios ácidos solamente hasta que el medio se alcalinice.

6.2.2. pH básico

A pH superior a 5,5, según Fakkruddin et al. (3) la bacteria prolifera significativamente comparado con el pH 4,5 pero no hay diferencia significativa entre el pH 5,5 y el 7,2. Nosotros, de este rango, hemos analizado los pH 7,5; 7,8 y 8,5. La diferencia que hay, en nuestros resultados, entre el pH 4,5 y el pH 7,5 es notoria ya que el recuento en el pH 4,5 se mantiene en 7-8 log y en el 7,5 alcanza casi el 9 log.

En la Figura 6 se puede comprobar que en un medio con un pH de 7,5 el *Cronobacter sakazakii* va a crecer en 1,49 log ufc/mL. En este experimento se observó que el período de máximo crecimiento es el que comprende desde el tiempo 3 hasta el tiempo 6 en el que se produce un

aumento promedio de 1,165 log ufc/mL que representa un 78% del crecimiento total tras las 4 horas.

En este medio se puede observar que la bacteria no proliferó notablemente hasta los 90 minutos. Esto sugiere tras esos 90 minutos la bacteria se adaptó al medio.

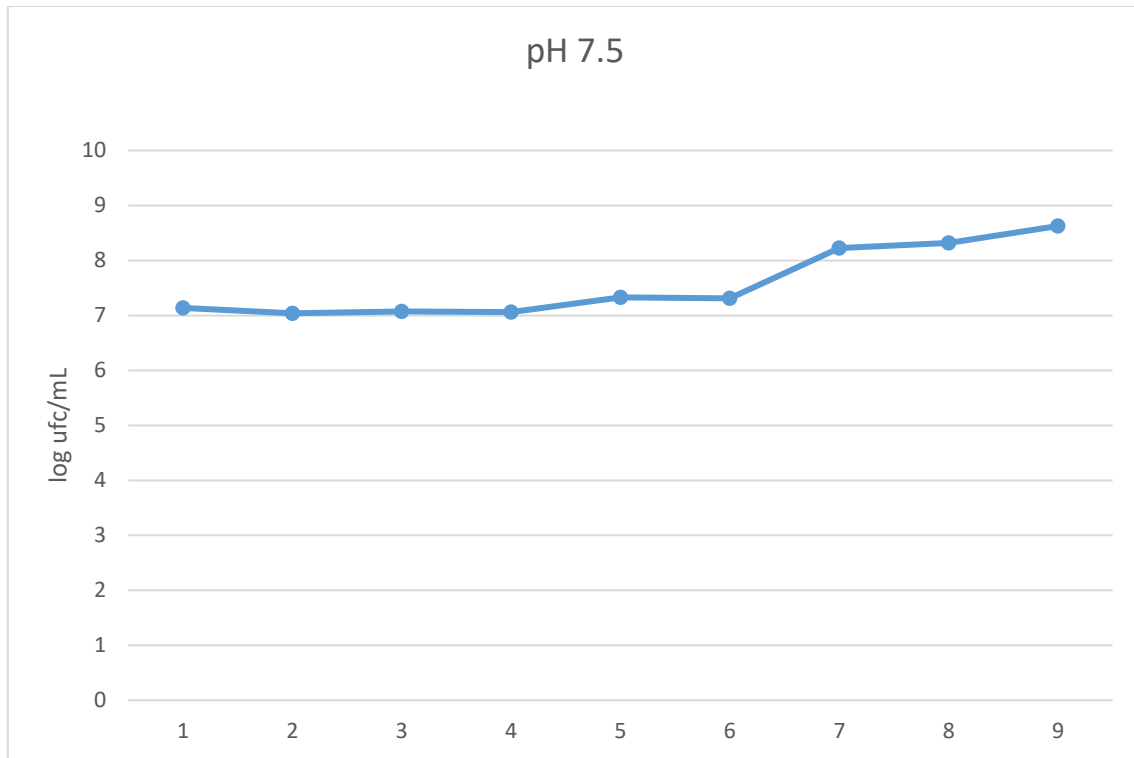


Figura 6. Crecimiento del *Cronobacter ssp.* en un medio de TSB con un pH de 7.5.

La Figura 7 refleja el crecimiento de *Cronobacter sakazakii* a un pH de 7,8. En este medio el número de ufc/mL empieza disminuyendo la primera media hora para mantenerse durante una hora hasta que empieza a aumentar siendo el período entre el t3 y el t4 el tiempo de máximo crecimiento. Tras las 4 horas se produce un aumento total de 0,9412 log ufc/mL.

Esta Figura muestra, al igual que la 1, la 2 y la 6, que la bacteria necesita cierto tiempo de adaptación al medio, tras el cual comienza a proliferar. En los primeros minutos de la siembra las colonias no proliferan e, incluso, mueren y, tras este tiempo, comienzan a crecer en número. Los resultados a pH 7,5 fueron similares a los que obtuvimos al pH 7,8. Esto es lo esperado ya que son pH muy parecidos.

En la Figura 8 se puede ver un crecimiento en un medio con un pH de 8,5. Se produce, tras las 4 horas, un aumento de 1,51 log ufc/mL, pero es a partir de los 60 minutos cuando las bacterias empiezan a proliferar verdaderamente.

En este medio la bacteria sufre máximo aumento que se observó en todos los experimentos lo que nos indica que en este medio más básico es en el que mejor crece el *Cronobacter sakazakii* de todos los estudiados.

A pesar de ser un pH que es poco probable encontrar en el intestino del neonato en condiciones de normalidad, es importante estudiarlo ya que se podría encontrar en condiciones patológicas. Resulta, también, interesante su estudio con el fin de conocer los mecanismos de acción del microorganismo.

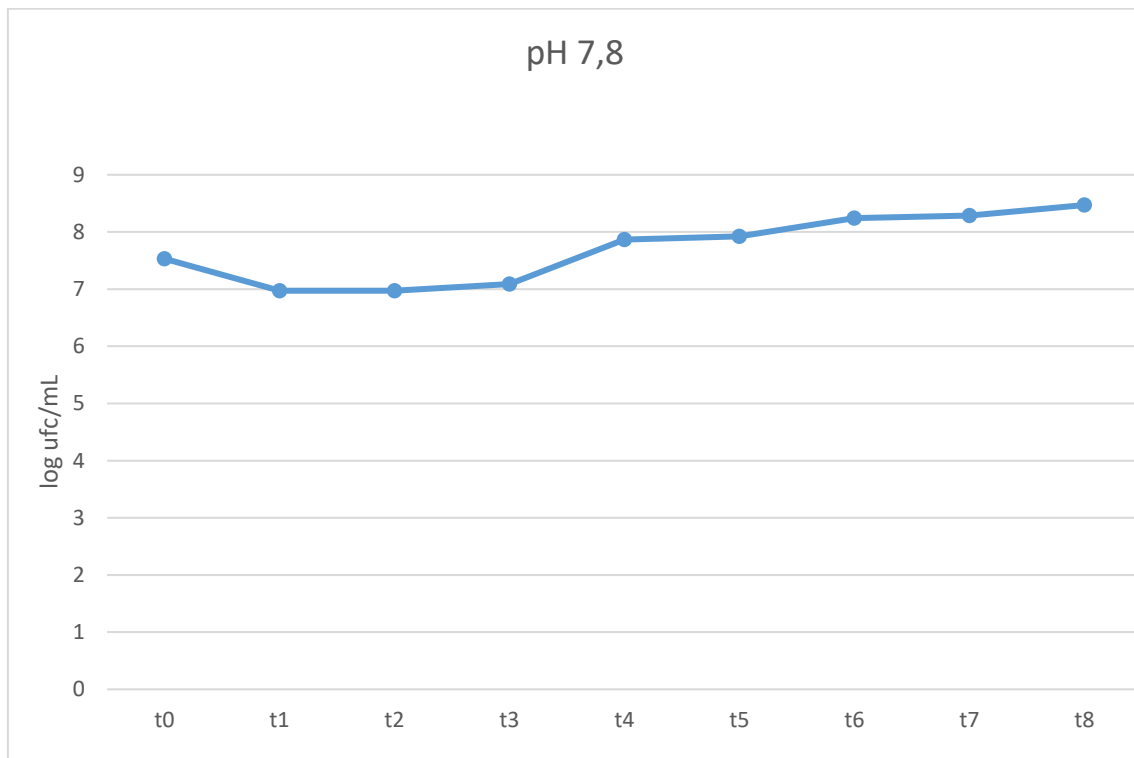


Figura 7. Crecimiento del *Cronobacter ssp.* en un medio de TSB con un pH de 7,8.

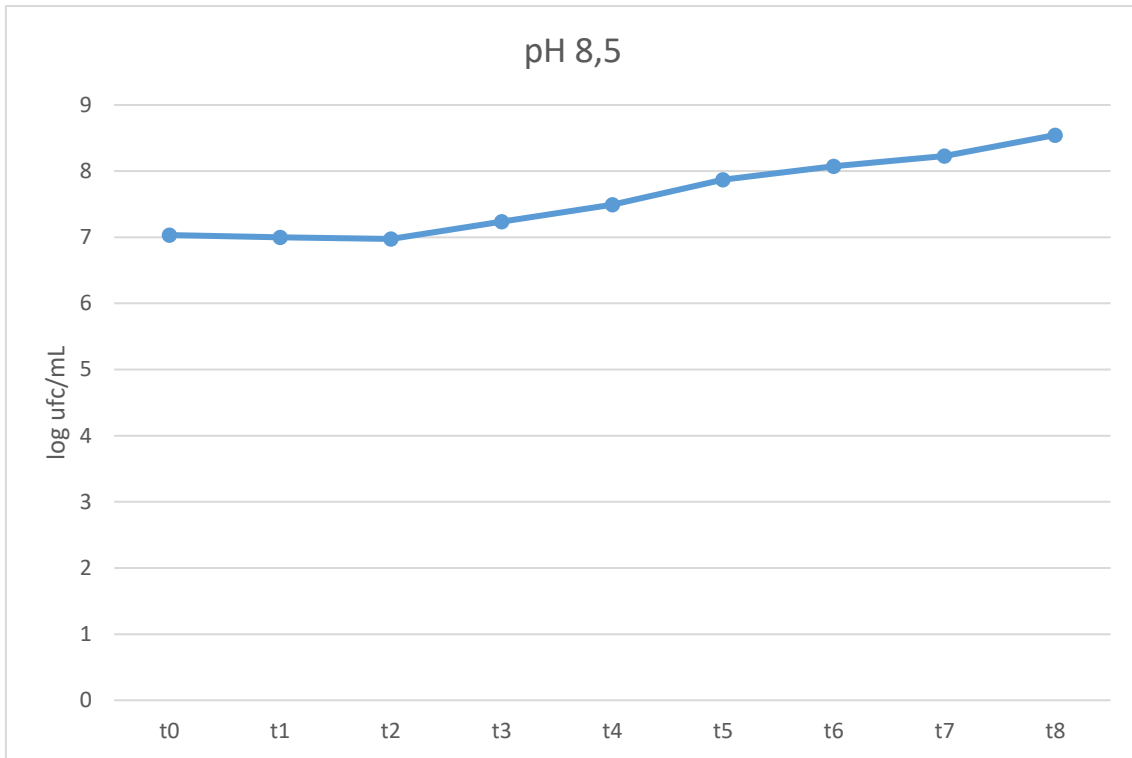


Figura 8. Crecimiento del Cronobacter ssp. en un medio de TSB con un pH de 8,5

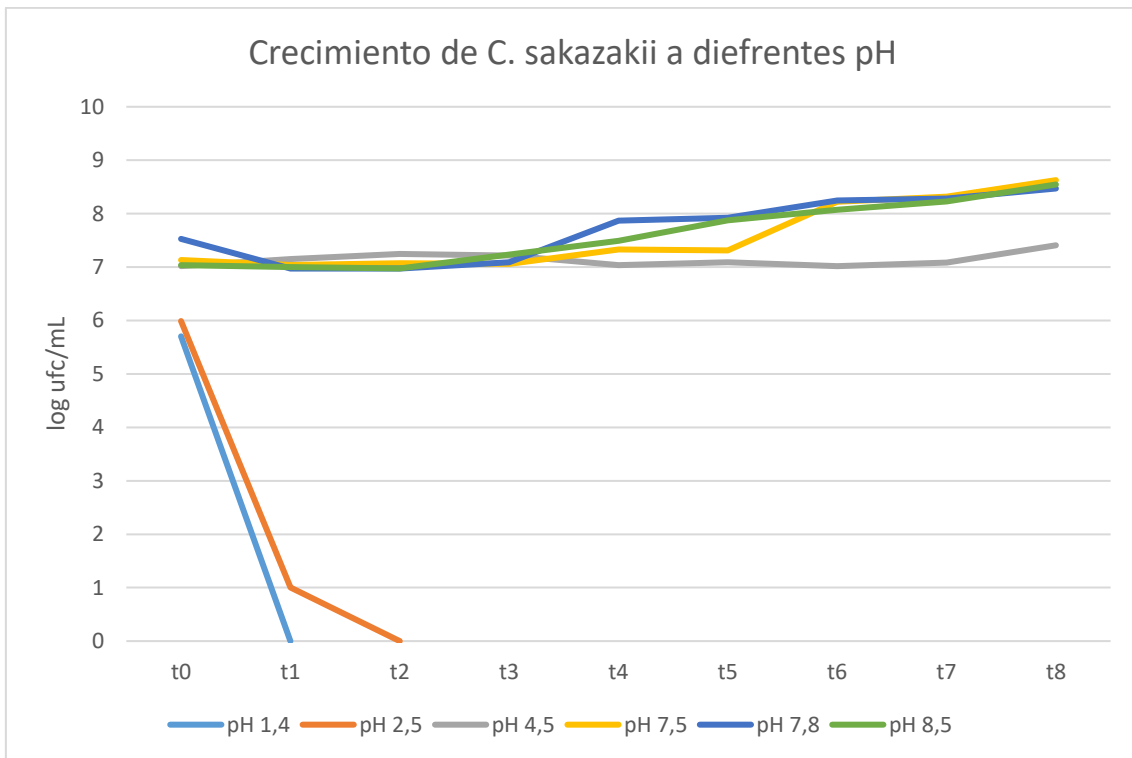


Figura 9. Crecimiento de *C. sakazakii* a diferentes pH

La Figura 9 se obtuvo haciendo las medias de los datos recogidos de cada experimento con diferentes pH. En esta Figura se puede observar claramente la gran diferencia de supervivencia entre los medios muy ácidos y los más básicos.

La Figura 10 se obtuvo haciendo las medias de los datos recogidos de cada experimento con diferentes concentraciones de sales biliares. Al comparar el crecimiento en los dos medios en una gráfica podemos comprobar que el comportamiento es diferente en los dos medios. En el de 1mM la concentración de ufc disminuye durante la primera hora para luego crecer hasta el tiempo 6 (hora 3) tras el cual vuelve a disminuir ligeramente. Esto nos indica que en este medio el *C. sakazakii* tiene un tiempo de adaptación de 60 minutos.

En cambio, en el medio de 4,7 mM la concentración de ufc no disminuyó sino que no varió notablemente durante los primeros 90 minutos tras los que las bacterias comenzaron a proliferar.

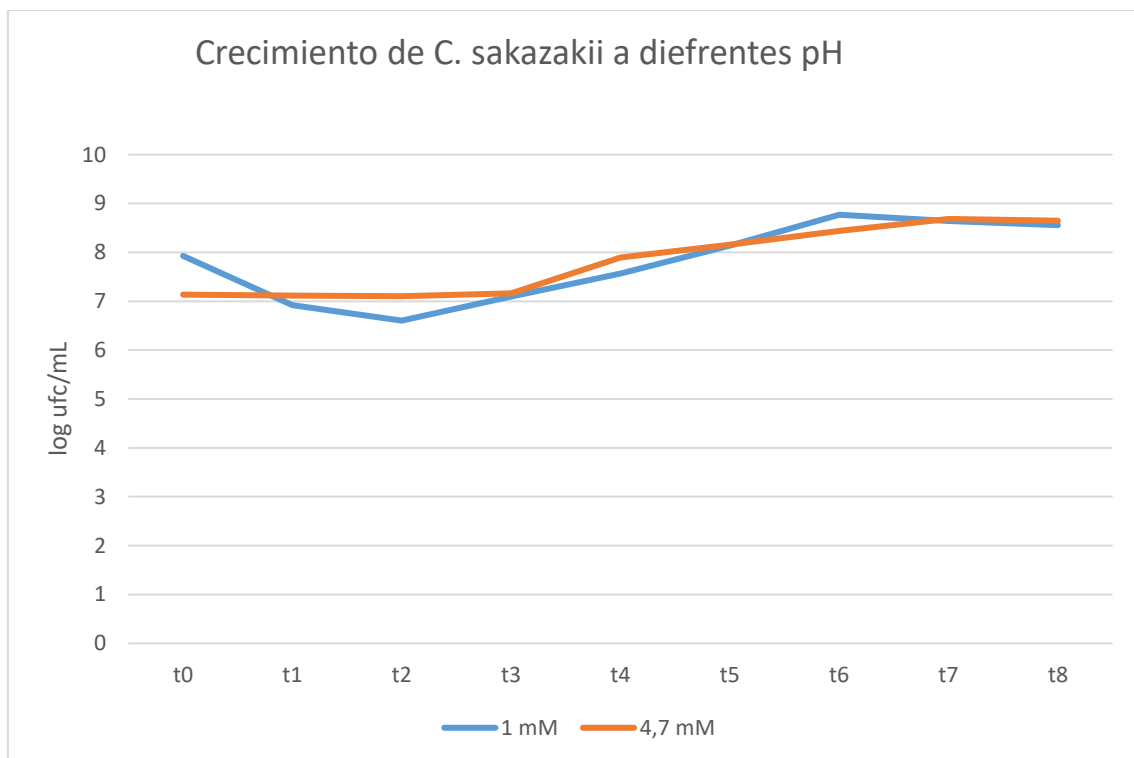


Figura 10. Crecimiento de *C. sakazakii* en diferentes concentraciones de sales biliares

7. Conclusiones

La supervivencia del *Cronobacter sakazakii* en condiciones de pH del intestino de un neonato varía entre los diferentes pH. Esta bacteria no sobrevive a pH de 2,5 o inferior y prolifera a partir del pH 4,5.

En cuanto a las concentraciones de sales biliares: el *Cronobacter sakazakii* sobrevivió y proliferó cuando fue cultivado en los dos medios con diferentes concentraciones de sales biliares.

Son necesarios más estudios que comprueben el crecimiento del *C. sakazakii* combinando las diferentes concentraciones de sales biliares y los diferentes pH que encontramos en el intestino del neonato. Asimismo, también son necesarios estudios que combinen estos factores con otros como son las enzimas o las condiciones de oxígeno del intestino del neonato.

8. Bibliografía

1. Centers for Disease Control and Prevention. (n.d.). La infección Por Cronobacter y los Bebés. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved June 13, 2022, from <https://www.cdc.gov/cronobacter/es/infection-and-infants-es.html>
2. Centers for Disease Control and Prevention. (n.d.). Food Safety and invasive cronobacter infections during early infancy, 1961–2018 - volume 26, number 5-May 2020 - Emerging Infectious Diseases Journal - CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved June 13, 2022, from https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/5/19-0858_article?deliveryName=USCDC_331-DM26146
3. Fakruddin, M., Rahaman, M., Ahmed, M. M., & Hoque, M. M. (2014). Stress tolerant virulent strains of Cronobacter Cronobacter sakazakiizakii from food. *Biological research*, 47(1), 63. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-63>
4. Kamstrup, D., Berthelsen, R., Sassene, P. J., Selen, A., & Müllertz, A. (2017). In Vitro Model Simulating Gastro-Intestinal Digestion in the Pediatric Population (Neonates and Young Infants). *AAPS PharmSciTech*, 18(2), 317–329. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0649-1>
5. Omari, T. I., & Davidson, G. P. (2003). Multipoint measurement of intragastric pH in healthy preterm infants. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, 88(6), F517–F520. <https://doi.org/10.1136/fn.88.6.f517>
6. MASON S. (1962). Some aspects of gastric function in the newborn. *Archives of disease in childhood*, 37(194), 387–391. <https://doi.org/10.1136/adc.37.194.387>
7. EFSA, 2007. Review of the opinion on microbiological risks in infant formulae and follow on formulae with regard to Enterobacteriaaceae as indicators. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/444.pdf>
8. World Health Organisation FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (Ed.). (2008). Enterobacter Sakazakii (Cronobacter Spp.) in Powdered Follow-up Formula .
9. Miranda, N., Banerjee, P., Simpson, S., Kerdahi, K. y Sulaiman, IM (2017). Vigilancia Molecular de Cronobacter spp. Aislado de una amplia variedad de alimentos de 44 países diferentes mediante tipificación de secuencias de genes 16S rRNA, rpoB y O-Antigen. *Foods (Basilea, Suiza)* , 6 (5), 36. <https://doi.org/10.3390/foods6050036>
10. Center for Food Safety and Applied Nutrition. (n.d.). Bam Chapter 29: Cronobacter. U.S. Food and Drug Administration. Retrieved June 17, 2022, from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-29-cronobacter>

11. U.S. Food and Drug Administration, FDA. (2012). Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 2nd Edition. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodbornellnessContaminants/UCM297627.pdf>
12. Chaves, C., Brandão, M., Lacerda, M., Rocha, C., Leone de Oliveira, S., Parpinelli, T. C., Vasconcellos, L., Forsythe, S. J., & Paniago, A. (2018). Fatal *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 494 Meningitis in a Newborn, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 24(10), 1948–1950. <https://doi.org/10.3201/eid2410.180373>
13. Ueda S. (2017). The Effects of Temperature on the Growth and Heat Resistance of *Cronobacter* spp. *Biocontrol science*, 22(2), 125–129. <https://doi.org/10.4265/bio.22.125>
14. Forsythe, S. (n.d.). *Cronobacter* species Culture - oxid. Retrieved June 17, 2022, from <http://www.oxid.com/culture/Culture-31-1.pdf>
15. Luján Medina, G. A., Loredó Treviño, A., & Nole Aguilar, C. (2014). *Cronobacter sakazakii*: Un Patógeno Emergente Transmitido Por Alimentos. *Revista Científica De La Universidad Autónoma De Coahuila*, 6. Retrieved from <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/articulos/12-5%20cronobacteria.pdf>.
16. Bai, Y., Yu, H., Guo, D., Fei, S., & Shi, C. (1AD, January 1). Survival and environmental stress resistance of *Cronobacter sakazakii* exposed to vacuum or air packaging and stored at different temperatures. *Frontiers*. Retrieved June 18, 2022, from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00303/full>
17. Aly, M. A., Domig, K. J., Kneifel, W., & Reimhult, E. (2019). Whole Genome Sequencing-Based Comparison of Food Isolates of *Cronobacter sakazakii*. *Frontiers in microbiology*, 10, 1464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01464>
18. Farmer J.J., Asbury M.A., Hickman F.W, Brenner D.J. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “Enterobacteriaceae” isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980;30: 569–584.
19. Grimm, M., Stephan, R., Iversen, C., Manzardo, G. G., Rattei, T., Riedel, K., Ruepp, A., Frishman, D., & Lehner, A. (2008). Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms. *Journal of food protection*, 71(1), 13–18. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.1.13>
20. Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., & Joosten, H. (2007). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC evolutionary biology*, 7, 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-64>

21. Joseph, S., Sonbol, H., Hariri, S., Desai, P., McClelland, M., & Forsythe, S. J. (2012). Diversity of the Cronobacter genus as revealed by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 3031–3039. <https://doi.org/10.1128/JCM.00905-12>
22. Bowen, A., & Braden, C. R. (2006). Invasive *Enterobacter sakazakii* Disease in Infants. *Emerging Infectious Diseases*, 12(8), 1185-1189. <https://doi.org/10.3201/eid1208.051509>.
23. Friedemann M. (2007). *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *International journal of food microbiology*, 116(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.018>