



## **GRADO NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**

Facultad de Medicina

Universidad de Valladolid

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

---

### **Crecimiento de *Cronobacter sakazakii* en fórmula de leche infantil a temperaturas ambiente**

Autora: Noelia Carrillo Grande

Tutor: Emiliano J. Quinto Fernández

Valladolid, Junio de 2015

(Curso académico 2014-2015)



## Universidad de Valladolid

Dr. Emiliano José Quinto Fernández, Profesor Titular del Área de Nutrición y Bromatología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

Hace constar:

Que Dña. Noelia Carrillo Grande ha realizado, bajo su dirección, el Trabajo de Fin de Grado titulado "Crecimiento de *Cronobacter sakazakii* en fórmula de leche infantil a temperaturas ambiente", que presenta, tras su autorización, para optar al Grado de Nutrición Humana y Dietética.

Y, para que conste donde corresponda, firmo la presente en Valladolid a nueve de Junio de dos mil quince.

A handwritten signature in green ink, consisting of stylized, cursive letters.

Dr. Emiliano J. Quinto Fernández

# Índice

	Pág.
<b>RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT AND KEYWORDS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMÉ ET MOTS-CLÉS.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>11</b>
2.1. Objetivo general.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Materiales.....</b>	<b>12</b>
3.1.1. <i>Cepa bacteriana y tipo de leche utilizada.....</i>	12
3.1.2. <i>Medios de cultivo.....</i>	12
3.1.2.1. <i>Medios de cultivo empleados en el estudio .....</i>	12
3.1.3. <i>Material de laboratorio utilizado .....</i>	14
<b>3.2. Métodos .....</b>	<b>15</b>
3.2.1. <i>Preparación del material de laboratorio y medios de cultivo .....</i>	15
3.2.2. <i>Reconstitución de la fórmula de leche infantil .....</i>	15

3.2.3. Inoculación artificial de la fórmula láctea infantil con <i>C. sakazakii</i> y obtención de muestras de leche de población $10^2$ UCF/ml.....	15
3.2.4. Diluciones seriadas .....	18
3.2.5. Siembra en placa .....	19
3.2.6. Recuento microbiológico en placas (contaje de UFC).....	19
3.2.7. Cálculos estadísticos.....	20
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
4.1. Reacción positiva de <i>C. sakazakii</i> en TSA. ....	21
4.2. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en FLI a la temperatura de 25°C. ....	22
4.3. Crecimiento de <i>C. sakazakii</i> en FLI a la temperatura de 30°C. ....	22
4.4. Comparación del crecimiento a las dos temperaturas .....	22
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>31</b>
Resultados a la temperatura de 25°C .....	32
Resultados a la temperatura de 30°C .....	32
Fotos del estudio .....	33

## RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.

### Resumen:

Las fórmulas de leche infantiles (FLI) en polvo son el principal vehículo de transmisión de *Cronobacter sakazakii*. Esta bacteria representa un riesgo importante para los recién nacidos, sobretodo prematuros e inmunocomprometidos, y puede causar patologías graves como meningitis y sepsis e incluso producir la muerte (40-80% de los casos).

El objetivo del presente trabajo de investigación es estudiar el crecimiento de *C. sakazakii* a lo largo del tiempo en una Fórmula Láctea Infantil en polvo (para lactantes de 1-2 semanas) reconstituida a las temperaturas ambiente de 25°C y 30°C. Para ello, se traza una curva de crecimiento para cada temperatura, que refleja la densidad de población expresada en log UCF/ml frente al tiempo expresado en horas, y una gráfica comparativa de crecimiento a las dos temperaturas. Para determinar la densidad de población se cuenta el número de colonias que crecen en Agar Triptona de Soja a las temperaturas de estudio y a tiempos de 2 horas. La población a tiempo cero es mayor a 25°C que a 30°C. Pasadas 24 horas, tienen aproximadamente la misma densidad de población y 2 horas después la población es mayor a 30°C que a 25°C. Las dosis consideradas para algunos autores como letales para lactantes se alcanzan entre las 2 y las 24 horas.

Se concluye que la temperatura es un factor que condiciona el crecimiento de *C. sakazakii* y que éste crece de forma exponencial a ambas temperaturas (con un tiempo de retraso mayor de 2 horas a 25°C y menor de 2 horas a 30°C). También, se corroboran las recomendaciones de no consumir las fórmulas 2 horas después de haber sido reconstituidas. Los resultados de este estudio muestran la importancia de llevar a cabo un mayor control del almacenamiento y preparación de las FLI en polvo.

### Palabras clave:

*Cronobacter sakazakii*, Fórmula Láctea, temperatura, crecimiento.

## ABSTRACT AND KEYWORDS.

### Abstract:

Powdered infant formulas (FI) are the most important vehicle of transmission de *Cronobacter sakazakii*. This bacterium represents an important risk for newborns, particularly premature and immunocompromised neonates, and it can cause serious diseases such as meningitis and sepsis, and even cause death (40-80% of cases).

The aim of this essay is to study the growth of *C. sakazakii*, over time, in powdered infant formulas (for infants between 1 and 2 weeks of age) reconstituted at room temperatures of 25°C and 30°C. For this, a growth curve is drawn for each temperature, reflecting the population density in log UCF/ml against time in hours, and a comparative graph of two growth temperatures. To determine the bacterial density is counted the number of colonies that grow on Tryptone Soya Agar at room temperatures and times of 2 h. Initial bacterial density at 25 °C is greater than at 30 °C. After 24 hours, there is approximately the same density and two hours later the bacterial density at 30°C is greater than at 25 °C. Doses considered for some authors as lethal for infants are reached between 2 and 24 hours.

It is concluded that temperature is a determinant factor of *Cronobacter sakazakii*'s growth, and that it grows exponentially at both temperatures (with a lag time of 2 hours at 25 °C and less 2 hours at 30 °C). Also, the findings corroborate recommendations of not using the formulas 2 hours after being reconstituted. The results of this study show the importance of using a proper temperature control in the preparation and storage of powdered infant formulas.

### Keywords:

*Cronobacter sakazakii*, powdered infant formula , temperature, growth.

## RESUMÉ ET MOTS-CLÉS.

### Resumé:

Les formules de lait infantiles (FLI) en poudre sont le principal véhicule de transmission de *Cronobacter sakazakii*. Cette bactérie représente un risque significatif pour les nouveau-nés, en particulier pour les prématurés et immunodéprimés, et peut provoquer maladies graves comme la méningite et la septicémie et causer la mort (40-80% des cas).

Ce travail de recherche avait pour objectif d'étudier la croissance de *C. sakazakii*, au fil du temps, dans les FLI en poudre (approprié pour nouveau-nés) reconstitués aux températures ambiantes de 25 °C et 30 °C. À cette fin, une courbe de croissance est tracée pour chaque température, reflétant la densité bactérienne exprimée en Log UFC/ ml en fonction du temps en heures, et un graphique comparatif de deux températures de croissance. Pour déterminer la densité bactérienne, on compte el nombre de colonies qui croissent en gélose tryptone soja aux températures indiquées et a temps de 2 heures. La densité bactérienne au temps zéro est supérieure à 25 °C qu'à 30 °C. Après 24 heures, on présente approximativement la même densité et deux heures plus tard, la densité est supérieure à 30 °C qu'à 25 °C. Les doses considérées pour certains auteurs comme mortelle pour les nourrissons sont atteints entre les 2 et 24 heures.

Il est conclu que la température est un facteur qui détermine la croissance de *C. sakazakii* et que ce micro-organisme croît de façon exponentielle aux deux températures (avec un retard de 2 heures à 25° C et moins de 2 heures à 30° C). En outre, les résultats confirment les recommandations de ne pas utiliser les formules 2 heures après avoir été reconstitué. Les résultats de cette étude montrent l'importance de mener plus de contrôle sur le stockage et la préparation des FLI en poudre.

### Mots-clés:

*Cronobacter sakazakii*, formule de lait, température, croissance.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La lactancia materna es una de las formas más eficaces de asegurar la salud y la supervivencia de los niños, ya que aporta todos los nutrientes necesarios para su desarrollo hasta los 6 meses de edad. Contiene sustancias que le protegen contra infecciones, disminuye el riesgo de sufrir enfermedades y también establece un vínculo afectivo entre madre e hijo.

La OMS promueve activamente la lactancia natural como la mejor forma de nutrición para los lactantes y niños pequeños. Sin embargo existen casos, como puede verse en la Tabla 1, en los que no es posible alimentar de esta forma a los niños y se recurre a Fórmulas Lácteas Infantiles (FLI)<sup>1</sup>.

Estas fórmulas o leches para lactantes y niños están adaptadas para suplir parcial o totalmente la leche materna, pero su etiquetado no debe disuadir la lactancia materna, quedando prohibida la utilización de los términos «leche humanizada», «maternizada», «adaptada» u otros similares<sup>2</sup>.

1. En hijos de mujeres que no pueden o no desean lactar total o parcialmente.
2. Como sustituto en lactantes cuyas madres desean interrumpir la lactancia o en quienes la lactancia está médicamente contraindicada:
  - Enfermedades infecciosas como SIDA, tuberculosis activa y lesiones sífilíticas o herpéticas en el pecho materno.
  - Madres que reciben quimioterapia o antimetabolitos.
  - Galactosemia (deficiencia de galactosa 1-fosfato uridil transferasa).
  - Madres con problemas de drogadicción.
3. Como suplemento nutricional cuando la producción de leche materna es insuficiente y en especial si no hay una ganancia de peso adecuada.

**Tabla 1.** - Indicaciones de uso de las FLI.

A pesar de haber fórmulas infantiles líquidas, estériles, listas para utilizar, las fórmulas infantiles en polvo siguen siendo las más utilizadas<sup>3</sup>. Este tipo de fórmula no es un producto estéril, y puede estar expuesto a diversos niveles de contaminación. Según



expertos, los microorganismos cuya presencia es más preocupante en estos tipos de fórmula son *Salmonella enterica* y *Cronobacter sakazakii*<sup>4,5</sup>.

Este último, nombrado en honor al bacteriólogo Riichi Sakazakii, es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y caracterizada por ser un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, con movilidad peritrica y no esporulado.

Inicialmente se clasificó como *Enterobacter cloacae*, productor de pigmento amarillo, y en el año 1980 pasó a denominarse *Enterobacter sakazakii*, por las diferencias obtenidas mediante pruebas de hibridación de ADN, reacciones químicas, producción de pigmento y susceptibilidad a antibióticos con respecto al primero<sup>6</sup> (Tabla 2).

Test	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>
Pigmento amarillo en Agar Triptona de Soja (TSA)	+	-
Producción de oxidasa	-	+
Producción de $\alpha$ - glucosidasa	+	-
Producción de Tween 80 esterasa	+	-
Producción de fosfoamidasa	-	+
Producción retardada de DNasa	+	-

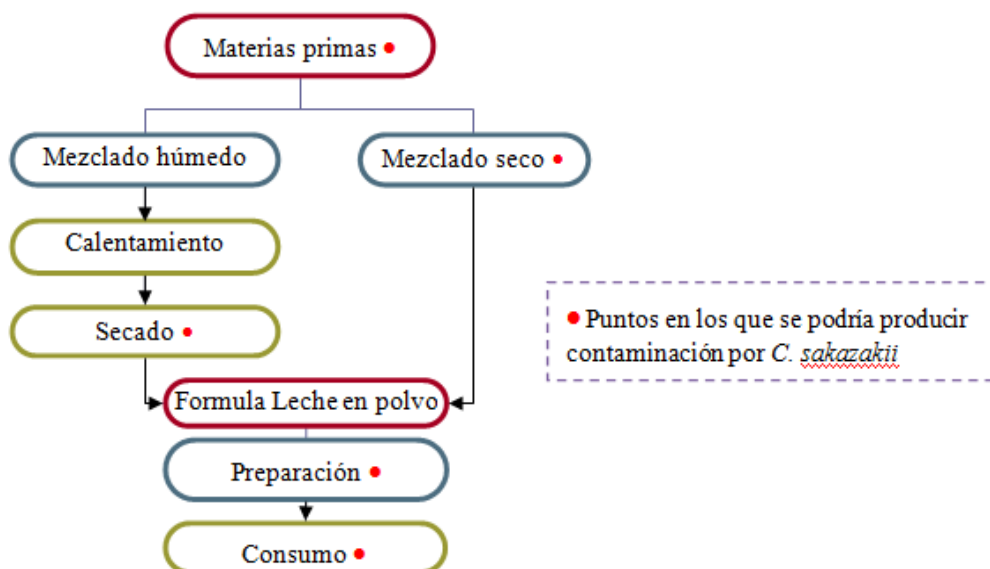
**Tabla 2.-** Diferencias en las características bioquímicas entre *C. sakazakii* y *E. cloacae*.

Hace solamente ocho años, fue reclasificado dentro de un nuevo género, "Cronobacter", que actualmente cuenta con siete especies (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* y *C. condimentii*).

Es un microorganismo patógeno oportunista. Produce de forma poco frecuente casos aislados o pequeños brotes de enfermedades graves como meningitis, enterocolitis necrosante, septicemia y abscesos cerebrales. La tasa de mortalidad es elevada, oscila entre 40 y 80%<sup>6</sup> y los individuos que sobreviven sufren graves secuelas neurológicas (hidrocefalia, retraso del desarrollo neural y tetraplejia)<sup>7</sup>. El mayor grupo de riesgo es la población infantil, particularmente los recién nacidos y lactantes de menos de 2 meses prematuros, con bajo peso al nacer (<2,5 kg) y/o inmunodeficientes<sup>8</sup>.

Ha sido encontrado en diversos ambientes (fábricas de leche, hospitales y hogares), transmitiéndose a diversos alimentos (leche en polvo, arroz, vegetales, queso, té,

salchichas y especias) y material de hospital<sup>9</sup>. Entre las vías de contaminación de las FLI en polvo se encuentran: deficiencias en producción, falta de buenas prácticas industriales y recontaminación durante la preparación de las fórmulas (Figura 1).



**Figura 1.-** Diagrama de flujo de producción de FLI.

A excepción de otras bacterias, es resistente a los cambios osmóticos y de baja humedad, lo que le permite sobrevivir durante largos periodos de tiempo en alimentos deshidratados (hasta 2 años y medio de almacenaje en leche en polvo), y su temperatura óptima de crecimiento es de unos 39°C, no obstante se ha observado que puede crecer desde los 6°C hasta los 45°C<sup>6,9</sup>.

Aunque existen diversas estrategias de prevención en niños<sup>9</sup>, entre las que se encuentra la promoción de la lactancia materna, un adecuado almacenaje y una correcta regulación de la temperatura de los preparados de leche; tras ser clasificado como microorganismo de Categoría "A" (causa bien conocida de enfermedades en los lactantes y encontrado en preparaciones en polvo<sup>4</sup>), expertos de todo el mundo tratan de encontrar nuevas medidas para su control y eliminación.

La OMS recomienda no consumir las fórmulas de leche 2 horas después de haber sido reconstituidas<sup>8</sup>. Estas recomendaciones puede que no sean las mismas para diferentes situaciones, como por ejemplo lugares que tengan diferentes temperaturas ambiente. Por ello, este trabajo se ha centrado en estudiar el crecimiento de *C. sakazakii* a diferentes temperaturas con el fin de contribuir a la elaboración de nuevas estrategias de prevención.

## **2. OBJETIVO.**

### **2.1. Objetivo general.**

El presente Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo observar el crecimiento de *Cronobacter sakazakii* a lo largo del tiempo en una Fórmula Láctea Infantil en polvo (para lactantes de 1-2 semanas) reconstituida a la temperatura ambiente de 25°C y ligeramente superior, 30°C.

### **2.2. Objetivos específicos.**

- Observar la reacción positiva de *C. sakazakii* en Agar Triptona de Soja (TSA).
- Trazar una curva de crecimiento de *C. sakazakii* que refleje la densidad de población expresada en log UCF/ml frente al tiempo expresado en horas, para cada temperatura.
- Trazar una gráfica comparativa de crecimiento a las dos temperaturas.
- Determinar si la temperatura es un factor que condiciona el crecimiento de *C. sakazakii* en fórmulas de leche en polvo para lactantes.
- Establecer un margen de consumo de fórmula de leche en polvo reconstituida a las dos temperaturas estudiadas (25 y 30 °C).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Materiales.**

##### **3.1.1. Cepa bacteriana y tipo de leche utilizada.**

El presente estudio experimental en laboratorio, se realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Para la realización de este trabajo se utilizó la cepa *Cronobacter sakazakii* CECT 858, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo en caldo de triptona soja (TSB); y una fórmula láctea infantil en polvo apta para lactantes de entre 1 y 2 semanas de edad, obtenida comercialmente en la ciudad de Valladolid, España.

##### **3.1.2. Medios de cultivo.**

Los medios utilizados se presentan deshidratados en forma de polvo fino. Contienen extractos y otros preparados (utilizados como base nutritiva), agar-agar (poligalactósido que se obtiene a partir de algas rojas marinas utilizado como agente solidificante) y peptonas y triptonas (productos que se obtienen por la degradación proteolítica de proteínas de diversos orígenes, utilizados como fuente de Nitrógeno).

##### **3.1.2.1. Medios de cultivo empleados en el estudio.**

El TSB y el TSA por su contenido de peptona de soja y peptona de caseína resultan una aportación nutritiva que permite el desarrollo óptimo de un gran número de microorganismos, tanto exigentes como no exigentes. Se utilizan como tales o como base para preparar medios especiales (Agar Sangre, Agar Proteus).

##### **➤ AGAR TRIPTONA DE SOJA (TSA).**

Se emplea como medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismos.

Fórmula (por litro):

Digerido Papaínico de Soja .....5,0 g  
 Digerido Pancreático de Caseína .....15,0 g  
 Sodio Cloruro .....5,0 g  
 Agar .....15,0 g  
 pH final: 7,3±0,2

Preparación:

Suspender 40 g en 1 litro de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar en autoclave durante unos minutos.

➤ **CALDO DE TRIPTONA SOJA (TSB).**

Al igual que el TSA, se emplea como medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismos.

Fórmula (por litro):

Digerido Papaínico de Soja .....3,0 g  
 D(+)-Glucosa .....2,5 g  
 Digerido Pancreático de Caseína .....17,0 g  
 di-Potasio Hidrógeno Fosfato .....2,5 g  
 Sodio Cloruro .....5,0 g  
 pH: 7,3 ±0,2

Preparación:

Suspender 30 g en 1 litro de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar en autoclave durante unos minutos.

**3.1.3. Material de laboratorio utilizado.**

- 1 botella de 500 ml, 2 botellas de 250 ml y 6 botellas de 100 ml.
- 1 matraz de 1000 ml.
- 3 probetas (de 250 ml, 500 ml y 1000 ml).
- Alcohol 96°.
- Agua destilada.
- Pipeta Pasteur.
- Vaso de precipitados.
- Olla a presión.
- Mechero bunsen.
- Cucharilla.
- Balanza.
- Imanes para agitador magnético ("moscas").
- Agitador magnético con placa calefactora.
- Recuperador de imanes de agitador.
- Cinta testigo para esterilización a vapor.
- Rotulador permanente.
- Guantes.
- Placas de Petri.
- Papel de aluminio.
- Cacito.
- Pipetas de 10-100  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l.
- Puntas estériles para pipetas.
- Gradillas.
- Tubos de ensayo.
- Tubos "eppendorf".
- Bote para puntas.
- Baño María.
- Cámara frigorífica.
- Estufa de incubación a 25 y 30°C.
- Estufa a 37°C.
- Vórtex.

### **3.2 Métodos.**

El estudio se llevo a cabo siguiendo el mismo procedimiento y por triplicado para cada una de las temperaturas (25°C y 30°C).

#### **3.2.1. Preparación del material de laboratorio y medios de cultivo.**

Se autoclavaron los tubos eppendorf y puntas para pipetas para su uso posterior. Se calcularon, por regla de tres, los gramos de TSA y TSB que se debían disolver en agua para obtener 1.000 ml de TSA y 750 ml de TSB. Una vez disueltos en agua, se esterilizaron en olla a presión durante unos 40 minutos y se atemperaron en baño maría. El TSA se distribuyó en placas de Petri y cuando solidificó se conservó todo en refrigeración.

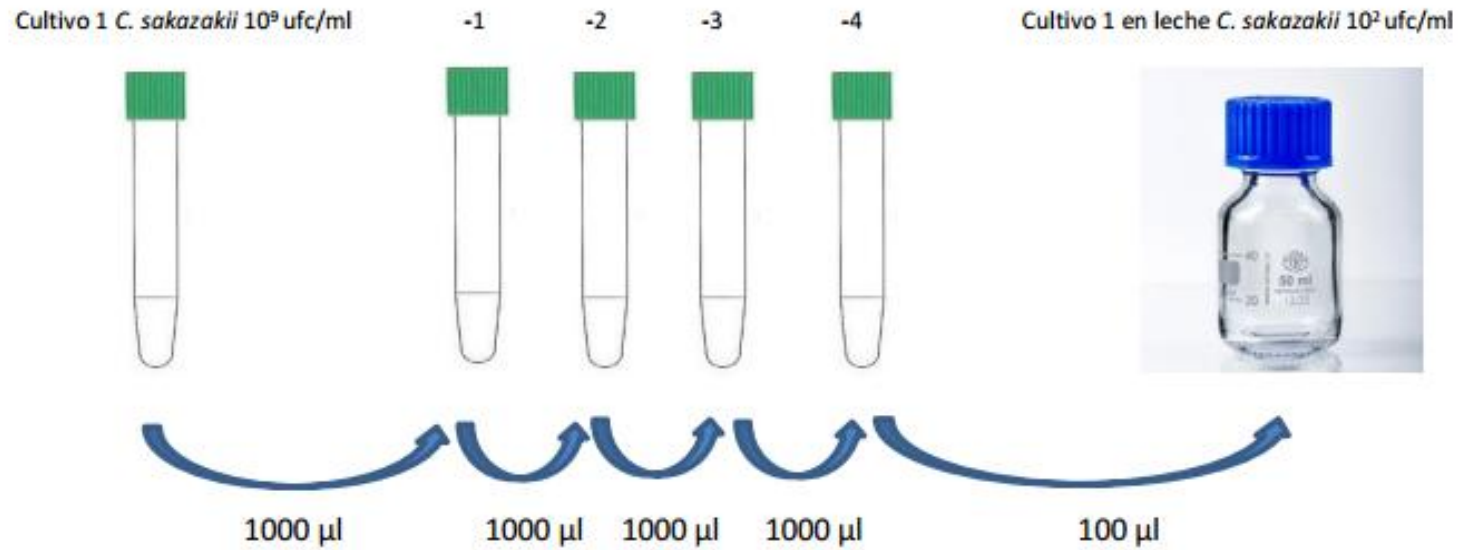
#### **3.2.2. Reconstitución de la fórmula de leche infantil.**

Una semana antes de comenzar el estudio se reconstituyeron 6 muestras de leche en polvo (3 para cada temperatura) de la misma marca y lote. Cada una de ellas se reconstituyó del mismo modo, con agua destilada a temperatura ambiente y siguiendo las indicaciones del fabricante para lactantes de 1 y 2 semanas.

#### **3.2.3. Inoculación artificial de la Fórmula Láctea Infantil con *C. sakazakii* y obtención de muestras de leche con población $10^2$ UFC/ml.**

Para la contaminación artificial de la fórmula, se inoculó 1 ml de cultivo de *C. sakazakii* de población  $10^9$  UFC/ml en cada uno de los 3 tubos, que contenían 9 ml de TSB. Posteriormente, los tubos se incubaron a 37°C durante 24 h.

Se realizó una dilución seriada logarítmica decimal de cada uno de los cultivos de *C. sakazakii* en 4 tubos, inoculando 1 ml de estos cultivos en 4 tubos con 9 ml de TSB. Para obtener una población aproximada de  $10^2$  UFC/ml, se inocularon 100  $\mu$ l de la dilución "- 4" de población  $10^5$  UFC/ml en 100 ml de leche (Figura 2).

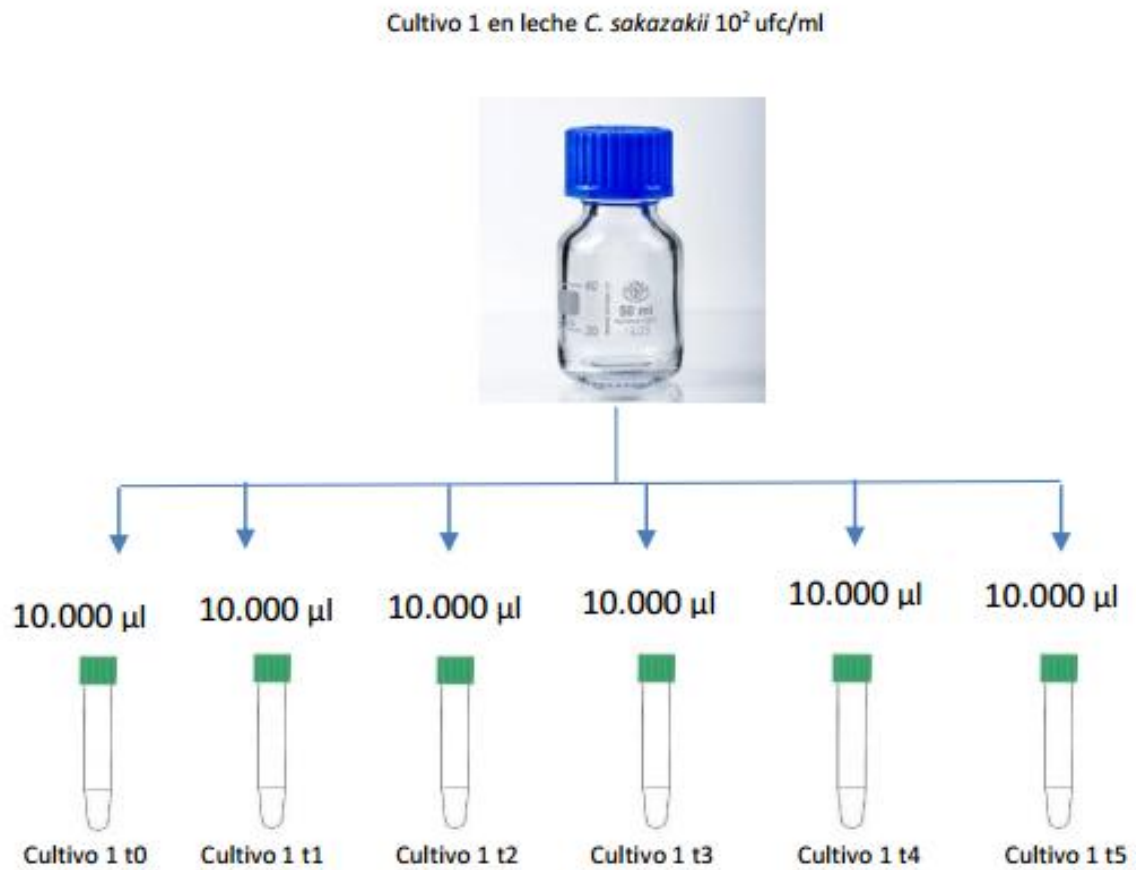


	Cultivo original	Diluciones seriadas				Dilución final
nº Dilución	Cultivo en TSB	-1	-2	-3	-4	Cultivo en leche
Densidad (UFC/ml)	$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^2$

**Figura 2.** - Diluciones seriadas y densidad de población de las diluciones (cultivo 1).



Se obtuvieron 6 muestras de 10 ml de cada uno de los cultivos 1, 2 y 3 de *C. sakazakii* en leche de población  $10^2$  UFC/ml (Figura 3).

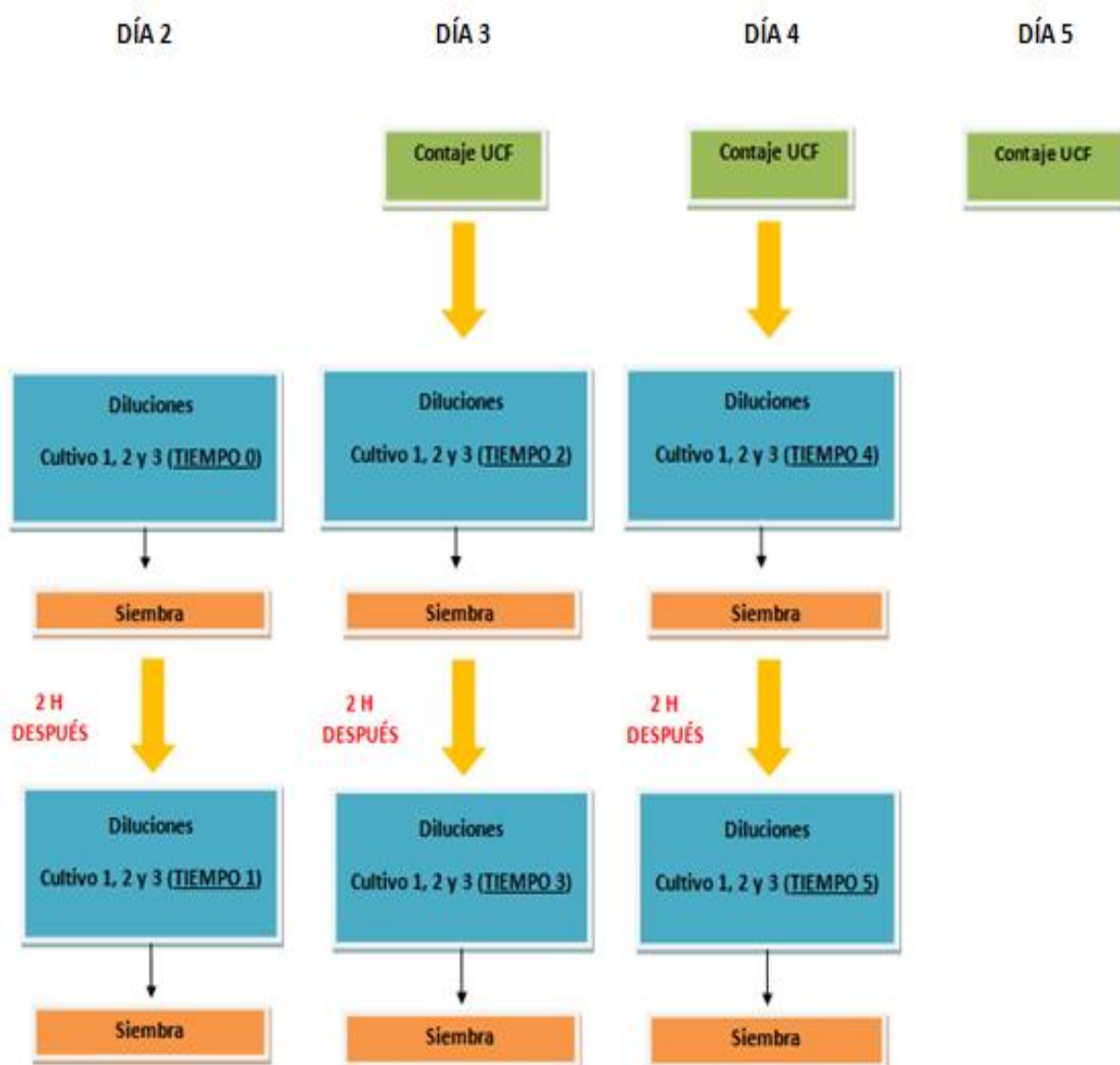


**Figura 3.-** Obtención de muestras de población  $10^2$  UFC/ml (cultivo 1).

Todas las muestras se introdujeron a  $25^{\circ}\text{C}$  (en la semana 1) y a  $30^{\circ}\text{C}$  (en la semana 2) durante 50 h.

### 3.2.4. Diluciones seriadas.

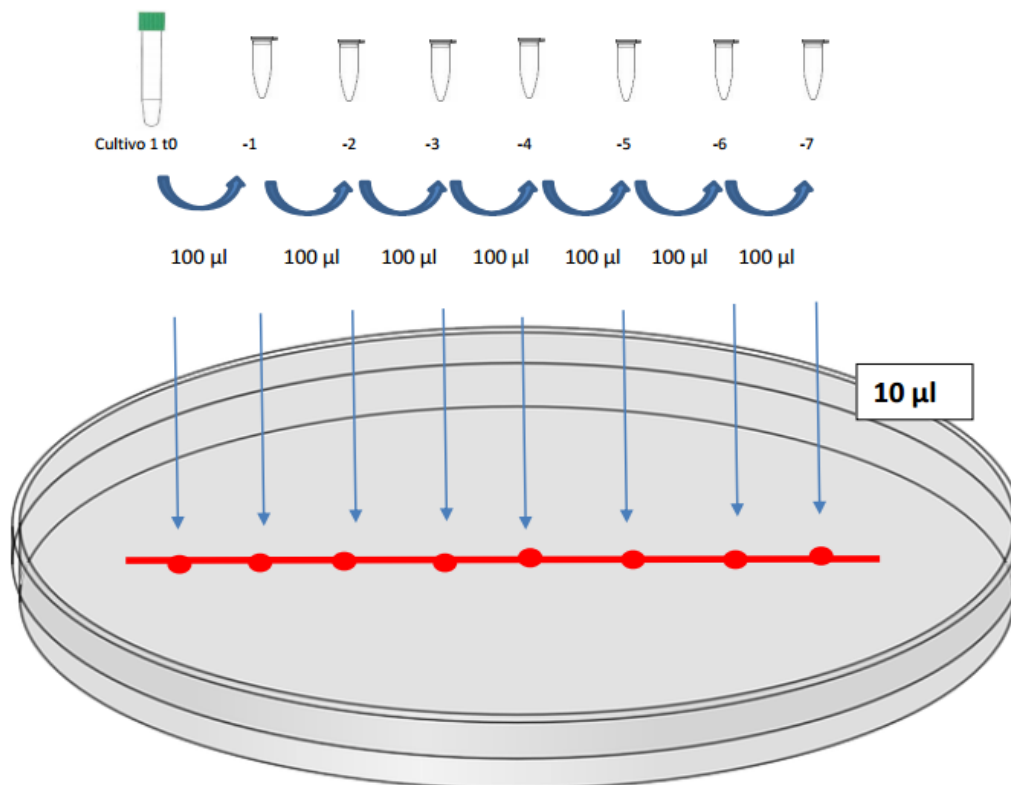
Se llevaron a cabo 7 diluciones seriadas de cada una de las 6 muestras de los cultivos 1, 2 y 3 a diferentes tiempos (0, 2, 24, 26, 48, 50 horas): El día 2 de los tiempos 0 y 1, el día 3 de los tiempos 2 y 3 y el día 4 de los tiempos 5 y 6, tal y como se muestra en la Figura 4. Para cada serie de diluciones, se prepararon 7 tubos eppendorf con 900  $\mu$ l de TSB cada uno y se fue inoculando 100  $\mu$ l del cultivo de forma seriada en cada uno de los tubos.



**Figura 4.** - Esquema del orden de las diluciones, siembra y recuento en placa.

### 3.2.5. Siembra en placa.

En una placa de Petri con TSA se sembraron 10  $\mu$ l de cada una de las diluciones y 10  $\mu$ l procedentes del tubo con el cultivo inicial (Figura 5). Las placas se introdujeron a 37°C durante 24h.



**Figura 5.-** Diluciones seriadas del cultivo 1 (tiempo 0) y siembra en placa.

### 3.2.6. Recuento microbiológico en placas (contaje de UFC).

Los días 3, 4 y 5 se llevaron a cabo los recuentos en placa de las colonias de *C. sakazakii* sembradas el día anterior. Para calcular las UFC por cada mililitro de leche, se multiplicó este número de "colonias" por  $10^2$  (ya que cada "gota" son 10  $\mu$ l de dilución) y por el total de partes de cada dilución (Tabla 3).

### 3.2.7. Cálculos estadísticos.

Se calcularon los Logaritmos en base 10, las medias y las Desviaciones Estándar de los datos obtenidos de los tres cultivos para cada uno de los tiempos y se reflejaron en una única curva de crecimiento para cada temperatura (con las barras de error de sus desviaciones estándar) y una gráfica comparativa del crecimiento a las dos temperaturas.

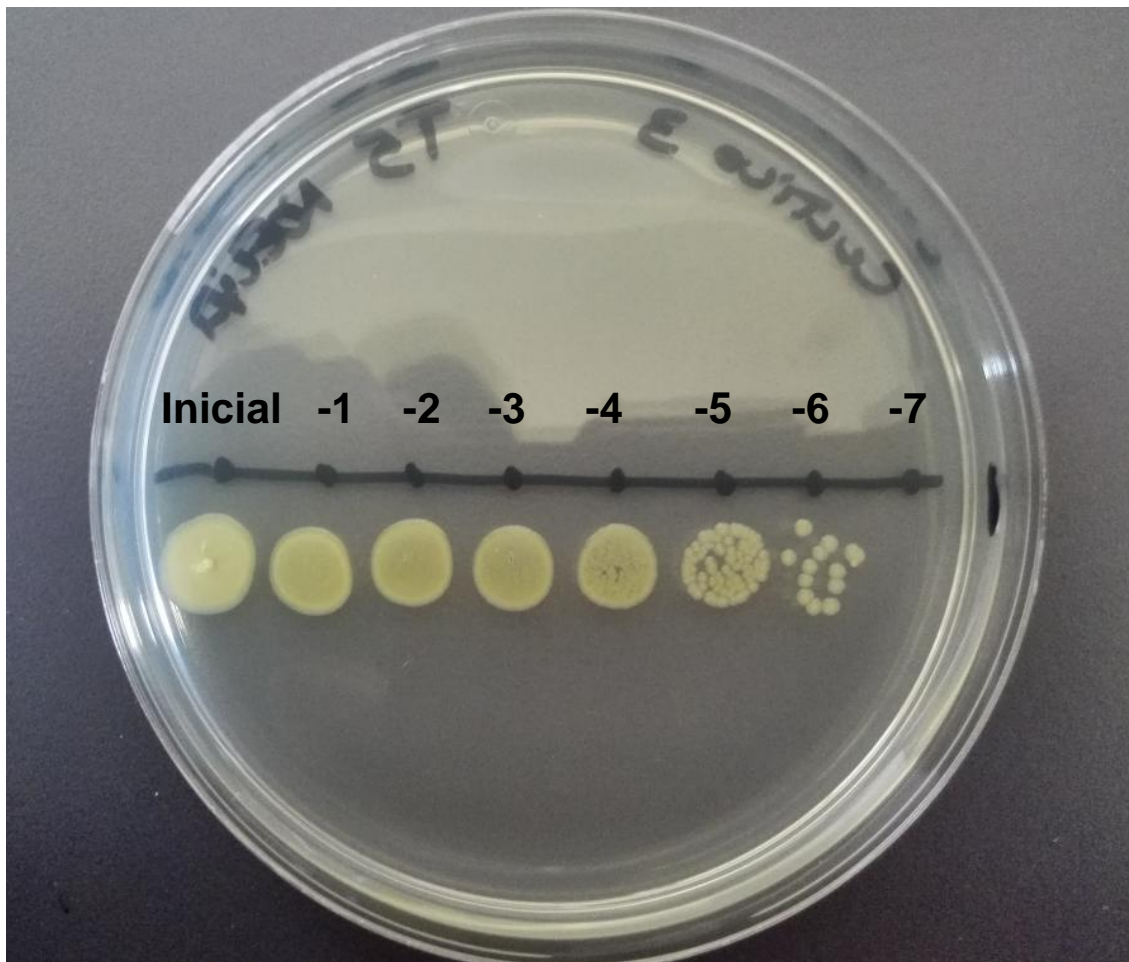
Nº dilución	Inicio	- 1	- 2	- 3	- 4	- 5	- 6	- 7
Dilución lograda	1:1	1:10	1:100	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>7</sup>
Total de partes	1	10	100	1000	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>

**Tabla 3.-** Total de las partes de cada dilución.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Reacción positiva de *C. sakazakii* en TSA.

Se observó que debajo de cada punto crecieron "colonias" de color amarillo. En las diluciones más concentradas no se pudo observar el número de éstas, pero en las diluciones de menor concentración sí. Por ello, para calcular las UFC de *C. sakazakii* existentes en cada mililitro de leche se contó el número de "colonias" que se podían observar a simple vista en cada "gota" de la placa. Por ejemplo, en la Figura 6 sólo se pueden contar las de la dilución -6. Se observan 12 "colonias", que multiplicadas por  $10^2$  y por  $10^6$  son  $1,2 \times 10^9$  UFC/ml.



**Figura 6.-** Colonias de *Cronobacter sakazakii* en placa de Petri con TSA.

#### **4.2. Crecimiento de *C. sakazakii* en FLI a la temperatura ambiente de 25°C.**

Como se observa en la Figura 6, después de 2 horas a la temperatura ambiente de 25°C no existe una variación significativa en la población de *C. sakazakii* en FLI reconstituida con respecto a la inicial. A las 24 horas, se observa un aumento de la carga de *C. sakazakii* y en las horas posteriores esta carga se mantiene sin variaciones significativas.

El crecimiento se muestra como densidad de población, expresado en log UCF/ml, frente al tiempo, expresado en horas. Se pueden diferenciar tres de las cuatro fases de crecimiento bacteriano: Fase de adaptación (en la que las bacterias se adaptan al ambiente y maduran), fase exponencial (en la que se produce la duplicación celular) y fase estacionaria (en la que se van agotando los nutrientes y se acumulan productos tóxicos). El tiempo de retraso es igual o mayor de 2 horas.

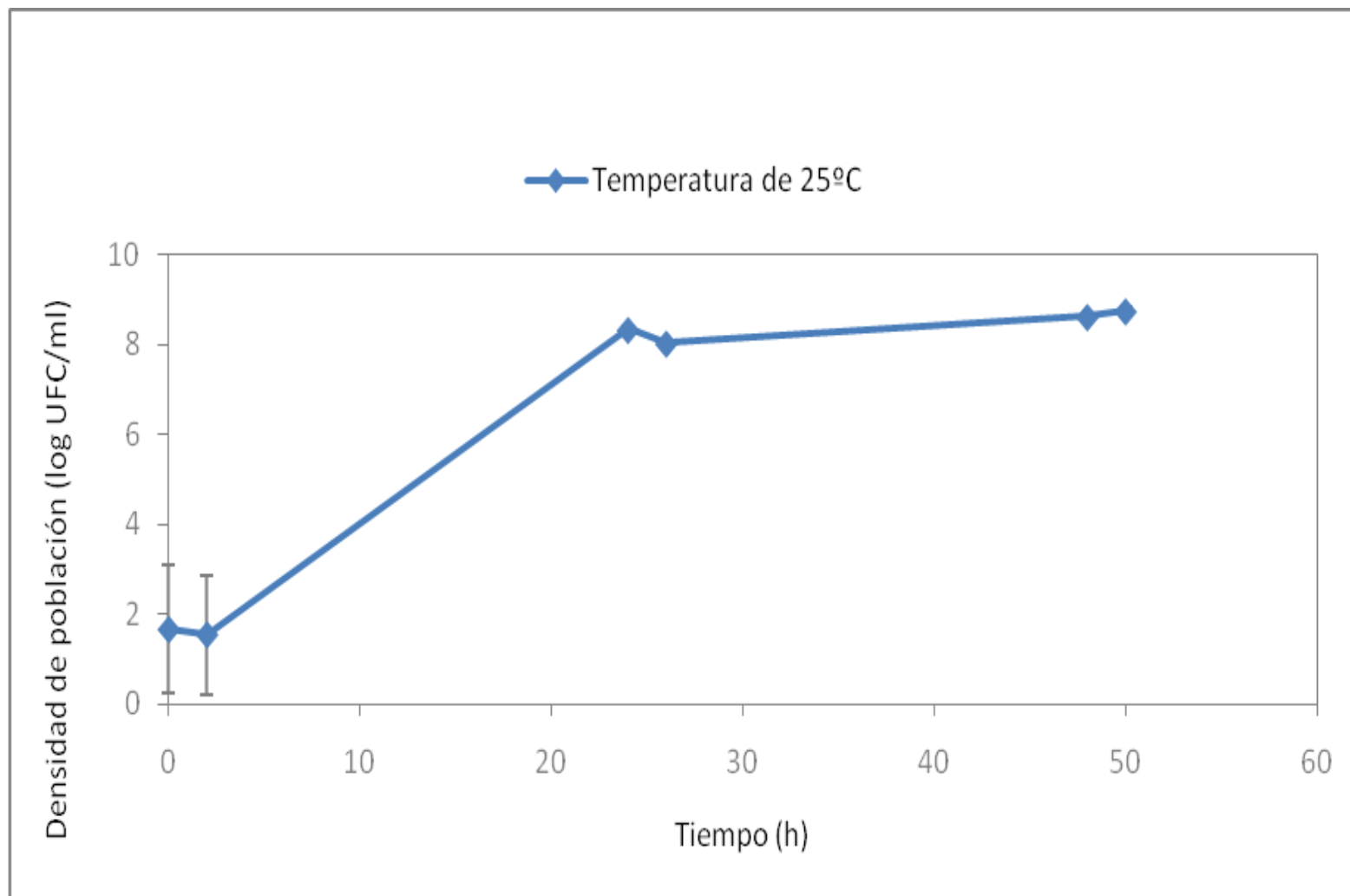
#### **4.3. Crecimiento de *C. sakazakii* en FLI a la temperatura ambiente de 30°C.**

En la Figura 7 se muestra que después de 2 horas a la temperatura ambiente de 30°C la población de *C. sakazakii* en FLI reconstituida es mayor que la inicial. A las 24 horas, se percibe un mayor aumento de la carga de *C. sakazakii* y en las horas posteriores esta carga se mantiene sin variaciones significativas.

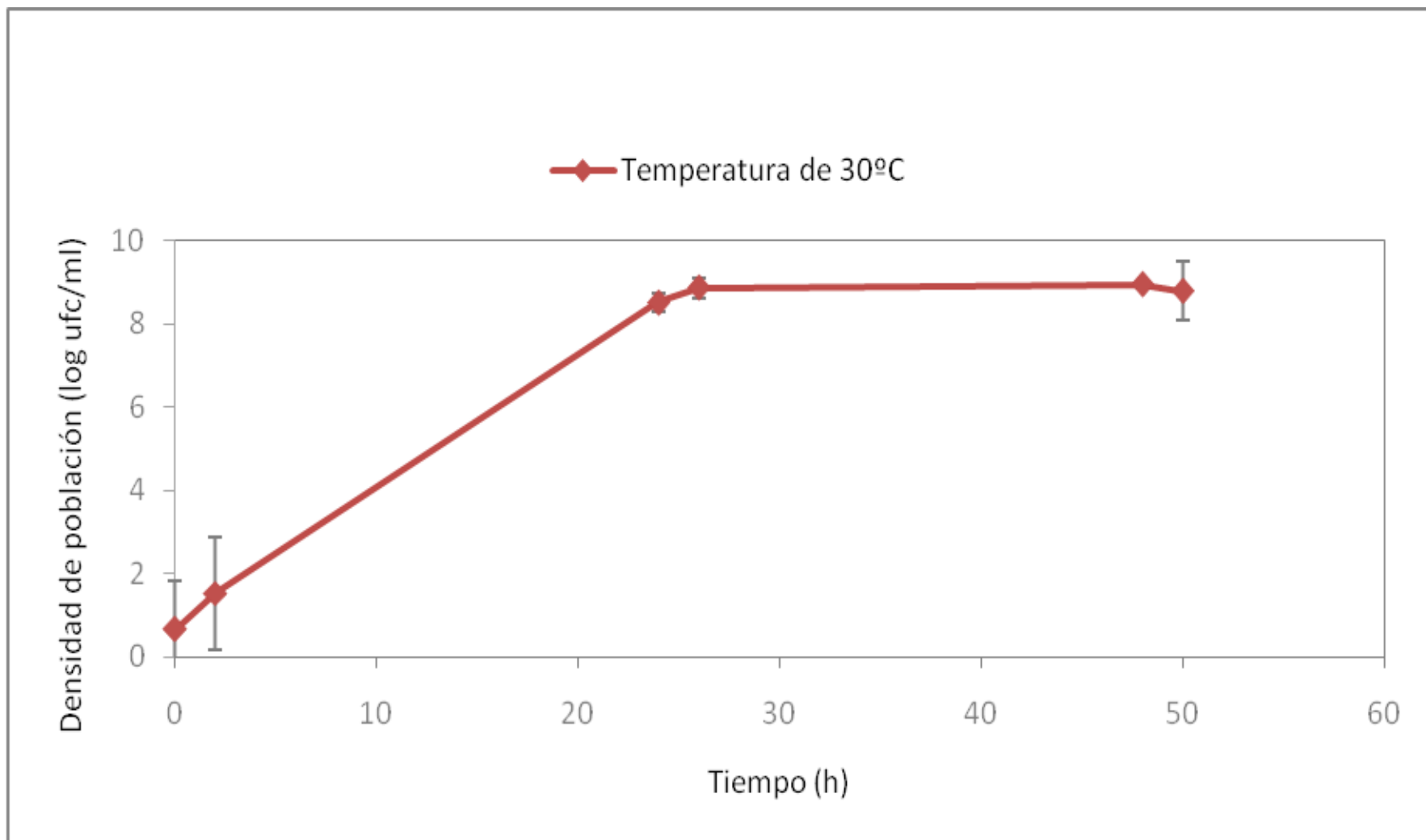
Al igual que con la temperatura de 25°C, el crecimiento se muestra como densidad de población, expresado en log UCF/ml, frente al tiempo, expresado en horas. En este caso se pueden diferenciar sólo dos de las cuatro fases de crecimiento bacteriano: fase exponencial y fase estacionaria. El tiempo de retraso es menor de 2 horas.

#### **4.4. Comparación del crecimiento a las dos temperaturas (25°C y 30°C).**

La población de *C. sakazakii* a tiempo cero es mayor a 25°C que a 30°C. Pasadas 24 horas, tienen aproximadamente la misma densidad de población y 2 horas después sin embargo, la población es mayor a 30°C que a 25°C, alcanza la densidad máxima de población ( $10^9$  UFC/ml). El tiempo de retraso es igual o mayor de 2 horas a 25°C y menor de 2 horas a 30°C.

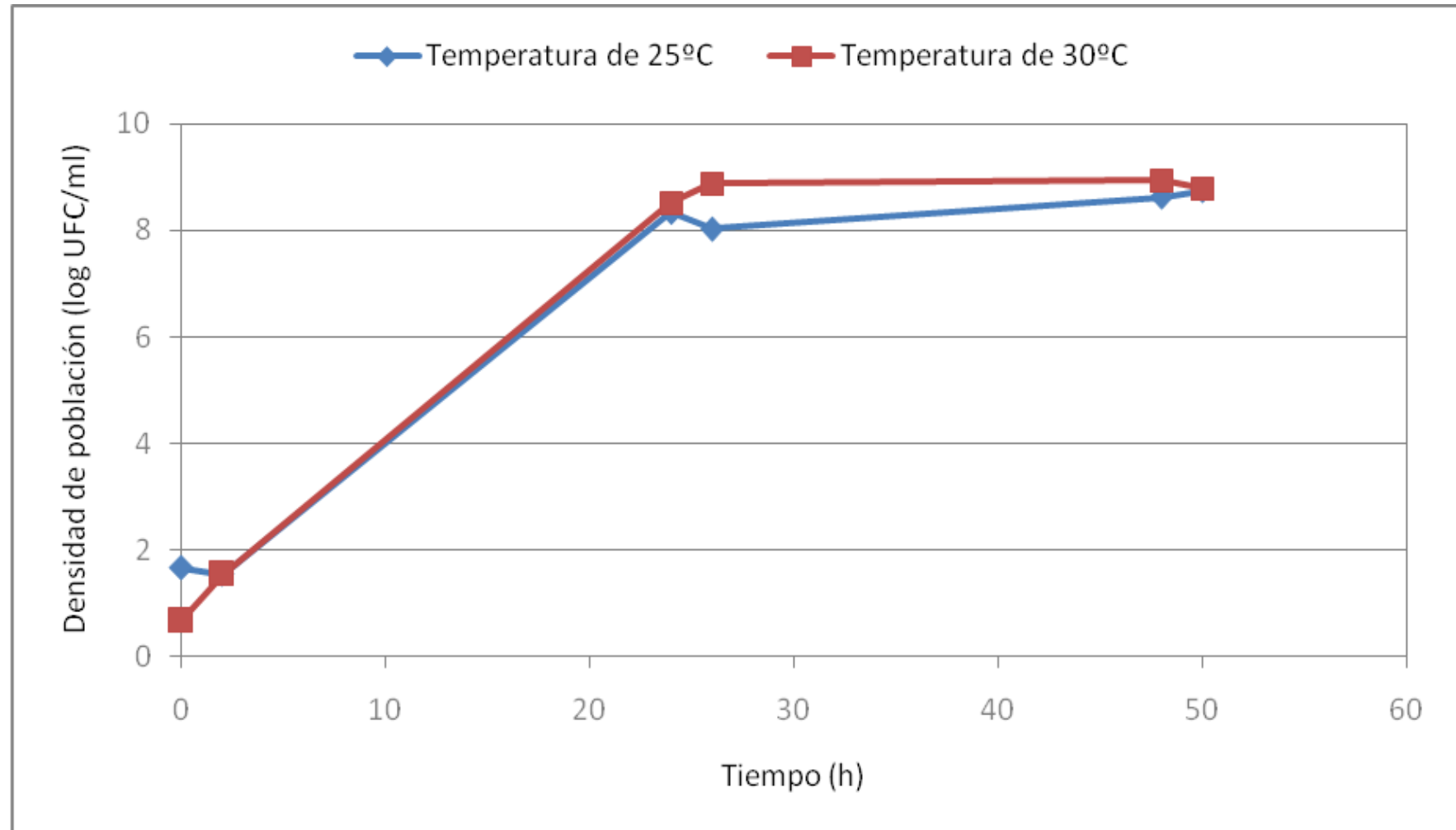


**Figura 6.-** Curva de crecimiento de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 a las temperatura ambiente de 25°C.



**Figura 7.-** Curva de crecimiento de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 a las temperatura ambiente de 30°C.





**Figura 8.-** Gráfica comparativa del crecimiento de *Cronobacter sakazakii* CECT 858 a las temperaturas ambiente de 25°C y 30°C.

## 5. DISCUSIÓN.

Tal y como describen Lehener y Stephan en una de sus revisiones<sup>10</sup>, *Cronobacter sakazakii* reacciona de forma positiva en agar de triptona soja (TSA) produciendo un pigmento amarillo que la diferencia de otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*.

La variación de la temperatura ambiente es un factor que afecta en el desarrollo de *C. sakazakii* en FLI, ya que después de incubar las fórmulas reconstituidas durante un mismo número de horas a las temperaturas de 25°C y 30°C, se observó que a la temperatura de 30°C la carga bacteriana en TSA era mayor. Esto demuestra que crece más rápido a la temperatura de 30°C que a la de 25°C.

En este estudio también se percibió que *C. sakazakii* tiene un crecimiento exponencial a ambas temperaturas (25°C y 30°C), que comienza su fase exponencial de forma aproximada después de 2 horas a 25°C y antes de las 2 horas a 30°C y que pasadas 24 horas ya se encuentra en fase estacionaria.

Nazarowec-White y Farber<sup>11</sup>, estudiaron el crecimiento de *E. sakazakii* a varias temperaturas, entre estas la de 23°C, y observaron que el tiempo de retraso de este microorganismo a esta temperatura estaba entre 1,76 y 3,4 horas. Los resultados del presente estudio indican que a la temperatura de 25°C el tiempo de retraso es de por lo menos 2 horas, lo que coincide con los tiempos observados por Nazarowec-White y Farber.

No se han realizado estudios en humanos que investiguen la relación dosis-respuesta en la infección por *C. sakazakii*. Pagotto et al.<sup>12</sup>, en un estudio experimental con ratones determinaron una dosis letal mínima para 18 aislamientos de *C. sakazakii* (8 cepas de alimentos, 9 cepas clínicas y 1 tipo de cepa ATCC 29544). Todas las cepas investigadas fueron letales a una dosis de 10<sup>8</sup> UFC mediante inyección intraperitoneal y dos cepas (un aislamiento clínico y otro de alimentos) causaron muerte cuando se administraron de forma oral. Los autores concluyeron que la dosis letal mínima en lactantes podría requerir una densidad muy alta de población de *C. sakazakii* (esto puede ocurrir si se reconstituye la fórmula a una temperatura inadecuada durante un largo periodo de tiempo). En este trabajo estas densidades de población (10<sup>8</sup> UFC y

$10^5$  UFC) consideradas como dosis letales para lactantes se alcanzaron entre las 2 y las 24 horas a ambas temperaturas.

Estos resultados, permiten corroborar las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud<sup>8</sup> de no consumir las fórmulas de leche 2 horas después de haber sido reconstituidas.

## 6. CONCLUSIONES.

Los resultados de este estudio muestran la importancia de llevar a cabo un mayor control de la temperatura en la preparación, uso y almacenamiento de las fórmulas de leche en polvo.

Es importante aclarar que se ha observado la densidad de población a tiempos muy distanciados. La observación a tiempos más seguidos durante las primeras 24 horas, permitiría observar mejor el tiempo de retraso y de generación del microorganismo y poder extraer conclusiones más precisas. Tampoco se ha llevado a cabo un control negativo de las muestras de leche para *C. sakazakii* que permita determinar la existencia de *C. sakazakii* antes del inóculo artificial.

Se recomienda realizar más estudios experimentales sobre este microorganismo, ya que un mejor conocimiento del crecimiento y patogénesis de *C. sakazakii* podría ayudar en el desarrollo de nuevas estrategias de prevención.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Morales G. Nutrición Infantil. En: Rodríguez U, Gaviria M. Guías de pediatría práctica basadas en la evidencia. 2ed. Bogotá: Editorial Médica Panamericana; 2009. p. 17-28.
2. Reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. REAL DECRETO 867/2008, de 23 de mayo. Boletín Oficial del Estado nº131 (30-5-2008).
3. Vargas-Leguás H, Rodríguez Garrido V, Lorite Cuenca R, Pérez-Portabella C, Redecillas Ferreiro S, Campins Martí M. Guía para la elaboración de fórmulas infantiles en polvo en el medio hospitalario: Sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico. *An Pediatr.* 2009; 70 (6): 586-93.
4. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: Meeting report. WHO/FAO, Geneva, Switzerland; 2004. Microbiological Risk Assessment Series 6.
5. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report. WHO/FAO, Geneva, Switzerland; 2006. Microbiological Risk Assessment Series 10.
6. Petrola M, Martínez A, Tomé E, Luigi T, Rojas T. Efecto de la temperatura de refrigeración y calentamiento de fórmulas lácteas infantiles en el crecimiento de *Cronobacter sakazakii*. *An Venez Nutr.* 2013; 26(2): 106-111.
7. Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG, Fanning S. *Enterobacter sakzakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 996-1002.
8. OMS/FAO. Preparación, almacenamiento y manipulación en condiciones higiénicas de preparaciones en polvo para lactantes: Directrices. Suiza; 2007.
9. Hunter CJ, Petrosyan M, Ford HR, Prasadarao NV. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Infants and Neonates. *Surg Infect (Larchmt).* 2008; 9(5): 533–539.

10. Lehner A , Stephan R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. J Food Prot. 2004; 67(12):2850-7.
11. Nazarowec-White M, Farber JM. Incidence, Survival, and Growth of *Enterobacter sakazakii* in Infant Formula. J. Food Prot. 1997; 60: 226-230.
12. Pagotto FJ, Nazarowec-White M, Bidawid S, and Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. J. Food Prot. 2003; 66: 370-375.

## ANEXOS

## RESULTADOS A LA TEMPERATURA DE 25°C.

Tiempo (nº)	Tiempo (h)	UCF de <i>C. sakazakii</i> /mL de leche		
		Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3
0	0	$3 \times 10^2$	0	$3 \times 10^2$
1	2	$2 \times 10^2$	$2 \times 10^2$	0
2	24	$1,9 \times 10^8$	$2 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$
3	26	$1,2 \times 10^9$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$
4	48	$4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
5	50	$7 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$

**Tabla 1A.-** UFC de *C. sakazakii*/ mL de leche de los Cultivos 1, 2 y 3 en cada uno de los tiempos.

Tiempo (h)	Log Cultivo 1	Log Cultivo2	Log Cultivo 3	Media	DS
0	2,47712125	0	2,47712125	1,65141417	1,43016662
2	2,30103	2,30103	0	1,53402	1,32850029
24	8,2787536	8,30103	8,41497335	8,33158565	0,07306977
26	8,07918125	8	8	8,02639375	0,04571531
48	8,60205999	8,62324929	8,63346846	8,61959258	0,01602035
50	8,84509804	8,69897	8,69897	8,74767935	0,08436706

**Tabla 2A.-** Logaritmos en base 10 de las UFC de *C. sakazakii*/ mL de leche de los Cultivos 1, 2 y 3 en cada uno de los tiempos, densidad de población media y Desviación Estándar (DS).

### RESULTADOS A LA TEMPERATURA DE 30°C.

Tiempo (nº)	Tiempo (h)	UCF de <i>C. sakazakii</i> /mL de leche		
		Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3
0	0	0	$2 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
1	2	0	$4 \times 10^2$	$1 \times 10^2$
2	24	$2 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$6 \times 10^8$
3	26	$4 \times 10^8$	$1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
4	48	$1 \times 10^9$	$1 \times 10^9$	$7 \times 10^8$
5	50	$2 \times 10^9$	$1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$

**Tabla 3A.-** UFC de *C. sakazakii*/ mL de leche de los Cultivos 1, 2 y 3 en cada uno de los tiempos.

Tiempo (h)	Log Cultivo 1	Log Cultivo 2	Log Cultivo 3	Media	DS
0	0	0	2	0,66666667	1,15470054
2	0	2,60205999	2	1,53402	1,36217916
24	8,30103	8,47712125	8,77815125	8,5187675	0,24127159
26	8,60205999	9	9,04139269	8,88115089	0,24258429
48	9	9	8,84509804	8,94836601	0,08943269
50	9,30103	8	9,07918125	8,79340375	0,69600384



**Tabla 4A.-** Logaritmos en base 10 de las UFC de *C. sakazakii*/ mL de leche de los Cultivos 1, 2 y 3 en cada uno de los tiempos, densidad de población media y Desviación Estándar (DS).



## FOTOS DEL ESTUDIO.



**Foto 1.-** Fórmula de leche en polvo para lactantes utilizada.

TABLA DE ALIMENTACIÓN			
Si tu bebé parece necesitar cantidades mayores o menores que las recomendadas en la siguiente tabla de alimentación consulta a tu médico.			
Edad del niño	Agua hervida ml	Nº de medidas*	Tomas diarias
1 y 2 semanas	90	3 	6 
3 y 4 semanas	120	4	6
A partir de 1 mes	150	5	5
A partir de 2 meses	180	6	5
A partir de 3 meses	210	7	5
A partir de 5 meses	240	8	5**


\* Usa exclusivamente la medida incluida en el estuche que contiene, rasa y sin comprimir, 4,3 g. Una menor proporción de polvo privaría a tu hijo del alimento adecuado y una proporción mayor podría provocarle deshidratación.

\*\* A partir de los 4-6 meses se suele recomendar la introducción paulatina de otros alimentos, empezando por una vez al día. Por ejemplo: Papillas NESTLÉ de cereales y también frutas, verduras, carnes y pescados, que en los Tarritos NESTLÉ se encuentran listos para consumir.


**Foto 2.-**Tabla para la preparación de las muestras de leche según la edad del niño.


### PREPARACIÓN


Lavarse y secarse bien las manos antes de preparar el biberón.

 Hervir el biberón, la tetina y la rosca durante 5 minutos.

Verter la cantidad adecuada de agua en el biberón (agua mineral o de manantial adecuada para el bebé o bien agua hervida), a un máximo de 40°C.

 Utilizar únicamente la medida que se encuentra en el estuche y enrasar para una dosificación exacta.

 Añadir el nº correspondiente de medidas rasas, tal como indica la tabla de alimentación. Tapar el biberón. Agitar enérgicamente hasta la completa disolución del polvo y dárselo inmediatamente.

 Después de la toma aclarar en agua fría y lavar bien el biberón, la tetina y la rosca, eliminando cualquier resto de leche.

### PRECAUCIONES DE USO

El uso de agua sin hervir, la utilización de biberones no esterilizados o la disolución incorrecta pueden provocar trastornos al bebé.

Un incorrecto almacenamiento, manipulación, preparación y administración podrían provocar efectos adversos en la salud de tu bebé.

No preparar más de un biberón a la vez, dárselo inmediatamente y seguir las instrucciones exactamente.

Tirar la leche sobrante del biberón que el bebé no tome.

Cerrar el estuche convenientemente después de cada utilización y almacenar en lugar fresco y seco.

No se debe usar el contenido del estuche un mes después de haberlo abierto.

### AVISOS IMPORTANTES

La leche materna es la mejor para los bebés. Antes de utilizar una fórmula infantil conviene consultar a tu médico.

Mantener el bebé siempre un poco inclinado cuando tome el biberón, para evitar el riesgo de que se atragante.

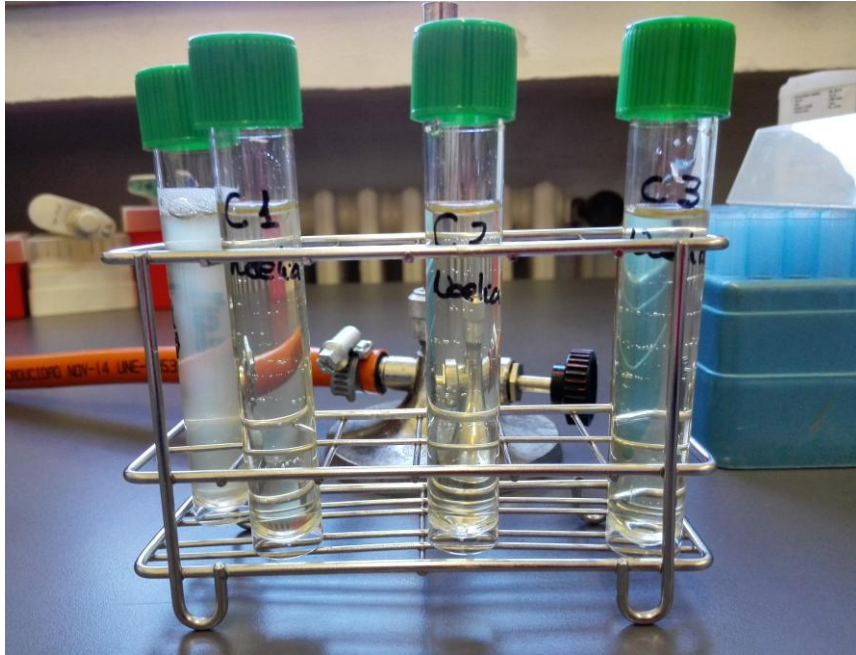
**Foto 3.-** Forma de preparación y precauciones de uso de la FLI.



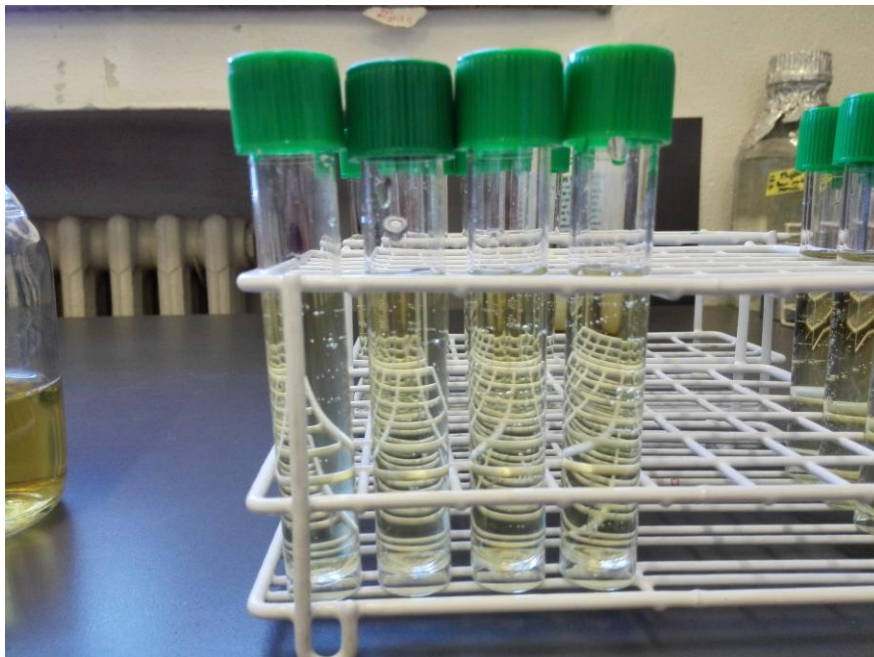
**Foto 4.-** Proceso de esterilización del material mediante autoclave (olla a presión).



**Foto 5.-** Botellas de TSB.



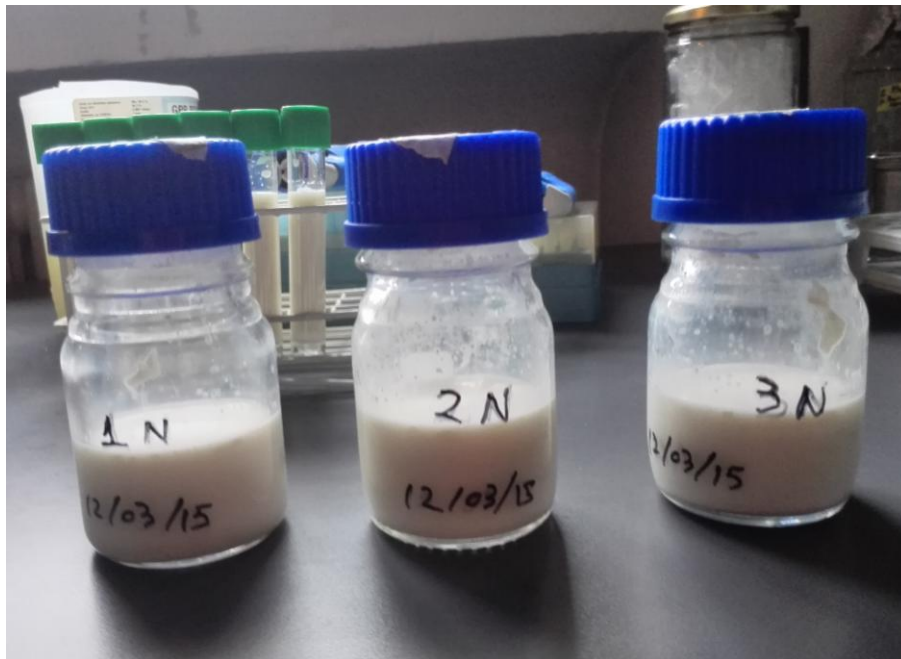
**Foto 6.-** Solución inicial de *C. sakazakii* y cultivos de *C. sakazakii* en TSB.



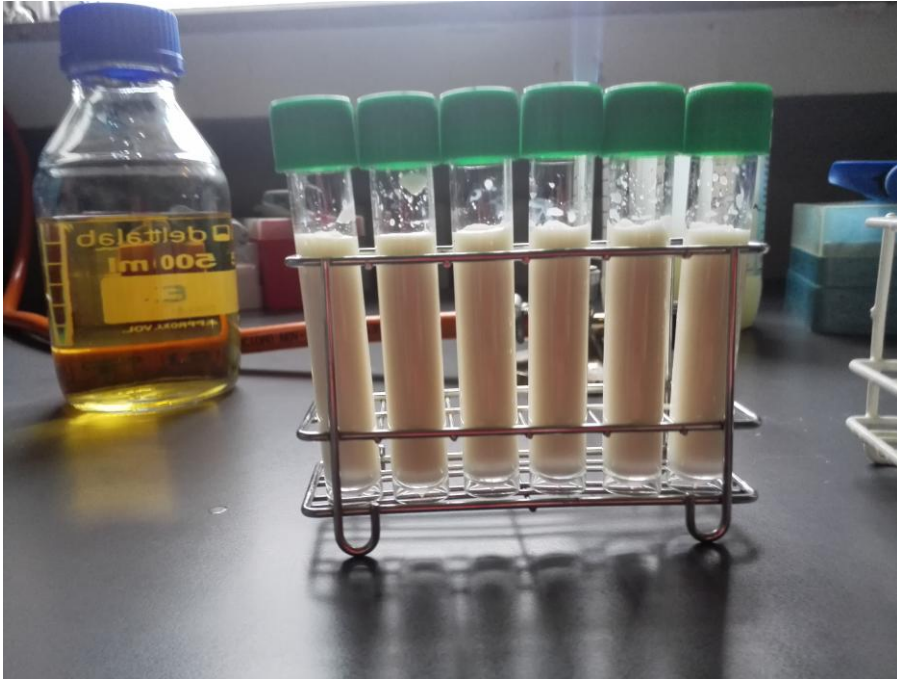
**Foto 7.-** Gradilla con diluciones seriadas.



**Foto 8.-** Mesa de trabajo.



**Foto 9.-** Cultivos 1, 2 y 3 de *C. sakazakii* en leche en polvo reconstituida.



**Foto 10.-** Muestras de cultivo de *C. sakazakii* en leche (tiempos 0, 1 2, 3, 4 y 5).



**Foto 11.-** Incubadora donde se mantienen las muestras a 25°C y 30°C.



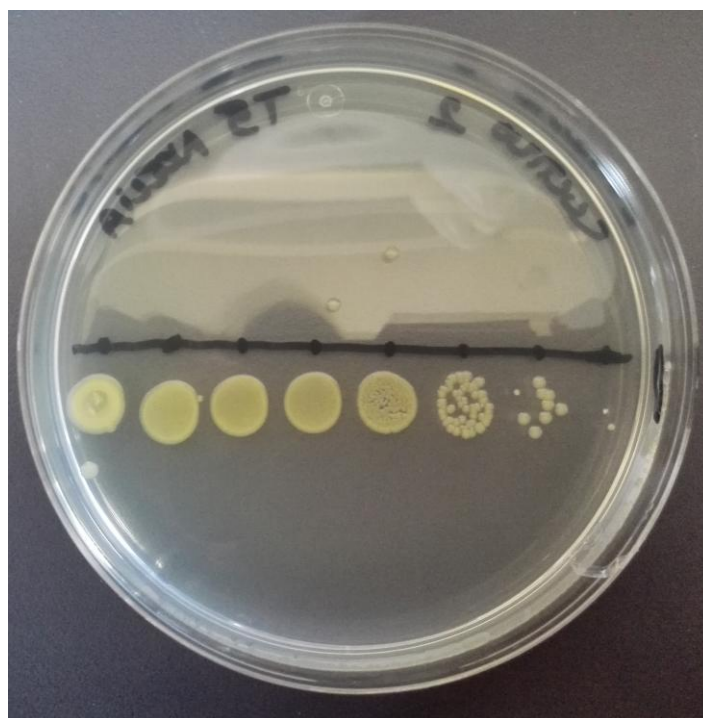
**Foto 12.-** Gradilla con diluciones seriadas.



**Foto 13.-** Proceso de diluciones seriadas en tubos "eppendorf".



**Foto 14.-** Cámara a 37°C donde se mantienen las placas sembradas durante 24 h.



**Foto15.-** Placa de Petri con TSA en el que se muestran las colonias de *C. sakazakii*.