

Crecimiento de patógenos intestinales en fórmulas infantiles

S. LECUMBERRI, V. MARTÍNEZ DE ARTOLA y J. L. FERNÁNDEZ CALVO

RESUMEN: Se han determinado las curvas de crecimiento de *Salmonella enteritidis* y de *Staphylococcus aureus*, como especies representativas de bacterias transmisibles por la ingesta, utilizando como sustrato una fórmula infantil comercial. Se establecieron las temperaturas de incubación en 37°C y 22°C y se realizaron los recuentos de colonias en diversos tiempos de incubación. Se comprueba que la fórmula ensayada constituye un excelente medio de cultivo para ambos gérmenes. El número de microorganismos obtenidos en la fórmula es bastante análogo al encontrado cuando crecen en un medio de cultivo convencional, superando a las 4 horas de incubación los niveles considerados como peligrosos. Se recomienda, por ello, un proceso de descontaminación meticuloso y que el consumo de la fórmula tenga lugar en un tiempo que no exceda las dos horas a partir de su preparación. PALABRAS CLAVE: FÓRMULA INFANTIL. DECONTAMINACIÓN. PATÓGENO INTESTINAL.

GROWTH OF INTESTINAL PATHOGENS IN INFANTILE FORMULA (SUMMARY): The growth of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in a commercial formula, at 37°C and room temperature in several periods of incubation, was studied. The infantile formula was an excellent culture medium for both microorganisms. In four hours of incubation the number of bacteria was similar to the growth of bacteria in conventional cultures. The importance of the decontamination process and the rapid consume of the formula by the infants are emphasized. KEY WORDS: INFANTILE FORMULA. DECONTAMINATION. INTESTINAL PATHOGEN.

INTRODUCCIÓN

Cualquiera que sea el mecanismo, parecen existir pocas dudas de que el biberón, sobre todo en países en vía de desarrollo, es con frecuencia vehículo de transmisión de infecciones al lactante (1). Se ha comprobado que, en los lactantes alimentados con biberón, los índices de enfermedad, muerte e ingreso hospitalario son mayores que en los niños alimentados al pecho. PLANK y MILANESI (2) encuentran que, durante los tres primeros meses de vida, la mortalidad es tres veces superior en los primeros que en los segundos.

GERRARD y TAN (3) han indicado que las muertes por neumonía y diarrea se producían con una frecuencia siete u ocho veces superior entre los niños canadienses alimentados con biberón. Parece, por lo tanto, que los lactantes alimentados con lactancia natural presentan, al menos en los tres primeros meses, una menor incidencia de enfermedades infecciosas, en especial de infecciones gastrointestinales, que los alimentados de modo artificial (4, 5).

Aunque en ambientes de un cierto nivel de educación sanitaria se conoce la conveniencia de que las fórmulas para lac-

tantes sean esterilizadas al final de su preparación o preparadas asépticamente, en la práctica doméstica estas instrucciones son, de hecho, generalmente ignoradas o mal ejecutadas.

Es razonable pensar que, cuando el suministro de agua no está contaminado y el ambiente se encuentra relativamente libre de portadores de gérmenes patógenos, pueda conseguirse un adecuado control de la proliferación bacteriana en dichas fórmulas mediante la limpieza cuidadosa de biberones y tetinas, la utilización de la fórmula recién preparada, o evitando su almacenamiento prolongado a temperaturas superiores a 10°C.

La eventualidad de una contaminación y la relativa frecuencia con que, por comodidad o conveniencia (viajes, paseos) se administran las fórmulas después de algunas horas de haber sido preparadas, nos ha llevado a plantear el presente estudio con el fin de observar las posibilidades de supervivencia que ofrecen las fórmulas infantiles a los microorganismos que incidentalmente pueden contaminarles, y valorar el riesgo que potencialmente puede representar una eventual contaminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos determinado las curvas de crecimiento de *Salmonella enteritidis*, serotipo B y *Staphylococcus aureus*, como especies representativas de bacterias transmisibles por la ingesta, utilizando como sustrato una fórmula infantil comercial. Dicha fórmula es una leche humanizada de iniciación en cuya composición intervienen seroproteínas lácticas desmineralizadas, leche entera, lactosa, aceite vegetal, vainilla, calcio, hierro y vitaminas.

El nivel máximo de contaminación aceptado para las leches en polvo (6) es de 5×10^4 unidades formadoras de colonias

(CFU)/gramo, lo que significa que, a la concentración en que se consume la fórmula, el 12 %, puede admitirse como tolerable la presencia de hasta 6×10^3 CFU/ml.

Según esta valor, se fijaron en 3×10^2 , 3×10^3 , y 3×10^4 las concentraciones más adecuadas de los inóculos de *Salmonella enteritidis* para utilizar posteriormente concentraciones menores, iguales y superiores a la concentración tolerada; la concentración empleada del inóculo fue de 3×10^6 CFU/ml. para el *Staphylococcus aureus*, ya que a menores concentraciones se obtenía una gran variabilidad de resultados. Las temperaturas de incubación se establecieron en 37°C y 22°C, y se realizó el recuento de colonias a las 2, 4, 9, 24 y 48 horas de incubación.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo se hicieron 20 experiencias con *Salmonella enteritidis*, utilizando una misma cepa mantenida en subcultivo mediante pases sucesivos en placas de agar MacConkey, y otras 20 con *Staphylococcus aureus*, empleando una cepa distinta en cada ocasión. En cada experiencia se preparaba un volumen de la fórmula y una suspensión de microorganismos para hacer un control de la viabilidad del germen, un control de la esterilidad de la fórmula, y un cultivo del inóculo en la fórmula y en el caldo tripticosa soja (TSB), tanto a 22°C como a 37°C.

La fórmula infantil se reconstituyó disolviendo 12 gramos del polvo en 96 ml. de agua estéril, calentada previamente en baño maría a 48-50°C. La solución obtenida se repartió en dos fracciones de 48 ml. cada una, añadiendo a una de ellas 2 ml. del inóculo correspondiente, y a la otra 2 ml. de agua destilada estéril. De este modo, cada fracción quedaba a una concentración final del 12 %, concentración a la que debe consumirse la fórmula

según las indicaciones de la firma propietaria.

Se resuspendía una o dos colonias del microorganismo correspondiente en 2 ml. de suero salino fisiológico estéril y se ajustaba la suspensión a una turbidez equivalente al patrón 1 de la escala de Mc Farland, lo que venía a resultar una concentración aproximada de la suspensión stock bacteriana de 3×10^8 CFU/ml.

A partir de esta suspensión, se tomaron 0,1 ml. que se añadieron a 9,9 ml. de suero salino con lo que se consiguió una dilución de 3×10^6 CFU/ml., que fue la concentración utilizada con el *Staphylococcus*. En el caso de la *Salmonella*, a partir de dicha concentración se hicieron diluciones en suero fisiológico para conseguir las tres concentraciones de empleo, 3×10^2 , 3×10^3 , y 3×10^4 CFU/ml.

Por cada experiencia se hicieron controles de esterilidad de la fórmula utilizada como medio de cultivo y de la viabilidad de los microorganismos en las suspensiones empleadas como inóculo.

Para determinar el número de microorganismos presentes en las muestras se efectuaron cinco recuentos en agar CLED (Cistina-Lactosa-Electrolitos-Deficiente) sembrando por vaciado al cabo de los distintos períodos de incubación. Se promediaron estos resultados y la media obtenida fue el valor que se tomó para expresar el resultado correspondiente a cada muestra.

Se han calculado los estadísticos básicos de media, desviación típica, error típico de la media, y coeficiente de variación en las 20 experiencias. Para la *Salmonella* el nivel de confianza para la significación de las diferencias entre curvas se ha calculado utilizando el análisis bidireccional de la varianza para la doble clasificación sustrato-inóculo en cada temperatu-

ra de incubación y temperatura-inóculo en cada sustrato, realizado para cada uno de los cinco tiempos de incubación.

En el caso del *Staphylococcus* sólo se ha comparado el sustrato y la temperatura, ya que sólo se ha utilizado una concentración con inóculo.

RESULTADOS

Considerados globalmente, los recuentos obtenidos en las 20 experiencias realizadas para cada tiempo de incubación, temperatura, inóculo y medio de cultivo ponen de manifiesto una gran variabilidad. Los coeficientes de variación de los recuentos de *Salmonella enteritidis* son considerablemente altos (Tabla I). Como puede apreciarse, los resultados más constantes, con menor coeficiente de variación, se obtuvieron con los inóculos más altos (3×10^4 CFU/ml.), cualquiera que fuera el medio utilizado como sustrato de crecimiento y la temperatura de incubación.

En los inóculos bajos (3×10^2 CFU/ml.) y medios (3×10^3 CFU/ml.) la variabilidad es mayor cuando se utiliza el caldo tripticasa soja como sustrato de crecimiento y tiende a disminuir al aumentar el tiempo de incubación. En los inóculos medios y altos la variación no presenta patrones regulares en relación con la temperatura de incubación, aunque en los inóculos bajos la variabilidad es sistemáticamente menor a 37°C que a 22°C.

En los recuentos de *Staphylococcus aureus* los coeficientes de variación son menores que en el caso anterior (Tabla II) y se advierte una mayor regularidad de resultados con caldo tripticasa soja, que presenta coeficientes de variación más bajos.

Las curvas de crecimiento para cada inóculo de *Salmonella enteritidis* en fórmula y en caldo tripticasa soja a 37°C pre-

TABLA I. COEFICIENTES DE VARIACION EN LAS SERIES DE RECUENTOS DE COLONIAS DE *S. PARATYPHI* B
a: F6rmula

INOCULO (CFU/ml)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE INCUBACION				
		2 h.	4 h.	9 h.	24 h.	48 h.
$3 \cdot 10^2$	22	40,37	97,79	127,11	53,18	59,69
	37	20,76	48,22	61,41	52,10	52,15
$3 \cdot 10^3$	22	19,30	28,36	43,59	76,25	35,05
	37	43,00	64,78	9,91	3,88	35,30
$3 \cdot 10^4$	22	11,31	11,43	9,36	7,66	24,06
	37	10,94	10,07	10,04	3,75	67,35

b: T S B

INOCULO (CFU/ml)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE INCUBACION				
		2 h.	4 h.	9 h.	24 h.	48 h.
$3 \cdot 10^2$	22	90,09	87,39	114,80	51,82	44,00
	37	67,84	96,14	59,90	0,65	1,95
$3 \cdot 10^3$	22	88,40	64,71	37,34	17,64	59,35
	37	143,71	35,29	10,67	4,54	5,44
$3 \cdot 10^4$	22	16,42	19,04	6,12	3,75	2,94
	37	13,76	4,64	8,61	18,50	4,61

TABLA II. COEFICIENTE DE VARIACION EN LAS SERIES DE RECUENTOS DE COLONIAS DE *S. AUREUS*

INOCULO (CFU/ml)	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE INCUBACION				
			2 h.	4 h.	9 h.	24 h.	48 h.
$3 \cdot 10^6$	Leche	22	24,43	6,33	26,43	85,76	67,68
		37	24,47	7,58	9,84	13,88	86,45
	T S B	22	3,89	4,87	10,85	59,24	75,88
		37	5,16	9,01	12,25	10,46	76,10

sentan una morfología muy similar (Figura 1). La fase logarítmica se inicia y termina prácticamente igual, aunque la magnitud del crecimiento es ligeramente superior en el caldo tripticasa soja. Las diferencias entre inóculos para cada sustrato no son significativas, excepto a las 2 y a las 9 horas de incubación.

Las curvas obtenidas a 22°C presentan características muy semejantes a las anteriores (Figura 2). Sin embargo, el crecimiento logarítmico es más lento y la influencia del sustrato en las cuatro primeras horas es más marcada.

Por el contrario, las diferencias observadas en el caso del *Staphylococcus aureus* (Figura 3) entre las curvas de crecimiento en la fórmula y en el caldo son estadísticamente significativas, por lo que puede afirmarse que el germen tiene mayor crecimiento en el caldo tripticasa soja, tanto a 22°C como a 37°C.

DISCUSIÓN

La aparición de trastornos nutritivos y diarreicos que parecen estar en relación con la lactancia artificial justifica la existencia de una actitud de reserva frente a ella y un esfuerzo por establecer y eliminar los factores de riesgo que permitan su utilización segura cuando ello sea aconsejable.

Aunque son muchos y muy diversos los factores que pueden influir en la probabilidad de que un lactante padezca un proceso infeccioso, el biberón puede jugar un papel importante en el caso de infecciones gastrointestinales o de toxi-infecciones (7). En zonas de bajo nivel sociocultural y económico a las que llega la «leche artificial», el nivel de contaminación del biberón puede ser importante y el riesgo de infección transmitida por la alimentación artificial elevado (8). Por otra parte,

los procedimientos domésticos de descontaminación son con frecuencia mal aplicados, lo que conlleva a una mayor incidencia de infecciones (9).

Se acepta desde hace tiempo que la *Salmonella*, la *Shigella* y los serotipos enterotóxicos de *Escherichia coli* son agentes etiológicos de los trastornos gastrointestinales del lactante. De entre ellos, hemos elegido en nuestro estudio el género *Salmonella* porque constituye un problema importante de salud pública y porque su incidencia en lactantes no es nada desdeñable (10). La ubicuidad del *Staphylococcus aureus* y, por consiguiente, la elevada posibilidad de que el biberón se contamine a partir de las personas que lo preparan, así como su relación con la mastitis y su papel en las toxi-infecciones alimentarias nos ha movido a incluirlo, igualmente, en el presente trabajo.

La legislación española recogida en el Real Decreto 2.685/76 sobre Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales (6), admite para productos que han de consumirse después de añadir un líquido, un máximo de 50.000 microorganismos aerobios por gramo de producto. Este tipo de legislación garantiza en cierto modo que la fórmula no llegue al mercado con un grado de contaminación igual o mayor al señalado. Por otra parte, aunque la fórmula no es leche en sentido estricto, el proceso industrial de su preparación es análogo al de la leche en polvo. En consecuencia, asumimos que, como en ella, los microorganismos que contenga o se incorporen durante su elaboración, disminuyen en número conforme aumenta el tiempo de almacenamiento en el medio desecado, quedando en todo caso reducidos a los gérmenes formadores de esporas.

Por lo tanto, el riesgo más importante no radica en los microorganismos que con-

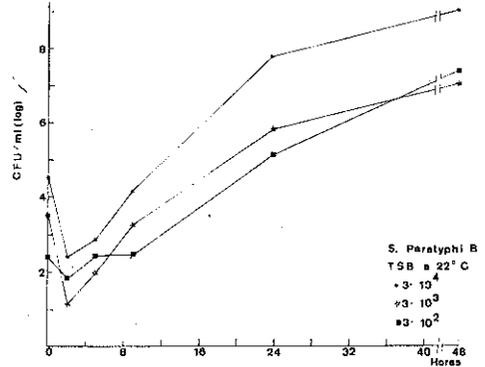
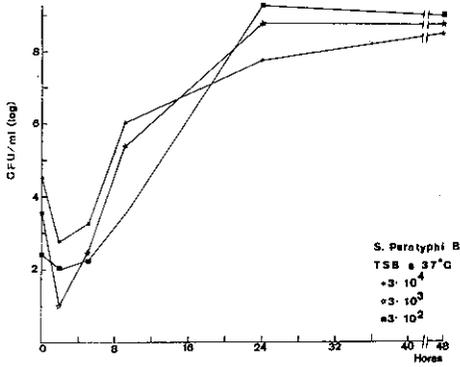
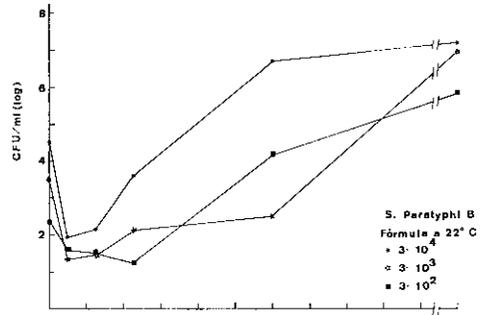
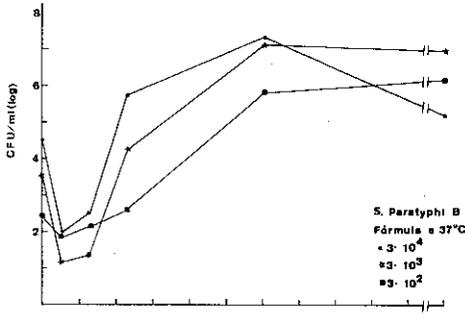


FIGURA 1

FIGURA 2

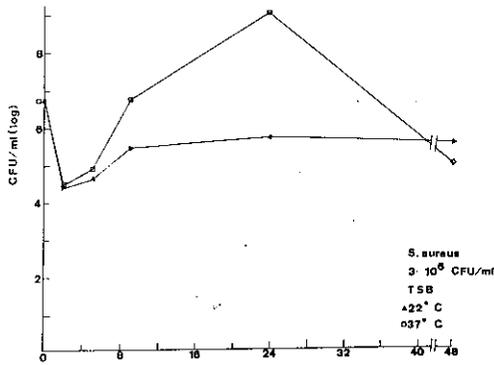
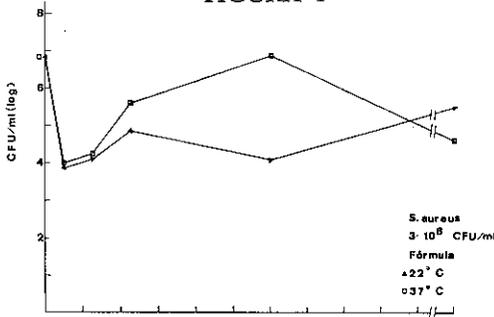


FIGURA 3

FIG. 1. Curvas de crecimiento de Salmonella enteritidis en fórmula y en caldo tripticasa soja a 37°C

FIG. 2. Curvas de crecimiento de Salmonella enteritidis en fórmula y en caldo tripticasa soja a 22°C

FIG. 3. Curvas de crecimiento de Staphylococcus aureus en fórmula y en caldo tripticasa soja a ambas temperaturas

tenga la fórmula en polvo sino en los que pueden ser introducidos en los recipientes por las manipulaciones utilizadas en su preparación para el consumo. Sin embargo, el riesgo de infección sería relativo si el microorganismo no fuera capaz de sobrevivir y multiplicarse en la fórmula.

En el presente estudio hemos comprobado que la fórmula ensayada constituye un excelente medio de cultivo para la *Salmonella enteritidis* y para el *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, el número de microorganismos que se obtienen en ella, incluso a temperatura ambiente y con inó-

culos bajos como los tolerados por la legislación, es bastante análogo al obtenido cuando crecen en un medio de cultivo convencional, superando con mucho, a las 4 horas de incubación, los niveles considerados como peligrosos.

La contaminación de biberones y tetinas representa un riesgo real de infección cuando las fórmulas infantiles se consumen después de haber transcurrido más de dos horas desde su preparación, por lo que recomendamos que el proceso de descontaminación sea metódico y esmerado.

BIBLIOGRAFIA

1. JOSEPH, D. C.: *The anatomy of the infant formula controversy*. Amer. J. Dis. Child. 1981; 135: 889-892.
2. PLANK, S. J.; MILANESI, M. L.: *Infant feeding and infant mortality rural in Chile*. Bull. WHO 1973; 48: 203-210.
3. GERRARD, J. W.; TAN, L. K. T.: *Hazards of infant formula feeding: keeping abreast*. J. Hum. Nutr. 1978; 3: 20-25.
4. FALLOT, M. E.: *Breast-feeding reducing incidence of hospital admissions for infection in infants*. Pediatrics 1980; 65: 1121-1124.
5. CUNNINGHAM, A. S.: *Morbidity in breast-fed and artificially fed infants*. J. Pediatr. 1977; 90: 726-729.
6. REAL DECRETO 2.685/1976 de 16 de octubre de 1976: Reglamentación Técnico-Sanitaria para elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales. BOE, n. 284, p. 23.543, 26 de noviembre de 1976.
7. SANTULI, T. V.; SCHULLINGER, J. N.; HEIRD, W. C. y col.: *Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases*. Pediatrics 1975; 55: 376-387.
8. SURJONO, D.: *Bacterial contamination and dilution of milk in infant feeding bottle*. J. Trop. Pediatr. 1980; 26: 58-61.
9. CREAGH, A.: *The domestic sterilization of feeding bottles*. Ir. Med. J. 1978; 71: 452-454.
10. ROSENSTEIN, B. J.: *Salmonellosis in infants and children*. J. Pediatr. 1967; 70: 1-7.

Petición de Separatas:

Dr. VÍCTOR MARTÍNEZ DE ARTOLA
Sección de Microbiología
Hospital Virgen del Camino
31008 PAMPLONA