

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**“EFICACIA DE LA LECHE MATERNA COMO INHIBIDOR
IN VITRO DE BACTERIAS”**

Estudio experimental realizado en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Betancourt, Antigua Guatemala y en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Tesis

Presentada a la Honorable Junta Directiva
de la Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

**Brian Eduardo Alvarez Aguilar
Sergio Ricardo Cabrera Pérez
Kimberly Johanna Montenegro Salazar
Marlit Alejandra Juárez Villacinda**

Médico y Cirujano

Guatemala, agosto de 2017

El infrascrito Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala hace constar que:

Los estudiantes:

- | | | |
|--|-----------|---------------|
| 1. Brian Eduardo Alvarez Aguilar | 201110284 | 2344104420101 |
| 2. Sergio Ricardo Cabrera Pérez | 201110489 | 2315736690101 |
| 3. Kimberly Johanna Montenegro Salazar | 201119272 | 2194897420101 |
| 4. Marlit Alejandra Juárez Villacinda | 201144325 | 2321996200101 |

Cumplieron con los requisitos solicitados por esta Facultad previo a optar al Título de Médico y Cirujano en el grado de Licenciatura, y habiendo presentado el trabajo de graduación titulado:

"EFICACIA DE LA LECHE MATERNA COMO INHIBIDOR
IN VITRO DE BACTERIAS"

Estudio experimental realizado en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala y en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Trabajo asesorado por la Dra. Carmen Villagrán de Tercero y revisado por el Dr. Miguel Ángel Soto Galindo, quienes avalan y firman conformes. Por lo anterior, se emite, firma y sella la presente:

ORDEN DE IMPRESIÓN

En la Ciudad de Guatemala, el veintidós de agosto del dos mil diecisiete


DR. MARIO HERRERA CASTELLANOS
DECANO



UNIVERSIDAD DE
SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE
CIENCIAS MÉDICAS
DECANATO

El infrascrito Coordinador de la Coordinación de Trabajos de Graduación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hace constar que los estudiantes:

- | | | | |
|----|-------------------------------------|-----------|---------------|
| 1. | Brian Eduardo Alvarez Aguilar | 201110284 | 2344104420101 |
| 2. | Sergio Ricardo Cabrera Pérez | 201110489 | 2315736690101 |
| 3. | Kimberly Johanna Montenegro Salazar | 201119272 | 2194897420101 |
| 4. | Marlit Alejandra Juárez Villacinda | 201144325 | 2321996200101 |

Presentamos el trabajo de graduación titulado:

**"EFICACIA DE LA LECHE MATERNA COMO INHIBIDOR
IN VITRO DE BACTERIAS"**

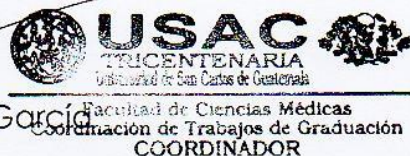
Estudio experimental realizado en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala y en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

El cual ha sido revisado por la Dra. Ana Liss Perdomo Mendizabal y, al establecer que cumple con los requisitos exigidos por esta Coordinación, se les autoriza continuar con los trámites correspondientes para someterse al Examen General Público. Dado en la Ciudad de Guatemala el veintidós de agosto del dos mil diecisiete.

*César O. García G.
Doctor en Salud Pública
Colegiado 5,950*

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Dr. C. César Oswaldo García
Coordinador



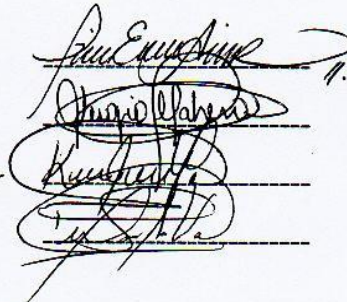
Guatemala, 22 de agosto del 2017

Doctor
César Oswaldo García García
Coordinación de Trabajos de Graduación
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Dr. García:

Le informamos que nosotros:

1. Brian Eduardo Alvarez Aguilar
2. Sergio Ricardo Cabrera Pérez
3. Kimberly Johanna Montenegro Salazar
4. Marlit Alejandra Juárez Villacinda



Presentamos el trabajo de graduación titulado:

"EFICACIA DE LA LECHE MATERNA COMO INHIBIDOR
IN VITRO DE BACTERIAS"

Estudio experimental realizado en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala y en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Del cual la asesora y el revisor se responsabilizan de la metodología, confiabilidad y validez de los datos, así como de los resultados obtenidos y de la pertinencia de las conclusiones y recomendaciones propuestas.

Firmas y sellos

Revisor: Dr. Miguel Ángel Soto Galindo
Reg. de personal 113 47

Asesora: Dra. Carmen Villagrán de Tercero



Miguel Angel Soto Galindo
Jefe Departamento Pediatría
HOSPITAL PEDRO BETHANCOURT ANTIGUA G.

Dra. Carmen Villagrán de Tercero
Médico y Cirujano
Col. 3177

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por habernos permitido llegar hasta este punto y dado vida para lograr nuestros objetivos, además de su infinita bondad y amor. Por ser nuestro guía en momentos de dificultad y nunca dejarnos caer ante las adversidades. Por todas las bendiciones que nos ha dado.

A nuestros padres:

A nuestros padres por ser el pilar fundamental en todo lo que somos, en nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y ser nuestros guías en el camino de la vida y llevarnos de la mano en cada paso de la carrera. Este triunfo es compartido con ellos.

A familia:

Por estar a nuestro lado durante esta etapa de nuestra vida, por siempre creer en nosotros y apoyarnos en las adversidades tanto académicas como de la vida.

A nuestros amigos:

Por compartir este largo camino junto a nosotros, ser un apoyo incondicional y vivir las experiencias que no brindo esta carrera.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala:

Por el ser el centro de enseñanza que inculco en nosotros la responsabilidad, trabajo y dedicación. Por ser nuestra alma máter.

De la responsabilidad del trabajo de graduación:

El autor o autores es o son los únicos responsables de la originalidad, validez científica, de los conceptos y de las opiniones expresadas en el contenido del trabajo de graduación. Su aprobación en manera alguna implica responsabilidad para la Coordinación de Trabajos de Graduación, la Facultad de Ciencias Médicas y para la Universidad de San Carlos de Guatemala. Si se llegara a determinar y comprobar que se incurrió en el delito de plagio u otro tipo de fraude, el trabajo de graduación será anulado y el autor o autores deberá o deberán someterse a las medidas legales y disciplinarias correspondientes, tanto de la Facultad, de la Universidad y otras instancias competentes.

RESUMEN

Objetivo: Identificar la eficacia de la leche materna para inhibir el crecimiento *in vitro* de los agentes infecciosos (*E. coli*, *S. aureus*, *N. gonorrhoea*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*) en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Betancourt, Antigua Guatemala y en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala en mayo-junio de 2017. **Población y métodos:** Estudio experimental, se recolectó 20 muestras de calostro y 20 de leche madura, 10 provenientes de banco de leche y 10 extraídas de la glándula mamaria. Se analizó con ANOVA unifactorial y test de Dunnett unilateral a la derecha. **Resultados:** De los cultivos que mostraron inhibición el 58% fue inhibido por calostro recién extraído. El agente infeccioso *E. coli* presentó 27% de inhibición al aplicarse leche materna. La leche materna no es eficaz para la inhibición *in vitro* en las bacterias estudiadas, presentando valor $p > 0.05$ con intervalo de confianza del 95%. **Conclusiones:** La leche materna independientemente del estado de madurez y si esta se encuentra o no almacenada en un Banco de Leche Humana, no presenta eficacia para ninguno de los agentes infecciosos estudiados comparado con su control positivo, sin embargo, sí presentó inhibición *in vitro* para *N. gonorrhoea*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *E. coli*.

Palabras clave: leche materna, Inhibición *in vitro*, Banco de leche.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO DE REFERENCIA	3
2.1 Marco de antecedentes	3
2.2 Marco teórico.....	4
2.3 Marco conceptual	5
2.3.1 Agentes infectivos	5
2.3.2 Infecciones neonatales	17
2.3.3 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	18
2.3.4 Leche materna.....	22
2.3.5 Protocolo de extracción de leche en los bancos de leche de Guatemala	35
2.4 Marco geográfico.....	42
2.5 Marco demográfico	42
2.6 Marco institucional.....	43
2.7 Marco legal	43
3. OBJETIVOS.....	45
4. HIPÓTESIS	47
5. POBLACIÓN Y MÉTODOS	49
5.1. Tipo y diseño de la investigación	49
5.2. Unidad de análisis	49
5.3. Población y muestra	49
5.4. Selección de los sujetos de estudio	51
5.5. Definición y operacionalización de variables	52
5.6. Técnica, procedimientos e instrumentos utilizados en la recolección de datos	57
5.7. Procesamiento y análisis de los datos.....	60
5.8. Alcances	62
5.9. Aspectos éticos de la investigación	62
6. RESULTADOS	65
7. DISCUSIÓN	67
8. CONCLUSIONES.....	71
9. RECOMENDACIONES	73
10. APORTES	75
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
12. ANEXOS.....	83

1. INTRODUCCIÓN

Los agentes infecciosos presentes en el ambiente y salas de parto son responsables de causar múltiples enfermedades infecciosas en el recién nacido, tales como septicemia, meningitis, neumonía, infecciones dermatológicas, de la conjuntiva, del oído, entre otras. Siendo las más frecuentes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*. Se ha postulado que la leche materna actúa como agente importante en la prevención de infecciones neonatales por su capacidad antimicrobiana gracias a los componentes humorales y celulares que actúan complementando el sistema inmunológico del recién nacido.^{1, 2, 3}

Existen estudios que describen la actividad antimicrobiana de la leche materna contra múltiples agentes infecciosos (bacterias, virus, parásitos, etc), como el Manual de Lactancia para profesionales de la salud de UNICEF (Por sus siglas en inglés United nations international children's emergency fund) del año 1995, otro estudio como "Efecto *in vitro* del sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus sp.* Aislados de leche materna, sobre crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella sp.*" de la Universidad Nacional de Trujillo en Perú (2015) y a nivel nacional se cuenta con un estudio de "Leche materna como inhibidor del crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae in vitro*" de la Universidad de San Carlos de Guatemala (1986).

Actualmente no existen estudios experimentales que determinen la actividad *in vitro* de acuerdo al estado de madurez, así como después del proceso de pasteurización, ya que se sabe que disminuyen sus componentes humorales y celulares, dependiendo del estado de madurez en el que se encuentre la leche materna, así como una disminución adicional luego del proceso de pasteurización.^{3, 4, 5, 6}

En Guatemala el 65% de los partos y atención inmediata al recién nacido, está dada por atención primaria de una partera tradicional (comadrona) en sus hogares, por el apego a las tradiciones socioculturales y el difícil acceso de una atención médica, elevando así la probabilidad de que el recién nacido adquiera alguna enfermedad infecciosa.⁷

Con base a lo anterior nace la importancia de realizar un estudio experimental que logre llenar estos vacíos de información y que describa la eficacia de la leche materna como inhibidor *in vitro* de bacterias de acuerdo al estado de madurez de la leche materna, ya que se sabe que el calostro presenta mayor protección antimicrobiana. Asimismo, tampoco se cuentan con estudios acerca de la capacidad de la leche materna almacenada en banco de leche, sabiendo que ésta pasa por el proceso de pasteurización, viéndose afectado la cantidad de IgA secretora, importante en la actividad antimicrobiana de la leche.

Se logró determinar la efectividad de la inhibición del crecimiento bacteriano con la impregnación de discos de papel filtro con calostro y leche madura recién extraída de la glándula mamaria, dicha inhibición se observó utilizando el método de Kirby-Bauer.

Por otro lado, se hizo exactamente el mismo experimento utilizando calostro y leche madura almacenada en el banco de leche, en el cual el resultado fue diferente, encontrándose menor inhibición del crecimiento bacteriano.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Marco de antecedentes

Según el Manual de Lactancia para profesionales de la Salud de UNICEF, publicado en el año de 1995 se describe la experiencia *in vitro* de la leche humana contra diversos patógenos, ya que posee componentes humorales (las inmunoglobulinas IgA secretora, IgM, IgG, lisozima y otras enzimas, lactoferrina, factor bífido, interferón, gangliósidos, prostaglandinas y otras sustancias inmunoregulatoras) como celulares de los cuales se sabe que los macrófagos son los que están en mayor cantidad y que contienen a su vez IgA, lisozima y lactoferrina, cuya concentración es mayor en el calostro que en la leche madura. Se describe la actividad antibacteriana contra: *E. coli*, *C. tetani*, *C. diphtheriae*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* (6 grupos), *Shigella*, *Streptococcus*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y otros. Posee lactoferrina la cual posee una acción bacteriostática potente contra *S.aureus*, *E. coli*, *Vibrio cholerae* y *P. aeruginosa*. Lactoperoxidasa la cual *in vitro* presenta actividad contra *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *S. typhimurium*. y Factor Bífido que antagonizan el desarrollo de gérmenes intestinales como *E. coli*, *Shigella*, amebas y otros; entre otros.³

A nivel latinoamericano se tiene un estudio de Perú del año 2015, cuyo objetivo fue determinar el efecto *in vitro* del sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus sp.* aislados de leche materna, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* así que se recolectaron 12 muestras de leche materna, de las cuales se aislaron y se identificaron cuatro cultivos de *Lactobacillus sp* observando que todos presentaban actividad antimicrobiana con la formación de halos de inhibición en las bacterias estudiadas.⁴

Un ensayo experimental realizado en 1999 en El Salvador, tuvo como objetivo demostrar las propiedades antimicrobianas de la leche materna madura, en niños menores de dos años contra enterobacterias. Para ello se recolectan muestras de leche madura y cuatro enterobacterias (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Shiguella sp.*) donde se observó que no hubo crecimiento bacteriano significativo en placas inoculadas con cepas de entero patógenos en el 93 % de los casos⁶

En Guatemala se realizó un estudio durante el periodo de agosto de 1985 a enero de 1986 y el objetivo fue determinar si la leche materna actúa como inhibidor del crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae in vitro*. Observando que el 100% de las muestras identificadas con este agente obtenidas de secreción conjuntival y endocervical, fueron inhibidas a las 24 horas de incubación con la aplicación de leche materna.⁵

2.2 Marco teórico

2.2.1 Teoría microbiana de la enfermedad

El primero que puso de manifiesto que los organismos vivos podían ser la causa de las enfermedades infecciosas fue el agrónomo italiano A. Bassi, que en 1834 demostró que ciertas enfermedades de los gusanos de seda eran provocadas por un hongo que podía transmitirse de un gusano a otro. Mientras que en 1838, Ferdinand Cohn estableció la hipótesis de que los bacilos podían ser la causa de la enfermedad, definiéndolos como “el menos importante pero también el más poderoso, de los seres vivos”.⁸

En 1850 fue establecida la conexión entre microorganismos y enfermedades infecciosas por C.J. Cavaine y P.F.O. Rayer, comunicaban a la Sociedad Francesa de Biología la observación de “pequeños cuerpos filiformes que tenían, doble longitud de un glóbulo sanguíneo” en la sangre de un cordero muerto. Fue la primera vez que se observó *in situ* una bacteria patógena dentro de su huésped.⁸

En 1872, R. Virchow demostró por primera vez la presencia de un microorganismo patógeno en la sangre de un hombre, haciéndose evidente la relación existente entre las enfermedades contagiosas y los organismos microscópicos.⁸

En 1867, dos años más tarde de que L. Pasteur ideara el proceso de destrucción de las bacterias conocido como “Pasteurización”, J. Lister utilizó el ácido fénico para pulverizar la sala de operaciones, para destruir los microorganismos y aplicaba curas de pomadas fénicas para el tratamiento de heridas infectadas.⁸

A partir de las pruebas aportadas por R. Koch y L. Pasteur, la teoría del origen microbiano de la enfermedad infecciosa fue universalmente aceptada. Al comenzar el siglo XX la mayoría de los microorganismos habían sido estudiados y la microbiología médica estaba constituida como disciplina autónoma.⁸

En 1877 L. Pasteur y J. Joubert notaron que los bacilos del carbunco crecían rápidamente cuando se inoculaban en orina esterilizada, pero no se multiplicaban y morían pronto si una de las bacterias comunes del aire se introducía al mismo tiempo en la orina. Ambos autores explicaron el antagonismo observado, comentando que “la vida destruye a la vida” y declarando que “estos hechos tal vez justifican las más amplias esperanzas terapéuticas.”⁸

En 1895, V. Tiberio observó la acción antibiótica de diferentes extractos de mohos (*Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*) frente a diversos microbios *in vitro*.⁸

En septiembre de 1928 Alexander Fleming, observó que un hongo que había contaminado uno de sus cultivos de laboratorio, poseía la capacidad de impedir el crecimiento de estafilococos y dedujo que ese moho contaminante presenta verdadera actividad antibacteriana. Durante los siguientes días se dedicó, a obtener jugo del moho y a comprobar su eficacia y seguridad en animales de experimentación, demostrando su poder antimicrobiano y bajísima toxicidad.⁸

2.3 Marco conceptual

2.3.1 Agentes infecciosos

Se reconoce como agentes infecciosos a los microorganismos que son capaces de producir infección y enfermedad infecciosa.¹

2.3.1.1 *Neisseria gonorrhoeae*

- Características microbiológicas

Es un microorganismo Gram negativo, no móvil, no formador de esporas que crece aislado o en pares (es decir, en forma de monococo o diplococo, respectivamente). Es un agente infeccioso exclusivo de seres humanos y posee en promedio tres copias de genoma por unidad cónica. Compromete la mucosa genital, el recto, la conjuntiva y la orofaringe. Se diferencia de otras bacterias del género por su capacidad de crecer en medios selectivos (principalmente Thayer-Martin, New York City o agar chocolate enriquecido),

utilizar glucosa, pero no maltosa, sacarosa o maltosa y reducir los nitritos a nitratos. Adicionalmente es capnófilo, requiriendo una atmosfera enriquecida con CO₂ al 5% para su crecimiento a una temperatura de 37 °C y en condiciones aerobias estrictas o en condiciones anaerobias cuando se adiciona nitrito al medio de cultivo.⁹

- Patogenia

La presencia de pilis o fimbrias que se extienden por la superficie de la célula bacteriana es fundamental para la infección, ya que estas estructuras se relacionan con la adherencia del microorganismo a receptores específicos presentes en las células epiteliales del huésped (el más estudiado de estos receptores es el CD46). Presenta el fenómeno biológico conocido como variación de fase, el cual consiste en que las cepas carentes de pilis (no patógenas) pueden expresarlos o incluso modificarlos, con una composición antigénica diferente a fin de evadir, en parte, la respuesta inmune del huésped.⁹

La porina (Por) presente en la membrana celular externa, desempeña un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad. Se presenta en dos clases antigénicas mayores, denominadas PorA y PorB, las cuales son motivo de extensa investigación ya que se consideran lo suficientemente antigénicas como para desarrollar una posible vacuna. Las proteínas Opa aumentan la adherencia de *N. gonorrhoeae* a diversas células eucarióticas. Se conocen al menos dos receptores para Opa presentes en las células humanas: los compuestos relacionados con heparina y el CD66.⁹

Otra proteína de la membrana externa que merece la pena mencionar es la H.8, lipoproteína que abunda en la superficie de todas las cepas de gonococo y que constituye un objetivo excelente para las pruebas de diagnóstico basadas en anticuerpos. Se ha demostrado que la transferrina y el hierro aumentan la adherencia de *N. gonorrhoeae* privado de hierro a las células endometriales del ser humano, asimismo produce la proteasa IgA 1 y quizá lo protege de la acción de la IgAmucosa.⁹

- Resistencia antimicrobiana

Como es de esperarse *N. gonorrhoeae*, con su notable capacidad de alterar su estructura antigénica y adaptarse a los cambios en el microambiente, haya adquirido

resistencia a varios antimicrobianos. Cabe mencionar que los primeros fármacos eficaces contra la gonorrea fueron las sulfonamidas (introducidas en la década de 1930), tornándose ineficaces en el mismo lapso. Más tarde, se utilizó la penicilina como fármaco preferente para el tratamiento de la gonorrea. Hacia 1965, cerca del 42% de las cepas clínicas del gonococo ya había generado cierta resistencia a la penicilina G, después surgió resistencia a causa de la producción de penicilinasa.⁹

El gonococo adquirió resistencia antimicrobiana, sea por mutaciones cromosómicas o al adquirir factores R (plásmidos). Este puede poseer varios tipos de plásmidos, algunos de ellos relacionados directamente con la resistencia gonococo a diferentes agentes antimicrobianos. A demás de la resistencia por plásmidos, se han descrito dos mecanismos de resistencia mediados por cromosomas, el primero, que es específico de cada fármaco, aparece una mutación de un solo paso que origina una gran resistencia. La segunda variedad comprende la variación de mutaciones en varios loci cromosómicos que se combinan para definir tanto el grado como el modelo de resistencia.^{9, 10}

También ha mostrado resistencia a las fluoroquinolonas, observándose como mecanismo de resistencia las alteraciones en el DNA girasa y en la topoisomerasa IV. Así mismo se ha notificado resistencia a estreptomycin, debido a que éste medicamento no suele vincularse con resistencia a otros antibióticos, por tanto, la espectinomycin puede utilizarse para cepas de *N. gonorrhoeae* resistente a múltiples antibióticos.⁹

Las cefalosporinas de tercera generación siguen siendo eficaces como tratamiento en única dosis de la gonorrea, sin embargo, hay evidencia reciente que su concentración inhibitoria mínima contra las cepas de gonococos se está incrementando.⁹

- Profilaxis

Como método profiláctico contra la oftalmia neonatal se instauró el método de Credé, el cual consiste en la limpieza de ambos ojos de todo recién nacido después del nacimiento y aplicación de Nitrato de Plata al 1% en ambos sacos conjuntivales. En un inicio la profilaxis era con Nitrato de Plata al 2%, sin embargo, se observó la aparición de conjuntivitis química, que desaparecía de 1 a 2 días después de instaurada, por lo que se redujo la concentración al 1%, sin afectar la efectividad del tratamiento para disminuir la

aparición de conjuntivitis química. A pesar de esto, un 10% de los recién nacidos siguen presentando conjuntivitis química.¹¹

El mecanismo de acción del Nitrato de plata consiste en la descamación de las células superficiales de la conjuntiva con inflamación subsecuente. Entre los aspectos negativos del método de Credé se encuentra el que no proporciona protección absoluta y produce efectos secundarios como la conjuntivitis química, también cuenta con aspectos positivos como; el bajo costo, fácil acceso y una alta sensibilidad al gonococo sin que se conozca producción de resistencia.¹¹

Es necesario tener ciertas precauciones al momento de aplicar el método de Credé, entre ellas se encuentra el correcto envasado y evitar el almacenamiento prolongado, realizando recambios diariamente para evitar el aumento de la concentración en la solución y así evitar apareamiento de conjuntivitis química; por lo tanto, es importante que los contenedores de la solución sean de color ámbar para evitar la inactivación y estar libres de alcoholes. Es importante que no se repitan la dosis de nitrato de plata, ni utilizarlo como tratamiento.¹¹

2.3.1.2 *Staphylococcus aureus*

- Características microbiológicas

Es una bacteria Gram positiva perteneciente a la familia *Micrococcaceae*, formada por cocos con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas en tinción de Gram. Estos microorganismos son positivos para catalasa, (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre) diferenciándolos de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, que son catalasa negativos. Estas son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. El género *Staphylococcus* contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, de los cuales, se ha demostrado que más del 30% son patógenos.^{12, 13}

- Medios de aislamiento

En los medios de cultivo tradicionales la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro, estas se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, la mayoría de las cepas producen β -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en Agar sangre. *S. aureus* se diferencia de las demás especies por producir coagulasa, una enzima de superficie que convierte fibrinógeno en fibrina. Estuches de látex elaborados para detectar proteína A y factor aglutinante también la distinguen de otras especies de estafilococos. Asimismo, fermenta manitol, posee proteína A y produce DNAsa.¹²

- Epidemiología

Es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, bacteria oportunista que forma parte de la microbiota humana; cerca del 25 al 50% de las personas puede colonizarse de manera persistente o transitoria. Es importante mencionar que poco tiempo después del nacimiento, los neonatos son colonizados por esta bacteria, siendo los lugares más frecuentes de colonización el muñón del cordón umbilical, la región perineal, piel y en ocasiones el tracto digestivo. Sin embargo, la tasa de colonización es más alta en pacientes diabéticos insulino dependientes, individuos infectados con VIH, pacientes bajo tratamiento hemodialítico y personas con lesiones cutáneas. La parte anterior de las fosas nasales es el sitio más frecuente de colonización humana, aunque también se coloniza la piel, vagina, axila, perineo y orofaringe, sirviendo de reservorio para las cepas e infecciones futuras. En general es una causa importante de infecciones hospitalarias, siendo los aislados nosocomiales cada vez más resistentes a múltiples fármacos. De igual manera sigue siendo causa importante de infecciones cutáneas y de partes blandas a nivel extrahospitalario.^{12, 13}

- Factores de virulencia

Produce una gran variedad de proteínas, contribuyendo a su capacidad de colonizar y causar enfermedades en el ser humano. La mayoría de las cepas producen una gran variedad de proteínas y citotoxinas; dentro de las cuales se encuentran cuatro hemolisinas (alfa, beta, gama y delta), nucleasas, lipasas, proteasas, hialuronidasa y

colagenasa. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina. En la tabla 2.1 se presenta la clasificación de los factores de virulencia que posee *S. aureus*, tomando en cuenta si son estructuras propias de la bacteria o si son enzimas o toxinas.¹⁴

Tabla 2.1
Principales factores de virulencia de *S. aureus*

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglucano	Catalasa	Toxina alfa (Hemolisina α)
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina β
Factores de adhesión	Lipasas	Hemolisina γ
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina δ
Polisacáridos capsulares	Nucleasas	Leucocidina de Pantone- Valentine (PVL)
	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas (SE)
	Estafilocinasa	Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)

Fuente: RevBiomed 2006; 17:287-305¹⁴

- Patogenia

Las bacterias de este tipo desencadenan una reacción inflamatoria que se caracteriza al principio por una respuesta intensa de leucocitos polimorfonucleares (PMN) e infiltración posterior de macrófagos y fibroblastos. Si la respuesta celular del hospedador no detiene la infección, ésta se diseminará hacia los tejidos vecinos o al torrente sanguíneo. Es importante destacar que, la enfermedad por estafilococos mediada por toxinas no siempre surge una infección clínica.¹²

- Resistencia antimicrobiana

En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes. La adquisición de esta resistencia se debe principalmente al intercambio de manera horizontal de genes que son transportados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones (Tn) y secuencias de inserción (IS).¹⁴

La introducción de la penicilina a principios de los años 40 como tratamiento abatió de manera importante las enfermedades ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, un año después de su utilización ya se tenían cepas resistentes a la penicilina. Debido a esto, a finales de los años 50 se introdujeron cefalosporinas estables a penicilinasas y penicilinas semisintéticas. Entre éstas estuvo la meticilina, como antibiótico de elección, sin embargo, para el año de 1960 ya se había detectado la primera cepa de *S. aureus* resistente a meticilina.¹³

2.3.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

- Características microbiológicas

Son un grupo heterogéneo de bacterias Gram negativas que tienen en común la incapacidad para fermentar lactosa. La patogenicidad depende del oportunismo; las excepciones son los microorganismos que causan melioidosis y muermo, los cuales son considerados agentes infectivos primarios. *Pseudomonas aeruginosa*, es el microorganismo patógeno principal del grupo de las *Pseudomonas* y se identifica por ser un bacilo Gram negativo ligeramente curvado que crece mejor en aerobiosis, es muy versátil nutritivamente y no fermenta hidratos de carbono, pero produce ácido a partir de azúcares como la glucosa, fructosa y lactosa o sacarosa; es causante de numerosas infecciones en los pacientes hospitalizados y personas con fibrosis quística.¹⁵

- Epidemiología

Se encuentra sobre todo en ambientes húmedos. La tierra, las plantas, los vegetales, el agua corriente y las cubiertas pueden actuar como reservorio para este microorganismo, debido posiblemente a sus necesidades nutricionales simples. Se ha observado que la infección a menudo ocurre de forma simultánea con disminución de las defensas del hospedador, traumatismo de la mucosa, alteraciones fisiológicas y supresión de la microbiota normal por uso de antibióticos.¹⁵

- Patogenia

Esta bacteria produce una amplia variedad de factores de virulencia, por lo tanto, la patogénesis de esta bacteria puede ser descrita como multifactorial. Algunos de estos

factores son el flagelo, fimbrias (pili), matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas y biopelículas. Algunos bastante estudiados son el alginato (producido por un subgrupo de cepas), polímero de polisacáridos, que facilita la adherencia a la superficie epitelial pulmonar, es una barrera para los fagocitos, para los antibióticos, inhibe a los anticuerpos y atenúa la respuesta del hospedero. La exotoxina A daña el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y afecta la respuesta del hospedero a la infección. El sistema de secreción de tipo III es el responsable por la secreción de las toxinas exoS, exoT, exoU y exoY; las primeras 3 han sido vinculadas a la virulencia. En la tabla 2.2 se describen los posibles factores de virulencia para *P. aeruginosa*.^{15, 16}

Tabla 2.2
Posibles factores de virulencia para *P. aeruginosa*

Sustancia y organelo	Función	Virulencia en la enfermedad en animales
Vellosidades	Adhesión a las células	¿?*
Flagelos	Adhesión, motilidad, inflamación	Sí
Lipopolisacáridos	Actividad antifagocítica, inflamación	Sí
Sistema de secreción tipo III	Actividad citotóxica (ExoU)	Sí
Proteasas	Actividad proteolítica, citotoxicidad	¿?*
Fosfolipasas	Citotoxicidad	¿?*
Exotoxina A	Citotoxicidad	¿?*

*No existe evidencia de virulencia en enfermedad en animales.

Fuente: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, HauserSL, JamesonJL, Loscalzo J editores. Harrison Principios de Medicina Interna.¹⁵

- Diagnóstico

Es un bacilo Gram negativo móvil, que se cultiva con facilidad y crece en la mayor parte de los medios de cultivo comunes, los cuales incluyen Agar- sangre y Agar MacConkey. La identificación de este microorganismo es fácil en el laboratorio en el cultivo primario por la producción de un pigmento que le confiere un color amarillento verdoso o incluso azulado. Las colonias tienen un aspecto metálico brillante y un olor a frutas típico. Las dos características bioquímicas que permiten su identificación son la

incapacidad para fermentar lactosa en el agar MacConkey y la reacción positiva en la prueba de oxidasa.¹⁵

2.3.1.4 *Streptococcus pneumoniae*

- Fisiología y estructura

Es un coco Gram positivo encapsulado, cuyas células tienen un diámetro de 0.5 a 1.2 μm , con forma ovalada o de lanceta, y se disponen en parejas (diplococos) o en cadenas cortas. La morfología de las colonias es variable. El microorganismo es exigente desde el punto de vista nutricional, ya que solo es capaz de crecer en medios enriquecidos complementados con productos sanguíneos. Puede fermentar varios carbohidratos, siendo el ácido láctico el principal derivado metabólico, además crece con dificultad en los medios con concentraciones elevadas de glucosa debido a que el ácido láctico alcanza rápidamente valores tóxicos en estas preparaciones. Como todos los estreptococos, carece de actividad catalasa. A no ser que se le proporcione una fuente de catalasa, la acumulación de peróxido de hidrógeno inhibe el crecimiento de *S. pneumoniae*, como se observa en el agar chocolate.¹⁷

Las cepas virulentas se encuentran recubiertas de una capa de polisacáridos compleja. Los polisacáridos capsulares se han utilizado para la clasificación serológica de las cepas y en la actualidad se han identificado más de 90 serotipos diferentes. La capa de peptidoglucano de la pared celular del neumococo es la característica de un coco Gram positivo. El otro componente fundamental de la pared celular es el ácido teicoico. En la pared del neumococo hay dos formas de ácido teicoico, una de las cuales se halla expuesta en la superficie celular el cual se une a la capa de peptidoglucano extendiéndose a través de la capsula que lo rodea y otra está unida de forma covalente a los lípidos de la membrana plásmica.¹⁷

El polisacárido C precipita una fracción de las globulinas séricas (proteína C reactiva [CRP]) en presencia de calcio. La CRP está presente en bajas concentraciones en personas sanas, pero aparece a concentraciones elevadas en pacientes con enfermedades inflamatorias agudas. El ácido teicoico unido a los lípidos en la membrana citoplásmica bacteriana recibe el nombre de antígeno F debido a su capacidad de producir reacción cruzada con los antígenos de superficie de Forssman de las células de

mamíferos. Ambas formas del ácido teicoico se asocian a residuos de fosfocolina. La fosfocolina es unida de la pared celular de *S. pneumoniae* y juega un papel regulador importante en la hidrólisis de la misma.¹⁷

- Patogenia e inmunidad

Las manifestaciones de la enfermedad se deben a la respuesta del organismo anfitrión frente a la infección en mayor medida que a la producción de factores tóxicos del microorganismo. Este es un patógeno humano que coloniza la bucofaringe, es capaz de diseminarse a los pulmones, senos paranasales, oído medio y a través de la sangre puede llegar al cerebro. La colonización es mediada por la unión de las bacterias a las células epiteliales por de adhesinas de superficie, su migración hacia vías respiratorias inferiores se impide cuando las bacterias están rodeadas de mucosidad y son eliminadas mediante células de epitelio ciliado, sin embargo, las bacterias lo neutralizan a través de una proteasa de IgA secretora y una neumolisina, ya que esta crea poros y destruye a las células del epitelio ciliado y a las células fagocíticas.¹⁷

Una de las características de las infecciones neumocócicas es la movilización de células inflamatorias hacia el foco de infección, este proceso es mediado por el ácido teicoico neumocócico, fragmentos de peptidoglucano y neumolisina; estos activan a ruta alternativa del complemento, produciendo C5a. La neumolisina activa la ruta clásica del complemento produciendo C3a y C5a. En consecuencia, de lo anterior los leucocitos fabrican citocinas como IL-1 o TNF-a, provocando migración de células inflamatorias a las zonas de infección, fiebre, daño tisular y otros signos de infección estreptocócica.¹⁷

El *S. pneumoniae* sobrevive a la fagocitosis como consecuencia de la protección antifagocítica que le proporcionan su cápsula y la inhibición de la actividad oxidativa fagocítica de la célula mediada por neumolisina, la cual es necesaria para producir la destrucción intracelular. Los polisacáridos libres pueden proteger a los microorganismos virales de la fagocitosis al unirse con los anticuerpos opsonizantes.¹⁷

- Epidemiología

Este microorganismo habita con frecuencia en la faringe y nasofaringe de personas sanas y se transmite a través de gotitas respiratorias. La colonización es más frecuente en niños que en adultos, tiene lugar inicialmente alrededor de los seis meses de

edad, la ecología de la nasofaringe neumocócica varía según la región geográfica, nivel socio económico, clima, grado de hacinamiento y la intensidad del contacto con otros niños. La frecuencia varía de acuerdo a la época del año y es mayor durante los meses fríos en los climas templados; con el sexo, es más común en varones que en mujeres; es posible que contribuyan el nivel socio económico y la prevalencia de otros factores de riesgo, existe una relación bastante clara entre una infección viral del aparato respiratorio y riesgo de una infección neumocócica.^{17, 18}

La introducción de vacunas ha reducido su incidencia, aunque sigue siendo una causa frecuente de neumonía bacteriana, meningitis, otitis media, sinusitis y bacteriemia extrahospitalaria. La incidencia de la enfermedad es más alta en ancianos y niños, ya que sus concentraciones de anticuerpos son más bajas.^{17, 18}

2.3.1.5 *Escherichia coli*

- Características generales

Es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Muchas de las cepas son capaces de producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia (O 157).¹⁹

Es un bacilo corto Gram negativo, catalasa positiva, oxidasa negativa y anaerobio facultativo. La mayoría de cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar.¹⁹

Sus cepas se pueden diferenciar serológicamente en relación a los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). El antígeno O es un polisacárido termoestable, que forma parte del lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de la bacteria. El antígeno K corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la bacteria. La combinación específica de los antígenos O y H define el serotipo de una bacteria, en tanto que la identificación del antígeno somático hace referencia al serogrupo de la cepa de *E. Coli*.¹⁹

El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, algunas especies son móviles (por flagelos peritricos), no esporulados, reducen los nitratos a nitritos.¹⁹

- Factores que afectan al crecimiento y supervivencia.

Posee capacidad para sobrevivir en condiciones acidas (pH 2,5 a 3), crecer a muy bajas temperaturas (7°C) y permanecer viables durante varios meses en productos congelados.¹⁹

- Patogenia e inmunidad

Posee una amplia variedad de factores de virulencia. Además de los factores generales que comparten todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, las cepas se pueden clasificar en dos categorías generales: adhesinas y exotoxinas.¹⁹

- Epidemiología

En el tubo digestivo existen grandes cantidades de *E. Coli*. Aunque estos microorganismos pueden comportarse como patógenos oportunistas cuando el intestino se perfora y las bacterias acceden a la cavidad peritoneal, la mayoría de las cepas que causan enfermedad digestiva y extra intestinal lo hacen porque han adquirido factores de virulencia secundarios codificados en plásmidos, islotes de patogenicidad o en ADN de bacteriófagos.¹⁹

- Diagnóstico

E. Coli se aísla en medios como McConkey o eosina azul de metileno, estos permiten la diferenciación de las bacterias intestinales por sus características morfológicas y de afinidad a la lactosa. Para la identificación de la bacteria a nivel de especie, se utilizan métodos automatizados. Para la tipificación serológica se identifican los antígenos: somáticos, flagelar y capsular.¹⁹

Otras alternativas para identificar cualquier grupo, se basan en técnicas de recombinación genética que permiten el desarrollo de sondas moleculares para la identificación de secuencias de genes relacionados con la producción de factores de patogenicidad de enterobacterias. Estas sondas están elaboradas con secuencias específicas de DNA marcado con fósforo radioactivo o con enzimas, que en un proceso de hibridación reconocen secuencias de DNA complementarios.¹⁹

Una técnica de biología molecular muy utilizada actualmente es la amplificación de secuencias específicas para un factor de virulencia (enterotoxinas, citotoxinas, adherencia, invasividad) de una cepa en particular por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹⁹

2.3.2 Infecciones neonatales

Son las infecciones que se presentan en recién nacidos menores de 28 días, causadas predominantemente por agentes infecciosos bacterianos, como se muestra distribuido en la siguiente tabla:

Tabla 2.3
Infecciones neonatales y sus agentes infecciosos

Patologías	Agentes infecciosos				
	<i>E. coli</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Oftalmía		X	X	X	
Otitis media aguda			X	X	X
Diarrea	X			X	
Síndrome hemolítico urémico	X			X	
Infección del tracto urinario	X		X		
Bronconeumonía	X		X	X	X
Infecciones cutáneas	X		X	X	X
Osteoartritis				X	
Enterocolitis necrotizante	X			X	
Meningitis	X		X	X	X
Sepsis	X		X	X	X

Fuente: Tapia JL. González A. Neonatología. 3 ed. Santiago, Chile: Editoreal Mediterraneo. 2008.²

2.3.3 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Para determinar la sensibilidad de las bacterias se tienen dos técnicas, la dilución que proporciona resultados cuantitativos (concentración mínima inhibitoria, CMI) mientras que la difusión da resultados cualitativos: sensible (si existe una buena probabilidad de éxito en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.), intermedia (cuando el éxito es imprevisible y se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones) y resistente (si la probabilidad es nula o muy reducida, no se esperar ningún efecto sea cual fuere el tipo de tratamiento). Ambos métodos son parecidos ya que hay una similitud directa entre el diámetro del halo de inhibición con un disco y la CMI.²⁰

El método de disco difusión (Kirby-Bauer) consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Müller Hinton (MH) previamente inoculado con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurriendo 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.²¹

Procedimiento para preparar el inóculo:

- Selección de colonias: es uno de los pasos más importantes. Involucra la selección de colonias apropiadas para la prueba, suspensión en caldo y la estandarización de la suspensión. Se seleccionan varias colonias (3 a 5 colonias), en vez de solo una; utilizando una herramienta de inoculación (un hisopo de algodón) se seleccionan solo colonias bien aisladas. Si no se dispone de colonias bien aisladas, se realiza un subcultivo en una nueva placa.²¹
- Preparación y estandarización de la suspensión del inóculo: Existen dos métodos para la preparación de inóculo: suspensión directa de colonias y fase logarítmica de crecimiento. Solo el método de suspensión directa de colonias proveerá resultados precisos para ciertos organismos. En ambos métodos, la turbidez de la suspensión debe ser estandarizada al estándar 0.5 de McFarland (lo que corresponde a aproximadamente 1.5×10^8 CFU/ml). Las suspensiones así ajustadas deben utilizarse como inóculo dentro de los 15 minutos siguientes.²¹

- Suspensión directa de colonias: Las colonias no deben sobrepasar las 18 a 24 horas de aislamiento. Se tiene que estandarizar el inóculo al mismo tiempo que se va a preparar la suspensión. Suspender las colonias en solución salina o caldo (MüllerHinton o soya triptica). Luego ajustar el inóculo a la turbidez equivalente a la estándar 0.5 de McFarland.²¹
- Método de fase logarítmica: Una vez que se han inoculado las colonias en un caldo, se incuban a 35 °C para lograr un crecimiento en fase logarítmica. El crecimiento de fase logarítmica ocurre después de 2 a 8 horas de incubación.²¹
- Inoculación de la placa: antes de abrir el contenedor de los discos esperar a que los discos se equilibren a la temperatura ambiente durante una a dos horas para minimizar la condensación y reducir la posibilidad de que la humedad afecte la concentración de los agentes antimicrobianos. Luego de sumergir el hisopo de algodón estéril en la suspensión, remover el exceso de líquido del hisopo presionándolo contra la pared del tubo.²¹
- Inoculación de la placa: empezando de la parte superior de la placa de agar MH inocular la superficie con el hisopo en forma paralela. Rotar la placa aproximadamente 60° y repetir el procedimiento de frotado. Rotar otra vez la placa 60° y frotar toda la placa por tercera vez. Esto garantiza que el inóculo sea distribuido homogéneamente. Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario pueden haber problemas en la realización de las lecturas. Se tiene que incubar la placa dentro de los 15 minutos siguientes después de haber estandarizado el inóculo.²¹
- Dejar secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos antimicrobianos.²¹
- Aplicación de los discos antimicrobianos: estos deben ser colocados con dispensador o pinza estéril. Estos tiene que ser colocados dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación de la placa de agar MH. Luego de estar sobre el agar se deben presionar los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 milímetros (mm) del borde de la placa y deben distribuirse de manera de que no haya superposición de los halos de inhibición.

Se pueden aplicar hasta 12 discos en una placa de 150 mm de diámetro o hasta 5 discos en una placa de 100 mm. Invertir la placa para incubarlas.²¹

Luego de colocados los discos, las placas deben incubarse de 35 °C a 37 °C. Las placas deben de colocarse de forma invertida para que el agua condensada no caiga sobre el agar, lo que cambiaría las condiciones del medio y por lo tanto no serviría para la lectura de los halos.²¹

Medición de las zonas de inhibición (luz reflejada): después de retirar la placa de la incubadora, examinar la placa para verificar el crecimiento uniforme y confluyente de tal modo que se pueda identificar las zonas sin crecimiento bacteriano. Medir las zonas de inhibición desde la parte posterior de la placa usando luz reflejada se puede utilizar una regla o un calibrador.²¹

Se utilizan tablas estándar, para interpretar el diámetro de la zona de concentración inhibitoria mínima. Según *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en Estados Unidos.²²

2.3.3.1 Control positivo

Son aquellos en donde se espera que el grupo de control brinde un resultado positivo y permiten al investigador demostrar que fue capaz de producir resultados. En general, se utilizará una sustancia de efecto ya conocido en vez de la sustancia que se desea ensayar.²³

- **Penicilina**

Su estructura consiste en un anillo de tiazolidina unido a otro anillo lactámico β . Su propio núcleo constituye el elemento estructural básico para la actividad biológica. Ejerce una acción bactericida que se desarrolla fundamentalmente en la última fase de la síntesis del peptidoglicano de la pared celular, uniéndose a una enzima transpeptidasa llamada proteína fijadora de penicilina, responsable de producir una serie de enlaces cruzados entre las cadenas de péptidos (estos confieren una mayor rigidez a la pared bacteriana). Por lo tanto, al inhibir la síntesis de peptidoglicano no se forma la pared celular bacteriana, provocando que estas estallen o sean más fácilmente fagocitadas por los granulocitos. Es activa contra *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* del grupo B, C y G, *Streptococcus*

pneumoniae, *Neisseria sp*, *Clostridium tetani*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus sp*, *Bacteroides sp*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* y *Enterobacteriae*.²⁴

- **Vancomicina**

Es un antibiótico glucopéptido tricíclico que es activo contra un espectro amplio de bacterias Gram positivas, pues actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana al interferir en la incorporación de las subunidades peptídicas N- acetilmurámico y N- acetilglucosamina a la matriz de peptidoglicano de la pared celular, sin embargo, por su gran tamaño molecular, no puede penetrar la membrana externa de bacterias Gram negativas. Su espectro de acción es con *Staphylococcus coagulasa* negativo meticilinoresistente, *S. pneumoniae* resistente a cefalosporina, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium jeikeium* y *Clostridium difficile*.²⁴

- **Piperacilina/ tazobactam**

Es un antibiótico inhibidor de betalactamasa combinado con una penicilina de espectro extendido, pertenece al grupo de las ureidopenicilinas, su mecanismo de acción es la inhibición de ciertas betalactamasas y el de la síntesis de la pared celular. Actúa contra *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aureginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxellacatarrhalis*.²⁴

- **Ciprofloxacina**

Antibiótico que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas de segunda generación, estas actúan contra la DNA girasa bacteriana y la topoisomerasa IV por lo que se consideran bactericidas potentes contra *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *P. aureginosa*, *Campylobacter* y *Neisseria*, también comprenden especies de *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella* y *Mycobacterium*. Por ser de segunda generación tiene mayor acción a bacilos Gram negativos aerobios.²⁴

2.3.3.2 Control negativo

Consiste en utilizar el grupo de control para asegurarse de que ninguna variable de confusión haya afectado los resultados o eliminar las posibles fuentes de sesgo. Se utiliza una muestra que no se espera que funcione, generalmente es agua purificada estéril o solución salina en vez de la sustancia que se desea ensayar.²³

- **Solución salina**

Es una solución estéril de cloruro de sodio al 0.9% en agua.²⁵

2.3.4 Leche materna

Es un término usado en forma genérica para señalar una alimentación única del recién nacido y lactante, a través del seno materno permitiendo que la madre transfiera sus mecanismos de defensa al recién nacido.³

La lactancia materna puede darse de diferentes maneras:

- Exclusiva: al bebé no se le da otro alimento o bebida que no sea leche materna, incluyendo agua.
- Predominante: el bebé es amamantado, pero también recibe pequeñas cantidades de agua o bebidas a base de agua.
- Completa: bebé es alimentado exclusiva o predominantemente al pecho.
- Parcial: se amamanta algunas veces y otras veces se les da alimentos artificiales.
- Complementaria oportuna: al bebé se le dan otros alimentos además de la leche materna, después de los 6 meses.
- Destete: proceso que consiste cuando él bebé empieza a ingerir otro alimento o leche, distinto a la lactancia materna y se completa cuando ya no toma más leche materna.³

2.3.4.1 Fisiología de la lactancia

La lactancia materna se activa a través de mecanismos fisiológicos y psicológicos que se inician antes del acto de amamantamiento, para ello el desarrollo mamario debe atravesar de 3 fases para alcanzar la lactancia:

- Mamogénesis

Es el desarrollo y crecimiento mamario que ocurre a las pocas semanas de embarazo. Este se debe a la producción de estrógenos y progesterona que estimulan la proliferación del tejido glandular y conductos mamarios.²⁶

- Lactogénesis

Es el proceso destinado a la producción láctea, esta comienza al expulsarse la placenta, pues esto disminuye los niveles de estrógeno y especialmente de progesterona los cuales inhiben la acción lactogénica de la prolactina durante el embarazo. Esta hormona actúa a nivel de las células epiteliales alveolares, estimulando la síntesis de componentes lácteos, por lo general, de 30 a 40 horas después del parto, luego hay un aumento en la cantidad de leche en el segundo y quinto día postparto.²⁶

- Galactopoyesis

Es el mantenimiento de la lactancia y este dependerá del reflejo de succión del pezón el cual aumenta la liberación de prolactina y oxitocina. Es necesario que los niveles de prolactina se mantengan altos para que los alveolos produzcan leche, por lo cual se debe amamantar al niño no menos de 8 veces al día.²⁶

Los impulsos sensoriales que llegan a la pituitaria desde el pezón hace que se segregue la prolactina por el torrente sanguíneo, el cual actúa a nivel de las células musculares que rodean los alveolos, haciéndolos contraerse y expulsando la leche hacia los conductos y posteriormente a los senos lactíferos. En los cuatro primeros días se produce calostro, con mayor contenido en proteínas, sales, menos grasa y lactosa. Este es rico en anticuerpos IgA por lo que su toma ofrece protección a las infecciones.²⁶

2.3.4.2 Tipos de leche materna

Su composición varía según la etapa de la lactancia y extracción de la misma. Debemos distinguir dentro de la leche materna calostro, leche de transición y leche madura, si proviene directamente la glándula mamaria o de un banco de leche.³

✓ Calostro

Se secreta durante los primeros días luego del parto. Es un fluido espeso y amarillento debido a la alta concentración de beta carotenos. Su volumen puede variar entre 2 a 20 ml por toma en los 3 primeros días. Esto es suficiente para satisfacer las necesidades del recién nacido. Tiene 67 Kcal. /100 ml. Tiene una mayor cantidad de vitaminas A, E, K, ácido sialico, colesterol, algunos minerales (sodio, hierro, zinc, azufre, potasio, manganeso, selenio), proteínas protectoras como la IgA y la lactoferrina y una gran cantidad de linfocitos y macrófagos que confieren al recién nacido una eficiente protección contra los gérmenes del medio ambiente.³

✓ Leche de transición

Se produce ente el 4 y 15 día posparto. Se observa un aumento del volumen progresivo hasta llegar alrededor de 600- 700 ml/día entre el 8 y 15 día posparto. Esto puede variar según la mama y va variando día a día hasta alcanzar las características de la leche madura.³

✓ Leche madura

Se produce a continuación de la leche de transición. Se secreta en promedio alrededor de 700-900 ml/día durante los 6 meses posteriores al parto para luego descender a 500 ml/día durante los 6 meses siguientes. Los principales componentes de la leche materna son: proteínas, agua, lactosa, grasa, minerales y vitaminas. Su pH es neutro y su aporte energético está entre 70 a 76 Kcal/dl.³

✓ Leche almacenada

Es aquella proveniente de un banco de leche, que ha pasado por un proceso de selección, clasificación y pasteurización, destinada al consumo de recién nacidos, particularmente en unidades de terapia intensiva.³

✓ Leche recién extraída de la glándula mamaria

Es aquella extraída directamente de la glándula mamaria para el consumo inmediato del recién nacido.³

2.3.4.3 Composición de la leche materna

Los principales componentes de la leche materna son: agua, carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas y minerales. También contiene elementos traza como enzimas y hormonas de crecimiento.³

✓ Agua

La leche materna contiene un 88% de agua y su osmolaridad semejante al plasma, permite al niño mantener un perfecto equilibrio electrolítico.³

✓ Proteínas

La leche humana madura posee la concentración más baja de proteína (0,9 g/100 ml), esta es la cantidad adecuada para el crecimiento óptimo del niño. La proteína de la leche humana está compuesta de 30% de caseína y 70% de proteínas del suero. La caseína está formada por micelas complejas de caseinato y fosfato de calcio, mientras que las proteínas del suero son entre otras: alfa-lactoalbúmina, seroalbúmina, beta-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lactoferrina, lisozima, enzimas, moduladores del crecimiento, hormonas y prostaglandinas.³

Las inmunoglobulinas de la leche materna son diferentes a las del plasma, tanto en calidad como en concentración. La IgA es la principal inmunoglobulina en la leche materna. La IgG es la más importante del plasma y se encuentra en una cantidad 5 veces mayor que la IgA. La proporción de inmunoglobulinas en la leche se modifica progresivamente hasta llegar al nivel que se mantendrá en la leche madura, más o menos a los 14 días postparto. El calostro tiene 1740 mg/100 ml de IgA contra 43 mg/100 ml de IgG. La leche madura tiene 100 mg/100 ml de IgA contra 4 mg/100 ml de IgG. (3) La IgA protege tanto a la glándula mamaria como a las mucosas del lactante en el período en que la secreción de IgA en el niño es insuficiente.³

La lactoferrina además de su acción bacteriostática sobre ciertos gérmenes ferrodpendientes (*E. Coli*), contribuye a la absorción del hierro en el intestino del niño. La lisozima constituye un factor antimicrobiano no específico, pues tiene efecto bacteriolítico contra *Enterobacteriaceae* y bacterias Gram positivas. Contribuye a la mantención de la flora intestinal del lactante y además tiene propiedades anti-inflamatorias. Ocho de los veinte aminoácidos presentes en la leche son esenciales y provienen del plasma de la madre. El epitelio alveolar de la glándula mamaria sintetiza algunos aminoácidos no esenciales.³

La taurina es un aminoácido libre de la leche materna, que el recién nacido no es capaz de producir y este es necesario para conjugar los ácidos biliares y como posible neurotransmisor o neuromodulador del cerebro y la retina. La cistina es otro aminoácido que está combinado con la metionina en una proporción de 2:1, específica para la leche humana.³

✓ Hidratos de carbono

La lactosa es el principal hidrato de carbono de la leche, es un disacárido compuesto de glucosa y galactosa. La leche humana tiene un alto contenido de lactosa, 7 g/dl. Este parece ser un nutriente específico para el primer año de vida, ya que la enzima lactasa que la metaboliza sólo se encuentra en los mamíferos infantes mientras se alimentan con leche materna. Provee el 40% de la energía. La porción galactosa participa en la formación de los galactolípidos necesarios para el sistema nervioso central. La alta concentración de lactosa facilita la absorción del calcio y el hierro y promueve la colonización intestinal con el *Lactobacillus bifidus*, flora microbiana fermentativa que, al mantener un ambiente ácido en el intestino, inhibe el crecimiento de bacterias, hongos y parásitos. El crecimiento del *Lactobacillus* es promovido por el factor bífido, un carbohidrato complejo con contenido de nitrógeno, que no está presente en los derivados de leche de vaca.³

En la leche humana se han identificado más de 50 oligosacáridos de diferente estructura, muchos de los cuales contienen nitrógeno. Constituyen el 1,2% de la leche madura. Los componentes de estos azúcares complejos incluyen glucosa, galactosa, fructosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico y representan una porción significativa del nitrógeno no proteico de la leche humana.³

✓ Grasas

Es el componente más variable de la leche humana. Las concentraciones de grasa aumentan desde 2 g/100 ml en el calostro, hasta alrededor de 4 a 4,5 g/100 ml a los 15 días post parto, por ende, siguen siendo relativamente estables, pero con bastantes variaciones interindividuales tanto en el contenido total de grasa, como en la composición de los ácidos grasos. La composición de los ácidos grasos de la leche humana es relativamente estable, con un 42% de ácidos grasos saturados y 57% de poliinsaturados.³

Los ácidos grasos araquidónico y docosahexaenoico participan en la formación de la sustancia gris y en la mielinización de las fibras nerviosas, los cuales se forman a partir de los ácidos linoleico y linolénico respectivamente. Estos últimos se obtienen de la dieta de la madre. El contenido de ellos en la leche humana es 0,4 g/100 ml. La síntesis de las prostaglandinas depende de la disponibilidad de estos ácidos grasos esenciales. Estas se encuentran distribuidas ampliamente en el tracto gastrointestinal del niño y contribuyen en forma importante en los mecanismos generales de defensa. La leche humana puede contener cantidades significativas de prostaglandinas.³

✓ Vitaminas

La concentración de vitaminas en la leche humana puede variar según la ingesta de la madre.³

▪ Vitaminas liposolubles

La absorción de vitaminas liposolubles en el lactante está relacionada con la variabilidad de la concentración de la grasa en la leche materna.³

✓ Vitamina A

La concentración de vitamina A en la leche materna es mayor que en la leche de vaca. En el calostro es el doble que en la leche madura.³

✓ Vitamina K

La concentración es mayor en el calostro y en la leche de transición. Después de 2 semanas, en los niños amamantados, se establece la provisión de dicha vitamina por la microbiota intestinal.³

✓ Vitamina E

El contenido en la leche materna cubre las necesidades del niño a menos que la madre consuma cantidades excesivas de grasas poliinsaturadas sin un aumento paralelo de vitamina E.³

✓ Vitamina D

El contenido en la leche materna es bajo (0,15 mg/100 ml). En los niños amamantados con pecho exclusivo no se manifiestan deficiencias, probablemente debido a la presencia de vitamina D hidrosoluble en la fase acuosa de la leche humana en cantidades tan altas como 0,88 mg/100 ml. Esta vitamina D hidrosoluble no se procesa en el tracto gastrointestinal, sino a través de la piel en presencia de luz solar. Se necesita sólo una buena exposición al sol para producir suficiente de esta vitamina.³

▪ Vitaminas hidrosolubles

En estas vitaminas pueden ocurrir variaciones dependiendo de la dieta materna. Los niveles son más altos en las madres bien nutridas. La concentración de vitamina B12 en la leche humana es muy baja. Las usuarias de anticonceptivos orales por largo plazo pueden presentar niveles bajos de vitamina B6 en su leche.³

✓ Minerales

La concentración de la mayoría de los minerales en la leche humana: calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc, potasio y flúor, no es afectada por la dieta materna. Los mecanismos compensatorios, como una disminución en la excreción urinaria del calcio comienzan a actuar, y sólo en casos extremos se alterarán significativamente las reservas de los tejidos propios de la madre.³

✓ Hierro

La alta biodisponibilidad del hierro de la leche humana es el resultado de una serie de interacciones complejas entre los componentes de la leche y el organismo del niño: la mayor acidez del tracto gastrointestinal, la presencia de niveles apropiados de zinc y cobre, el factor de transferencia de lactoferrina, que impide que el hierro esté disponible para las bacterias intestinales, liberándolo sólo cuando los receptores específicos se unen a la transferrina.³

✓ Zinc

Las cantidades de zinc en la leche humana son pequeñas pero suficientes para cubrir las necesidades del niño sin alterar la absorción del hierro y del cobre.³

2.3.4.4 Otros componentes de la leche materna

✓ Hormonas

Las hormonas incluidas en la leche materna son: oxitocina, prolactina, esteroides suprarrenales y ováricos, prostaglandinas, GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), GRF (factor de liberación de hormona del crecimiento), insulina, somatostatina, relaxina, calcitonina y neurotensina, que se encuentran en la leche en niveles mayores que los de la sangre materna y la TRA (hormona de liberación de la tirotrópina), TSH (hormona tiroideo estimulante), tiroxina, triyodotironina y eritropoyetina, en niveles menores que los del suero materno.³

✓ Nucleótidos

En la leche materna, están presentes nucleótidos, que afectan la absorción de las grasas y numerosos factores de crecimiento, entre los que se incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF I - II y III) y el factor de crecimiento de nervios (NGF) entre otros.³

✓ Enzimas

Las múltiples enzimas de la leche materna tienen diversas funciones. Algunas reflejan los cambios fisiológicos que ocurren en las mamas; otras son importantes para el desarrollo neonatal (enzimas proteolíticas, peroxidasa, lisozima, xantino-oxidasa) y otras aumentan las enzimas digestivas propias del infante (alfa-amilasa y lipasa estimulada por sales biliares). Muchas de ellas se encuentran en concentraciones más altas en el calostro que en la leche madura. La lisozima es bacteriolítica contra bacterias Gram positivas y puede proteger contra algunos virus. Hay enzimas que tienen funciones inmunológicas directas y otras que pueden actuar en forma indirecta, promoviendo la maduración celular.³

Tabla 2.4
Componentes de la leche materna.

Nutriente	Calostro	Leche madura
Agua	87	88
Calorías	58	70
Proteínas totales (g/100 ml)	2.3	0.9
Caseína (g/100 ml)	0.14	0.25
Nitrógeno total (mg/100 ml)	2.3	0.9
Lactoalbúmina (mg/100 ml)	218	161
Lactoferrina (g/100 ml)	0.33	0.17
IgA (g/100 ml)	0.36	0.14
Grasas totales (g/100 ml)	2.9	4.2
Colesterol (mg/100 ml)	28	16
Ácido linoleico (% de la grasa)	6.8 %	8.3 %
Lactosa (g/100 ml)	5.3	7.3
Vitamina A (mcg/100 ml)	89	47
Vitamina D (mcg/100 ml)	Trazas	0.004
Vitamina E (mcg/100 ml)	1280	315
Vitamina K (mcg/100 ml)	0.23	0.21
Biotina (mcg/100 ml)	0.06	0.6
Vitamina B12 (mcg/100 ml)	200	26
Ácido ascórbico (mcg/100 ml)	4.4	4.5
Magnesio (mg/100 ml)	4	3.5
Calcio (mg/100 ml)	23	28

Potasio (mg/100 ml)	74	58
Sodio (mg/100 ml)	50	15
Fósforo (mg/100 ml)	16	15
Cloro (mg/100 ml)	70	42
Azufre (mg/100 ml)	22	14
Cobre (mcg/100 ml)	46	35
Hierro (mcg/100 ml)	45	40
Yodo (mcg/100 ml)	12	7

Fuente: S c Shellhorn, V Valdés. La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca.³

2.3.4.5 Cualidades inmunológicas de la leche materna

La leche materna es de gran complejidad biológica. Además de proteger activamente es inmunomoduladora y contiene además muchos componentes antiinflamatorios cuyo mecanismo de acción aún no se conoce. El calostro y la leche madura tienen componentes antiinfecciosos tanto humorales como celulares.³

- Componentes humorales

Son las inmunoglobulinas IgA, IgM, IgG, lisozima y otras enzimas, lactoferrina, factor bífido, interferón, gangliósidos, prostaglandinas y otras sustancias inmunoregulatoras. La mayor concentración de inmunoglobulinas se encuentra en el calostro de todas las especies y va decreciendo en la medida que transcurre el tiempo de lactancia.^{3, 27}

La mayor fracción de la IgA se produce por el mecanismo bronco-entero-mamario como reacción a los gérmenes con los que la madre ha estado expuesta. En el tejido linfático contiguo al tubo digestivo y a la mucosa respiratoria materna se generan linfocitos que luego viajan a la glándula mamaria dando a la leche materna células inmunológicamente activas que secretan inmunoglobulinas específicas (IgA, IgA secretora); Se cree que los anticuerpos de la IgA agrupan a las toxinas, a las bacterias y a los antígenos macromoleculares, impidiendo de ese modo su acceso al epitelio.³

- Componentes celulares

Los leucocitos están en una concentración similar a la que se encuentran en la sangre periférica, sin embargo, hay un predominio de macrófagos en vez de neutrófilos. De la actividad de los elementos celulares de la leche se sabe todavía muy poco. Los macrófagos son los que están en mayor cantidad seguidos por los linfocitos y luego los granulocitos neutrófilos. El mecanismo de acción es la fagocitosis y la secreción de algunas sustancias inmunológicas con cierta especificidad contra los gérmenes con los que la madre ha tenido exposición. Los macrófagos contienen a su vez IgA, lisozima y lactoferrina, cuya concentración es mayor en el calostro que en la leche madura.³

2.3.4.6 Experiencias *in vitro*

Se ha demostrado que la leche humana *in vitro* actúa contra diferentes agentes infectivos.

- Actividad antibacteriana

Ataca a *E.coli*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* (6 grupos), *Shigella*, *Streptococcus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* entre otros.³

- Actividad antiviral

Poliovirus tipos 1, 2, 3, Coxsackie tipos A9, B3, B5, Ecovirus tipos 6, 9, rotavirus, citomegalovirus, reovirus tipo 3, virus rubeola, Herpes simple, parotiditis, influenza, sincitial respiratorio entre otros.³

- Actividad antiparasitaria

Giardia lamblia, *Entamoeba histolytica*, *Schistosomamansoni*, *Cryptosporidium*. La IgM y la IgG *in vitro* actúan contra los lipopolisacáridos de *Vibrio cholerae*, *E. coli*, virus rubeola, citomegalovirus, virus sincitial. La IgA se mantiene estable a 56°C durante 30

minutos y se destruye a la ebullición, la IgM se destruye a 62,5°C durante 30 minutos y la IgG disminuye a un tercio su actividad.³

- Otros componentes con rol inmunológico

- ✓ Lactoferrina

Es una glicoproteína producida en las células epiteliales por los granulocitos neutrófilos y monocitos macrófagos, además posee una acción bacteriostática potente contra *S. aureus*, *E. coli*, *V. cholerae* y *P. aeruginosa*, por bloqueo de la síntesis de ARN de las bacterias.³

- ✓ Lisozima

Tiene la propiedad de separar los péptidos de la pared celular bacteriana y posee una acción bactericida en presencia de IgAs y del factor C3 del complemento *contra E. Coli* y *Salmonella Spp.* Mientras que en presencia de vitamina C ataca entero bacterias y gérmenes Gram positivos.³

- ✓ Lactoperoxidasa

In vitro presenta actividad contra *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*.³

- ✓ Factor bífido

Es un carbohidrato específico (que contiene nitrógeno), que en presencia de lactosa promueve la colonización intestinal por el lactobacilo acidófilo. Es un bacilo anaerobio, inmóvil, Gram positivo que alcanza niveles elevados en el intestino delgado de los lactantes; estas mantienen una marcada acidificación intestinal y en unión de IgAs y lisozima, antagonizan el desarrollo de gérmenes intestinales como *E. coli*, *Shigella*, amebas y otros.^{3, 28}

✓ Componente C3 y C4 del complemento

Estos componentes provocan la lisis bacteriana al unirse con anticuerpos específicos (IgAs). Su concentración en el calostro es más baja que en el suero. Poseen actividad opsónica, quimiotáctica y bacteriolítica contra *E. Coli*.³

✓ Ácido neuramínico

El calentamiento de la leche materna hace que pierda su actividad antiviral y antibacteriana. Posee acción bacteriostática sobre *E. coli* y *S. aureus* y parece inhibir la adhesión del virus de la influenza a las células humanas.³

✓ Proteína insaturada unida a vitamina B12

Es una proteína de elevado peso molecular que ha sido encontrada en alta concentración en la leche materna, en el meconio y en heces de niños alimentados al seno materno. La proteína insaturada unida a vitamina B12, hace que esta vitamina sea inutilizable por la bacteria, para su crecimiento.³

✓ Lípidos

Los ácidos grasos insaturados y monoglicéridos: *in vitro* han demostrado actividad contra: *S. aureus*, virus Herpes simple, SemlikiForest virus, influenza, dengue, virus Ross River, encefalitis japonesa B, virus Sindbis y West Nile, *G. lamblia*, *E. histolytica*, *Trichomonas vaginalis*.³

✓ Propiedad antialérgica

La IgA del calostro y de la leche madura, recubre la mucosa intestinal y previene la absorción de macromoléculas extrañas cuando el sistema inmune del niño aún es inmaduro. Estas proteínas son específicas de la especie humana, por lo que los niños amamantados no desarrollan anticuerpos contra ellas.³

2.3.5 Protocolo de extracción de leche en los bancos de leche de Guatemala

2.3.5.1 Higiene y seguridad

Se debe asegurar las condiciones de higiene que deben cumplir todas las personas implicadas, para evitar contaminaciones secundarias. El acceso a las áreas de manipulación debe restringirse únicamente al personal implicado. Todos deben estar con el equipo de protección personal mínimo (guantes, bata, mascarilla, gorro) para asegurar la protección de leche y cumplir con los requisitos de bioseguridad.²⁹

Toda persona implicada debe ser instruida de manera verbal y escrita sobre la manera correcta de lavarse las manos y antebrazos utilizando agua, jabón antiséptico y secándolas con toallas de papel desechables en las siguientes condiciones:

1. Antes de realizar el procedimiento de extracción de leche materna.
2. Posterior al contacto con la leche materna.
3. Después de tocar materiales contaminados utilizados durante el procedimiento.²⁹

En áreas de extracción y manipulación de la leche materna es prohibido tanto para el donante como el encargado de la toma de muestras la utilización de relojes, joyas, entre otras.²⁹

Todas las donantes deben ser orientadas para lavarse adecuadamente las manos y antebrazos antes de realizar la extracción de leche materna. Por medidas de seguridad la donante debe usar gorro, mascarilla, bata. No se permite conversar, escupir, fumar, comer o beber durante la extracción de la leche materna.²⁹

Los materiales desinfectantes a utilizar deben ser aquellos productos de limpieza y desinfección que han sido formulados para la industria alimentaria, deben ser inodoros e incoloros. Para evitar la contaminación de la leche humana extraída se debe limpiar las aéreas de manipulación con alcohol isopropílico al 70% al iniciar y terminar el trabajo. La basura y el material de descarte deben ser eliminados en recipientes adecuados para este fin con tapadera acorde a la normativa de manejo de desechos hospitalarios. Todo instrumento utilizado en el procedimiento debe ser desinfectado con alcohol isopropílico al 70% después de cada extracción de leche materna.²⁹

2.3.5.2 Técnicas desinfectantes

- Técnica de limpieza

Frotar con un paño sobre las superficies retirando los residuos y secar con un paño o limpiador limpio.²⁹

- Técnica de desinfección

Frotar con un paño mojado en alcohol isopropílico 70% en toda la superficie, esperar 10 min y volver a frotar con otro paño con agua limpia, para luego secar con un paño seco y limpio.²⁹

- Técnica de descontaminación

Esta técnica busca corregir situaciones de contaminación por derrames con leche materna o cualquier otro tipo de fluido corporal. Para ello se debe cumplir con lo siguiente: colocar la solución desinfectante sobre la toalla de papel, cubrir las superficies contaminadas con las toallas de papel con solución para dejar en contacto por 30 minutos para después removerlo y aplicar nuevamente la solución directamente en el sitio de derrame y dejarlo por 10 minutos más, al finalizar secar con trapo limpio.²⁹

2.3.5.3 Bioseguridad

- Condiciones generales

Las normas generales para los encargados del muestreo es usar obligatoriamente el equipo mínimo de protección, mientras que las medidas y reglas de prevención de accidentes en el lugar de extracción de muestras se derivan en no usar frascos de vidrio roto y/o rajado.²⁹

- Condiciones específicas

Los accidentes microbiológicos durante la extracción de leche humana en lugares en donde se extrae leche materna y laboratorios de microbiología son por la contaminación accidental por microorganismos. Las infecciones pueden ocurrir a través de la piel, vías digestivas, y mucosa bucal, vías respiratorias y mucosa nasal, los ojos y oídos.²⁹

– Medidas y reglas de prevención de accidentes:

- Toda persona implicada en el proceso de extracción de leche materna debe tener conocimientos básicos sobre desinfección.
- Todo material utilizado debe ser posteriormente esterilizado.
- Equipo de protección básico (gorro, mascarilla, bata, guantes).
- Tras el contacto con material infeccioso, desinfectar las manos con alcohol isopropílico al 70% y lavarlas con agua corriente y jabón.
- Usar solamente paños o limpiadores esterilizados cuando se limpie la superficie de trabajo (mesas, banquillos. etc.).
- Evitar tener objetos personales en el lugar donde se extraen las muestras.
- Para manipulación de leche humana y otros fluidos corporales se exige la utilización de guantes descartables apropiados para estos procedimientos.²⁹

2.3.5.4 Donantes

La donación se basa en el artículo 35 del Reglamento que crea y regula el funcionamiento de los Bancos de Leche Humana en donde estipula que la donación de leche humana debe ser voluntaria, altruista, no remunerada”.²⁹

Al ingresar el donante al programa de obtención de muestras se deben realizar los siguientes pasos y en la secuencia que acá se estipula:

- Selección

Para el proceso de extracción la donante debe contestar el “Formulario de Registro de participantes”, previo a la entrevista se debe evaluar en la donante la presencia de malnutrición, anemia, ictericia, cianosis, disnea, inestabilidad física y/o mental, la donante

debe encontrarse saludable y aportar información sobre los medicamentos que pueda estar tomando y dar antecedentes sobre su salud, debe presentar su Documento Personal de Identificación DPI en el momento de la entrevista , el formulario nunca debe ser llenado por la persona donante.²⁹

- Característica de la madre donante

Se contarán con dos parámetros: Edad (madre donante mayor de 18 años) y fecha de parto para determinar el tipo de leche que será extraída.

- Condiciones de aceptación de la donante

Para ser aceptada en el programa de donación de muestras, la madre debe cumplir con una serie de requisitos: No fumar más de 10 cigarrillos por día, no usar medicamentos incompatibles con el amamantamiento, no haber consumido alcohol o drogas ilícitas, preferiblemente realizar exámenes (Hematología completa, VDRL, VIH) cuando la tarjeta de control de natalidad no estuviese disponible, estar en pleno uso de sus facultades mentales y firmar el consentimiento informado de aceptación.

- Donación de la leche materna extraída

En la primera y única donación se debe informar a la madre donante de forma oral el procedimiento que se realizará, el encargado de extracción le debe estar capacitado para responder cualquier pregunta que plantee la madre. Para el traslado de la leche materna extraída y congelada se tiene un periodo máximo de 6 horas para mantener una cadena de frío siguiendo siempre la normativa de transporte.²⁹

2.3.5.5 Extracción y recolección de la leche materna cruda

- Extracción de la leche materna

La calidad de una muestra extraída es el resultado del esfuerzo de un rigor apegado a las normas de bioseguridad. Bajo la perspectiva microbiológica, la calidad depende fundamentalmente de los cuidados higiénicos sanitarios tomados en la manipulación de la leche materna, sobre todo en la extracción, ya que pueden ser

eficaces los procedimientos para el mantenimiento de la calidad, pero son incapaces de revertir las alteraciones que pudieron ocurrir en fases anteriores. Cuanto menor sea el número de bacterias presentes en la leche materna cruda, mayor es el valor biológico y menor es el riesgo de no conformidades de calidad e inocuidad.²⁹

- Recepción y almacenamiento de leche materna extraída cruda

Toda muestra de leche materna debe tener una etiqueta en donde se especifique: día, mes y año. La muestra ya etiquetada debe de ser almacenada, para evitar alteraciones de oxidación y crecimiento bacteriano, esto se logra al almacenarla en cadena de frío ya que las bajas temperaturas minimizan estas complicaciones. Se pueden almacenar en un refrigerador común donde la temperatura no sobrepase los 5 °C, pero no debe permanecer más de 24 horas ya que la muestra después de este tiempo no se considera óptima. También se puede almacenar en un congelador a una temperatura de -3°C, en estas condiciones se puede mantener hasta por 15 días como máximo.³⁰

Al momento de recepción de muestras se debe verificar:

- Que haya sido transportada en temperaturas óptimas, verificándolo con el termómetro contenido en la caja isotérmica usada en el transporte.
- Que el envase contenga la etiqueta de identificación de la donante.
- No debe de existir alteración en la integridad del envase ni alteración física de la muestra de leche.
- Seleccionar las muestras que serán utilizadas para el estudio, si esto no se realiza en el momento de la recepción se deberá de almacenarlas bajo las condiciones antes descritas.³⁰

2.3.5.6 Selección y clasificación de la leche materna cruda

Toda muestra de leche materna recibida por los bancos de leche se deberá someter al proceso de selección y clasificación que se definirá a continuación.

- Criterios de clasificación y selección

Criterios para la selección, comprende la verificación de:

- Recipiente: debe de estar correctamente identificado, no debe de existir alteración de alguno de los datos de identificación. El envase en el que sea transportado no debe de presentar lesiones físicas como rajaduras o quebraduras y debe de estar cerrado adecuadamente. Si no se cumple alguno de estos criterios se descartará la muestra.³⁰
- Color: el color de la leche materna puede variar. Se tomará como normal si presenta coloración blanca, amarilla, anaranjada (debido a la presencia de caroteno) y verdosa (por consumo de vegetales, algas marinas). Si presenta coloración rosada, roja o café puede indicar contaminación con sangre por lo que se descartará la muestra.³⁰
- Flavor: es la percepción del estado de la leche basándose en el olor. Se descartarán las muestras que presenten olor a leche cortada (fermentación), jabón de coco (rancificación), pescado (proteólisis) y huevo podrido (combinación de rancificación y proteólisis).³⁰
- Acidez dornic: consiste en determinar la acidez de la leche humana ya que la presencia de ácido láctico produce que las proteínas solubles y la caseína se desestabilicen lo que causa precipitación de la leche y ya no es útil. Esta se realiza con la utilización del compuesto fenolftaleína como indicador del cambio de pH.³⁰

- Criterios para clasificación

Para determinar la clasificación debe considerarse la información del paciente en su inscripción como donante; la edad de gestación en el momento del parto y la edad de la lactación en que la leche fue recolectada. Se clasificará según su periodo de lactancia y acidez dornic.²⁹

- Periodo de lactancia: calostro, transición y madura.
- Acidez dornic: los valores considerados aceptables oscilan entre 1.0 y 8.0 D.

- Descarte

La leche materna que no cumpla con los parámetros de normalidad en la selección deberá ser descartada como desechos hospitalarios, de acuerdo con las instrucciones

establecidas en el apartado de higiene y seguridad, así como la normativa del manejo de desechos sólidos hospitalarios (Deberá quedar constancia en el registro oficial).²⁹

2.3.6 Pasteurización de la leche materna

La leche materna extraída destinada al consumo de recién nacidos, particularmente los internados en Unidades de Terapia Intensiva, no debe presentar microorganismos en cantidad o calidad capaces de representar agravios a la salud. De esta forma, es preciso que se disponga de procedimientos capaces de asegurar la calidad sanitaria de la leche materna extraída.³¹

La pasteurización representa una alternativa eficaz, conocida hace mucho y practicada en el campo de tecnología de alimentos. Es un tratamiento térmico aplicable a la leche materna que adopta como referencia la inactividad térmica del microorganismo más termorresistente, la *Coxiella burnetti*. Una vez observado el binomio temperatura de inactividad y tiempo de exposición capaz de desactivar ese microorganismo, se puede asegurar que los demás agentes infectivos también estarán térmicamente inactivos.³¹

La pasteurización, conducida a 62,5 °C por 30 minutos, no busca la esterilización de la leche materna extraída, pero sí una letalidad que garantice la inactividad de 100% de los microorganismos patógenos que están presentes ya sea por contaminación primaria o secundaria, más allá del 99,99% de la microbiota saprofita o normal.³¹

El almacenamiento y procesamiento de la leche materna donada, altera algunas de sus propiedades inmunológicas y nutricionales. El almacenamiento en el refrigerador a 4°C durante veinticuatro horas resulta en pérdida de vitamina C (40%), lisozima (40%), lactoferrina (30%), actividad de la lipasa (25%), IgA secretora (40%); la actividad fagocítica de la leche refrigerada se reduce 40% y el número de elementos celulares incrementa. También existe un incremento marcado de ácidos grasos libres, sugiriendo deterioro. El congelamiento a 2°C durante 3 meses también afecta los componentes en la leche. Hay un pequeño descenso en la IgA total del 3% pero no hay cambios en la IgA secretora o lactoferrina. El congelamiento reduce la concentración de lisozima a más del 20%, y destruye casi por completo los leucocitos. Además, debido a la potencial transmisión de virus, la leche materna debe ser pasteurizada.³¹

Actualmente la técnica de pasteurización de Holder es el método más empleado (62.5°C durante 30 minutos). El proceso de pasteurización de Holder resulta en una pérdida variable de los componentes de la leche: IgA secretora se reduce del 20 al 50%, IgA total de 0 a 50%, lactoferrina de 0 a 65%, lisozima de 0 a 65%, linfocitos 100%, lipasa 100% y fosfatasa alcalina 100%. Por lo tanto, el almacenamiento en refrigeración o congelamiento y el contacto con recipientes para leche humana y el proceso de calentamiento de la leche de banco, afectan muchos componentes de la leche y presumiblemente su eficacia.³¹

2.4 Marco geográfico

El área geográfica donde se realizaron las tomas de muestra son: el Banco de Leche y Hospital Nacional Pedro de Betancourt (HNPB) localizado en aldea San Felipe del municipio de Antigua Guatemala departamento de Sacatepéquez y la investigación experimental se desarrolló en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas del Centro Universitario Metropolitano (CUM) edificio D, zona 11 ciudad de Guatemala, Guatemala.

2.5 Marco demográfico

La muestra de leche materna se obtuvo de mujeres mayores de 18 años que se encontraron ingresadas en el servicio de post parto sin complicaciones y que estuvieron donando en el Banco de Leche del HNPB, estas tuvieron que cumplir con los requisitos que la institución solicita para considerarlas como aptas para donar. Entre ellos es que cuenten con constancia de pruebas prenatales donde indique exámenes con resultado negativo de VIH, sífilis y hepatitis B, de no contar con ellas pueden ser realizadas por el propio hospital, no debe de estar consumiendo medicamentos que se encuentren contraindicados para la lactancia materna, que no haya recibido transfusiones de sangre en los últimos cinco años y no ser consumidoras de alcohol, cigarro y ninguna otra droga.

2.6 Marco institucional

2.6.1 Banco de Leche Materna del Hospital Nacional Pedro de Betancourt

Según referencia verbal por Dr. Miguel Ángel Soto Galindo, en el Hospital Nacional Pedro de Betancourt, localizado en la Aldea San Felipe de Jesús Antigua Guatemala, Sacatepéquez. En el año 2016 se recibió alrededor de 2500 muestras de leche, las cuales 500 se obtuvieron por visitas domiciliarias y 2000 llegaron directamente a donar. Se logró recolectar alrededor de 581 litros de leche materna de los cuales 567 fueron distribuidos en los diferentes servicios de pediatría. El número de pacientes que fue beneficiado por esta donación fue de 1435 pacientes ingresados en el hospital.

2.6.2 Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este centro inició sus labores en el año 2012 con la finalidad de brindar servicios de diagnósticos rutinarios y especializados de Laboratorios Clínico como lo son: urología, coprología, hematología, inmunología, microbiología clínica, bioquímica, patología y biología molecular, a las personas que asisten a cualquiera de las 13 Clínicas Familiares de la facultad, Centros de Salud, Hospitales Nacionales y regionales del país.³²

Apoya a las Unidades Didácticas en la preparación de materiales biológicos para las prácticas de laboratorio de acuerdo a la disponibilidad de recursos existentes y así también elabora proyectos de investigación para presentarlos antes instituciones nacionales e internacionales.³²

2.7 Marco legal

En el Acuerdo Ministerial No. 748-2010 “Reglamento que crea y regula el funcionamiento de los Bancos de Leche Humana”, en el artículo 35 se estipula que la donación de leche humana debe ser voluntaria, altruista, no remunerada.³³

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Identificar la eficacia de la leche materna para inhibir el crecimiento *in vitro* de los agentes infectivos (*E. coli*, *S. aureus*, *N. gonorrea*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*) en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Betancourt, Antigua Guatemala y Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala en mayo-junio de 2017.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Determinar la inhibición *in vitro* de los agentes infectivos según la aplicación de calostro y leche madura extraída directamente de la glándula mamaria o proveniente del banco de leche comparado con el control positivo y negativo.
- 3.2.2. Identificar que agentes infectivos presentan mayor sensibilidad de inhibición *in vitro* con la aplicación de leche materna.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis de la investigación

- 4.1.1. La leche materna es efectiva como inhibidor *in vitro* del crecimiento de los agentes infecciosos *E. coli*, *S. aureus*, *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa*, *P. pneumoniae*.
- 4.1.2. La leche materna inhibe el crecimiento *in vitro* de los agentes infecciosos *E. coli*, *S. aureus*, *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa*, *P. pneumoniae*

4.2. Hipótesis estadística

4.2.1. Planteamiento de hipótesis

4.2.1.1. Hipótesis de nulidad

$H_0: p > 0.05.$

4.2.1.2. Hipótesis alternativa

$H_a: p \leq 0.05.$

5. POBLACIÓN Y MÉTODOS

5.1. Tipo y diseño de la investigación

5.1.1. Enfoque cuantitativo

5.1.2. Diseño de la investigación experimental

5.2. Unidad de análisis

5.2.1. Unidad de análisis

Resultado obtenido de la boleta del registro de participante. (Ver anexo 12.2)

5.2.2. Unidad de información

Pacientes que se encontraron en puerperio inmediato o mediano ingresadas en Hospital Nacional Pedro de Betancourt (HNPB) en los servicios de encamamiento de post parto sin complicaciones y pacientes que asistieron a la unidad de Banco de Leche y consulta externa del HNPB.

5.3. Población y muestra

5.3.1. Población

Mujeres en puerperio inmediato y mediano que cumplieron con los criterios de selección (inclusión y exclusión).

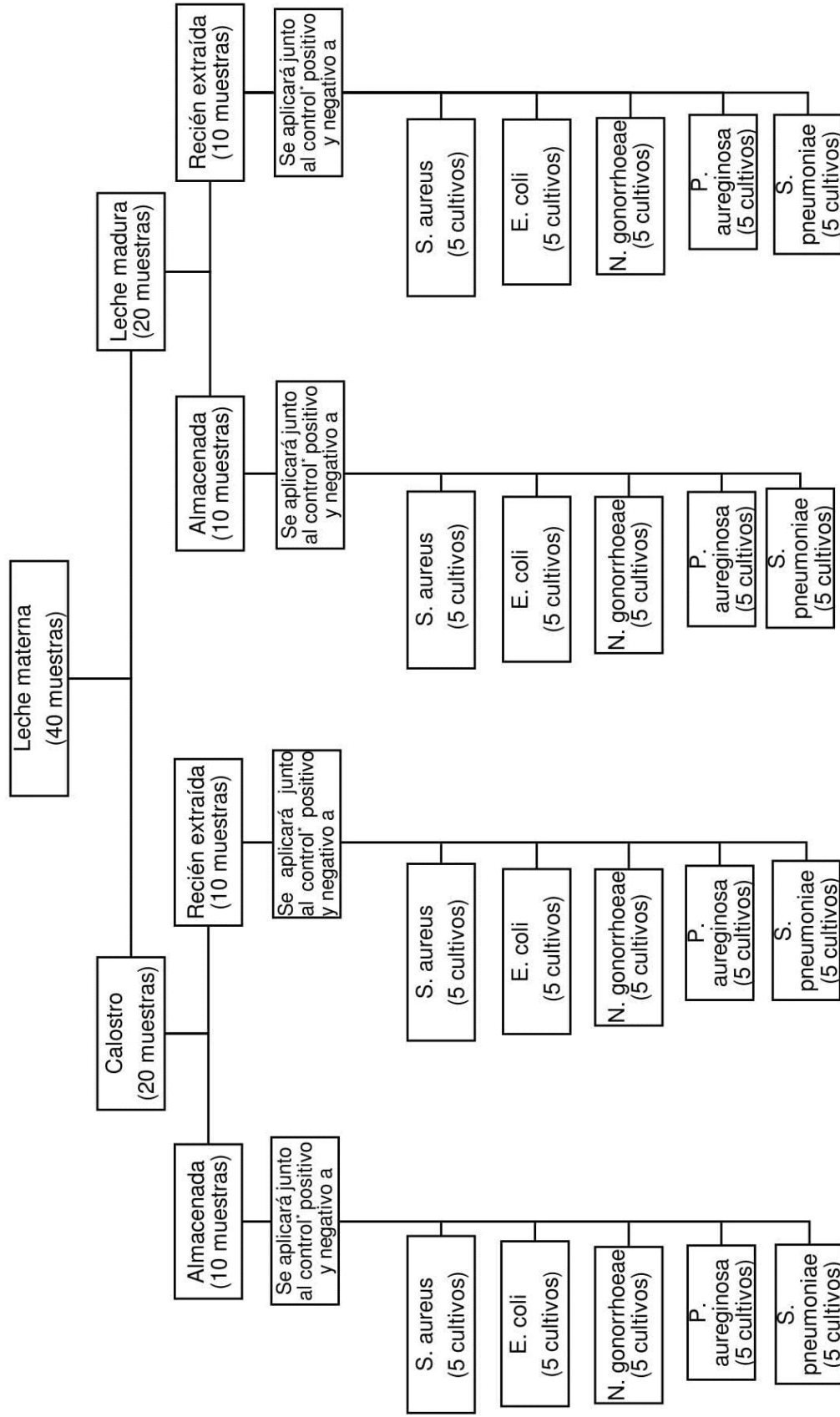
5.3.2. Muestra

Todas las muestras de leche materna obtenida de la consulta externa del Hospital Nacional Pedro de Betancourt y Banco de Leche del HNPB.

5.3.3. Muestreo

No probabilístico por conveniencia. (Ver flujograma 5.1)

Flujograma 5.1



*el control positivo estará dado por antibióticos (vancomicina, ciprofloxacina, piperacilina/tazobactam, penicilina) mientras que el control negativo será solución salina

5.4. Selección de los sujetos de estudio

5.4.1. Criterio de inclusión

Muestra de leche madura o calostro proveniente de mujeres mayores de 18 años que aceptaron participar voluntariamente, que estuvieron en puerperio inmediato y mediato, ingresadas en los servicios de postparto sin complicaciones y que se encontraron donando leche en el banco de leche y consulta externa del HNPB.

5.4.2. Criterios de exclusión

Muestras de leche madura o calostro proveniente de mujeres en puerperio inmediato y mediato con infecciones de transmisión sexual, fumadoras, usuarias de drogas y alcohol.

5.5 Definición y operacionalización de las variables

Macro – variable	Micro - variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Criterios de clasificación n/ Unidad de medición
Agentes infectivos	<i>N. gonorrhoeae</i>	Diplococos Gram negativos, inmóviles, metabolismo aerobio, oxidasa positiva.	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros
	<i>S. aureus</i> .	El género <i>Staphylococcus</i> cocos Gram positivos pertenecientes a la familia Micrococcaceae, formados por cocos con un diámetro de 0.5 a 1.5 µm, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas en tinción de Gram.	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros
	<i>P. aeruginosa</i> .	Un bacilo Gramnegativo ligeramente curvado que crece mejor en aerobiosis, es muy versátil nutritivamente y	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros

		no fermenta hidratos de carbono, pero produce ácido a partir de azúcares como la glucosa, fructosa y lactosa o sacarosa.				
	<i>S. pneumoniae</i> .	Bacterias Gram positivas, miden de 0.5 a 1.2 μ de diámetro, se disponen en pares, son anaerobios facultativos.	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros
	<i>E. Coli</i>	Bacteria Gram negativa, no formadora de esporas, μ 0.5 de ancho por 3 μ de largo, catalasa positiva y oxidasa negativa.	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros
Control positivo	Penicilina	Antibiótico que inhibe la síntesis de la pared bacteriana, ataca a cocos Gram positivos, algunos bacilos Gram positivos, espiroquetas y algunos anaerobios.	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros
	Vancomicina	Antibiótico del grupo de los glicopéptidos. Actúa inhibiendo la síntesis de	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros

		pared celular, previniendo la incorporación de las subunidades peptídicas N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina a la matriz de peptidoglicano de la pared bacteriana.					
	Piperacilina/tazobactam	Antibióticos inhibidores de betalactamasas combinadas con penicilina de espectro extendido.	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros	
	Ciprofloxacina	Antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas que actúa inhibiendo la síntesis de Ácido desoxirribonucleico (ADN) al inhibir el ADN girasa y topoisomerasa IV.	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros	
Control negativo	Solución salina	Es una solución estéril de cloruro de sodio al 0,9% en agua.	Dato obtenido al realizar la medición del halo de inhibición	Numérica	Razón	Milímetros	
Leche almacenada	Calostro	Leche que se secreta durante los primeros tres días luego del parto. Es un fluido espeso y amarillento debido a la alta concentración de beta	Sí: Leche que se haya extraído en los primeros tres días post parto que haya pasado por el proceso de selección, clasificación y pasteurización del	Categoría dicotómica	Nominal	Si	

		carotenos. Proveniente de un banco de leche	banco de leche. No: leche que se haya extraído después del cuarto día post parto y que haya pasado por el proceso de selección, clasificación y pasteurización del banco de leche.			No
Leche Madura	Leche que se produce a continuación de la leche de transición, a partir del 15 día postparto. Proveniente de un banco de leche	Sí: Leche que se haya extraído en mujeres con más de 15 días post parto que haya pasado por el proceso de selección, clasificación y pasteurización del banco de leche. No: leche que se haya extraído antes de los primeros 15 días post parto y que haya pasado por el proceso de selección, clasificación y pasteurización del banco de leche.	Categoría dicotómica	Nominal		Sí
Leche extraída de glándula	Calostro	Leche que se secreta durante los primeros tres días luego del parto. Es un fluido espeso	Sí: Leche que se haya extraído en los primeros tres días post parto, directamente de la	Categoría dicotómica	Nominal	Sí

mamaria			y amarillento debido a la alta concentración de beta carotenos.	glándula mamaria. No: leche que se haya extraído después del cuarto día post parto directamente de la glándula mamaria.			No
	Leche madura	Leche que se produce a continuación de la leche de transición, a partir del 15 día postparto.	Sí: Leche que se haya extraído en mujeres con más de 15 días post parto, directamente de la glándula mamaria. No: leche que se haya extraído antes de los primeros 15 días post parto, directamente de la glándula mamaria.	Categoría dicotómica	Nominal	Sí	
Características de la madre donante	Edad	Tiempo que un individuo ha vivido desde su nacimiento hasta un momento determinado		Dato de la edad en años referido por el paciente.	Numérica discreta	Razón	Años
	Fecha de parto	Fecha en la cual se expulsa feto y placenta.	Fecha referida por el paciente y si esta se encuentra en entre los primeros tres días se considerará calostro y si esta lleva más de 15 días se considerará leche madura	Categoría dicotómica	Nominal	Calostro	Leche madura

5.6. Técnica, procedimientos e instrumentos utilizados en la recolección de datos

5.6.1. Técnicas

Se utilizó una boleta de recolección de datos denominada “Registro de la participante” (ver anexo 12.2), la cual ayudó a identificar el tipo de leche de acuerdo a su grado de madurez y la procedencia de la misma, ya sea de banco de leche o extraída directamente de la glándula mamaria.

5.6.2. Procesos

Se llevó a cabo en el Hospital Nacional Pedro de Betancourt Antigua Guatemala, en pacientes que se encontraron en puerperio inmediato y mediano en la unidad de Ginecología y Obstetricia del encamamiento de post parto sin complicaciones y con pacientes que en el momento de la entrevista se encontraron donando en el Banco de Leche y consulta externa de esa misma institución. Asimismo, se trabajó con las muestras ya almacenadas en el banco de leche. A cada participante se le explicó la finalidad y objeto de la investigación, se instó a que participara y luego se le administró el consentimiento informado; posterior a ello la participante:

1. Aceptó y firmó o en su defecto colocó huella digital, en el consentimiento informado (ver anexo 12.1)
2. Se completó el “Registro de la participante”. (ver anexo 12.2).
3. Se extrajo muestra, de acuerdo a los siguientes pasos:

Paso I: Se colocó gorro y mascarilla a la donante.

Paso II: La extracción de leche materna realizada por los investigadores quienes prepararon el recipiente isotérmico, inmediatamente se colocaron gorro, mascarilla, bata y se procedió a efectuar asepsia y antisepsia de manos del investigador para luego realizar el mismo procedimiento en el pecho de la madre donante seguido de la extracción y depuración de 3 gotas de leche, a continuación, se utilizó el extractor de leche mecánico marca AVENT® esterilizado, se escogió uno de los tres tamaños de copas disponibles, asegurándose de que este tocando toda la piel del alrededor, haciendo vacío y

obteniendo entre tres a cinco milímetros de leche. Se colocó la leche extraída en tubos de ensayo y se rotuló con el código correspondiente.

El transporte de la leche del Hospital Nacional Pedro de Betancourt Antigua Guatemala hasta el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas, se realizó el mismo día de la obtención de la muestra y se utilizó una caja isotérmica (hielera) marca Rubbermaid® con aislante térmico y hielo a un intervalo de -3 a 5°C.

Posteriormente en el Laboratorio Clínico se procedió a la impregnación de 5 discos de papel filtro con un espesor de 0.158 mm y un diámetro de 5 mm con 20 microgotas por muestra de leche materna y con solución salina estéril, utilizando una micropipeta SOCOREX® estéril, estos se dejaron en incubación a 37°C por 24 horas en cajas de Petri estériles previamente identificadas con el código correspondiente. La leche humana que quedó se descartó como desecho biológico.

Se utilizó como control positivo discos de antimicrobianos de reconocida eficacia para cepas American Type Culture Collection (ATCC® por sus siglas en inglés), los cuales se observan detalladamente en la tabla 5.1

Tabla 5.1

Antimicrobianos de reconocida eficacia ante cepas ATCC® utilizadas en este estudio

Agente Infeccioso	Cepa ATCC No.	Control Positivo	Marca Registrada del control positivo
<i>N. gonorrhoeae</i>	49226	Penicilina	Himedia ®
<i>S. aureus</i>	25923	Vancomicina	Himedia ®
<i>P. aeruginosa</i>	27853	PiperacilinaTazobactam	Himedia ®
<i>S. pneumoniae</i>	49619	Penicilina	Himedia ®
<i>E. coli</i>	35218	Ciprofloxacina	Himedia ®

Fuente: Cercenado E, Saavedra-Lozano J. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales²⁶

Las cepas utilizadas en el estudio fueron ATCC® obtenidas gracias al apoyo del Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas, cuyas colonias fueron nuevamente cultivadas en Agar Müller-Hinton, Agar chocolate y Agar sangre de carnero cumpliendo los siguientes pasos:

1. Selección de colonias: Se seleccionó de tres a cinco colonias apropiadas de bacterias a través del asa bacteriológica estéril y se procedió a la suspensión directa de colonias en el caldo triptosado.
2. Preparación y estandarización de la suspensión del inóculo: El caldo triptosado con la suspensión de bacterias se dejó reposar durante 15 minutos, luego se procedió a medir la turbidez con el estándar 0.5 de McFarland.
3. Inoculación de la placa: Se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión, se removió el exceso de líquido del hisopo presionándolo contra la pared del tubo y se empezó por la parte superior de la placa de Agar Müller Hinton, Agar chocolate y Agar sangre de carnero a inocular la superficie con el hisopo de forma paralela, se rotó la placa aproximadamente a 60° y se repitió el procedimiento de frotado. Se rotó nuevamente la placa a 60° frotando toda la placa por tercera vez. Luego se rota nuevamente la placa a 60° frotando toda la placa por cuarta vez asegurando que el inóculo sea distribuido homogéneamente en el 100% de la placa. Se dejó reposar durante 15 minutos.
4. Aplicación de discos: Se procedió a corroborar que los discos impregnados previamente con leche materna, solución salina estéril y discos antimicrobianos se encontraran secos y almacenados en condiciones de esterilidad. Estos fueron colocados en la placa con pinza estéril presionando los discos levemente para asegurar su adherencia de la siguiente manera: colocación del disco antimicrobiano específico para cada bacteria como control positivo, disco impregnado con solución salina estéril como control negativo y de dos a tres discos impregnados con leche materna a una distancia de dos centímetros entre cada disco para asegurar que no se superpusieran los halos de inhibición. Se dejó reposar durante 15 minutos.
5. Incubación: Se procedió a colocar las cajas de Petri en incubadora a 37°C durante 24 horas.
6. Medición de halos: Se retiraron las placas de la incubadora y se procedió a examinar la placa para verificar el crecimiento uniforme y poder identificar las zonas sin crecimiento bacteriano. Se midieron las zonas de inhibición de la parte anterior de la placa utilizando una regla milimetrada.
7. Interpretación de medidas de zonas de inhibición: Para tal efecto se consideró como un efecto no inhibitorio la medición del disco impregnado con los productos estudiados que correspondieron a cinco milímetros, mientras que los mayores a

éste se consideraron con efecto inhibitor. Luego se procedió a colocar dichos datos en la boleta de “Registro de Participantes”.

5.6.3. Instrumentos

Se utilizó la boleta de: “Registro de participantes” (ver anexo 12.2), la cual contiene dos secciones. La sección número uno contiene información acerca de la edad de la participante, fecha de parto que ayudó a clasificar si la muestra que se extrajo fue calostro o leche madura, también contiene si la leche proviene del banco de leche o si fue extraída al momento de la recolección de datos.

En la sección número dos se encuentra la información acerca del procesamiento de las muestras en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas, tales como: tipo de leche, presencia o ausencia del halo de inhibición de las cinco bacterias analizadas, control positivo y negativo.

5.7. Procesamiento y análisis de los datos

5.7.1. Procesamiento de datos

Se realizó a través de la observación del crecimiento de colonias de *E. Coli*, *S. aureus*, *N. gonorrea*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, a través de la inhibición del crecimiento (diámetro del halo de inhibición) el cual se relacionó con la aplicación de la leche materna y los cambios que se suscitaron en comparación al grupo control.

Los resultados fueron tabulados e interpretados de acuerdo al diámetro del halo de inhibición producido por la acción de la leche tipo calostro y leche madura recién extraída, así como almacenada en el banco de leche para cada bacteria, que se comparó con el control positivo y negativo, identificando que tipo de leche presentaba mayor diámetro en el halo de inhibición.

El vaciado de la información fue representado en cuadros, los cuales ayudaron a visualizar la relación de las variables, para tal efecto se utilizó las medidas de tendencia central, siendo la indicada la media y porcentaje de las mismas.

5.7.2. Análisis de datos

Objetivo general: Identificar la eficacia de la leche materna para inhibir el crecimiento *in vitro* de los agentes infecciosos (*E. coli*, *S. aureus*, *N. gonorrhoea*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*) en el Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala y Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala en mayo-junio de 2017

Para comprobar este objetivo se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) unifactorial con nivel de significancia del 0.05 ($\alpha= 0.05$). Se manejó como variable independiente el agente infeccioso y como variable dependiente la media del halo de inhibición de la leche materna respecto a cada bacteria. Con esto se verificó las diferencias entre la aplicación de la leche materna con respecto al crecimiento bacteriano. Luego de esto se realizó la prueba post hoc de Dunnett unilateral a la izquierda con nivel de significancia del 0.05 que ayudó a identificar los grupos de leche que fueron eficaces para la inhibición del crecimiento bacteriano.

Objetivo específico uno: Determinar la inhibición *in vitro* de los agentes infecciosos según la aplicación de calostro y leche madura extraída directamente de la glándula mamaria o proveniente del banco de leche comparado con el control positivo y negativo.

Se dispuso de 200 cultivos de las bacterias anteriormente mencionadas, los cuales se dividieron en cuatro grupos:

- Primer grupo: 50 cultivos a los que se les aplicó calostro recién extraído de la glándula mamaria, control positivo y negativo.
- Segundo grupo: 50 cultivos a los que se les aplicó calostro proveniente del banco de leche, control positivo y negativo.
- Tercer grupo: 50 cultivos a los que se les aplicó leche madura recién extraída de la glándula mamaria, control positivo y negativo.
- Cuarto grupo: 50 cultivos a los que se les aplicó leche madura proveniente del banco de leche, control positivo y negativo.

Luego se procedió la observación de los cultivos, se compararon con los controles positivos y negativos, se procedió a la medición del halo formado y así sucesivamente con

cada cultivo para recopilar la medida del halo. Los resultados se analizaron a través de medidas de tendencia central, siendo la más adecuada la media. Luego se compararon las medias y porcentajes de todos los grupos para poder determinar los grupos que presentó mayor inhibición.

Objetivo específico dos: Identificar que agentes infectivos presentan mayor sensibilidad de inhibición *in vitro* con la aplicación de leche materna.

Se dispuso de 200 cultivos, los cuales fueron divididos en 5 grupos correspondientes a cada una de las bacterias que se estudiaron, siendo estas: *S. aureus* (40 cultivos), *S. pneumoniae* (40 cultivos), *E. coli* (40 cultivos), *N. gonorrhoeae* (40 cultivos), *P. aeruginosa* (40 cultivos). A éstas se le aplicó calostro y leche madura, tanto recién extraída como proveniente del banco de leche, asimismo su control positivo y negativo. Los resultados se analizaron a través de las medias y porcentajes de las mediciones de los halos de inhibición. Luego se compararon los cinco grupos, identificando así el grupo de bacterias que presenten mayor porcentaje de inhibición.

5.8. Alcances

En la presente investigación experimental a través del análisis de las muestras de leche materna, se logró determinar según el crecimiento *in vitro*, la inhibición de *E. Coli*, *S.aureus*, *N. gonorrea* y *S. pneumoniae*, con lo que se puede realizar nuevas investigaciones sobre la utilización de leche materna como profilaxis en enfermedades infecciosas en recién nacidos.

5.9. Aspectos éticos de la investigación

Este trabajo de investigación se basó en la utilización de leche humana proveniente del banco de leche, así como también la extraída directamente de madres, por ende fue necesario contar previamente con el aval del comité de ética del Hospital Nacional Pedro de Betancourt Antigua Guatemala. Se administró el consentimiento informado a las pacientes que decidieron participar en dicho estudio.

Las muestras obtenidas del banco de leche fueron utilizadas exclusivamente por personal del laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas y los estudiantes encargados de la realización de este trabajo. Los datos obtenidos de las muestras donadas por el banco de leche fueron manejados bajo total confidencialidad, las madres donantes participaron de forma voluntaria y no remunerada en la investigación, asimismo se les explicó detalladamente a las participantes el objetivo y propósito de la investigación, siendo ellas libres de decidir ser parte o no del trabajo.

Al momento de la extracción se siguieron los protocolos establecidos, descritos anteriormente con el fin de evitar algún daño físico o emocional a las participantes. Las muestras obtenidas de las madres donantes se manejaron bajo los estándares establecidos para su pronta utilización y adecuado almacenamiento. No se realizó ningún experimento en personas, ni se tuvo ninguna asociación con ninguna casa médica o laboratorio privado que esté a cargo de la investigación.

El estudio se clasificó como categoría II (con riesgo mínimo), la cual comprende estudios o el registro de datos por medio de procedimientos diagnósticos (físicos o psicológicos) de rutina, en este caso se invadió la privacidad de las donadoras al realizarles la extracción de las muestras de leche.

6. RESULTADOS

Se realizó la medición de los halos de inhibición en 20 muestras de calostro y 20 muestras de leche madura, 10 muestras provenientes de la glándula mamaria y 10 muestras provenientes de banco de leche. A continuación, se presentan los resultados después de 24 horas de incubación.

Tabla 6.1

Muestras de leche materna según el grado de madurez de la leche, almacenamiento de la misma y agentes infectivos

n=40

	Frecuencia	Porcentaje
Leche almacenada		
Calostro	10	25
Leche madura	10	25
Leche extraída de la glándula mamaria		
Calostro	10	25
Leche madura	10	25
Agente infeccioso cepas ATCC® (n=200)		
<i>N. gonorrhoea</i>	40	20
<i>S. aureus</i>	40	20
<i>P. aeruginosa</i>	40	20
<i>S. pneumoniae</i>	40	20
<i>E. coli</i>	40	20

Tabla 6.2
Eficacia de la leche materna como inhibidor *in vitro* de bacterias.

Tipo de leche materna	Agente infeccioso	Media de halo de inhibición del agente infeccioso (mm)	Media de halo de inhibición del control positivo (mm)	Media de halo de inhibición del control negativo (mm)	Valor p para determinar la eficacia de la leche materna respecto al control positivo*	Inhibición sobre el agente infeccioso
Calostro recién extraído de la glándula mamaria	<i>N. gonorrhoeae</i>	9.8	23.8	5	1.000	Si
	<i>S. aureus</i>	6.9	20.4	5	1.000	Si
	<i>P. aeruginosa</i>	6.0	26.2	5	1.000	No
	<i>S. pneumoniae</i>	12.9	31.6	5	1.000	Si
	<i>E. coli</i>	14.3	33.6	5	1.000	Si
Calostro almacenado en banco de leche humana	<i>N. gonorrhoeae</i>	8.7	23.8	5	1.000	Si
	<i>S. aureus</i>	5.5	20.0	5	0.992	No
	<i>P. aeruginosa</i>	5.4	27.3	5	0.997	No
	<i>S. pneumoniae</i>	5.9	34.5	5	0.980	No
	<i>E. coli</i>	11.5	32.8	5	1.000	Si
Leche madura recién extraído de la glándula mamaria	<i>N. gonorrhoeae</i>	5.0	23.0	5	0.901	No
	<i>S. aureus</i>	5.3	18.0	5	0.901	No
	<i>P. aeruginosa</i>	5.7	32.0	5	0.984	No
	<i>S. pneumoniae</i>	5.0	26.0	5	0.901	No
	<i>E. coli</i>	5.0	42.0	5	0.901	No
Leche madura almacenada en banco de leche humana	<i>N. gonorrhoeae</i>	5.7	20.5	5	0.978	No
	<i>S. aureus</i>	5.0	16.6	5	0.975	No
	<i>P. aeruginosa</i>	5.7	26.8	5	0.997	No
	<i>S. pneumoniae</i>	5.1	34.3	5	0.915	No
	<i>E. coli</i>	5.5	34.7	5	0.965	No

*Valor p menor de 0.05 representan diferencias significativas que las denota eficaz.

Con respecto al tipo de leche calostro se determinó que las muestras recién extraídas de la glándula mamaria presentaron un 42% de inhibición de los agentes infecciosos, mientras que el calostro almacenado en banco de leche humana presentó un 27.88% de inhibición (ver tabla 12.1 y 12.2).

Asimismo, el tipo de leche madura almacenada en el banco de leche humana demostró un porcentaje de inhibición del 22% y la recién extraída de la glándula mamaria un 20% (ver tabla 12.3 y 12.4)

Se observó que *E. coli* presentó mayor sensibilidad a la acción inhibitoria *in vitro* con respecto a la aplicación de leche materna, presentando un porcentaje del 40%, seguido de *N. gonorrhoeae* con un 30%, *S. aureus* 28%, *S. pneumoniae* 25% y por último *P. aeruginosa* presentando menor sensibilidad con un 18% (ver tabla 12.7).

7. DISCUSIÓN

Se ha demostrado con pruebas *in vitro* que la leche materna contiene actividad antimicrobiana contra ciertas bacterias, virus y parásitos, esto debido a los componentes inmunológicos humorales y celulares, los cuales se ven afectados según el grado de madurez de la leche materna y si ha pasado por el proceso de pasteurización.³

Los cultivos que tuvieron inhibición en el crecimiento de los agentes infecciosos, el 58%(32) corresponden a calostro recién extraído de la glándula mamaria, calostro almacenada en banco de leche 27% (15), mientras que la leche madura almacenada en banco de leche humana presentó 11% (6), y leche madura recién extraída 4% (2). Según la literatura se sabe que la leche materna muestra variación en su composición dependiendo de la fase en que se encuentre, siendo el calostro el que presenta mayor número de componentes inmunológicos humorales y celulares como IgA, IgM, IgG, lisozima, lactoferrina, factor bífido, interferón, gangliósidos, prostaglandinas y otras sustancias inmunoregulatoras, C3 y C4 del complemento así como ácido neuramínico. La mayor concentración de éstos componentes se encuentra en el calostro de todas las especies y va decreciendo en la medida que transcurre el tiempo de lactancia, como ocurre con la leche madura, que sus propiedades inmunológicas disminuyen desde que se inicia la fase de transición de la leche materna.^{3,27}

En los cultivos realizados se evidenció una disminución en las propiedades antimicrobianas *in vitro* de la leche, ya que el 85% de cultivos que presentaron inhibición corresponden a leche recién extraída mientras que el 15% corresponde a la proveniente del banco de leche. Esto debido a que el almacenamiento de la leche materna causa alteración en las propiedades inmunológicas y nutricionales en comparación con la recién extraída de la glándula mamaria ya que presenta pérdida de lisozima en un 40%, lactoferrina un 30%, IgA secretora con un 40%. Asimismo, al momento de la pasteurización se pierden aún más componentes inmunológicos de la leche ya que el contenido de IgA secretora disminuye hasta un 50%, así como la lactoferrina y lisozima que presenta disminución hasta un 65%³², sin embargo se garantiza una inactividad del 100% de los microorganismos patógenos que están presentes por contaminación en las muestras y el número de elementos celulares se incrementa.³²

Al analizar las bacterias en su crecimiento se determinó que la leche materna no alcanzó el nivel de eficacia con respecto a su control positivo, sin embargo presentó inhibición para los agentes infectivos, predominando en *E. Coli* con un 27%(15), esto debido a ciertos componentes de la leche como la lactoferrina teniendo acción bacteriostática sobre gérmenes ferredpendientes, la lisozima que tiene factor bacteriolítico contra enterobacterias y Gram positivas, factor bifido, componentes del complemento C3 y C4, que posee actividad opsonica, quimiotáctica y bacteriolítica, así como ácido neuramínico que posee actividad bacteriostática contra esta bacteria.

N. gonorrhoeae presentó un 24% (13) de inhibición relacionándolo a que en estudios anteriores se ha determinado la actividad antimicrobiana sobre esta bacteria, sin embargo, no está descrito los componentes humorales y celulares que actúan sobre esta bacteria.

S. aureus 25% (11), *S. pneumoniae* 16% (9) debido a la presencia de lactoperoxidasa, ácido neuramínico y por último *P. aureginosa* 13% (7), la cual es beneficiada por la actividad bacteriostática de la lactoferrina que produce bloqueo en la síntesis de ARN.^{3, 29}

En este estudio se determinó que la leche materna presentó efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano, sin embargo, no es eficaz ya que no igualó o superó la media de inhibición de su control positivo. Para dicha conjetura se utilizó ANOVA unifactorial con intervalo de confianza del 95% comprobando que existieron diferencias de medias con un valor p menor a 0.05 entre la aplicación de la leche materna con respecto al crecimiento bacteriano, por lo que se realizó la prueba post hoc de Dunnet unilateral a la derecha con nivel de significancia del 0.05 que ayudó a exponer si alguno de los grupos de leche fue eficaz para la inhibición del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo, en la tabla 12.8 se observó que ninguno de los resultados fueron menores a 0.05, demostrando estadísticamente que no hay eficacia de la leche materna como inhibidor *in vitro* de bacterias.

La importancia de realizar un estudio de tipo experimental que demuestre la actividad *in vitro* de la leche materna sobre distintos tipos de bacterias, es debido a que actualmente son muy pocos los estudios realizados referentes a este tema ya que la mayoría se han hecho para evaluar la cantidad de componentes humorales y celulares

implicados en la actividad antimicrobiana y a nivel nacional el último estudio similar fue realizado hace aproximadamente hace treinta años. Por lo que se realizó este estudio con la finalidad de demostrar la eficacia de la leche materna como antimicrobiano, ya que en ciertas comunidades del área rural del país se ha utilizado aplicándola directamente como tratamiento a distintas patologías infecciosas.

La fortaleza de este estudio es que existe inhibición del crecimiento bacteriano a la aplicación de la leche materna, así mismo, servirá de base para estudios posteriores sobre la utilización de calostro recién extraída como profilaxis de enfermedades infecciosas, ya que su inhibición está demostrada *in vitro* con este estudio.

La debilidad del mismo es que no es eficaz comparado con su control positivo, por lo que no se propone como tratamiento para enfermedades en el recién nacido por las bacterias estudiadas.

8. CONCLUSIONES

- 8.1. La leche materna en su etapa calostro recién extraída de la glándula mamaria presenta mayor inhibición *in vitro* de los agentes infecciosos *E. coli*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *N. gonorrhoeae* en comparación con la leche materna en su etapa calostro y leche madura almacenada en banco de leche humana y leche madura recién extraída de la glándula mamaria.

- 8.2. El agente infeccioso *E. coli* presenta mayor sensibilidad ante la aplicación *in vitro* de leche materna tipo calostro.

- 8.3. La leche materna no presenta eficacia como inhibidor *in vitro* de los agentes infecciosos *N. gonorrhoea*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* y *E. coli*.

9. RECOMENDACIONES

9.1. Al personal que labora en el Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad San Carlos de Guatemala:

9.1.1. Exhortar a la elaboración de estudios específicos basados en la capacidad de la leche materna como forma de tratamiento profiláctico ante enfermedades donde se pueda aplicar de forma directa debido a su capacidad inhibitoria *in vitro* de agentes infectivos.

10. APORTES

- 10.1.** A la coordinación del Banco de Leche Humana del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt se les proporcionará una copia del estudio para la difusión de los resultados, así como un poster y charla informativa.

- 10.2.** Al Laboratorio Clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se entregará una presentación tipo póster para ser colocado en el muro del laboratorio.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mata LJ. El agente infeccioso. Rev Med Hosp Nal Niños [en línea]. 1977 [citado 6 Abr 2017]; 12(2): 115-118 Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmhnn/v12n2/art8.pdf>
2. Tapia JL, González A. Enfermedades infecciosas. En: Neonatología. 3 ed. Santiago, Chile: Mediterraneo; 2008.
3. Shellhorn C, Valdés V. La Leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. Manual de lactancia para profesionales de la salud [en línea]. Chile: UNICEF; 2012 [citado 15 Feb 2017]. Disponible en: <http://www.unicef.cl/lactancia/docs/mod01/Mod1beneficiosmanual.pdf>
4. Bénites López CF. Efecto *in vitro* del sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus sp.* aislados de leche materna, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* [tesis Biólogo- Microbiólogo en línea]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas; 2015 [citado 14 Feb 2017]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4532/Benites%20Lopez%2c%20Ceidi%20Fiorela.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Guillen Folgar DI. Leche materna como inhibidor del crecimiento de *N. gonorrhoeae in vitro* [tesis Médico y Cirujano]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencia Medicas; 1986.
6. Vásquez Hidalgo A. Propiedades antimicrobianas de la leche materna madura contra enterobacterias en niños menores de 2 años de edad: pruebas *in vitro* [en línea]. El Salvador: Universidad de El Salvador, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología; 2000 [citado 21 Feb 2017]. Disponible en: http://ri.ues.edu.sv/726/1/articulo_Propiedades_antimicrobianas_leche_materna_madura.pdf

7. Guatemala. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Centro Nacional de Epidemiología. Departamento de Vigilancia Epidemiológica. Memoria de estadísticas vitales y vigilancia epidemiológica. Guatemala: MSPAS; 2015.
8. Volcy C. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Rev Agron (Colombia) [en línea]. 2000 [citado 15 Abr 2017]; 26 (1): 107-115. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n1>
9. Ram S, Rice PA. Infecciones gonocócicas. En: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editores. Harrison principios de medicina interna. 18 ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2012: vol. 1 p. 1220-1227.
10. Zuñiga MN. *gonorrhoeae*: un patógeno que impone grandes retos. Rev Col Enf [en línea]. 2009 [citado 9 Feb 2017]; 5 (1): 67-70. Disponible en: http://www.uelbosque.edu.co/sites/default/files/publicaciones/revistas/revista_colombiana_enfermeria/volumen5/neisseria_gonorrhoeae.pdf
11. Fariñas AT. El control de la oftalmia neonatal gonocócica. Rev cub Med Gen Integr [en línea]. 1999 [citado 9 Feb 2017]; 15 (1): 36-40. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mgi/v15n1/mgi07199.pdf>
12. Cervantes E, García R, Salazar PM. Características generales del *S. aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab [en línea]. 2014 [citado 10 Feb 2017]; 61 (1): 28-40. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
13. Lowy FD. Infecciones estafilocócicas. En: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editores. Harrison principios de medicina interna. 18 ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2012: vol. 1 p. 1160-1170.
14. Bustos JA, Hamdan A, Gutiérrez M. *S. aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Bio med [en línea]. 2006 [citado 10 Feb 2017]; 17 (4): 287-305. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb061746.pdf>
15. Ramphal R. Infecciones por *Pseudomonas* y microorganismos relacionados. En: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editores.

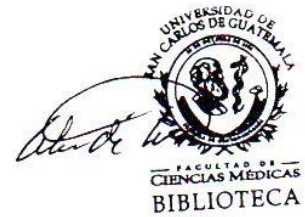
- Harrison principios de medicina interna. 18 ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2012: vol. 1 p. 1266-1273.
16. Luján DA. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. Rev Acta Bioquím Clín Latinoam [en línea]. 2014 [citado 10 Feb 2017]; 48 (4): 465-74. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v48n4/v48n4a09.pdf>
 17. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 6 ed. Madrid: Elsevier; 2009. Capítulo 22. *Streptococcus*; p. 237-242.
 18. Goldblatt DL, O'brien K. Infecciones neumococicas. En: Longo, D. Kasper D, Jameson L, Fauci A, Hauster S, Loscalzo J. Harrison principios de medicina interna. 18 ed. México: Mc Graw Hill; 2012: vol 1 p. 1152–1159.
 19. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 6 ed. Madrid: Elsevier; 2009. Capítulo 30. *Enterobacteriaceae*; p. 303-307.
 20. Cercenado E, Saavedra-Lozano J. Interpretación del antibiograma: conceptos generales. An Pediatría Contin [en línea]. 2009 Ago [citado 7 Abr 2017]; 7(4): 214–217. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1696281809719274>
 21. Cavalieri S, Harbeck R, McCarter Y, Ortez J, Rankin I, Sautter R, et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana [en línea]. Seattle: American Society for Microbiology; 2005. Capitulo 4. Prueba de difusión por disco; [citado 22 Feb 2017]; p. 39-52. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid=270
 22. Patel J, Weinstein M, Eliopoulos G, Jenkins S, Lewis J, Limbago B, et al. M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing [en línea]. 27 ed. West Valley Road, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017 [citado 7 Abr 2017]. Disponible en: <http://em100.edaptivedocs.info/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 S27:2017&scope=user>
 23. Shuttleworth M. Grupo de control científico [en línea]. [s.l.]. Explorable; 2010 [citado 6 Abr 2017]. Disponible en: <https://explorable.com/es/grupo-de-control->

científico

24. Brunton L, Chabner B, Bjorn K. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12 ed. México: McGraw Hill; 2012.
25. Enciclopedia en salud. Definición de solución salina fisiológica [en línea]. Terragona, España: Enciclopedia en Salud; 2016 [citado 16 Feb 2017]. Disponible en: <http://www.encyclopediasalud.com/definiciones/solucion-salina-fisiologica>
26. Herráiz I, Arbués J, Martínez A, Gómez B. Lactancia. En: Bajo J, Melchor J, Merce LT, editores. Fundamentos de obstetricia (SEGO). Madrid: Gráficas Marte, S.L; 2007: p. 385-386.
27. Schwarcz R, Fescina R, Duverges C. Obstetricia. 6 ed. Argentina: El Ateneo; 2014. Capítulo 11. Lactancia materna; p. 516-517.
28. Riverón Corteguera R. Valor inmunológico de la leche materna. Rev Cub Pediatr [en línea]. 1995 Ago [citado 8 Feb 2017]; 67 (2): 3-12. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75311995000200006&lng=es
29. Guatemala. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Normas para el funcionamiento de los bancos de leche humana. Guatemala: MSPAS; 2012.
30. Moreira Ramírez NR. Curso procesamiento y control de calidad de la leche humana. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2011. Capítulo 8. Implementación de un banco de leche humana; p. 42-60.
31. Calderón Pérez M L. Efectos de la alimentación con leche humana pasteurizada comparada con fórmula para prematuro estándar en recién nacidos menores de 2,500 gramos [tesis de Maestría en línea]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas; 2015. [citado 22 Feb 2017]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/1907/1/Informe%20Final.pdf>
32. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. Centro

de Investigaciones Biomédicas [en línea]. Guatemala: USAC, FCCM; 2014 [citado 24 Feb 2017]. Disponible en: <http://medicina.usac.edu.gt/cib.html>

33. Guatemala. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Acuerdo ministerial 748 de 2010, agosto 2010, establece el reglamento que crea y regula el funcionamiento de los bancos de leche humana. Guatemala: MSPAS; 2010.



12. ANEXOS



12.1 Consentimiento Informado

Nosotros somos estudiantes de séptimo año de la carrera de Médico y Cirujano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Como parte de nuestro trabajo de tesis estamos investigando la capacidad de la leche materna, para impedir el crecimiento de las bacterias que pueden afectar a los bebés recién nacidos. Estas bacterias pueden causar infección en ojos, oídos e incluso neumonía, las cuales pueden presentar consecuencias graves si no son detectadas y tratadas a tiempo. Se invita a participar en este estudio a mujeres que estén dando pecho a sus hijos, que sean mayores de 18 años y que estén dispuestas a regalar de 3 a 5 mililitros de leche para dicho estudio. La participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Puede decidir participar o no. No importa la decisión que tome, continuará de forma normal todos los servicios que reciba en este hospital. Puede cambiar de parecer más tarde y dejar de participar cuando lo desee aun cuando haya aceptado antes.

Todos los datos y muestras que dé serán manejados únicamente por los investigadores y personal de laboratorio, donde se realizará dicho experimento. Estos serán procesados con privacidad y no se divulgará información acerca de las participantes.

El procedimiento que se llevará a cabo es el siguiente:

1. Se iniciará a preguntar su edad y fecha de parto.
2. Con cuidado se desinfectarán sus manos para evitar cualquier contaminación de la muestra.
3. Se realizará limpieza del pecho que será utilizada para la extracción de la muestra de leche.
4. Se procederá a la extracción de leche de más o menos una cucharadita (de 3 a 5 mililitros). Con esta cantidad se realizarán las pruebas necesarias en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
5. No recibirá dinero por dar su leche.

6. Este procedimiento no provocará daños físicos, ni dolor ya que no se utilizará aguja, se realizará de manera mecánica con el extractor de leche o bien como lo ha hecho en el bando de leche.
7. Este procedimiento no da complicación de ningún tipo.
8. El beneficio de esta investigación no será directo, ya que solo lo daremos a conocer con el Dr. Miguel Ángel Soto, coordinador del banco de leche y se realizará un póster, que será colocado en el banco de leche informando si la leche mata a microbios.

Agradeciendo por su atención y esperando su colaboración adjuntamos el consentimiento informado para que firmen si desean participar.

Aceptación

Lugar y Fecha _____

Yo _____ doy

fe que he sido informada e invitada a participaren la investigación titulada “**Eficacia de la leche materna como inhibidor *in vitro* de bacterias**”. Estudio que se realizará en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala en el año 2017. He sido informada de manera clara y concisa acerca del propósito del estudio y de la técnica que se utilizará para la extracción de la muestra de leche. He entendido que mi colaboración ayudará a determinar si la leche materna puede ser utilizada para inhibir el crecimiento de bacterias que causan infecciones en recién nacidos, siendo este el único propósito para el que se realiza la extracción. Estoy de acuerdo a someterme al procedimiento de extracción de muestra, bajo la técnica que se me explicó anteriormente y que no supone ningún riesgo o posible complicación, garantizando que me encuentro en completo goce de mis facultades físicas y mentales.

Firma Donante _____

Nombre del Entrevistador: _____



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala



FACULTAD DE
CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

12.2 Registro de participante

Fecha: _____

Sección Uno:

1. Datos generales:

Código de participante: _____

Edad: _____

Fecha del parto: _____

Almacenada en banco de leche: _____ Recién extraída: _____

Sección dos:

Para uso exclusivo de laboratorio	Madurez de leche materna:		
	Calostro: <input type="checkbox"/>		
	Madura: <input type="checkbox"/>		
Bacterias	Medición de halo de inhibición de leche materna (mm)	Medición de halo de inhibición control positivo (mm)	Medición de halo de inhibición control negativo (mm)
<i>N. gonorrhoeae.</i>			
<i>S. aureus</i>			
<i>P. aereginosa</i>			
<i>S. pneumoniae.</i>			
<i>E.coli</i>			

12.3 Tablas

Tabla 12.1

Porcentajes de las medias de halos de inhibición de calostro recién extraído de la glándula mamaria respecto a las medias de su control positivo y negativo.

Tipo de leche materna	Agente infeccioso	Porcentaje media de halo de inhibición del agente infeccioso (%)	Porcentaje media de halo de inhibición de control positivo (%)	Porcentaje media de halo de inhibición del control negativo (%)*
Calostro recién extraído de la glándula mamaria	<i>N. gonorrhoeae</i>	41.18	100	5
	<i>S. aureus</i>	33.82	100	5
	<i>P. aureginosa</i>	22.90	100	5
	<i>S. pneumoniae</i>	40.82	100	5
	<i>E. coli</i>	42.56	100	5
Promedio de porcentajes		42.13	100	5

*un porcentaje igual a 5 representa que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano

Tabla 12.2

Porcentajes de las medias de halos de inhibición de calostro almacenado en banco de leche respecto a las medias de su control positivo y negativo.

Tipo de leche materna	Agente infeccioso	Porcentaje media de halo de inhibición del agente infeccioso (%)	Porcentaje media de halo de inhibición de control positivo (%)	Porcentaje media de halo de inhibición del control negativo (%)*
Calostro almacenado en el banco de leche	<i>N. gonorrhoeae</i>	36.55	100	5
	<i>S. aureus</i>	27.5	100	5
	<i>P. aureginosa</i>	23.17	100	5
	<i>S. pneumoniae</i>	17.10	100	5
	<i>E. coli</i>	35.06	100	5
Promedio de porcentajes		27.88	100	5

*un porcentaje igual a 5 representa que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano

Tabla 12.3

Porcentajes de las medias de halos de inhibición de leche madura recién extraída de la glándula mamaria respecto a las medias de su control positivo y negativo.

Tipo de leche materna	Agente infeccioso	Porcentaje media de halo de inhibición del agente infeccioso (%)	Porcentaje media de halo de inhibición de control positivo (%)	Porcentaje media de halo de inhibición del control negativo (%)*
Leche madura recién extraído de la glándula mamaria	<i>N. gonorrhoeae</i>	21.74	100	5
	<i>S. aureus</i>	29.44	100	5
	<i>P. aureginosa</i>	17.81	100	5
	<i>S. pneumoniae</i>	19.23	100	5
	<i>E. coli</i>	11.9	100	5
Promedio de porcentajes		20.02	100	5

*un porcentaje igual a 5 representa que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano

Tabla 12.4

Porcentajes de las medias de halos de inhibición de leche madura almacenada en banco de leche respecto a las medias de su control positivo y negativo.

Tipo de leche materna	Agente infeccioso	Porcentaje media de halo de inhibición del agente infeccioso (%)	Porcentaje media de halo de inhibición de control positivo (%)	Porcentaje media de halo de inhibición del control negativo (%)*
Leche madura almacenada en banco de leche humana	<i>N. gonorrhoeae</i>	27.80	100	5
	<i>S. aureus</i>	30.12	100	5
	<i>P. aureginosa</i>	21.27	100	5
	<i>S. pneumoniae</i>	15.74	100	5
	<i>E. coli</i>	15.85	100	5
Promedio porcentajes		22.16	100	5

*un porcentaje igual a 5 representa que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano

Tabla 12.5

Comparación de porcentajes del halo de inhibición *in vitro* de los agentes infectivos según la aplicación de leche materna con su control positivo y negativo

Tipo de leche materna	Porcentaje media de halo de inhibición del agente infectivo (mm)	Porcentaje media de halo de inhibición de control positivo (mm)	Porcentaje media de halo de inhibición del control negativo (mm)*
Calostro recién extraído de la glándula mamaria	42.13	100	5
Calostro almacenado en banco de leche humana	27.88	100	5
Leche madura recién extraído de la glándula mamaria	20.02	100	5
Leche madura almacenada en banco de leche humana	22.16	100	5

*un porcentaje igual a 5 representa que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano

Tabla 12.6

Frecuencias y porcentajes de inhibición *in vitro* de los agentes infectivos según la aplicación de leche materna.

Tipo de Leche materna	Frecuencia de inhibición del agente infectivo	Frecuencia acumulada de inhibición del agente infectivo	Porcentaje de inhibición del agente infectivo (%)
Calostro recién extraída de glándula mamaria	32	32	58
Calostro almacenado en banco de leche humana	15	47	27
Leche madura recién extraída de glándula mamaria	2	49	4
Leche madura almacenada en banco de leche humana	6	55	11

Tabla 12.7

Porcentajes de sensibilidad a la acción de inhibición *in vitro* del agente infeccioso respecto a la aplicación de leche materna

Agente infeccioso	Tipo de leche materna	Porcentaje de sensibilidad (%)	Promedio de porcentaje de sensibilidad (%)
<i>N. gonorrhoeae</i>	Calostro recién extraído de la glándula mamaria	11	24
	Calostro almacenado en banco de leche humana	9	
	Leche madura recién extraída de la glándula mamaria	0	
	Leche madura almacenada en banco de leche humana	4	
<i>S. aureus</i>	Calostro recién extraído de la glándula mamaria	14	25
	Calostro almacenado en banco de leche humana	9	
	Leche madura recién extraída de la glándula mamaria	2	
	Leche madura almacenada en banco de leche humana	0	
<i>P. aureginosa</i>	Calostro recién extraído de la glándula mamaria	5	13
	Calostro almacenado en banco de leche humana	2	
	Leche madura recién extraída de la glándula mamaria	2	
	Leche madura almacenada en banco de leche humana	4	
<i>S. pneumoniae</i>	Calostro recién extraído de la glándula mamaria	12	16
	Calostro almacenado en banco de leche humana	2	
	Leche madura recién extraída de la glándula mamaria	0	
	Leche madura almacenada en banco de leche humana	2	
<i>E. coli</i>	Calostro recién extraído de la glándula mamaria	14	27
	Calostro almacenado en banco de leche humana	11	
	Leche madura recién extraída de la glándula mamaria	0	
	Leche madura almacenada en banco de leche humana	2	

Tabla 12.8
 Test de Dunnett (unilateral a la derecha) con su intervalo de confianza.

Tipo de leche materna	Agente Infeccioso	Intervalo de confianza (95%)		Valor p	Significativo
		Límite inferior	Límite superior		
Calostro recién extraído de la glándula mamaria	<i>N. gonorrhoeae</i>	7.53	12.08	1.000	No
	<i>S. aureus</i>	5.85	7.95	1.000	No
	<i>P. aeruginosa</i>	4.89	7.11	1.000	No
	<i>S. pneumoniae</i>	10.15	16.53	1.000	No
	<i>E. coli</i>	12.04	16.56	1.000	No
Calostro almacenada en banco de leche humana	<i>N. gonorrhoeae</i>	6.43	10.97	1.000	No
	<i>S. aureus</i>	4.45	6.55	0.992	No
	<i>P. aeruginosa</i>	4.29	6.51	0.997	No
	<i>S. pneumoniae</i>	3.15	8.65	0.980	No
	<i>E. coli</i>	9.24	13.76	1.000	No
Leche madura recién extraído de la glándula mamaria	<i>N. gonorrhoeae</i>	2.73	7.27	0.901	No
	<i>S. aureus</i>	4.25	6.35	0.901	No
	<i>P. aeruginosa</i>	4.59	6.81	0.984	No
	<i>S. pneumoniae</i>	2.25	7.75	0.901	No
	<i>E. coli</i>	2.74	7.26	0.901	No
Leche madura almacenada en banco de leche humana	<i>N. gonorrhoeae</i>	3.43	7.97	0.978	No
	<i>S. aureus</i>	3.95	6.05	0.975	No
	<i>P. aeruginosa</i>	4.59	6.81	0.997	No
	<i>S. pneumoniae</i>	2.35	7.85	0.915	No
	<i>E. coli</i>	3.24	7.76	0.965	No