

**Propiedades Antimicrobianas de la Leche Materna Madura contra enterobacterias en niños menores de 2 años de edad. Pruebas in Vitro. Año 1999**

## **ENSAYO EXPERIMENTAL**

PRESENTADO POR:

***Dr. Antonio Vásquez Hidalgo***

*Profesor Titular  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Medicina  
Universidad de El Salvador*

© Copyright. Puede citar al autor.

**2000**



## **R**ESUMEN

**OBJETIVO:** Demostrar las propiedades antimicrobianas de la leche materna madura, en niños menores de dos años contra enterobacterias.

El estudio tiene como propósito investigar las propiedades antimicrobianas contra enterobacterias para la prevención de diarreas en niños menores de dos años.

**METODO.** Se utilizó un diseño experimental in vitro, con un nivel de confianza del 95 % y un error de estimación del 5 %. La muestra consistió en la recolección de 500 ml de leche materna madura, 120 placas de Mc Conkey sembradas con **E. coli**, **Salmonella typhi**, **Klebsiella pneumoniae** y **Shigella sp**, en alícuotas de  $1.5 \times 10^8$  UFC,  $3.0 \times 10^8$  y  $6.0 \times 10^8$ .

**RESULTADO.** No hubo crecimiento bacteriano significativo en placas inoculadas con cepas de entero patógenos en el 93 % de los casos. (  $P= 0.05\%$  )

**CONCLUSION.** La leche materna madura tiene propiedades antimicrobianas contra entero patógenos entericos en niños menores de dos años, confiriendo protección en muertes prevenibles por deshidratación en diarreas.



**PALABRAS CLAVE:** Leche materna madura, Enterobacterias, Alícuotas, Bactericida, Bacteriostático.

## INTRODUCCION

La leche materna durante siglos ha sido el recurso más inmediato para la alimentación de recién nacidos.

En países en vías de desarrollo se ha promovido la importancia del uso en la administración de la leche materna en los primeros meses en el crecimiento y desarrollo del niño por su mayor digestibilidad, económica y fácil de administración, amén de otras propiedades descubiertas en las ultimas décadas.<sup>1</sup>

Al momento existen diversos estudios a nivel Internacional que documentan existencia de una menor tasa de mortalidad por Enfermedades Infecciosas en grupos de alto riesgo que han recibido lactancia materna, en contraposición a otros investigadores que no provee el 100 % de protección sino que disminuye severas infecciones<sup>2</sup>.

La desnutrición de los niños a nivel mundial según Food and Agriculture Organization (FAO) y por World Health Organization<sup>3</sup>, se les ha negado el derecho a la lactancia materna, debido a negligencia, falta de educación o comunicación, embarazos precoces, factores ocupacionales entre otros. Sumado a la articulación del binomio desnutrición diarrea, presentando casos de mayor severidad por cuadro diarreico.

<sup>1</sup> Riveron Cortaguera. R. Archivos Dominicanos de pediatría. Sep-dic. 1994. Pp 75<sup>a</sup> 86

<sup>2</sup> Healthline Publishing Immunology.1996. Is breast feeding Becoming obsolete?.Internet

<sup>3</sup> Internet.1995 Malnutrition and behavioral development: the nutrition variable. J. Nutri.125:2255-2262



En el niño salvadoreño, la mayoría de las diarreas de origen infeccioso son autolimitadas y responden favorablemente a algún tratamiento, exceptuando en el caso de exposición por agentes agresivos como el cólera, shigellosis, amebiasis entre otros, necesitan más atención. En algunos casos exámenes coprológicos y bacteriológicos en patologías graves.

En niños menores de dos años de edad la OMS define la diarrea como: " la producción de tres o más deposiciones de consistencia disminuida, en 24 hrs o de al menos una con presencia de elementos anormales ( pus, sangre o mucus)"<sup>4</sup>

En El Salvador según el manual de normas integradas de la atención Materno Infantil (MSPAS,1993) recomiendan la Lactancia exclusiva hasta los seis meses<sup>5</sup>. Esta recomendación se articula al Informe de FESAL-93 refiere que las tasas de incidencia por Diarreas tratadas en niños 1 a 4 años de edad son de 22.7 % después de la suspensión del seno materno.

### **ANTECEDENTES.**

En condiciones naturales se ha demostrado una inmunidad pasiva en recién nacidos, sobre todo en la primera semana de vida por la presencia alta de propiedades inmunológicas en el calostro humano, luego en la leche materna.<sup>6</sup>

---

<sup>4</sup> Torres, E.J. y Colab. Diarreas Infecciosas Agudas del adulto.1996

<sup>5</sup> MSPAS.1993. Manual de Normas Integradas de la Atención Materno Infantil.

<sup>6</sup> Blackmore. C. 1986. Biological Colostrums our colostrums en free of pesticide, antibiotics and artificial growth hormones. Internet.



Al momento en El Salvador no se han publicados estudios experimentales sobre la lactancia materna madura, debido a que se obtienen referencias de artículos científicos Internacionales.

### **JUSTIFICACION.**

A nivel mundial en las ultimas décadas se ha disminuido el uso comercial de las leches enteras o embarazadas, que promocionan su consumo a gran escala en el recién nacido por desplazamiento de la lactancia materna. Se ha demostrado que la formula enterica no tiene nutrientes naturales esenciales, así como la carencia o ausencia de anticuerpos.

En U.S.A el costo durante el primer año de vida alimentado por leche artificial es de \$ 1000 a \$ 1500 <sup>7</sup>. En El Salvador el costo es de \$ 1.25 por 3-4 días según UNICEF (1992) para 1999 el costo mensual es \$ 43.00.

En El Salvador las Enfermedades Diarreicas agudas en niños, son la principal causa de morbilidad y mortalidad con una tasa de mortalidad del 19 % y de morbilidad de 45 % en niños menores de dos años.<sup>8</sup>

El costo promedio para el tratamiento de diarreas en servicios de Salud Públicos es de ₡ 11.68, a nivel privado es de ₡ 300.00 y si es ingreso hospitalario el costo es aun mayor.

---

<sup>7</sup> Internet. 1998. Breasts or Bottle? Advantages and disadvantages of each.

<sup>8</sup> USAID. 1993. La lactancia materna en El Salvador.



El estudio intenta demostrar la importancia de la administración de la leche materna madura en niños menores de dos años, porque posee propiedades antimicrobianas presente contra enterobacterias, sumado a que el niño todavía mecanismos de defensa inmunológicos en desarrollo, lo hace susceptible frente al espectro de infecciones microbianas.

En nuestro caso puede controlar los patógenos entericos par evitar muertes prevenibles por deshidratación causados por diarreas bacterianas y virales.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La administración del calostro y leche materna madura confiere una inmunidad específica y protección parcial frente a agresores inmunogenos potencialmente virulentos, que hacen incrementar la incidencia y prevalencia de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas de índole respiratoria y gastrointestinal.

De tal forma que al plantearse ¿ es la promoción de la lactancia materna hasta por dos años puede disminuir la incidencia y prevalencia de las Enfermedades Diarreicas en el niño, causada por bacterias patógenas?.

Al estudiar in Vitro las propiedades y características de la leche materna madura bajo el punto de vista inmunológico y bacteriológico puede comprobarse los beneficios para prevenir las diarreas y recomendar a gran escala su uso.



## **OBJETIVOS.**

### **GENERAL.**

Demostrar las propiedades antimicrobianas de la Leche Materna madura, en niños menores de dos años contra enterobacterias asociadas al síndrome diarreico.

### **ESPECIFICOS.**

1. Investigar las propiedades antimicrobianas de la leche materna madura realizadas en pruebas in Vitro.
2. Identificar las principales enterobacterias asociadas al síndrome diarreico a nivel de campo.
3. Correlacionar la asociación causal entre anticuerpos contra enterobacterias.



## MARCO TEORICO

Las diarreas infecciosas básicamente colonizan el tubo digestivo por mecanismos invasivos, toxigenico o mixto, por causas etiológicas como: Bacterias, virus, parásitos y hongos. En lactantes y niños las bacterias mas frecuentes, están: **E. coli, Campylobacter sp, Shiguella sp y Salmonella sp.**

Los agentes microbianos a la cabeza son los Gram. Negativos, ejercen su acción a través de enterotoxinas que actúan sobre la función secretora del enterocito ocasionando un síndrome coleriforme, y por invasión a la mucosa digestiva provocando una reacción inflamatoria ocasionando un síndrome disenteriforme. <sup>1</sup>

### I. VALOR INMUNOLOGICO.

Se ha encontrado en la leche materna diferentes clases de inmunoglobulinas, la mayor concentración de inmunoglobulinas se encuentra en el calostro <sup>2</sup>. Estos anticuerpos se adhieren a la superficie del intestino delgado y actúan como barrera contra enterobacterias. <sup>3</sup>

Entre las inmunoglobulinas que están presentes en la leche materna, están:

1. **IgG.** De todas la inmunoglobulinas esta es la que se encuentra en mayores concentraciones en el calostro, pasando en la mucosa gastrointestinal del lactante, estimulan la fagocitosis contra bacterias.



2. **IgM.** Es considerada como una macroglobulina, generalmente aparece en la respuesta primaria, estimula la fagocitosis contra bacterias e impide su absorción.
3. **IgA.** Esta presente en las mucosas digestivas e intestinal, por lo que se considera como una defensa contra bacterias y otros microorganismos, tiene propiedades antitoxinas, es la más predominante en la leche humana.
4. **IgD.** Se considera que esta presente en los linfocitos del lactante.
5. **IgE.** Se considera responsable de las reacciones de hipersensibilidad sobre todo en las alergias.

La inmunoglobulina que se encuentra en mayores concentraciones es la IgA en la primera semana, disminuyéndose entre la segunda y tercera semana <sup>3</sup>. Se considera la más predominante en el 90 %.

La IgA se encuentra en concentraciones altas en el tracto intestinal, lo que permite suprimir el transporte de antígenos al unirse a la reacción Ag-Ac en la luz intestinal e impide su absorción <sup>4</sup> y actuando como una barrera pasiva contra las bacterias y otros antígenos.

La leche humana contiene factores humorales específicos como inespecíficos que protegen contra agentes infecciosos. Tiene acción protectora contra agentes bacterianos en los primeros años de vida, como: **E. coli, Vibrio cholerae, Salmonella sp., Shigella sp., Clostridium difficile, Campylobacter sp., Klebsiella pneumoniae, Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Streptococcus sp.**

Estudios realizados sostienen que los linfocitos presentes en la leche madura, producen efectos beneficiosos contra Meningitis, Infecciones respiratorias entre otros.<sup>5</sup>



Entre los componentes inmunológicos de la leche materna, están: Linfocitos B y T, Inmunoglobulinas (GAMDE) que inhiben la colonización de las bacterias en el tracto gastrointestinal <sup>6-7</sup>; lactoferrina tiene acción bacteriostática <sup>8-9</sup>; Factores del complemento capaces de producir lisis bacteriana <sup>10</sup>; lactoperoxidasa lipasa, que actúa como factor inactivador de protozoos <sup>11</sup>; factor lipídico posee acción contra virus <sup>12</sup>; Interferón que posee actividades antivirales <sup>13</sup>; Globotriaosylceramide no es considerado como una inmunoglobulina sino un glicolípido con capacidad de unirse a las toxinas producidas por las bacterias disminuyendo su poder agresor <sup>14</sup>; lisozima no es un anticuerpo, es una enzima con propiedades bactericidas contra enterobacterias <sup>15</sup>; Factor bifido con acción de producir acidez con efecto bacteriostático por inhibición del crecimiento de enterobacterias <sup>5</sup>; Acido neuramínico no es una inmunoglobulina, su acción principal es bacteriostática como inhibidor de la adhesión viral; Macrófagos como protectores contra bacterias en el intestino <sup>16</sup>. Se reitera que la leche artificial no contiene los componentes anteriores, sino macronutrientes.

## II. ENTEROBACTERIAS.

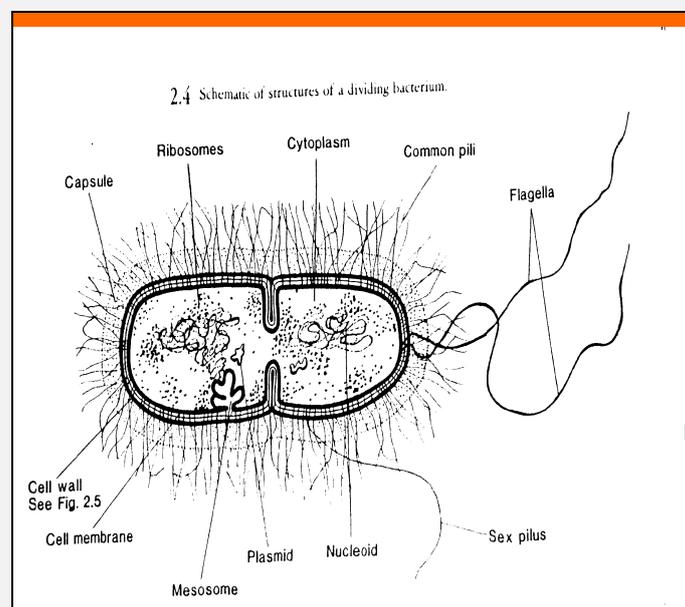
La morfología de la familia enterobacteriaceae están formadas por bacterias, en forma de bacilos Gram. Negativos, la mayoría son móviles por flagelos peritricos, cápsula dos o no <sup>17</sup>. Pueden crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, formando ácido o gas.

Entre los componentes de la familia enterobacteriaceae, <sup>17-19</sup> están: 1. Peptidoglicano responsable de la forma bacilar; 2. Lipopolisacárido localizado en la parte exterior de la membrana externa; 3. Proteínas de membrana denominados



lipoproteínas; 4. Cápsula con propiedades antifagocíticas utilizadas como mecanismo de defensa de las bacterias; 5. Fimbria con acción de adhesión bacteriana a la superficie celular de la mucosa del hospedero; 6. Antígenos de tipo somático (> 150), Capsulares K (>100) que en muchas veces confieren resistencia a medios físicos -químicos.

Entre los principales mecanismos patogénicos, están:<sup>20</sup> 1. Adherencia a mucosas por medio de fimbrias o Pili, evitando ser barridos por movimientos peristálticos y 2. Producción de toxinas que causan secreción de agua y electrolitos.



**Fig. 1. Morfología microscópica de una bacteria.**

## 2.1 Principales Enterobacterias.<sup>21,22</sup>

**A. Escherichia coli**, es un Gram negativo de forma bacilar, escasa movilidad, tienen cepas productoras de toxinas, como: Enterotoxigena (ETEC) responsable de causar diarrea líquida en niños, mediada por enterotoxinas (termolábil y estable al calor); Enteropatógena (EPEC) provoca cambios en las vellosidades intestinales del epitelio intestinal.



Estas toxinas afectan la pared del Intestino originando salida de agua y electrolitos, caracterizado clínicamente por diarreas líquidas acuosas, fétidas, sin gleras, de color verde en niños, cólicos abdominales, asociados a brotes epidémicos en guarderías infantiles.

**B. Campylobacter jejuni.** Es un bacilo Gram. negativo, no presenta esporas, produce una diarrea líquida, asociada a cuadros de Gastroenteritis aguda. Epidemiológicamente es el grupo más vulnerables son niños menores de un año en países en vías de desarrollo.

**C. Vibrio cholerae.** Son bacilos Gram. Negativos, cortos y curvos mediada por una entero toxina que produce gran secreción masiva de agua y electrolitos en el intestino delgado, provocando una deshidratación severa, colapso circulatorio y desequilibrio hidroelectrolítico. De todas las enterobacterias esta es la mas asociada epidemiológicamente a Pandemias.

**D. Salmonella sp.** Se adquiere por el consumo de carne contaminada de animales infectados, es un bacilo Gram. negativo no esporulado.

**E. Shiguella sp.** Es un bacilo Gram. negativo aeróbico o anaeróbico, no móvil, esta constituida por cuatro especies: **S.dysenterae** (10 serotipos), **S. flexneri** ( 6 serotipos), **S. boydii** ( 1 serotipo) que causa destrucción tisular por secreción excesiva de toxinas por la especie **S. dysenteriae**, esta se presenta en brotes epidémicos con una alta tasa de letalidad.

**MÉTODOS DE DIAGNOSTICO.**



1. Clínico. Se realiza por la historia clínica, cada agente tiene elementos clínicos que lo identifican, sin embargo el cuadro diarreico esta presente en la mayoría de las entidades clínicas.
2. Exámenes de laboratorio. A la cabeza el coprocultivo es el mas indicado, pruebas bioquímicas, antibiogramas entre otros.
3. Inmunológico. Entre los principales cromatografía, electroforesis y radioinmunoensayos.
4. Bacteriológico. Se realiza esencialmente por pruebas bioquímicas diferenciales para determinar genero y especie, así como medios de cultivo.

#### 4.1 Medios de cultivo.

- a. **Agar Mc Conkey.** Es un medio diferencial porque diferencia entre bacterias lactosa positiva y lactosa negativa, es muy selectivo porque permite el crecimiento de enterobacterias Gram. negativas e inhibe las bacterias Gram. positivas por contener sales biliares y cristal violeta. Establece diferencias entre las bacterias que no fermentan lactosa positivas que producen un color rojo. Entre las bacterias que utilizan lactosa +, están: **E. coli** y las que son formadoras de ácidos débiles se ven en placas de petri claras en la periferia y centro rosado son: **Salmonella sp, Shiguella, Proteus.** El medio contiene peptona 17 gr, proteasa pepona 3 g, lactosa 10 g, sales biliares 1.5 g, cloruro de sodio 5 g, Agar 20 g, Rojo neutro 0.03 g, Cristal violeta 0.001 g, agua destilada 1000 ml.

#### B. Agar TSI.



Entre las enterobacterias capaces de fermentar glucosa, producir gas sulfhídrico y fermentar carbohidratos, están: **Proteus, Salmonella, Shiguella, E. Coli, Klebsiella.**

El TSI ( tres azucres y hierro) contiene: peptona 20 g, Cloruro de sodio 5 g, lactosa 10 g, sucrosa 10 g, glucosa 1 g, sulfato de amonio ferroso 0.2 g, Trisulfato de sodio 0.2 gr, Rojo fenol 0.025 g, Agar 13 g y agua destilada 1000 ml.

### C. TSA (Trypticase Soya Agar)

Es un medio que se utiliza para el crecimiento de todas las bacterias y como medio de aislamiento, contiene tripticasa 15 g, Phytone 5 g, Cloruro de sodio 5 g, y agua destilada 1000 ml.

## 4.2 PRUEBAS BIOQUIMICAS.<sup>910</sup>

1. **Prueba de Voges Proskauer.** Su principio se fundamenta en que las bacterias fermentan la glucosa por la formación de ácido piruvio, como producto de la oxidación de la acetoína, dando el característico anillo de color rosado en la superficie de los tubos. Entre las bacterias que los producen están: Serratia, Klebsiella, Enterobacter. La prueba contiene alfa naftol 5 g, alcohol etílico 100 ml, hidróxido de potasio 40 g, agua destilada 100 ml
2. **Prueba de urea.** Las bacterias que poseen la enzima ureasa van hidrolizar la urea, liberando amoníaco produciendo un cambio de color rojo rosado en el medio ej. Proteus, klebsiella. Si la urea es negativa no se observa cambio de color en el medio

<sup>9</sup> Mac. Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 1990

<sup>10</sup> Koneman. Microbiología Médica. 1994.



ej E. coli, indicando que las bacterias poseen la enzima ureasa. La prueba contiene la stuart: extracto de levadura 0.1 g, Fosfato monopotásico 9.1 g, fosfato disódico 9.5 g, urea 20 g, rojo fenol 0.01 g.

- 3. Prueba de citrato.** Si las bacterias utilizan el citrato para su crecimiento y obtención de energía aparecerá un color azul, la prueba será positiva ej. Salmonella, Klebsiella. Algunas bacterias dan citrato negativo ej. E. coli, Shiguella. La prueba contiene: fosfato monoamonio 1 g, fosfato di potásico 1 g, cloruro de sodio 5 g, azul de bromotimol 0.80 g y agua destilada 1 litro.
- 4. Prueba de Indol.** Si las bacterias tienen la enzima triptofanasa van a producir Indol se formará un anillo de color rosado en la superficie del medio ej. E. coli, Proteus, si es negativa se formará el anillo ej Klebsiella neumoniae, Salmonellal. La prueba contiene peptona 2 g, cloruro de sodio 0.5 gr, agua destilada 100 ml.
- 5. Prueba rojo de Metilo.** Es un indicador de pH, si las bacterias producen concentraciones altas de potenciales de hidrogeno por la fermentación de ácidos mixtos se nos formará un color rojo en la superficie del medio ej E. coli, Salmonella. La prueba contiene caldo de metilo voges Proskauer 7 g, polipeptona 5 g, glucosa 5 g, fosfato dipotásico 5 g, agua destilada 1 litro, indicador de pH, rojo de metilo 0.1 g.
- 6. Prueba de TSI.** En este medio las bacterias pueden producir gas por la fermentación de azúcares y carbohidratos, como son: shiguella, E.coli, Proteus, fermentan los tres azúcares: Klebsiella, E. coli, producen gas: salmonella, E. coli, Klebsiella, Proteus, Citrobacter. Se observa en el laboratorio en el tubo burbujas o un precipitado negro.
- 7. Prueba de movilidad.** Su fundamento es determinar si un organismo es móvil e inmóvil, en el laboratorio se observa por la formación de turbidez ej. E. coli,



Salmonella, Proteus. Si no se observa turbidez la prueba es negativa ej Klebsiella , Shiguella. La prueba contiene: peptona 20 g, cloruro de sodio 5 g, lactosa 10 gr, glucosa 1 g, sulfato de amonio ferroso 0.2 g, trisulfato de sodio 0.2 gr, rojo fenol 0.025 gr, Agar 13 g, agua destilada 1 litro.

### **DISEÑO METODOLOGICO.**

Tipo de estudio. Se utilizó un diseño experimental con un nivel de confianza del 95 % y un error de estimación de un 0.05 %, P=50 para una muestra aleatoria de n=10 madres lactando y n= 120 placas de petri en medios de cultivo de TSA y Mc Conkey.

### **HIPOTESIS.**

**NULA:** el efecto antimicrobiano de la leche materna madura no difiere en el crecimiento de las colonias de las enterobacterias realizadas en pruebas in vitro.

**INVESTIGACION:** El efecto antimicrobiano de la leche materna madura difiere en el crecimiento de las enterobacterias realizadas en pruebas in Vitro.

### **SUJETOS.**

La muestra del estudio fueron diez madres que estaban con lactancia materna comprobada en niños menores de 2 años, que se encontraban en sala de espera en los servicios de consulta externa del anexo Hospital Benjamín Bloom. La otra muestra fueron las enterobacterias cultivadas de: **E.coli, Salmonella typhi, Klebsiella**



**pneumoniae y Shiguella sp**, sembradas en 124 placas de petri sembradas previamente con colonias de las cuatro especies en los laboratorios del departamento de microbiología.

#### **UNIDAD DE ANALISIS.**

Formada por madres con lactancia materna en grupo de niños entre 1-2 años de edad y por cuatro especies bacterianas obtenidas por aislamiento de laboratorio clínico.

#### **METODO.**

Se diseño en dos fases: FASE I. A cada madre se le explicó que primeramente se realizará aseo de manos con agua y jabón previo a la recolección de la muestra, se le instruyó que donara leche materna en un recipiente previamente estéril.

Las muestras recolectadas se colocaron en tubos cónicos estériles en volúmenes de 10 ml y se centrifugaron a 20,000 rpm/30 minutos a temperatura de 10 °C . El sobrenadante se acidifico con HCL 1.5N a un pH=2 y se centrifugó a 20,000 rpm/30 minutos para simular el pH ácido del estómago del niño, luego se le agregó NaOH 3 N a un pH=10 para simular el intestino del niño. Posteriormente se pipeteo 1 ml de solución preparada con volúmenes de 1 ml en tubos estériles para mezclarlo con las bacterias.

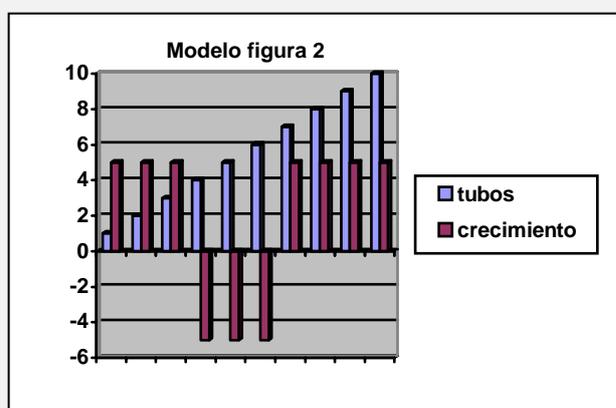
Fase II. Se utilizaron cuatro enterobacterias: E. coli, Salmonella typhi, Klebsiella pneumoniae y Shiguella sp. Obtenidas por aislamiento de laboratorio y sembradas en Agar Mc Conkey incubándose a 37 ° C por 24 hrs.



Para las pruebas in Vitro se inoculó 1 ml de cada una de las concentraciones bacterianas en las Placas de Mc Conkey, por medio de la escala de Mc Farland a una turbidez equivalente a 0.5 (  $1.5 \times 10^8$  UFC), 3.0 (  $9 \times 10^8$  UFC) Y 6.0 (  $1.8 \times 10^8$  UFC). Se cultivaron cuatro placas de control para cada prueba con el objeto de verificar genero y especie bacteriana utilizada.

En el experimento se pipeteo 1 ml del sobrenadante de la leche materna madura y se mezcló con alícuotas de 1 ml de entero bacterias, luego se siembra 100 microlitros por el método de Kirby Vauer en diez placas por cada bacteria. En total 120 placas de Mc Conkey.

Para destacar efecto del medio ácido y anticuerpos de la leche materna, se realizaron alícuotas por separado en placas testigo de TSA. Así por ejemplo se mezclaron las bacterias a un pH 2, luego se sembraron en medio de cultivo para observar si había crecimiento, en el caso de la leche materna se inoculo una porción por el método de estrías en las placas de TSA, incubándose a 37 grados por 18-24 hrs. para recuento colonial. ( modelo figura 2 ).





### **ANALISIS DE LA INFORMACION.**

Se utilizó el método cualitativo de observación en las placas para determinar crecimiento y comprobar efecto antibacteriano de la leche materna madura contra cuatro cepas bacterianas.

Para la tabulación y análisis se utilizó la estadística descriptiva e inferencial como desviación standard, riesgo relativo, prueba de Tukey por diseño de bloques, correlación y uso de programas de software como Epidat 2.0, microsoftword 6.0, Excel y otros.

### **VARIABLES DEL ESTUDIO.**

Entre las variables principales del estudio a considerar, están: anticuerpos de la leche materna madura ( variable dependiente) y cepas bacterianas ( variable independiente).

Estadísticamente se planteo la correlación directa entre anticuerpos y bacterias en los primeros años e inversamente proporcional anticuerpos y bacterias en niños mayores, es decir el efecto de los anticuerpos varia sobre el crecimiento de las bacterias, determinado bajo el método de observación clínica.

### **LOCALIZACION DEL ESTUDIO.**

Se realizó en los laboratorios de microbiología y bioquímica de la Facultad de Medicina.



## **SELECCIÓN DEL GRUPO.**

En la selección de la muestra se utilizó un muestreo no aleatorio, estableciendo los criterios:

### **Criterios de inclusión:**

1. Madre lactando
2. Niño sano menor de 2 años
3. Madre sana
4. No tratamiento antimicrobiano
5. No patología mamaria
6. Acepte entrar en el estudio
7. Etica madre anonima

### **Los criterios de exclusión fueron:**

1. No lactancia
2. Estar enferma
3. Hijo lactante menor de 1 año
4. Enfermedad concomitante de la madre
5. Tratamiento farmacológico

## **ANALISIS DE LABORATORIO.**

### **MATERIALES Y EQUIPO.**

1. 4 placas de Mc Conkey sembrado con: E. coli, Salmonella typhi, Klebsiella pneumoniae, Shiguella sp.
2. 10 tubos de solución salina estéril 0.85%



3. 12 tubos cónicos estériles de centrifuga de 15 ml
4. centrifugadora calibrada
5. incubadora a 37<sup>0</sup> C calibrada
6. 12 pipetas de 1 ml y 5 ml
7. 500 ml de leche materna madura
8. Reactivos preparados de HCL, NaOH
9. Tiras de papel de pH
10. 120 placas de Mc Conkey
11. 4 placas de Agar Sangre
12. 8 placas de TSA
13. Set de Pruebas bioquímicas
14. Reactivos de coloración al Gram.

En su análisis se consideró actividad bactericida: si la cuenta de colonias a las 24 hrs presentó ausencia de colonias en las placas ( niveles negativos), actividad bacteriostática si hay crecimiento de colonias en las placas ( niveles positivos y negativos) y No inhibitorio cuando hay crecimiento mayor de colonias (niveles positivos altos. ( modelo figura 2)

### **CONTROL DE SESGOS.**

Entre los sesgos a considerar en el ensayo experimental, están: 1. Sesgo de observación, se puede controlar por alícuotas de control; 2. Sesgo Instrumental: se controlo por observación; 4. Sesgo en los materiales: se controlo por tiras de papel de pH=2 y pH=10; sesgo de la muestra: se controlo verificando lactancia y niño entre 1-2



años; 4. Sesgo Biológico: se controló por el método de Gram. Verificando morfología de enterobacterias.

### **CONSIDERACIONES ETICAS Y CONFIDENCIALIDAD.**

La información obtenida resultó del consentimiento verbal de la madre en manifestar entrar a formar parte del estudio una vez que consistió en donar leche materna, explicándole los motivos del experimento, así como en mantener su anonimato.

### **FINES DE LA INVESTIGACION.**

Se parte del hecho de que en nuestro medio, la mujer salvadoreña "parcialmente" no cumple el rol en el seno materno, en alimentar al recién nacido<sup>11</sup>. La mujer urbana debido a ser cabeza de la familia por hogares desintegrados, asalariada, por estética, tener hijos subsecuentes entre otros, lo que conlleva a un destete precoz. La mujer rural en su mayoría prolonga su amamantamiento hasta el año, debido a su condición precaria alimenta a su hijo solo con pecho materno, luego lo desteta para buscar sustento familiar. Según informe de USAID-93 el 17.3 % suspenden la lactancia materna por leche insuficiente, el 14.9 % el niño no quería y el 10.3 % por trabajo.<sup>12</sup>

El fin de la investigación consiste en Promoción y Educación Sanitaria al menos por dos años para prevenir muertes por causas infecciosas sobre todo Intestinales y Respiratorias.

---

<sup>11</sup> USAID. La lactancia materna en El Salvador. Diciembre de 1993.

<sup>12</sup> USAID. IBID



## RESULTADOS

De las cuatro cepas utilizadas en el laboratorio, se puede demostrar una actividad antimicrobiana de la leche materna madura contra las enterobacterias.

Para **E. coli** en 10/10 muestras existe actividad bactericida en alícuotas de  $1.5 \times 10^8$  UFC, con duplicaciones positivas y 9/10 en alícuotas de 3 y  $6 \times 10^8$  UFC.

**Salmonella typhi** en 10/10 muestras a un inóculo de  $1.5 \times 10^8$  UFC no hubo crecimiento bacteriano con duplicaciones positivas ni en  $3,6 \times 10^8$  UFC.

**Klebsiella pneumoniae** en 7/10 con un inóculo de  $3,6 \times 10^8$  UFC hubo actividad bactericida y bacteriostática, con duplicaciones positivas y negativas.

**Shiguella sp** en 10/10 con alícuotas de  $1.5, 3,6 \times 10^8$  UFC hubo actividad bactericida con duplicaciones negativas. ( Figura 3,4,5 y 6)

En el caso de los testigos se obtuvieron efectos no inhibitorios con crecimientos mayores de colonias 2 veces, es decir de los inóculos bacterianos que contenían un medio ácido sin leche materna hubo un crecimiento mayor de 4 veces. En los inóculos bacterianos que contenían leche materna sin medio ácido hubo un crecimiento mayor de 2 veces. ( Figura 7 y 8.



De las cuatro cepas se encontró que las cepas de **Salmonella typhi** y **Shigella sp** presentaron mejor efecto bactericida en las tres alícuotas. ( Tabla I )

La media de la actividad antimicrobiana según alícuotas, se encontró: 10 en  $1.5 \times 10^8$  UFC, 9 en  $3.0 \times 10^8$  UFC y  $6.0 \times 10^8$  UFC. Presentando mejor efecto en  $1.5 \times 10^8$  UFC. ( 36 %) sin observar crecimiento bacteriano en las placas de Mc Conkey. ( Tabla 2.

Para las placas y cepas se encontró no hubo crecimiento bacteriano en las placas 2 y 4 ( 100 %), en el resto el crecimiento fue menor ( 20 %. ( Tabla 2 ).

La significancia estadística del 5 % en las tres alícuotas según escala de Mc Farland fue de 1.0 y el factor tablas fue de 0.14, de acuerdo a las pruebas de Tukey. ( Tabla 3)

En la tabla de ANOVA la eficacia de los anticuerpos de la leche materna madura por diseño de bloques, se encontró que la suma de los cuadrados totales por bloques fue de 14.7, la suma de cuadrados de tratamientos fue de 8.0 y la suma de cuadrados de error fue de 4.00, con grados de libertad de 3, 2 y 6 respectivamente. ( Tabla 4.)

El factor calculado fue de 7.42 para bloques y 6.06 para tratamientos, al compararlo con los valores de Ft 5 % fue de 4.76 en bloques y 5.14 en tratamientos, resultando  $F_c > F_t$ . (Tabla 4 )



Los resultados de correlación entre las propiedades antimicrobianas de la leche materna madura contra enterobacterias nos dan la ecuación  $Y = 0.44 + 0.04 X$  y  $X = -32.4 + 1.35 Y$ . ( tabla 5 )

Observamos en el grafico de coeficiente de correlación las líneas son paralelas entre las dos variables. ( Gráfico 1.)

En la distribución de valores según aceptación o rechazo de la hipótesis de estudio, se tiene que los valores oscilan entre 4.76 a 7.42, correspondiendo a dos desviaciones estándar.

**TABLA I**

**Resultado de Pruebas realizadas en actividades antimicrobianas de la Leche Materna Madura. MAYO 2000**

<b>BACTERIAS</b>	<b>1.5x 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>TOTAL</b>	<b>3 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>TOTAL</b>	<b>6 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>TOTAL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>1</b>	<b>10/10</b>	<b>10</b>	<b>9/10</b>	<b>9</b>	<b>9/10</b>	<b>9</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>10/10</b>	<b>10</b>	<b>10/10</b>	<b>10</b>	<b>10/10</b>	<b>10</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>10/10</b>	<b>10</b>	<b>7/10</b>	<b>7</b>	<b>7/10</b>	<b>7</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>10/10</b>	<b>10</b>	<b>10/10</b>	<b>10</b>	<b>10/10</b>	<b>10</b>	<b>30</b>

**FUENTE: Ensayo experimental 2000**

- **1. E.coli**
- **2. Salmonella typhi**
- **3. Klebsiella pneumoniae**
- **4. Shiguella**



**TABLA 2**

**Actividad antimicrobiana de la leche materna madura contra entero bacterias. Mayo 2000**

<b>TUBOS PLACAS</b>	<b>1.5 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>3 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>6 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>TOTAL</b>	<b>MEDIA</b>
<b>1</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>28</b>	<b>9.33</b>
<b>2</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>10.0</b>
<b>3</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>8.00</b>
<b>4</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>10.0</b>
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>36</b>	<b>36</b>	<b>112</b>	<b>37.33</b>
<b>MEDIA</b>	<b>10.00</b>	<b>9.00</b>	<b>9.00</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

**FUENTE: Ensayo experimental. 2000**

- **1. E.coli**
- **2. Salmonella typhi**
- **3. Klebsiella pneumoniae**
- **4. Shiguella sp.**

**TABLA 3****Significancia del 5 % en diferentes inóculos según Prueba de Tukey. Año 2000**

<b>CONCENTRACION</b>		<b>1.5 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>3.0 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>6.0 X 10<sup>8</sup> UFC</b>
		<b>10.00</b>	<b>9.00</b>	<b>9.00</b>
<b>6.0 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>9.00</b>	<b>1.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>3.0 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>9.00</b>	<b>1.00</b>	<b>0.00</b>	
<b>1.5 X 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>10.00</b>	<b>0.00</b>		

FUENTE: Ensayo experimental. 2000



**TABLA 4**  
**TABLA DE ANOVA**

**Eficacia de los anticuerpos contra enterobacterias por diseño de bloques al azar. 2000**

<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>Ft</b>
<b>Bloques</b>	<b>3</b>	<b>14.7</b>	<b>4.9</b>	<b>7.42 *</b>	<b>4</b> <b>.</b> <b>7</b> <b>6</b>
<b>Tratamiento</b>	<b>2</b>	<b>8.0</b>	<b>4</b>	<b>6.06 *</b>	<b>5</b> <b>.</b> <b>1</b> <b>4</b>
<b>Error</b>	<b>6</b>	<b>4.00</b>	<b>0.66</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>				

**FUENTE: Resultado de Pruebas de Estudio experimental. 2000**

- tiene significancia estadística.

FC > Ft para tener significancia estadística

**F de V = fuente de variación**

**Gl= grados de libertad**

**Sc= suma de cuadrados**

**CM= cuadrado medio**

**Ft 5 % = factor tablas**

**\* = Significación estadística**

**\* Ns= no significativo**



TABLA 5

Resultado Correlación entre propiedades antimicrobianas de la leche Materna Madura con Enterobacterias. 2000

	* Bacteria			Bacteria			Bacteria			Bacteria			TOTAL
PLACAS	1			2			3			4			
	Concentración			Concentración			Concentración			Concentración			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	2
TOTAL	0	0	0	1	1	0	0	3	3	0	0	0	8

FUENTE: Estudio Experimental. 2000

A=  $1.5 \times 10^8$  UFC, B=  $3 \times 10^8$  UFC, C=  $6 \times 10^8$  UFC

- **E. coli**
- **Salmonella typhi**
- **Klebsiella pneumoniae**
- **Shiguella sp.**



X	Y	X <sup>2</sup>	XY	Y <sup>2</sup>
1	1	1	1	1
2	1	4	2	1
3	1	9	3	1
4	1	16	4	1
5	0.1	25	0	0
6	1	36	6	1
7	1	49	7	1
8	0.1	64	0	0
9	0.1	81	0	0
10	2	100	20	4
$\Sigma X=55$	$\Sigma Y=8$	$\Sigma X^2=385$	$\Sigma XY=43$	$\Sigma Y^2=10$

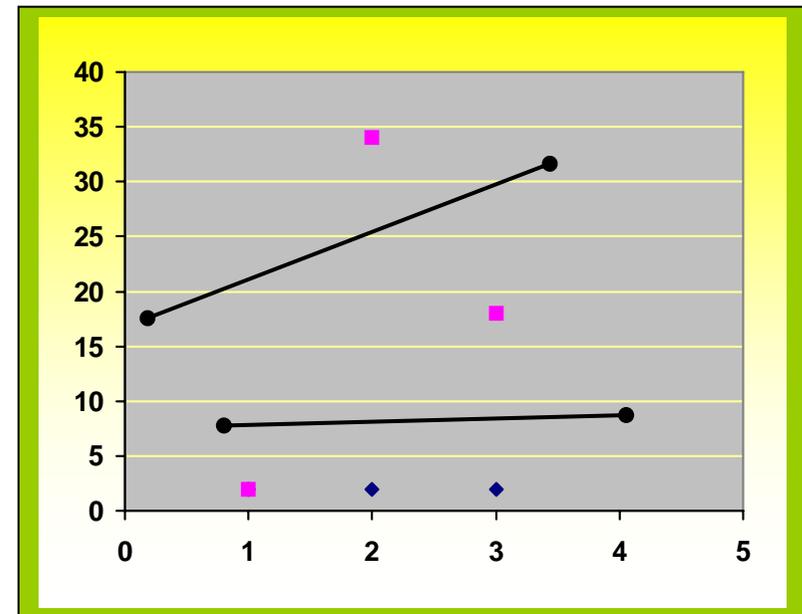
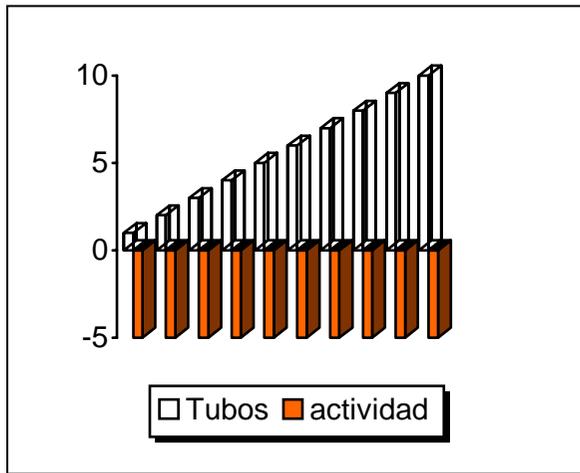
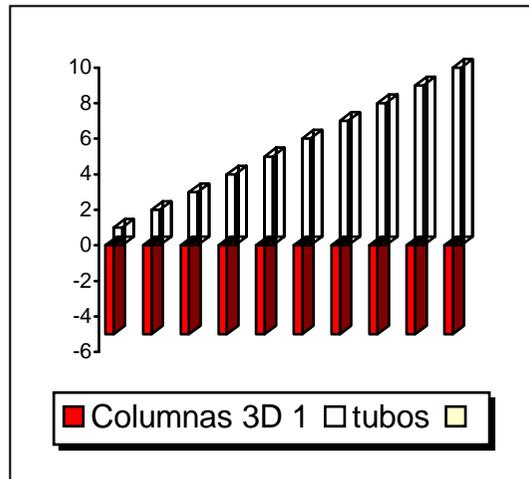


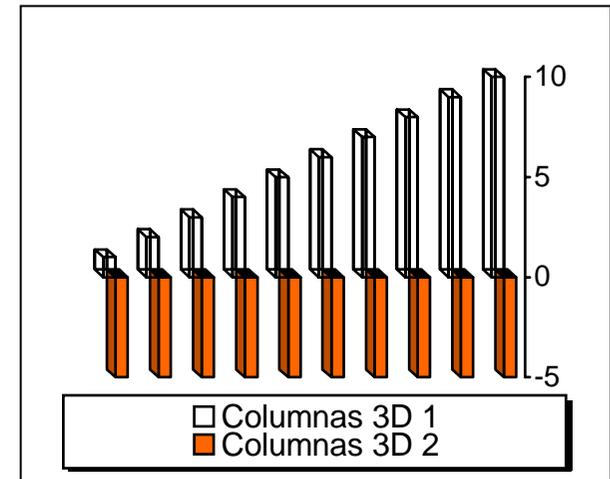
Grafico 1. Resultado correlación entre leche materna madura y enterobacterias. Año 2000



1.5 X 10<sup>8</sup> UFC

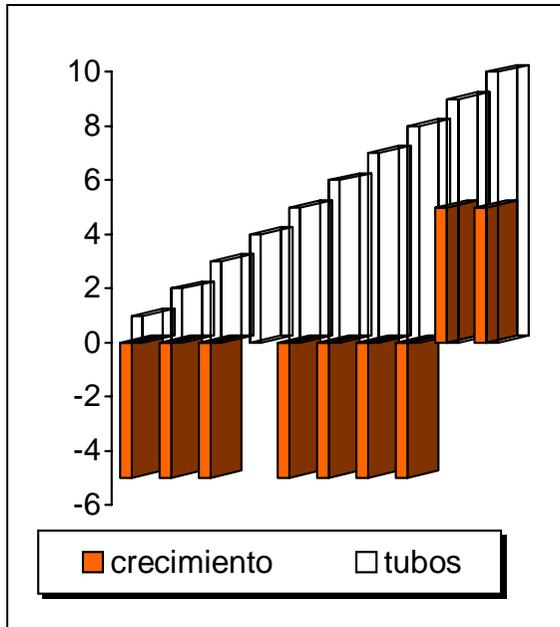


3 X 10<sup>8</sup> UFC

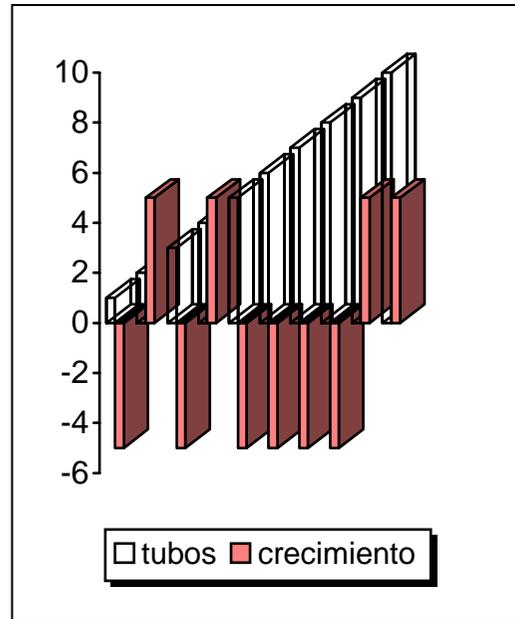


6 X 10<sup>8</sup> UFC

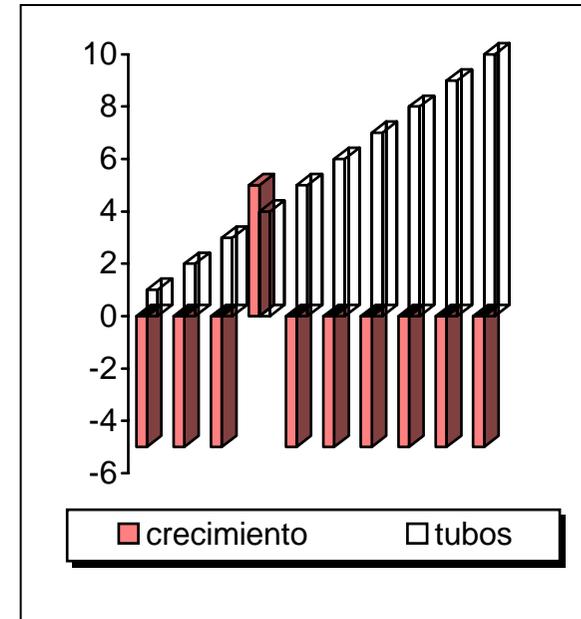
FIG. 3 . Actividad antimicrobiana de la leche materna madura en E. coli.



1.5 X 10<sup>8</sup> UFC



3.0 X 10<sup>8</sup> UFC



6.0 X 10<sup>8</sup> UFC

FIG. 4. Actividad antimicrobiana de la leche materna maduran en *Salmonella typhi*

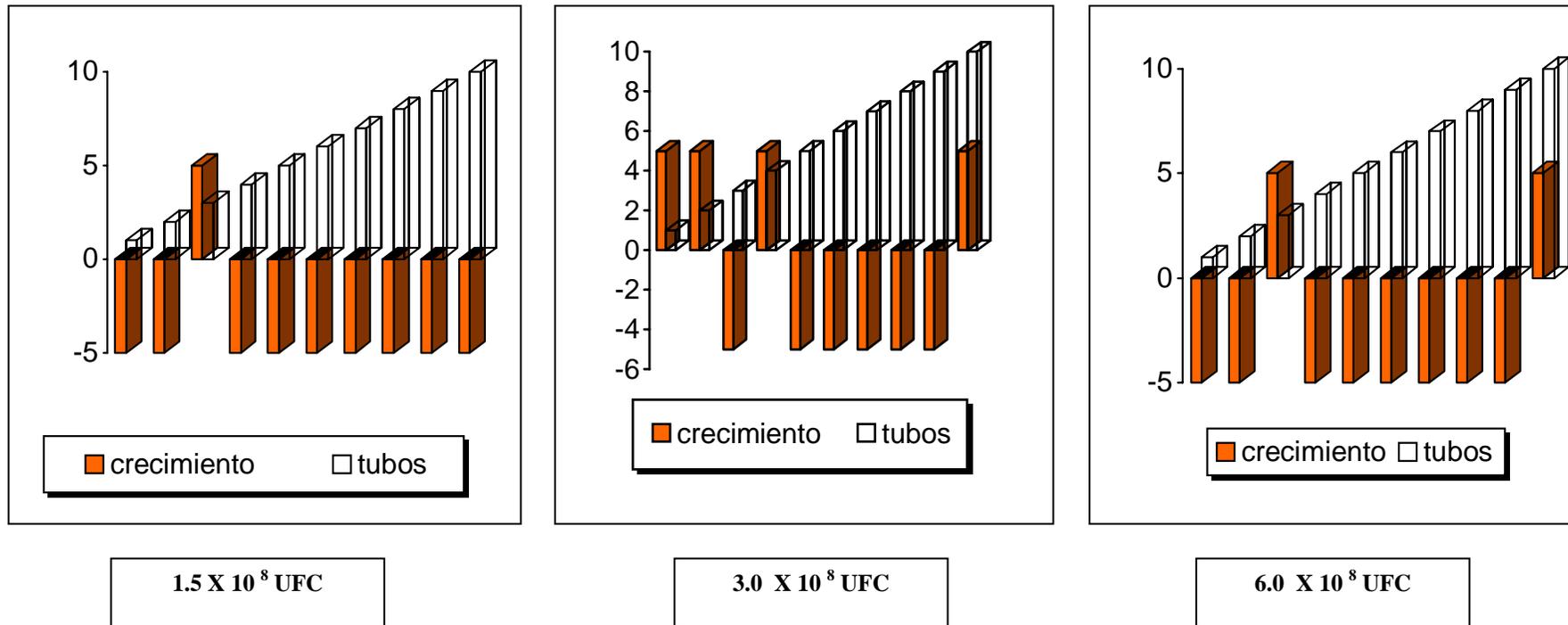


Fig. 5. Actividad antimicrobiana de la leche materna madura en *Klebsiella pneumoniae*

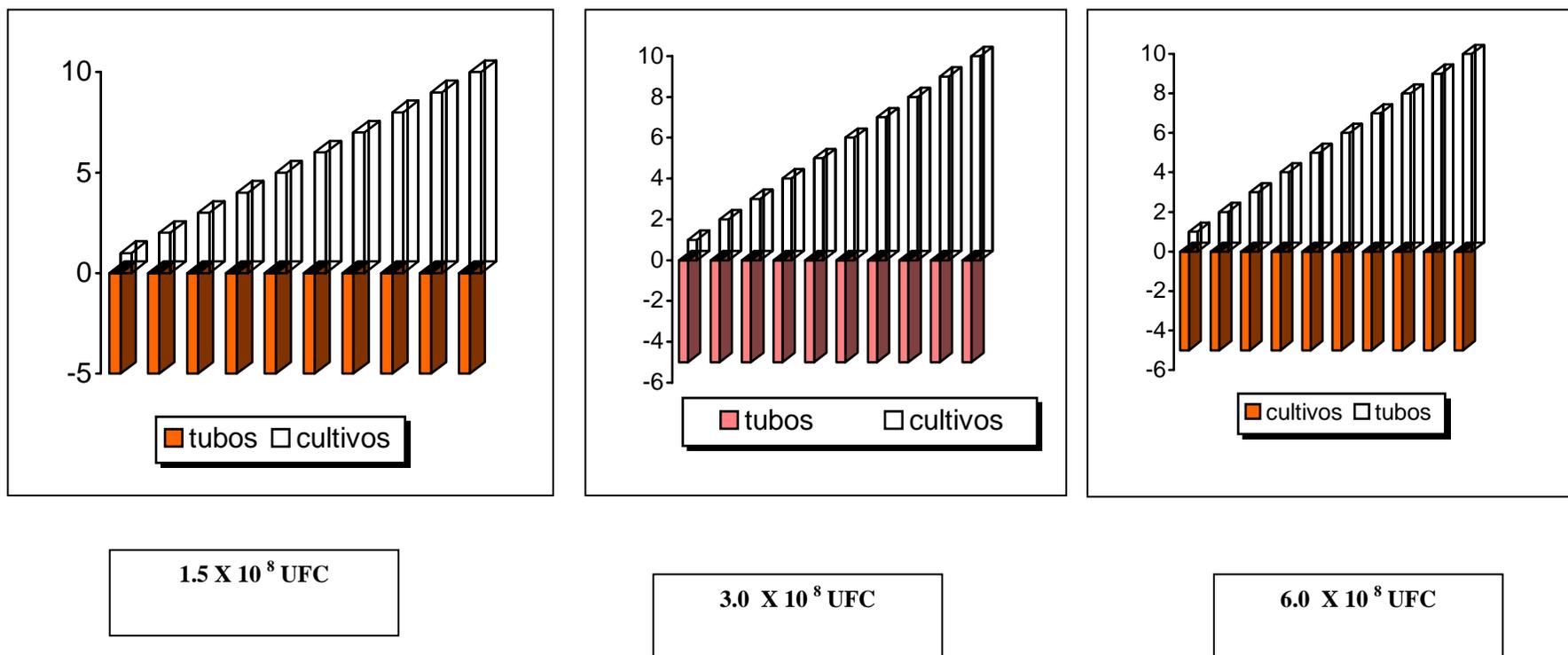
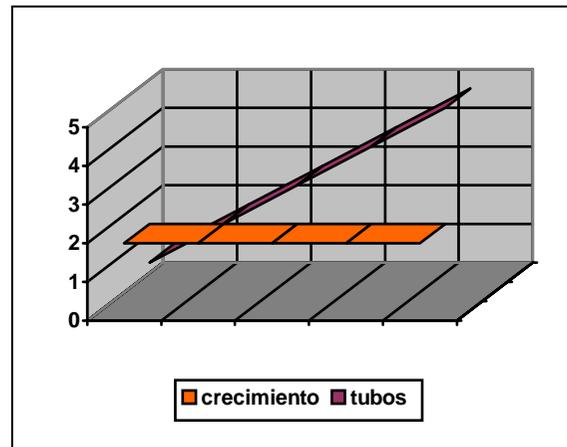
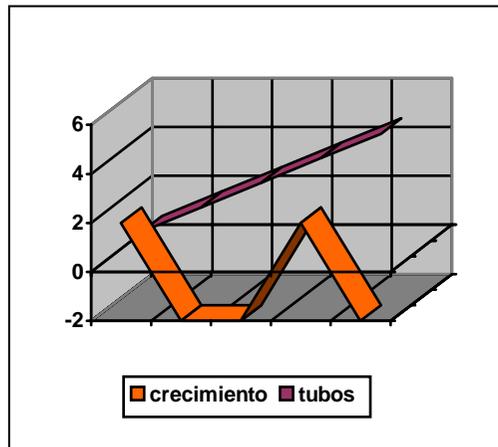
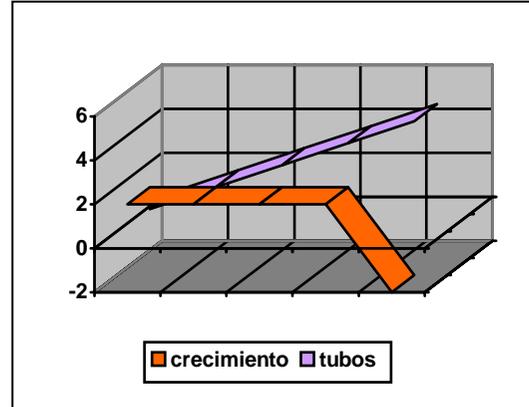
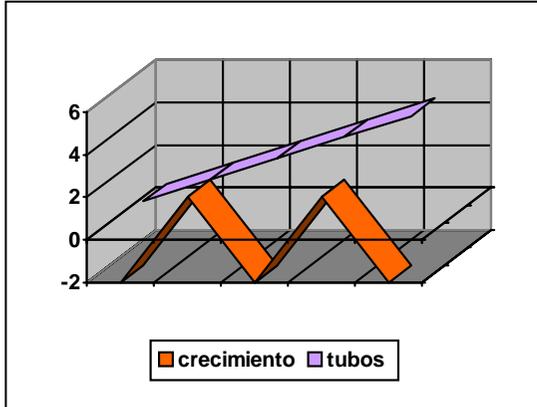
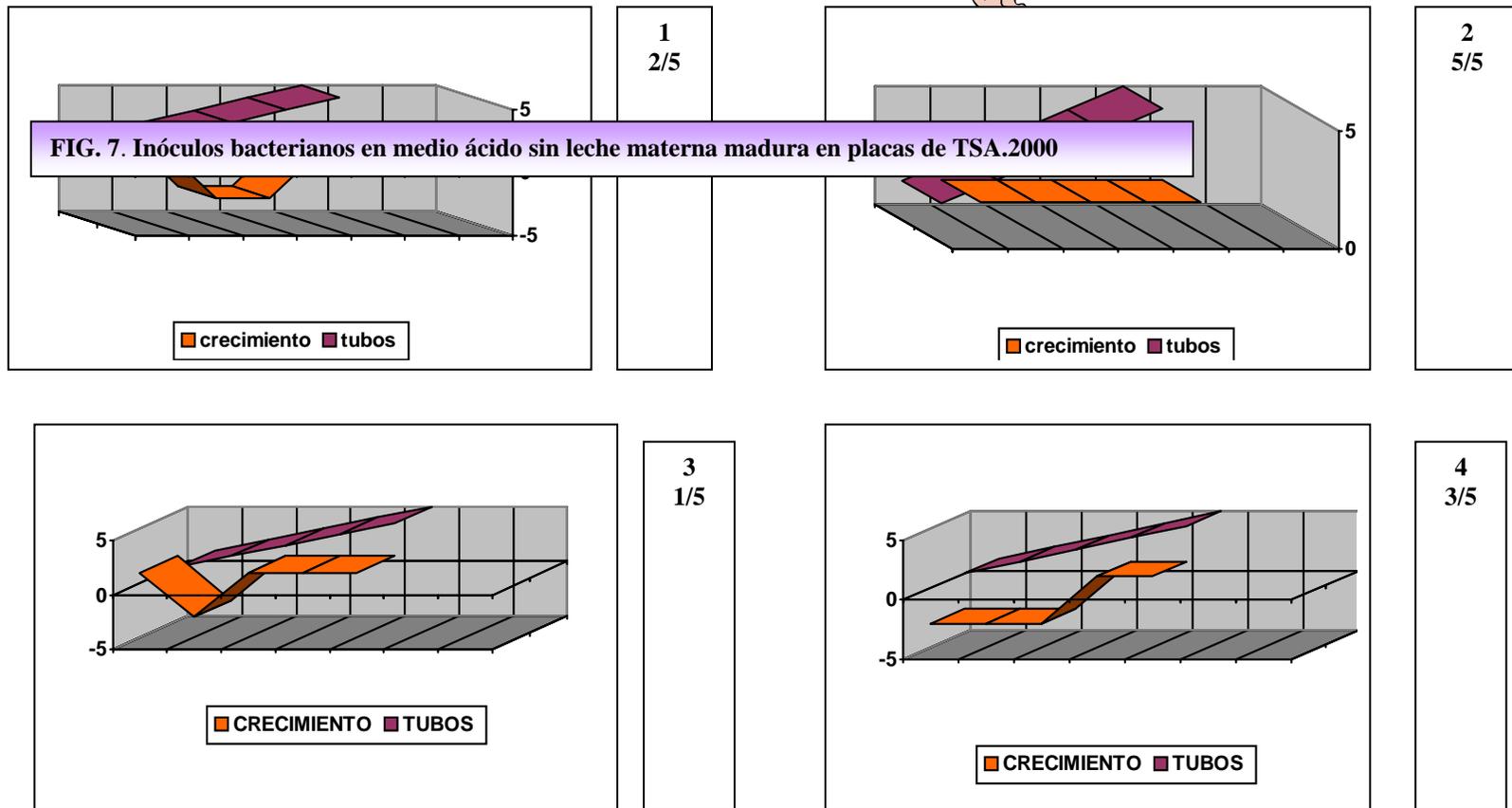
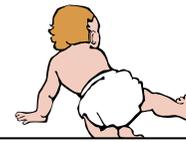


Fig. 6. Actividad antimicrobiana de la leche materna madura en *Shigella* sp.



18 X 10<sup>8</sup>UFC





**Fig. 8. Inóculos bacterianos en leche materna madura sin medio ácido en placas de TSA.año 2000**

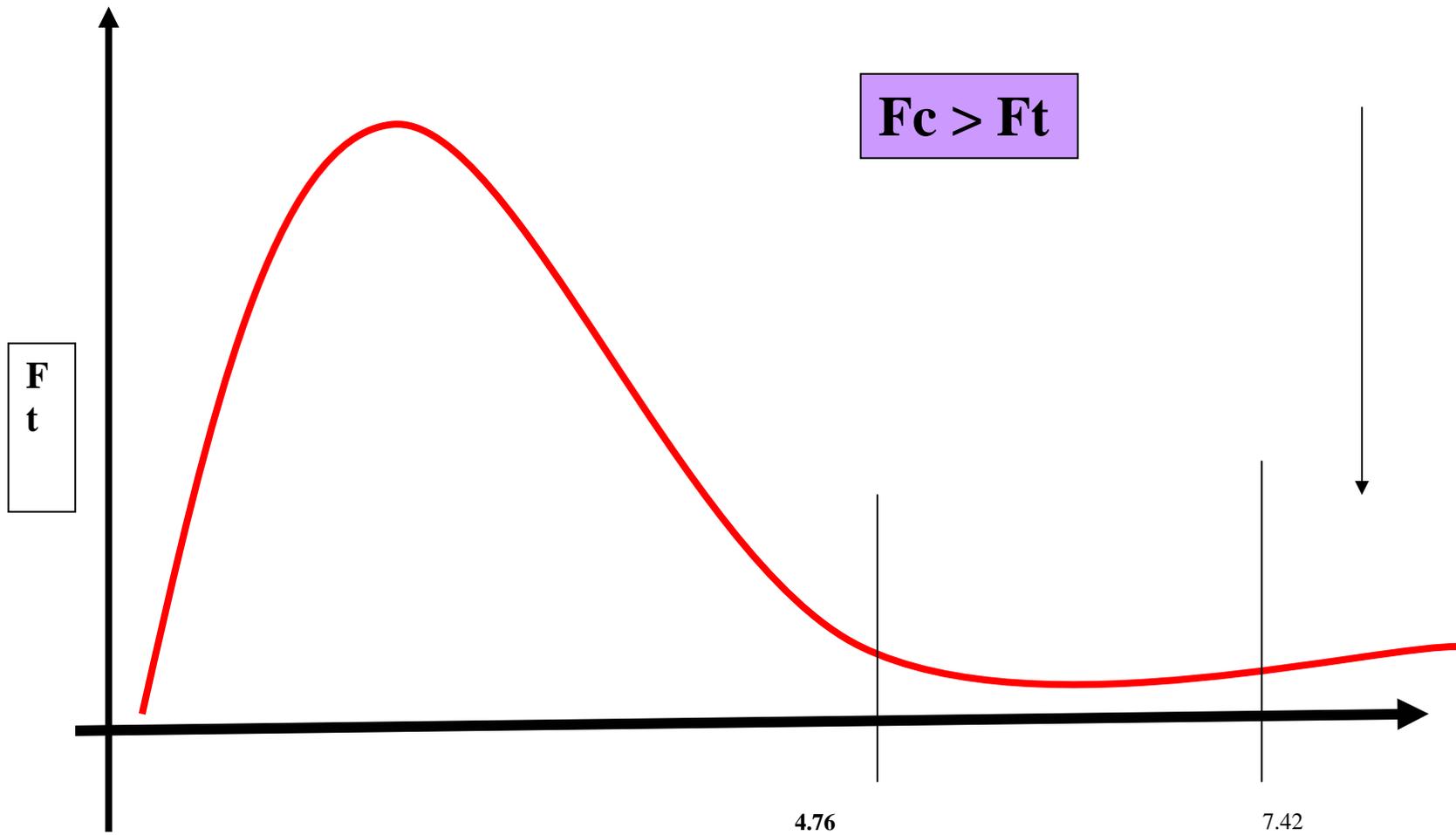


Fig. 9. Distribución de valores según aceptación o rechazo de la hipótesis de estudio. Año 2000.

## DISCUSION

Diversos autores refieren que la leche materna madura contiene componentes inmunológicos, que proveen defensas en el niño contra diversos patógenos.

La alimentación al seno materno disminuye según indicadores epidemiológicos las incidencias de morbilidad y mortalidad por Enfermedades respiratorias y gastrointestinales <sup>23</sup> en lactantes y niños menores de 1 año.

Michael y Colaboradores (1971) refieren que la mayor concentración de inmunoglobulinas se encuentra en el calostro, disminuyendo paulatinamente con el tiempo de lactancia <sup>2</sup>, en nuestro estudio en madres con lactancia materna mayores de 1 año todavía le confiere al niño propiedades inmunológicas contra enterobacterias.

En este estudio de investigación llama la atención sobremanera en los resultados de las pruebas in Vitro, que al separar la leche materna madura del medio ácido y alcalino, se observó crecimiento bacteriano en las placas de TSA. Es probable que las inmunoglobulinas necesitan el medio ácido para desdoblarse y ejercer su acción.

Murray y Colaboradores ( 1994) sostienen que los neutrofilos contienen mieloperoxidasa que al reaccionar con aminas primarias o secundarias producen nitrógenos clorados, denominadas cloraminas que actúan como microbicidas, así como radicales de oxígeno, formando iones hidrógeno e hidroxilo causando un " estallido



respiratorio" en la lisis bacteriana <sup>24</sup> manteniendo un potencial de oxidación óptimos y elaboración de ácidos grasos de cadena corta con funciones bactericidas <sup>25-26</sup>.

Neter et al (1985) y Arbelo et al ( 1995) afirman que la colonización bacteriana se inicia cuando el lactante esta en contacto directo del medio, desarrollándose una flora bacteriana en el intestino, formado por: E. coli, Klebsiella sp, Pseudomonas sp, disminuyendo posteriormente y aumentando las bacterias Gram. positivas <sup>27</sup>, a una concentración normal de  $10^3 - 10^4$  por ML.

Victoria y colaboradores ( 1989) en un estudio de casos y controles de mortalidad infantil, concluyeron que los infantes a quienes no recibieron lactancia materna tenían 14 veces más probabilidad de morir por complicaciones de diarrea que los infantes que recibieron leche materna exclusivamente. <sup>28</sup>

De las pruebas in vitro resultó que en las placas de Mc Conkey en un 90 % no hubo crecimiento bacteriano, demostrando el poder antimicrobiano de la leche materna madura contra las enterobacterias.

Staat et al (1991) en sus estudios consideran que la diarrea es mas frecuente en niños 3,2 casos/año que en niños 2,5 casos/año <sup>29</sup>. Entre los niños con ausencia de seno materno la mortalidad en cinco veces mayor. <sup>30</sup>

Sin embargo, otros estudios confirman que la leche materna no provee 100 % de protección, sino que minimiza los efectos de las enfermedades infecciosas en niños, así como en reducir el riesgo en enfermedades crónicas. <sup>3,31,32,33</sup>



En el estudio se analizaron diferentes concentraciones bacterianas encontrándose actividad bactericida aun en los inóculos  $3$  y  $6 \times 10^8$ , sugiriendo que la leche materna inhibe el crecimiento bacteriano, teniendo mayor eficacia en las cepas de **E. coli** y **Salmonella typhi**.

De las cuatro cepas estudiadas en el estudio in vitro, presentaron mayor sensibilidad a **Salmonella typhi** y **Shiguella sp** ( 25 %) a anticuerpos de la leche materna madura, con menor sensibilidad a **E. coli** y **Klebsiella pneumoniae** ( 17 %. En el 93 % de las placas sembradas con enterobacterias no se observó crecimiento, con una media de 37.33 demostrando eficacia de las inmunoglobulinas aun presentes.

Las leches enteras no pueden sustituir a enzimas y anticuerpos presentes en leche materna, aun a pesar de su alto contenido energético puede crear fenómenos de hipersensibilidad en el recién nacido y difícil digestión.

A nivel mundial al final del milenio están reconociendo la importancia de fortalecer el seno materno, porque protege al recién nacido contra el espectro de agentes virales, bacteriano, protozoos y micóticos.<sup>29,31</sup>

El estado nutricional deficiente en un niño esta articulado a la presencia de infecciones a repetición y ocurrencia de diarreas, de tal forma que las bacterias tienen poder de adherencia a las paredes intestinales causantes de diarrea aguda y posteriormente una diarrea persistente<sup>34,35</sup>.



La presencia de las enterobacterias en intestino presenta mayor secreción y aumento de volumen de líquidos, causando un desequilibrio hidroelectrolítico conllevando a una deshidratación y muerte.

En Israel (1972) encontraron que la gastroenteritis severa en niños menores de 3 meses presentaron una tasa de 25 %, por estar alimentados con leche entera. En América Latina la mortalidad es de 500,000 niños menores de 5 años por infecciones gastrointestinales <sup>36</sup>.

En El Salvador la duración promedio de lactancia es de seis meses <sup>37</sup> uno de cada cuatro menores de 3 meses reciben lactancia materna <sup>38</sup>. El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social recomienda entre sus normas dar seno materno exclusivamente hasta los seis meses <sup>37</sup>. La OMS recomienda entre 4 y 6 meses. En los países en vías de desarrollo durante las últimas dos décadas la tendencia a disminuir va en aumento <sup>39</sup>.

Es necesario comentar según método de observación cuando los niños son alimentados con leche materna al llegar a la edad adulta son "delgados" pero con una alta resistencia a las enfermedades, contrario a aquellos que son alimentados con leches de bote donde sobrepeso con altas susceptibilidades de enfermar y con un cociente intelectual promedio arriba de 8 puntos, según estudio de Lucas et al (1992) confirma en una muestra de 300 niños que recibieron leche materna se incrementó el cociente intelectual hasta 8,3 puntos del promedio normal <sup>40</sup>.



Estadísticamente se encontró que el factor calculado es mayor que el factor tablas, demostrando una diferencia significativa en el tratamiento por lo que rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis de investigación con un nivel de significancia estadística del 5 % y un nivel de confianza del 95 %.

La prueba de Tukey nos indica que las diferencias observadas entre los bloques y tratamiento son debidas a diferencias reales y no al azar.

La curva de significancia nos indica que la probabilidad de encontrar algún crecimiento bacteriano mayor de 4.76 sea nulo o bajo. ( figura 9 )

Coefficiente de correlación fue de 0.23 indicando que existe una correlación positiva, por lo que las variables interactúan, es decir que los niños con seno materno tienen mas resistencia a enfermedades diarreicas, si calculamos la varianza de factores comunes tenemos 0.05 indicando una variación del 5 % por lo que el coeficiente es significativo.



## CONCLUSIONES

- La lactancia materna en niños menores de dos años es eficaz contra enterobacterias previniendo la incidencia de casos diarreicos.
- Al utilizar las tres alícuotas mezclados con anticuerpos maternos el crecimiento bacteriológico es nulo o bajo.
- Es necesario que los anticuerpos de la leche materna maduran tengan reacción con un pH ácido y luego con un medio alcalino, para que se formen iones hidrogeno y mieloperoxidasas y ejerza una acción bactericida.
- Estadísticamente los valores encontrados son muy significativos por las pruebas de Tukey (  $F_c > f_t$  ), según diseños de bloques al azar, demostrado por la eficacia de anticuerpos.
- Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de investigación.
- Existe una correlación entre las propiedades antimicrobianas contra las cepas estudiadas en las pruebas realizadas in Vitro según ecuación  $Y=0.44 X$  y  $X= - 32.4 + 1.35 Y$ .



## **RECOMENDACIONES.**

### **A NIVEL INDIVIDUAL:**

- Educación sanitaria
- Lactancia materna hasta por dos años
- Prevenir el destete precoz
- Prevenir la incidencia de enfermedades diarreicas

### **A NIVEL COMUNITARIO**

- Comités de vigilancia de lactancia materna
- Vigilancia epidemiológica como indicador de prevalencia de lactancia materna

### **MARCO LEGAL.**

- Ejecución de Convenios Internacionales. UNICEF, MSPAS

### **MARCO NORMATIVO.**

- Revisión de normas del MSPAS y estandarización seno materno hasta por dos años
- Capacitación a madres con control de embarazo y visitas domiciliarias

### **MARCO POLITICAS DE SALUD**

- Sistematizar Política de lactancia materna hasta por dos años en madres a nivel regional y nacional en el primer nivel de atención.



## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Dutra, A. Torres E. Diarreas Infecciosas Agudas. 1996
2. Michael J.G. 1971. He antimicrobial activity of human calostrol antibody in the newborn. J. Infect dis 124: 495-448
3. Goldman. A.S. 1982. Inmunology factors in human milk during the first years of lactation J. Pediatrics. 100: 563-567
4. Fragoso Arbelo, T y otros. 1995 Microflora Intestinal y Diarrea persistente. Archivos dominicanos de Pediatria. Vol 31 No 1 enero a abril.
5. Lawrence. R.A. 1989 host resistance factors and immunological significance of human milk in : breastfeeding a guide for the medical profesion. Pp 118-147
6. Goldman. A.S. 1986 . anti inflamatory properties of human milk. Rev. Pediatrics 75: 689-695
7. Hay J.T. 1988 Microbial contaminants and antimicrobial properties of human milk. Microbiolgy. 5 : 42-46
8. Goldman, A.S. 1989. Inmunologics system in human milk. Characteristics and effects in textbook of gastroenterology and nutrition in infancy. Rev. Press pp 135-142
9. Brock, J.H. 19083. Role of antibody and enterobacterial in controlling growth of E. coli in human milk and adquisitions of lactoferrin and transferrin bound iron by E.coli immunology 40: 453
10. Hanson. L.A. 1975 Inmune defense factors in human milk. Pediatrics 15: 63-72
11. May. J.T. 1984. Antimicrobial properties and microbial contaminant of breast milk and update. Pediatrics. 20:265
12. Isaacs. Ch. 1986 Membrane disruptive effect of human milk, inactivation of enveloped viruses, Inf. Disease, 154:996-970
13. Pickering. L.K. 1986 Human milk humoral immunity and infant defense mechanisms in human milk and infant nutritions.
14. Newburg. D.S. 1992 human milk contains the toxin and shiga liketoxi. J. Infecto Disease. 166:832-836
15. Owen. R.L. 1974. Epithelial cell specialization within human peyes patches and ultra structural study of intestinal lymphoid pellices. Gastroentology 66:189-203
16. Rodríguez, C. 1989. Comparative functional study of colostrual macrophages form mother delivering preterm and at term. Pediatrics. 78: 337-341
17. Koneman. Microbiología medica. Edit. Panam. 2ª edicion 1996
18. Qwentin Myrkvik. 1998. Bacteriología medica.
19. Jawetz, Microbiología Médica. Edit. M/m 15 edic. 1997
20. OMS/OPS1993. Reading of diarrhea
21. Walker smith, J.Y. Gracey M. 1996 Resumen del 38 seminario de Nestle Nutrición. La enfermedad Diarreica. Nestec S.A. Suiza.
22. CIBA-GEIGY S.A. 1983 Monografía de la diarrea aguda
23. Castellanos C.R. 1990- leche humana propiedades inmunológicas y antimicrobianas 4: 32-38
24. Murray, R. 1994. Eritrocitos y leucocitos. Bioqu. De Harper. 60: 823-841
25. Lagana Piña. 19909- Actividad biológica de otras proteínas especializadas. Bioq. 4: 67-95
- Gracey M. 1984. He intestinal microflora in malnutrition and protected diarrhea in infancy. 233-236
- Neter. E . Braun. O. 1985. Colonización microbiana del recién nacido. Pd. 22224-231
- Soysa, et al 1992. Why promte breast-feeding in diarrhea disease control programmers? 371-379
- Staat M. et al .1991. Di9arrhea in children newly enrolled in day care centers in Houston. Pediatrics Infect. Disease. 10: 282-286
- UNICEF. 1991. Documentos sobre lactancia materna y breafeedin. Paper health line immunology. INTERNET
- Isaacs. Ch. 1996. Is breast feeding becoming obsolete? Health line immunology. INTERNET.
- Mainer. G. AIDS and milk. Protecting factors in milk. INTERNET enero1998
- Black more C. 1986. Biological active colostrums our colostrums in free of pesticides, antibiotics and artificial growth hormones. INTERNET
- Fagundes N. et al 1980 small bell bacterial flora in normal and in children with acute diarrhea. 17: 103
- Shorling. J.B. et al 1990. Malnutrition is associates with increased diarrhea incidence and duration among children in an urban bazillion slum J. Epid. 19: 728-735
- MSPAS. 1993.lactancia materna un regalo para toda la vida. UNICEF
- USAID. Lactancia materna en El Salvador. Dic. 1993
- FESAL-98 Encuesta nacional de salud familiar 1998. Informe preliminar mayo 1999.
- OPS. 1986 Manual de crecimiento y desarrollo del niño. Serie paltex. No 8 Pág. 104
- Lucas A. Et al. 1991. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm Lancet. Vol 339 Feb. 261-264