

10  
23

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
C U A U T I T L A N

MICROBIOLOGIA DE LA LECHE HUMANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A  
ROSIO CELINA CASTELLANOS CRUZ

DIRECTOR DE LA TESIS:  
DR. ERNESTO CALDERÓN JAÍMES

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
PROPIEDADES ESPECIALES DE LA LECHE HUMANA	3
PROTEÍNAS: CONSIDERACIONES NUTRICIONALES	4
PROTEÍNAS: PROPIEDADES FUNCIONALES	7
LÍPIDOS: PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES	11
CARBOHIDRATOS: PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES	12
FACTORES INMUNOPROTECTORES	14
PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LA LECHE MATERNA	20
III. OBJETIVOS	24
IV. METODOS	25
V. RESULTADOS	47
VI. DISCUSION	55
VII. CONCLUSIONES	61
VIII. ANEXOS	63
IX. BIBLIOGRAFIA	71

## I. RESUMEN

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación de nominado Microbiología e Inmunología de la Leche Humana, realizado en el Departamento de Infectología e Inmunología del INPer, dicho trabajo se fundamenta en los resultados obtenidos en un estudio previo acerca de la bacteriología de la leche de mujeres mexicanas, en el cual no se aislaron enterobacterias, por lo que se planteó la necesidad de saber si el calostro humano posee actividad antimicrobiana contra estos organismos. Se eligió probar Escherichia coli enteropatógena, Shigella sonnei y Klebsiella pneumoniae; debido a que las dos primeras especies son los agentes etiológicos más comunmente involucrados en aproximadamente la mitad de casos de diarrea infecciosa bacteriana. Klebsiella se aísla sólo en circunstancias especiales y sobre todo en recién nacidos.

El estudio se realizó utilizando una metodología variada que incluyó desde la obtención de muestra y sueros, ajuste de las concentraciones bacterianas probadas, y la realización del ensayo in vitro, mediante los métodos de recuento por dilución y recuento de colonias.

La importancia de este estudio radica en que, constituye

una evidencia fehaciente de la actividad antibacteriana de la leche humana contra patógenos entéricos, reforzando así los estudios que reportan que los bebes alimentados con pecho tienen más baja incidencia de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas incluyendo gastroenteritis, otitis media y enfermedad respiratoria que los lactantes alimentados con biberón.

## II. INTRODUCCION

### PROPIEDADES ESPECIALES DE LA LECHE HUMANA

Los descubrimientos de las investigaciones actuales han concluído que los constituyentes de la leche humana no son intercambiables con aquellos nutrientes de otro origen, por lo que nutricionistas clínicos recomiendan la leche humana como el alimento ideal para los recién nacidos de término, por su excelente biodisponibilidad de nutrientes, su contenido de factores inmunoprotectores y sus propiedades bactericidas asociadas (1-3), basando, además esta recomendación en el concepto de que los constituyentes de la leche humana juegan un papel dual único: por un lado, el papel asociado con la mayoría de nutrientes, que constituyen, la provisión de cofactores enzimáticos o sustratos para componentes energéticos o estructurales; y por otra parte, un papel funcional completo en el cual los constituyentes complementan el desarrollo de los recién nacidos (1, 4).

Las tres principales clases de nutrientes están representadas en la leche humana. Las Proteínas que proveen de aminoácidos para el crecimiento, aunque éstas se presentan como polipéptidos que ayudan a la digestión, defensas del huésped y otras funciones. Los Lípidos que proveen de ener-

gía, aunque algunas también tienen propiedades antivirales y antiprotozoarias (5). Los Carbohidratos son fuente de energía pero también pueden incrementar la absorción mineral, modular el crecimiento de bacterias y prevenir la adhesión de bacterias a las células epiteliales a lo largo de los tractos respiratorios y gastrointestinal. Hallazgos recientes sugieren que la leche humana puede estimular activamente la producción de factores inmunes selectos por los recién nacidos (1, 6).

Este capítulo estará enfocado a detallar estas características de la leche humana, enfatizando en el aspecto inmunológico y en las propiedades antimicrobianas de la leche materna por ser este último aspecto el objeto de estudio de esta tesis.

#### PROTEÍNAS: CONSIDERACIONES NUTRICIONALES

El contenido de proteína de la leche humana madura es aproximadamente de 0.8-0.9 g %. Sin embargo, la concentración de proteínas varía conforme progresa la lactación; durante los primeros 5 días postparto, se libera el calostro, el cual es un fluido amarillo claro que, comparado con la leche madura, es más viscoso y tiene un contenido más alto de proteínas y

minerales y menor cantidad de lípidos y carbohidratos (1, 7, 8). Al final de la segunda semana (20° día) postparto, la transición de calostro a leche madura es completa y la concentración de proteína es aproximadamente 1.3 g%, disminuyendo este valor hasta 0.9g% a fines del segundo mes y después del tercer mes el valor medio es 0.8 g%.

La concentración de Nitrógeno no Protéico (NPN) también disminuye. El NPN constituye el 18-30% del nitrógeno total de la leche y consiste de urea (30%), los aminoazúcares: N-acetilglucosamina (52%) y N-acetilneuramínico (10%), aminoácidos libres, creatinina, ácidos nucleicos, aminoalcoholes: colina y etanolamina (8%) (1).

COMPOSICION DE PROTEINAS DE LA LECHE MATERNA.- Las proteínas de la leche humana pueden agruparse en dos categorías principales CASEINA y PROTEINAS DEL SUERO, las cuales difieren en características de solubilidad; de tal manera que cuando la leche es digerida en el estómago del lactante se separa en dos fracciones: la caseína que se precipita y la parte soluble que contiene a las proteínas del suero.

El grupo de la caseína de la leche materna constituye aproximadamente 20-40% de las proteínas totales y consiste en



2 subtipos de alfa-caseína y varias formas de  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\kappa$  caseína. El componente principal de la familia de la caseína en leche humana es una proteína similar en tamaño, composición y movilidad electroforética a la caseína bovina  $\beta$ . La diferencia principal entre las dos es que en la proteína humana aparecen formas multifosforiladas (0-5 fosfatos por molécula), mientras que la proteína bovina contiene un número específico de grupos fosfatos por molécula.

La caseína de la leche humana a diferencia de la de otras especies animales, tiene una relación muy baja de metionina cistina reflejando una alta concentración de cistina y baja de metionina. Es de importancia resaltar que la enzima cistationasa, necesaria para la conversión de metionina a cistina, está ausente en el prematuro; por tanto, la cistina es un aminoácido esencial para el recién nacido prematuro (8).

Por lo que se refiere a las proteínas del suero, éstas constituyen el 60-80% del total de proteínas de la leche humana, pudiendo encontrar dentro de las principales a la alfa-lactoglobulina (40%), lactoferrina (25%), sIgA, IgM e IgG (0.16%), lisozima (0.08%) y albúmina (0.08%).

## PROTEÍNAS: PROPIEDADES FUNCIONALES

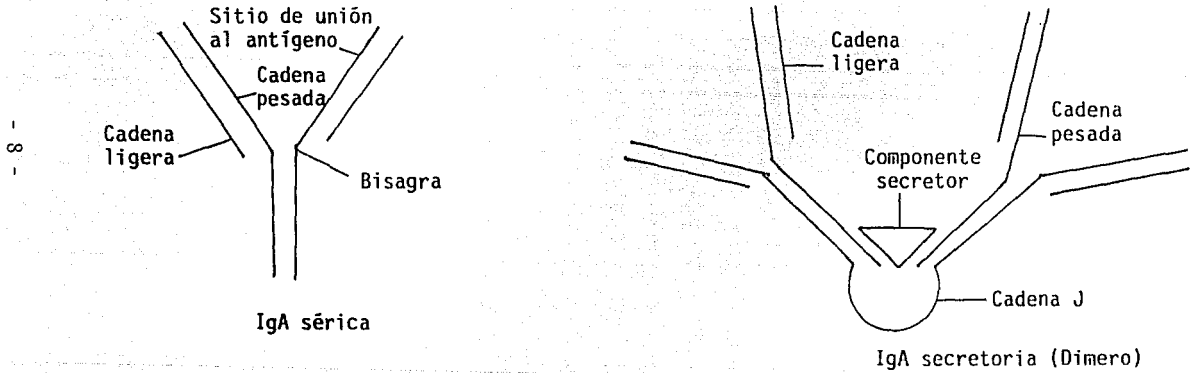
CASEINA.- La propiedad más importante de esta proteína es la elevación del contenido de calcio y fósforo en la leche humana, debido a la formación de precipitados estables con estos dos minerales, aumentando así su solubilidad.

PROTEÍNAS DEL SUERO (sIgA).- Golman y Goldblum en la Universidad de Texas, han estudiado las proteínas del suero que comprenden el sistema inmunológico de la leche humana, enfocándose principalmente en la inmunoglobulina IgA secretoria (sIgA).

Como se sabe, la sIgA es un dímero 11S unido por una cadena polipeptídica J y un componente secretor (9-12), cuya estructura es  $(L_2H_2)_2 \cdot J \cdot SC.$ , y puede observarse en la figura 1, donde se compara con la molécula de IgA sérica.

La cadena J es una pequeña glicoproteína descubierta por Halpem y Koshland (11). Se sabe, que es producida por células del plasma que sintetizan también IgA e IgM polimérica, su función biológica no está determinada, aunque se sospecha fuertemente que es el factor limitante en la polimerización de estas inmunoglobulinas.

Figura 1. ESTRUCTURA DE LA IgA SECRETORIA, COMPARADA CON LA IgA SERICA



El componente Secretor (SC), es una glicoproteína de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de 70,000-75,000 d y es sintetizado por células epiteliales de glándulas y mucosas. Se ha demostrado que el componente secretor protege a la molécula de IgA de la degradación por enzimas proteolíticas, tales como tripsina y pepsina y agrega a las moléculas para resistir cambios de pH (6, 11).

Brandtzaeg, ha sugerido que el SC, actúa como un aceptor específico para que la IgA dimérica sea transportada a través de las células epiteliales hacia fluidos secretores (10).

Se ha encontrado en la leche humana, sIgA específica contra una amplia variedad de bacterias entéricas y respiratorias y contra patógenos virales (5, 6, 13), demostrándose que la especificidad de dicha inmunoglobulina depende de la exposición antigénica de la madre (1, 6, 14). Probablemente, la IgA secretoria es el principal agente protector antimicrobiano contra infecciones infantiles (5), debido a que tiene la habilidad para adherirse por sí misma a la mucosa epitelial y prevenir así la adhesión y crecimiento subsecuente de los microorganismos en estas superficies mucosas. Se presume que si la adherencia es prevenida, la bacteria es removida por la acción del flujo rápido normal de las secreciones (1, 12).

Los mecanismos responsables para la aparición de anticuerpos IgA secretorios específicos sólo ha sido entendido parcialmente. Se ha planteado por diversos investigadores, que la mayoría de inmunoglobulinas de la leche probablemente son producidas en la glándula mamaria por los linfocitos B, mediante un proceso denominado como "homing", en el cual las células B reciben un estímulo antigénico inicial en las placas de Peyer's intestinales y en el tejido bronquial linfoide asociado (BALT) en los pulmones, para posteriormente emigrar hacia múltiples superficies mucosas, entre ellas, los alveolos de la glándula mamaria (1, 4, 6, 8). Así es sintetizada la IgA secretoria con especificidad para antígenos previamente encontrados en el intestino.

FACTORES PROTECTORES NO ESPECIFICOS.- En contraste con la IgA secretoria, que es una proteína protectora altamente específica, en la leche humana existen también factores protectores no específicos tales como: la lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa, etc., a los cuales me referiré más detalladamente en el apartado correspondiente.

## LÍPIDOS: PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES

Los lípidos proveen el 50% de la energía en la leche humana, el contenido total de grasa en ella es aproximadamente 3.5%; predominando los ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados, tales como el ácido oleico y linoleico (10%), siendo este último muy importante como ácido graso esencial en la nutrición del lactante ya que no puede ser sintetizado por lo que se tiene que administrar en la dieta (15).

El colesterol y sus esteres también están presentes en la leche materna, así como fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos libres.

La fracción lipídica de la leche humana, también provee ácidos grasos esenciales para funciones estructurales (membranas celulares) y otros fines funcionales (prostaglandinas). Adicionalmente, los lípidos de la leche parecen contribuir a la protección inmunológica de los lactantes. Los ácidos palmitoleico, oleico y láurico, así como ácidos grasos libres y monoglicéridos generados por las lipasas de la leche son los más efectivos agentes con actividad antiviral, y se ha reportado que los tres primeros también tienen actividad antibacteriana y antifúngica (1).

## CARBOHIDRATOS: PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES

La lactosa es el principal carbohidrato en la leche humana y provee aproximadamente 50% del contenido de energía. Este carbohidrato se encuentra casi exclusivamente en la leche y es el que le da el sabor dulce a este producto.

Existen evidencias de que la lactosa promueve la absorción de calcio, aunque esto no ha sido completamente aceptado.

Este carbohidrato, frecuentemente es propuesto como determinante de la flora gastrointestinal de los lactantes.

La leche humana contiene trazas de glucosa y pequeñas cantidades de oligosacáridos y glicoproteínas (factor bifido), estos componentes participan en la modulación de la flora gastrointestinal del recién nacido, favoreciendo el crecimiento de los Lactobacillus bifidus sobre el desarrollo de otras bacterias principalmente E. coli. Así, la flora comenzal resultante puede actuar de manera protectora ocupando el número limitado de sitios de unión, de tal manera que éstos permanezcan no viables para los patógenos potenciales (1, 7) (cuadro 1).

CUADRO 1. PRINCIPALES CLASES DE NUTRIENTES PRESENTES EN  
LECHE HUMANA Y FUNCIÓN BIOLÓGICA.

NUTRIENTE	CANTIDAD	F U N C I O N
ENERGIA	147 kcal/lt	
PROTEINAS TOTALES	10.6 g/lt	PROVEEN DE AMINOACIDOS PARA EL CRECIMIENTO, AYU DAN A LA DIGESTION Y DE- FENSAS DEL HUESPED.
LIPIDOS TOTALES	45.4 g/lt	PROVEEN DE ENERGIA, PRO VEEN DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES PARA FUNCIONES ESTRUCTURALES TALES COMO MEMBRANAS CELULARES Y PROSTAGLANDINAS.
ACIDO LINOLEICO COMO PORCENTAJE DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS	10.6 g/lt	
LACTOSA	71 g/lt	FUENTE DE ENERGIA, INCRE MENTA LA ABSORCION MINERAL REGULA EL CRECIMIENTO BAC- TERIANO PREVIENIENDO LA ADHESION A LOS TRACTOS RES PIRATORIO Y GASTROINTESTINAL.
MINERALES	82 meq/lt	EQUILIBRIO ELECTROLITICO



De más reciente interés, es la presencia de oligosacáridos, los cuales son estructuralmente similares a los oligosacáridos encontrados en la superficie de las células epiteliales retrofaríngeas. Estos oligosacáridos de leche humana pueden unirse a patógenos potenciales por receptores similares encontrados normalmente en células epiteliales.

### FACTORES INMUNOPROTECTORES

Está perfectamente demostrado que el neonato puede adquirir importantes elementos de resistencia inmunológica a través de la leche materna mientras se lleva a cabo la maduración de su propio sistema inmune (8, 16, 17, 18).

Una observación consistente ha sido que el calostro y leche, tienen un alto contenido celular (4-6, 13, 19) que incluye: macrófagos (80%), linfocitos T y B inmunocompetentes (10%), neutrófilos y células epiteliales (10%). Siendo los MACROFAGOS células fagocíticas activas que están implicadas como un factor en la protección proporcionada por la leche materna contra enterocolitis necrozante en animales de laboratorio (4, 5, 13, 20, 21). Esta célula también es responsable para la síntesis de algunos factores de resistencia no específicos de la leche incluyendo lisozima, componentes  $C_3$  y  $C_4$  del complemento y lactoferrina.

La enzima lisozima es capaz de lisar las paredes celulares de cualquier bacteria y su concentración en leche es de 200-250 ug/ml, 300 veces más que en leche de vaca, y es estable en un medio ácido comparable al contenido gástrico (1, 6).

La síntesis del componente  $C_3$  del complemento, el cual cuando es activado tiene propiedades opsónicas, parece no tener beneficio en la leche materna vía sistema clásico del complemento. No obstante, el sistema de complemento puede ser activado por vía alterna, la cual puede ser iniciada por IgA, la principal inmunoglobulina de la leche, y  $C_3$  activado puede ser de importancia en la leche humana vía estas propiedades opsónicas (6, 12).

La Lactoferrina es un producto adicional de los macrófagos, es una proteína acarreadora de hierro presente en muchas secreciones externas, siendo identificada primero en leche humana y su concentración varía de 1 mg/ml (6) ó 2-6 mg/ml (22) la mayor de cualquier fluido biológico. Esta proteína tiene una gran afinidad por hierro ferroso y el origen de su efecto antimicrobiano es su capacidad para privar a ciertas bacterias de hierro, por ejemplo el crecimiento in vitro de Staphylococcus y E. coli es inhibida en presencia de lactoferrina (6, 14).

Finalmente, los macrófagos de la leche, se ha demostrado que contienen IgA intracelularmente y en su superficie. In vitro esta inmunoglobulina es liberada lentamente a través del tiempo, sobresaliendo la hipótesis que esta célula podría representar un vehículo para el transporte de inmunoglobulinas.

En cuanto a las células T, éstas representan aproximadamente el 50% de los linfocitos en leche (calostro) y decrecen a menos de 20% con la lactación progresiva. Las células T de leche responden con proliferación ante la presencia del antígeno capsular K de E. coli. Aunque las células T de leche son responsables de la función inmune mediada por células, su papel total en la leche materna no está claro todavía.

Estudios recientes han sugerido que el calostro humano y la leche transfieren inmunidad específica para las superficies de la mucosa externa del intestino y posiblemente para el tracto respiratorio del recién nacido (sIgA) (1, 8, 23). La adquisición de una inmunidad pasiva semejante es de particular importancia en el período neonatal temprano cuando el sistema inmune secretor está pobremente desarrollado (13). El calostro humano contiene las principales clases de immuno-

globulinas; siendo la fuente de éstas el linfocito B (6, 8, 13). El grueso de inmunoglobulinas en calostro pertenecen a la clase IgA secretoria 11S, aunque también se pueden encontrar cantidades apreciables de componente secretor libre, IgA 7S, IgG, IgM e IgE (8). Las determinaciones cuantitativas de estas inmunoglobulinas por Ogra y Ogra (13) durante los 6 primeros meses de lactación, indicaron que los niveles de IgG (1.4 - 4.9 mg/ml) fueron relativamente constantes durante este periodo, mientras que niveles elevados de IgA e IgM 22-35 mg/g y 27-30 mg/g respectivamente, se observaron en el calostro durante los 3 a 4 primeros días; y entre los 15 a 180 días post-parto, se observó una disminución de 3 a 4 veces estas concentraciones.

Por lo que respecta a los Neutrófilos, su función en leche materna no está bien definida.

En el cuadro 2 y 3 se resumen, la contribución inmunológica de las células de la leche materna y los componentes inmunológicamente activos presentes en la misma.

**CUADRO 2. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DE LA LECHE  
HUMANA**

COMPONENTE	F U N C I O N
MACROFAGO	FAGOCITOSIS; PRODUCE LISOZIMA, LACTOFERRINA Y COMPLEMENTO; CONTIENE IgA
LINFOCITO:	
B	INMUNIDAD HUMORAL: IgA, IgM, IgD, IgG E IgE
T	INMUNIDAD CELULAR, TRANSFERENCIA DE TUBERCULINA, SENSIBILIDAD

**CUADRO 3. FACTORES INMUNOPROTECTORES ACTIVOS EN  
LECHE HUMANA**

S O L U B L E S	C E L U L A R E S
COMPONENTE SECRETOR	MONOCITOS
INMUNOGLOBULINAS: sIgA, IgA, IgG, IgM	MACROFAGOS
INTERLEUCINAS	NEUTROFILOS
MEDIADORES INMUNES	LINFOCITOS B
FACTORES DE COMPLEMENTO	CELULAS PLASMATICAS
FACTORES QUIMIOTACTICOS	LINFOCITOS T
LACTOFERRINA	
LISOZIMA	
LACTOPEROXIDASA	

## PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE LA LECHE MATERNA

Estudios recientes indican que la leche humana contiene factores antibacterianos, antivirales y antiprotozoarios (5, 6, 14, 24-26), mismos que se resumen en los cuadros 4, 5 y 6 respectivamente.

CUADRO 4. FACTORES ANTIBACTERIANOS EN LA LECHE MATERNA

FACTOR	IN VITRO ES ACTIVO CONTRA
IgA secretoria	Pili y Antígeno K de <u>E. coli</u> , <u>C. tetani</u> <u>C. diphtheriae</u> , <u>K. pneumoniae</u> , <u>Salmonella</u> , <u>Shigella</u> , <u>C. burnetti</u> , Enterotoxina de: <u>E. coli</u> , <u>V. cholerae</u> y <u>C. difficile</u>
IgM	Lipopolisacárido de <u>V. cholerae</u>
Factor de crecimiento <u>Bifidobacterium bifidus</u>	Enterobacteriaceae, patógenos entéricos
Complemento C <sub>3</sub> y C <sub>4</sub>	Efecto no reconocido
Lactoferrina	<u>E. coli</u> , <u>C. albicans</u>
Lactoperoxidasa	<u>Streptococcus</u> , <u>Pseudomonas</u> , <u>E. coli</u> , <u>S. typhimurium</u>
Lisozima	<u>E. coli</u> , <u>Salmonella</u> , <u>M. lysodeikticus</u>
Carbohidrato	Enterotoxina de <u>E. coli</u>
Lípidos	<u>S. aureus</u>
Gangliosidos (semejante a GM 1)	Enterotoxina de <u>E. coli</u> y <u>V. cholerae</u>
Glicoproteínas más oligosacáridos	Hemaglutinación de <u>V. cholerae</u>
Células de la leche:	Por fagocitosis y destrucción:
Macrófagos, leucocitos	<u>E. coli</u> , <u>S. aureus</u> , <u>S. enteritidis</u>
Polimorfonucleares,	Por sensibilización de linfocitos: <u>E. coli</u>
Linfocitos T y B	Por fagocitosis: <u>C. albicans</u> Por estimulación de linfocitos: antí- geno capsular de <u>E. coli</u>



CUADRO 5. FACTORES ANTIVIRALES EN LA LECHE HUMANA

FACTOR	IN VITRO ES ACTIVO CONTRA
IgA SECRETORIA	POLIO TIPO 1, 2, 3, COXSACKIE TIPO Ag B3, B5; ECHO TIPO 6, 9; VIRUS SILVESTRE, ROTAVIRUS, CITOMEGALOVIRUS, REOVIRUS TIPO 3, RUBEOLA, HERPES SIMPLE
IgM, IgG	RUBEOLA, CITOMEGALOVIRUS, VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO
LIPIDOS: ACIDOS GRASOS INSATURADOS Y MONOGLICERIDOS	HERPES SIMPLE, VIRUS SILVESTRE, INFLUENZA, DENGUE, VIRUS DE LA ENCEFALITIS
MACROMOLECULAS NO INMUNOGLOBULINAS	HERPES SIMPLE, VIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR, COXSACKIE B4, VIRUS SILVESTRE, CITOMEGALOVIRUS, ROTAVIRUS
ALFA <sub>2</sub> -MACROGLOBULINA (SEMEJANTE A)	HEMAGLUTINACION DEL VIRUS DE LA INFLUENZA Y PARAINFLUENZA
CELULAS DE LECHE	INDUCCION DE INTERFERON POR VIRUS A FITOHEMAGLUTININA (PHA) INDUCCION DE LINFOCINAS POR PHA, INDUCCION DE CITOCINAS POR VIRUS HERPES SIMPLE, ESTIMULACION POR RUBEOLA, CITOMEGALOVIRUS, HERPES Y SARAMPION

CUADRO 6. FACTORES ANTIPROTOZOARIOS EN LA LECHE HUMANA

FACTOR	IN VITRO ES ACTIVO CONTRA
LIPASA, ESTIMULADA POR SALES BILIARES	<u>G. lamblia</u> , <u>E. hystolitica</u> , <u>T. vaginalis</u>
NO INMUNOGLOBULINAS NO LIPASA	<u>G. lamblia</u>

### III. OBJETIVOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana IN VITRO del suero de calostro humano contra bacterias enteropatógenas.
- Establecer la actividad antimicrobiana del calostro humano ante tres diferentes inóculos bacterianos.
- Definir el espectro de los agentes bacterianos inhibidos por el calostro de mujeres mexicanas.

## IV. METODOS

### TÉCNICAS, PROCEDIMIENTOS Y MÉTODOS DE CONFIABILIDAD

#### I. MUESTRA DE CALOSTRO

En el lapso de junio a diciembre de 1987, se estudió el calostro de las mujeres en puerperio inmediato post-parto de término elegidas al azar. El número total de muestras fue de 30.

#### METODO DE SELECCION DE PARTICIPANTES

De las madres hospitalizadas en el INPer que se encontraban cursando el 2° y 4° día post-parto de término, se seleccionaron al azar 2 pacientes semanalmente.

#### CRITERIOS DE INCLUSION O EXCLUSION DE PARTICIPANTES

DE INCLUSION.- Se incluyeron a todas las mujeres sanas que se encontraban entre el 2° y 4° día post-parto de término entre 16 y 40 años de edad.

DE EXCLUSION.- Se excluyeron a las pacientes que estuvieran recibiendo en ese momento ó 2 semanas antes terapia antimicrobiana; también se excluyeron a las que tenían alguna contraindicación para lactancia materna como tuberculosis,

cardiopatías descompensadas, endocrinopatías, mastitis, grietas y malformaciones de la glándula mamaria.

#### OBTENCION DE LA MUESTRA

El procedimiento seguido para la toma de muestra fue el siguiente:

- a) A todas las participantes les fue realizada una evaluación física e interrogatorio para excluir desórdenes sistémicos o el uso de medicamentos.
- b) Las pacientes fueron informadas verbalmente acerca del estudio que se estaba realizando, obteniendo su consentimiento por escrito.
- c) Posteriormente, se indicaba a la donadora aseo de manos con agua y jabón, aseo de mamas con agua tibia y secado con una gasa estéril, prohibiéndole a partir de ese momento, tocar las llaves del lavabo u otros objetos, hasta el momento de la donación (27, 28, 29, 30).
- d) Las muestras de calostro se obtuvieron por expresión mecánica utilizando tiraleche estéril,

succionando suavemente con la bomba, descartando los primeros 10 ml. El tiempo de expresión no excedió de 15 a 20 minutos (31, 32).

- e) Se colectaron aproximadamente entre 20 y 30 mililitros de calostro por cada donadora, depositándolos en un biberón estéril y transportándolos en hielo para su procesamiento.
- f) El procesamiento de la muestra incluía la obtención del suero y la realización del ensayo in vitro; dicho procesamiento no excedió un tiempo de 5 días a partir del momento de la obtención de la muestra.

## II. OBTENCION Y PREPARACION DE LOS SUEROS (33)

El procedimiento seguido para la obtención de los 30 sueros, fue el siguiente:

- 1) Se recolectaron entre 20 y 30 mililitros de calostro (por cada donadora) de 30 mujeres.
- 2) Las muestras de calostro obtenidas se distribuyeron en volúmenes de 10 ml, en tubos de polialomero

de 11 x 60 mm estériles y se congelaron a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

- 3) Las muestras de calostro se centrifugaron a 15,000 rpm, a  $10^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos para separar elementos celulares y grasa.
- 4) Los sobrenadantes obtenidos se acidificaron con HCl 6 N a  $\text{pH} = 5$ , y se centrifugaron a 15,000 rpm por 20 minutos a  $10^{\circ}\text{C}$  para separar la caseína.
- 5) Los sueros obtenidos se ajustaron a  $\text{pH} = 7.0$  con NaOH 6N, y se distribuyeron en volúmenes de 1 ml en tubos estériles de 16 x 150 mm con tapón de rosca. Los sueros se congelaron a  $-4^{\circ}\text{C}$ .
- 6) Una asada del suero obtenido se sembró en Agar Sangre Humana para efectuar prueba de esterilidad.
- 7) Todo el procedimiento se manejó en condiciones de esterilidad y las muestras de calostro se manejaron en hielo, del paso 1 al 5, para

evitar la desnaturalización de proteínas (inmunoglobulinas), por acción del calor.

### III. OBTENCION Y CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS

Se probaron 3 especies bacterianas aisladas de coprocultivo en pacientes con diarrea: dos recién nacidos atendidos en el Instituto Nacional de Perinatología y un lactante atendido en el Hospital de Pediatría CMN. Todas las cepas se conservaron en el cepario del laboratorio de Microbiología del Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal.

Las especies aisladas de recién nacidos fueron: Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae (INPer) y Shigella sonnei (Hospital de Pediatría CMN), corroborando su identificación mediante frotis y con las pruebas bioquímicas descritas a continuación [cuadro 7] (34, 35, 36, 56).

Las cepas bacterianas se conservaron en caldo de soya tripticasa con glicerol al 20% y se congelaron a -70°C.



CUADRO 7. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL GÉNERO Y ESPECIE BACTERIANA

PRUEBA O SUSTRATO	ESPECIE BACTERIANA		
	<u>E. coli</u>	<u>K. pneumoniae</u>	<u>S. sonnei</u>
	BACILOS G (-)	BACILOS G (-)	BACILOS G (-)
FRONTS			
KI:			
PARED	ACIDO	ACIDO	ALCALINO
FONDO	ACIDO	ACIDO	ACIDO
GAS	+	++	—
H <sub>2</sub> S	—	—	—
LIA:			
PARED	ALCALINO	ALCALINO	ALCALINO
FONDO	ALCALINO	ALCALINO	ACIDO
GAS	+ 0 —	+ 0 —	—
H <sub>2</sub> S	—	—	—
MIO:			
MOVILIDAD	+	—	—
INDOL	+	—	—
ORNITINA	+	—	+
OXIDASA	—	—	—
REDUCCION DE NITRATOS	+	+	+
UREASA	—	+	—
MR	+	—	+
VP	—	+	—
FENILALANINA DESAMINASA	—	+	—
GLUCOSA:			
ACIDO	+	+	+
GAS	+	+	—
LACTOSA	+	+	—*
MANITOL	d	+	+
MALONATO	—	+	—
CITRATO	—	+	—
SACAROSA	d	+	—*
SALICIN	d	+	—
ADONITOL	—	+	—
INOSITOL	—	+	—

\* Fermenta lactosa y sacarosa lentamente  
d Diferentes reacciones

## CONTROL Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS, TÉCNICAS Y DATOS

### IV. AJUSTE DE LAS CONCENTRACIONES BACTERIANAS POR EL METODO DE RECUENTO POR DILUCION Y RECUENTO DE COLONIAS

A) FUNDAMENTO. - La metodología seguida para realizar el ajuste de las concentraciones bacterianas a probar en el ensayo in vitro, sobre actividad antimicrobiana del suero, se fundamenta teóricamente en los métodos que estudian el crecimiento y muerte bacterianas, en particular en los recuentos de cultivos de bacterias como son el recuento por dilución y el recuento de colonias, mismos que se emplean ampliamente cuando se desea hacer un recuento del número de bacterias vivas, y cuyo postulado básico es que cualquier célula viable (viva) inoculada en un medio reciente, se multiplicará y producirá datos de crecimiento de fácil conocimiento, tales como: turbidez, presencia de ácido o gas en el caldo o colonias en el agar. Estos métodos tienen la ventaja de uniformidad, ya que los resultados obtenidos por exámenes repetidos de una muestra dada, son bastante reproducibles.

RECUENTO POR DILUCION. - Con esta técnica se logra una estimación del número de bacterias en la población que pueden multiplicarse en un medio líquido. Cualquier medio puede emplearse, siempre que fomente el crecimiento de los microorga-

nismos por estudiar.

El recuento por dilución es más exacto si se inoculan varios tubos de medio de cultivo en porciones de 1 ml de cada dilución. Su precisión aumenta al inocular mayor cantidad de tubos con cada dilución sucesiva 5 ó 10, por ejemplo.

RECUENTO DE COLONIAS.- Se basa en la presuposición de que cada bacteria incluida en medio de agar nutritivo o en su superficie, se multiplicará y producirá una colonia visible. En consecuencia, el número de colonias será el mismo que el número de bacterias viables inoculadas en el agar. Un mililitro de una muestra original que contenga 100 bacterias por mililitro, se espera producirá 100 colonias, número que puede contarse sin problemas (37).

B) PROCEDIMIENTO.- Una vez establecido el fundamento teórico de las técnicas utilizadas en el ajuste de la concentración de bacterias. A continuación se detalla el procedimiento realizado.

1. Para ajustar las concentraciones bacterianas, se prepararon 4 tubos N° 1 de la serie Mac Farland y se sacó una media de las lecturas de su absorbancia

a 500 nm, posteriormente esta absorbancia que fue de 0.13, se utilizó como una medida estandar para ajustar las 3 especies bacterianas, usando como blanco para las lecturas, caldo salino peptonado al 0.1% (38).

2. Partiendo de la premisa teórica de que en el tubo 1 de la serie Mac Farland, se tiene una equivalencia de  $3 \times 10^8$  UFC/ml (cosa que se comprobó experimentalmente para E. coli y para K. pneumoniae, pero no para S. sonnei), se realizaron cuentas viables por duplicado de las 3 especies bacterianas a probar en el ensayo in vitro, con el objetivo de establecer el número de diluciones seriadas necesarias para alcanzar una concentración de  $7.5 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$  y  $0.375 \times 10^5$  UFC/ml para E. coli, K. pneumoniae y S. sonnei; y, asimismo, verificar por medio de cultivos en placa, la dilución idónea que proporcionaría un número de colonias que pudieran contarse fácilmente y con exactitud (figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Figura 2. AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE BACTERIAS A  $7.5 \times 10^5$  UFC/ml. PARA E. coli Y K. pneumoniae A PARTIR DEL TUBO I DE MAC FARLAND, -- POR EL METODO DE RECUESTO DE COLONIAS. Las flechas indican la -- transferencia o paso de 1 ml. de muestra o 5 ml. de la dilución.

	1ml	1ml	5ml	5ml	1ml	1ml	
ABSORBANCIA	0.13						
# DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7
ML. SAL. PEPT. AL 0.1% EST.	2.5	9	9	5	5	9	9
UFC/ML.	$3 \times 10^8$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$	$7.5 \times 10^3$
DILUCION		1:10	1:100	1:200	1:400	1:4 000	1:40 000

LECTURA A LAS  
24 HORAS EN -  
AGAR MUELLER-  
HINTON.

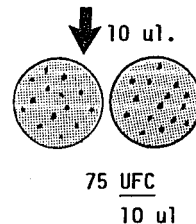
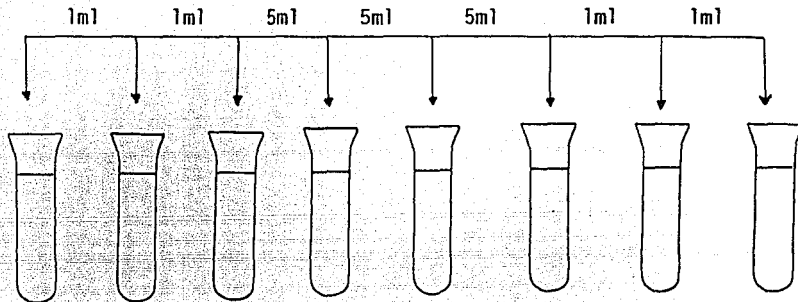


Figura 3. AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE BACTERIAS A  $7.5 \times 10^5$  UFC/ml PARA *S. sonnei* A PARTIR DEL TUBO I DE MACFARLAND, POR EL METODO DE RECuento DE COLONIAS. Las flechas indican la transferencia o paso de 1 ml. de muestra o 5 ml. de la dilución.



ABSORBANCIA 0.13

# DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
ml. SAL. PEPT. AL 0.1% EST.	2.5	9	9	5	5	5	9	9
UFC/ml.	$6 \times 10^8$	$6 \times 10^7$	$6 \times 10^6$	$3 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$	$7.5 \times 10^3$
DILUCION		1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	1:8000	1:80000

LECTURA A LAS 24 HORAS EN AGAR MUELLER-HINTON.

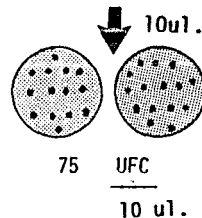
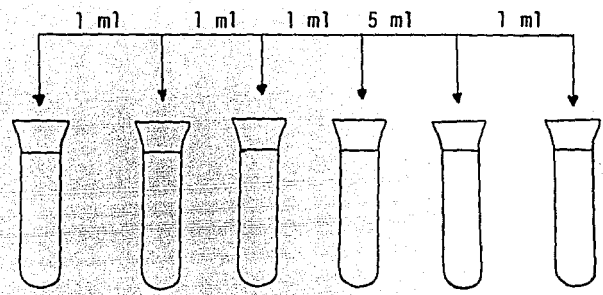


Figura 4. AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE BACTERIAS A  $1.5 \times 10^5$  UFC/ml PARA *E. coli* Y *K. pneumoniae* A PARTIR DEL TUBO 1 DE MAC FARLAND, POR EL METODO DE RECUESTO DE COLONIAS.

- 36 -



ABSORBANCIA	0.13					
# DE TUBO	1	2	3	4	5	6
ml SAL. PEPT. AL 0.1% EST.	2.5	9	9	9	5	9
UFC/ml	$3 \times 10^8$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$
DILUCION		1:10	1:100	1:1000	1:2000	1:20 000

LECTURA A LAS 24 HORAS EN - AGAR MUELLER-HINTON.

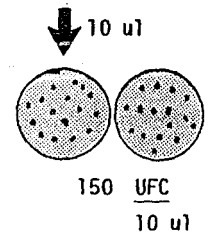
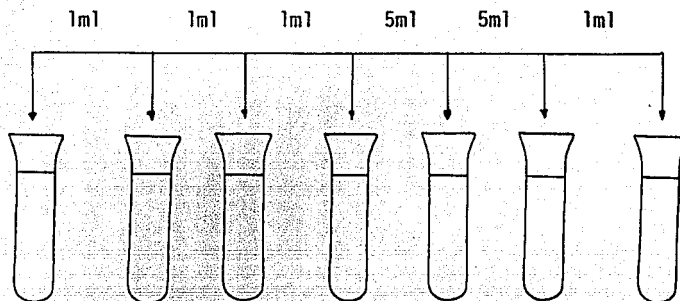


Figura 5. AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE BACTERIAS A  $1.5 \times 10^5$  UFC/ml. PARA *S. sonnei* A PARTIR DEL TUBO 1 DE MAC FARLAND, POR EL MÉTODO DE RÉCUENTO DE COLONIAS.



ABSORBANCIA	0.13						
# DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7
ML. SAL. PEPT. AL 0.1% EST.	2.5	9	9	9	5	5	9
UFC/ML.	$6 \times 10^8$	$6 \times 10^7$	$6 \times 10^6$	$6 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$
DILUCION		1:10	1:100	1:1000	1:2000	1:4 000	1:40 000

LECTURA A LAS  
24 HORAS EN -  
AGAR MUELLER-  
HINTON

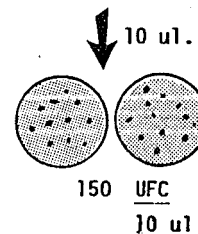
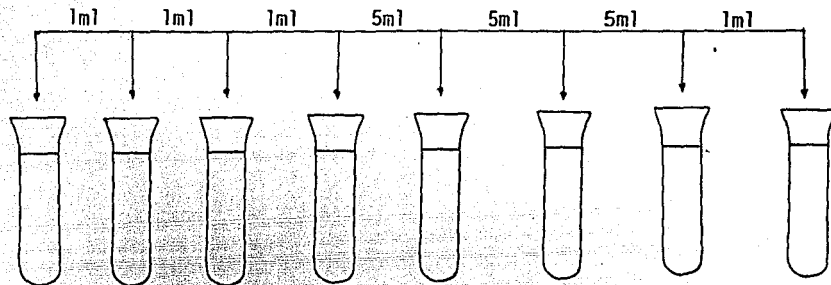




Figura 6. AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE BACTERIAS A  $0.375 \times 10^5$  UFC/ML. PARA *E. coli* Y *K. pneumoniae* A PARTIR DEL TUBO I DE MAC FARLAND, POR METODO DE RECUESTO DE COLONIAS. Las flechas indican la transferencia o paso de 1 ml. de muestra o 5ml. de la dilución.



ABSORBANCIA	0.13							
# DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
ML.SAL.PEPT. AL 0.1% EST.	2.5	9	9	9	5	5	5	9
UFC/ML.	$3 \times 10^8$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$.75 \times 10^5$	$3.75 \times 10^4$	$3.75 \times 10^3$
DILUCION		1:10	1:100	1:1000	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:80 000

LECTURA A LAS  
24 HORAS EN -  
AGAR MUELLER-  
HINTON.

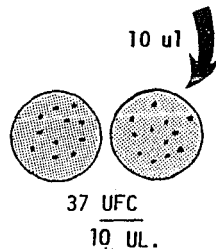
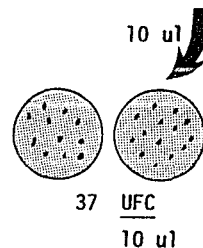


Figura 7. AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE BACTERIAS A.  $3.75 \times 10^5$  UFC/ML. PARA *S. sonnei* A PARTIR DEL TUBO I DE MAC FARLAND, POR EL METODO DE RECuento DE COLONIAS. Las flechas indican la transferencia o paso de 1 ml. de la muestra o 5 ml. de la dilución.

	1ml	1ml	1ml	5ml	5ml	5ml	5ml	1ml	
ABSORBANCIA	0.13								
# DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ML. SAL. PEPT. AL 0.1% EST.	2.5	9	9	9	5	5	5	5	9
UFC/ML.	$6 \times 10^8$	$6 \times 10^7$	$6 \times 10^6$	$6 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$	$3.75 \times 10^4$	$3.75 \times 10^3$
DILUCION		1:10	1:100	1:1,000	1:2,000	1:4,000	1:8,000	1:16,000	160,000

LECTURA A LAS 24 HORAS EN AGAR MUELLER-HINTON.



3. El recuento de colonias se hizo en la superficie del Agar de Müeller-Hinton, a partir de cultivos de 24 h, usando como diluyente caldo salino peptonado al 0.1% y un control riguroso de las condiciones de esterilidad y temperatura.

V. METODOLOGIA PARA EL ENSAYO IN VITRO SOBRE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SUERO DE CALOSTRO HUMANO, CONTRA TRES ENTEROBACTERIAS (33, 37)

La metodología seguida en la realización del ensayo in vitro se resume de manera general a continuación:

- 1) Se sembraron los microorganismos en Agar Mac Conkey y se incubaron por 18-24 h a 37°C.
- 2) Se cosecharon los microorganismos y se diluyeron en caldo salino peptonado al 0.1% y se agregaron a una concentración de  $7.5 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$  y  $0.375 \times 10^5$  UFC/ml, para Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Shigella sonnei, por mililitro de suero de calostro humano.

- 3) Se realizaron diluciones de base 10 del suero y del caldo salino peptonado (grupo control) y 10 ul de cada dilución se colocaron por duplicado en placas de Agar de Müeller-Hinton, para determinar el crecimiento de los microorganismos probados a tiempo cero y después de 4 h de incubación a 37°C (figuras 8 y 9).
- 4) Los cultivos se incubaron en aerobiosis a 37°C.
- 5) Después de 18-24 h de incubación se determinaron las cuentas coloniales del suero y del caldo salino peptonado para conocer el número de bacterias presentes por mililitro al tiempo de incubación y a las 4 h.
- 6) Una vez determinadas las cuentas de colonias, se calculó el número de duplicaciones bacterianas sobre el periodo de 4 h de incubación, considerando la actividad del suero como:

BACTERICIDA.- Cuando la cuenta de colonias de 4 h reveló una disminución de 4 veces o más (MAS DE DOS DUPLICACIONES NEGATIVAS) comparado

FIGURA 8. ESQUEMA DE DILUCIONES UTILIZADO PARA EL RECUENTO DE COLONIAS A LAS 0 Y 4 HORAS EN EL ENSAYO IN VITRO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL CALOSTRO HUMANO CONTRA  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml DE *E. coli* Y *K. pneumoniae*. GRUPO CONTROL.

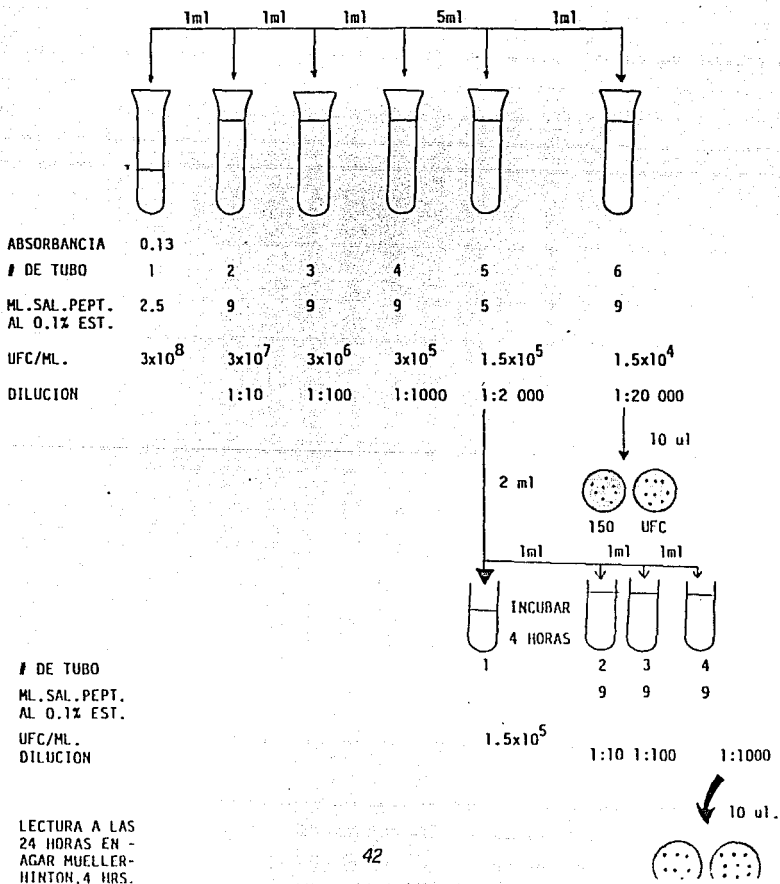
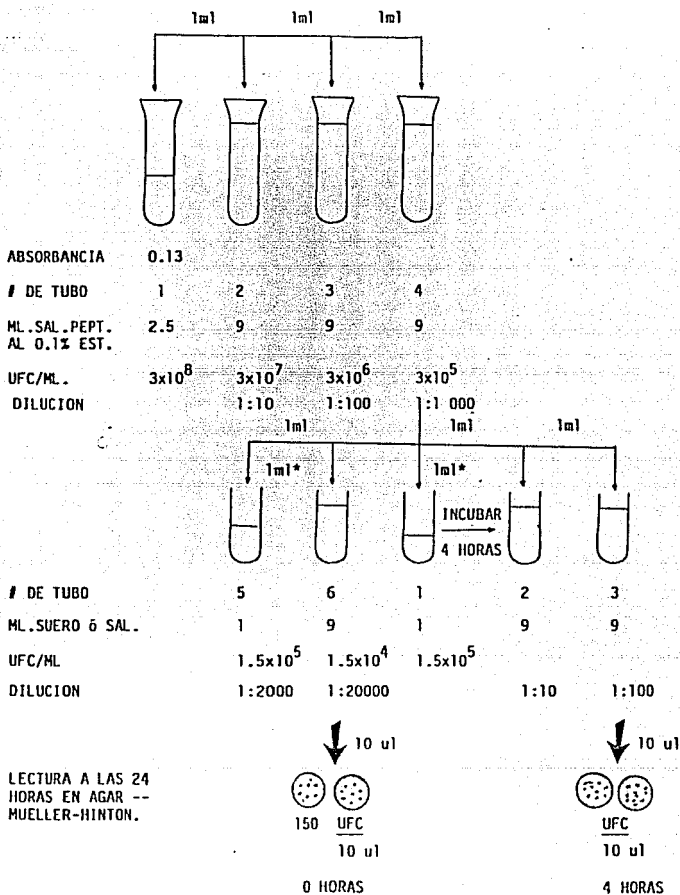


Figura 9. ESQUEMA DE DILUCIONES UTILIZADO PARA EL RECuento DE COLONIAS A LAS 0 Y 4 HORAS EN EL ENSAYO IN VITRO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL CALOSTRO HUMANO CONTRA  $1.5 \times 10^5$  UFC/ml DE *E. coli* Y *K. pneumoniae*. GRUPO PROBLEMA.



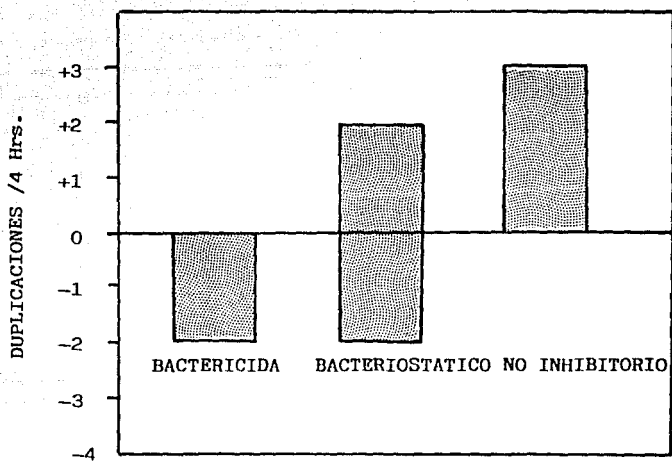
con el inóculo inicial (fig. 10).

**BACTERIOSTATICO.**- Si había una declinación menor de 4 veces (MENOS DE DOS DUPLICACIONES NEGATIVAS) pero un incremento menor de 4 veces (MENOS DE DOS DUPLICACIONES POSITIVAS) a la cuenta de 4 h. (fig. 10).

**NO INHIBITORIO.**- Si las cuentas de 4 h demuestran un incremento de 4 veces (MAS DE DOS DUPLICACIONES POSITIVAS) a la cuenta de 4 h. (fig. 10).

- 7) Grupo control.- En este experimento se utilizó como medio control el crecimiento positivo en caldo salino peptonado al 0.1%. Se decidió el empleo de este medio líquido después de haber obtenido resultados esencialmente similares cuando se probó suero inactivado por calor como medio de control. El tubo 1 control permitió comparar que al tiempo cero, la concentración de bacterias inoculadas por mililitro fue la misma que la concentración bacteriana en el suero problema. La cuenta de colonias de 4 h en caldo salino peptonado sirvió de referencia para poder comparar el número de duplicaciones bacterianas

FIG. 10  
DEFINICIONES OPERATIVAS





en suero a las 4 h y así obtener los resultados. Cada suero problema era corrido con su control correspondiente.

- 8) Durante todo el experimento se mantuvieron bajo un estricto control las condiciones de esterilidad y la temperatura, de tal manera que todo el procedimiento fue manejado en hielo, con el fin de conservar una temperatura de 0°C y así controlar el inóculo bacteriano al tiempo cero, tanto para el suero como para el control, y también con el fin de evitar la obtención de resultados falsos negativos en el número de duplicaciones bacterianas al realizar la cuenta de 4 h, ya sea porque el suero pudiese haber sufrido un proceso de desnaturalización de proteínas (inmunoglobulinas); o bien que fuera imposible contar las colonias por un exceso de duplicaciones bacterianas si el suero y el control hubieran permanecido a temperatura ambiente durante el lapso del ensayo que fue de 6 a 8 h aproximadamente.
- 9) El esquema de diluciones utilizado para probar las otras dos concentraciones ( $7.5$  y  $0.375 \times 10^5$  UFC/ml) se realizó en función de lo establecido en la figura 2 a 7.

## V. RESULTADOS

Algunas cepas de aislamientos clínicos de tres especies bacterianas fueron probadas en suero humano y en caldo salino peptonado al 0.1%. Las cepas bacterianas fueron aisladas de coprocultivo de pacientes con diarrea, incluyendo: E. coli enteropatógena, K. pneumoniae y S. sonnei.

Los sueros ensayados se obtuvieron del calostro de 30 mujeres mexicanas que cursaban entre el 2° y 4° día post-parto de término, cuya edad, peso y estatura promedio fue de  $26.1 \pm 6.59$  años,  $54.73 \pm 8.25$  kg y 1.54 metros respectivamente.

Los resultados se resumen en las figuras 11, 12 y 13 y en los cuadros 8 y 9; de tal manera que al analizar el cuadro 8 podemos observar que de un total de 30 muestras de suero se formaron tres grupos de 10 sueros cada grupo, con el objeto de probar 3 cepas bacterianas a una concentración diferente para cada grupo de sueros y posteriormente comparar la actividad antimicrobiana del calostro de mujeres mexicanas con cada una de las concentraciones ensayadas; encontrándose los siguientes resultados: para el grupo I de sueros, donde la primera concentración ensayada fue de  $7.5 \times 10^5$  UFC/ml observamos que la actividad antimicrobiana del suero fue dife-

CUADRO 8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA "IN VITRO" DEL CALOSTRO HUMANO CONTRA TRES ENTEROPATÓGENOS

CONCENTRACION BACT. A LAS 0 H (UFC/ml)	Nº DE MUESTRAS	BACTERICIDA	BACTERIOSTATICO	NO INHIBITORIO
$7.5 \times 10^5$	10	E - 4	E - 6	E - 0
		S - 1	S - 9	S - 0
		K - 0	K - 10	K - 0
$1.5 \times 10^5$	10	E - 4	E - 6	E - 0
		S - 4	S - 6	S - 0
		K - 1	K - 9	K - 0
$.375 \times 10^5$	10	E - 8	E - 2	E - 0
		S - 6	S - 4	S - 0
		K - 3	K - 7	K - 0
<u>T O T A L</u>	<u>30</u>			

E = E. coli

S = Shigella sonnei

K = Klebsiella pneumoniae

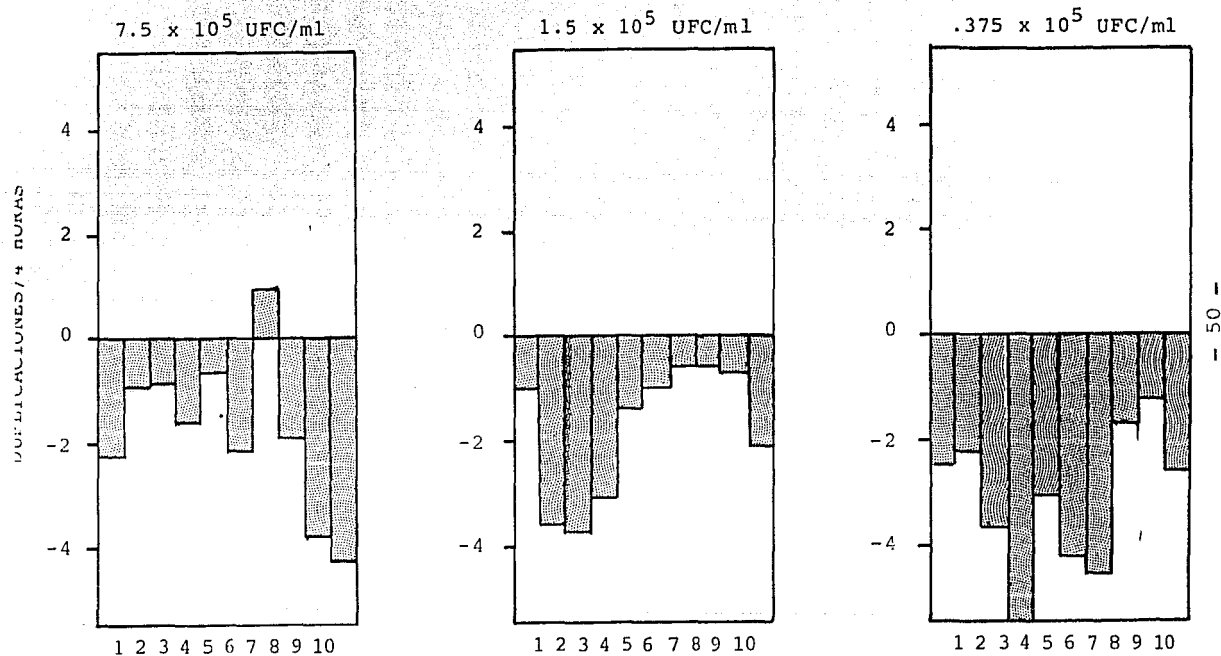
rente para cada especie bacteriana ya que para E. coli enteropatógena, 4 sueros fueron bactericidas y 6 fueron bacteriostáticos, en tanto que para S. sonnei, 1 suero resultó bactericida y 9 bacteriostáticos y para K. pneumoniae los 10 sueros resultaron bacteriostáticos.

En el grupo II, se ensayó una concentración de  $1.5 \times 10^5$  UFC/ml de las 3 especies bacterianas, demostrando que para E. coli y S. sonnei la actividad antimicrobiana fue la misma ya que 4 sueros resultaron bactericidas y 6 fueron bacteriostáticos. Para K. pneumoniae 1 suero fue bactericida y 9 sólo inhibieron su crecimiento.

En el grupo III, se ensayaron 10 sueros a una concentración de  $0.375 \times 10^5$  UFC/ml de las 3 enterobacterias, demostrando que E. coli enteropatógena fue destruída por 8 sueros e inhibida por 2, en tanto que S. sonnei fue destruída por 6 sueros e inhibida por 4 y, finalmente, para K. pneumoniae 3 sueros fueron bactericidas y 7 bacteriostáticos.

Por otra parte, al analizar los resultados de las figuras 11, 12 y 13, se pudo comprobar también que la actividad antimicrobiana del calostro humano con respecto a la concentración bacteriana inculada fue la siguiente: mientras mayor

FIG. 11 INHIBICION DE *Escherichia coli*  
 POR SUERO DE CALOSTRO HUMANO



- 50 -

FIGURA 12. INHIBICION DE *Shigella sonnei*  
 POR SUERO DE CALOSTRO HUMANO

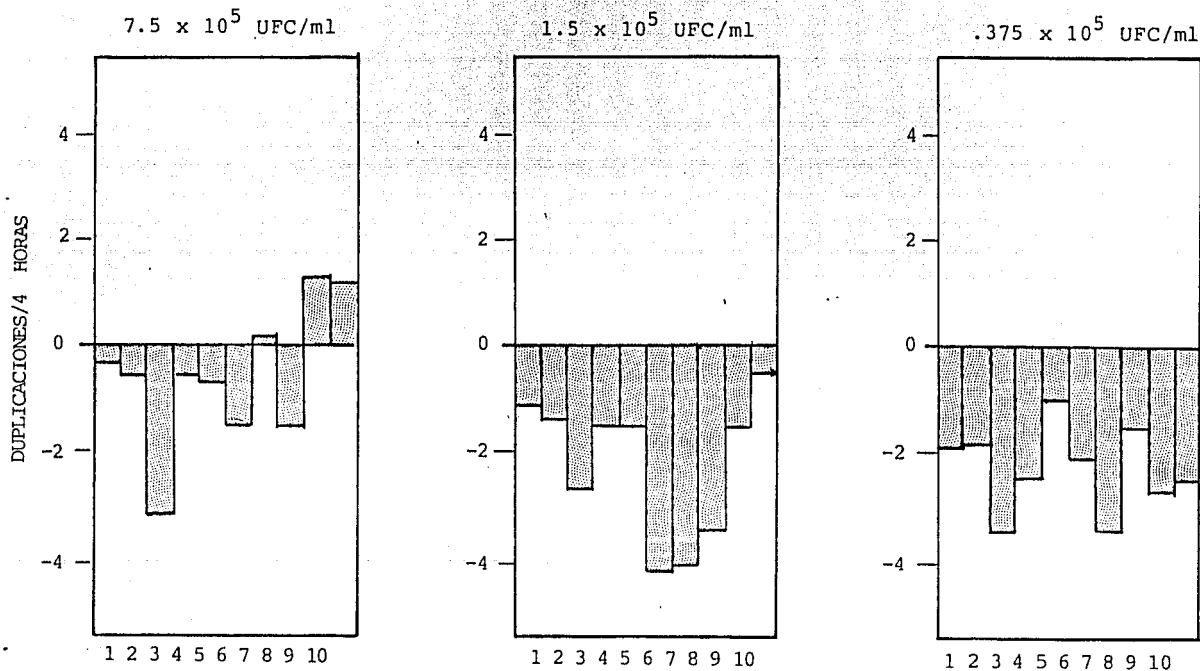
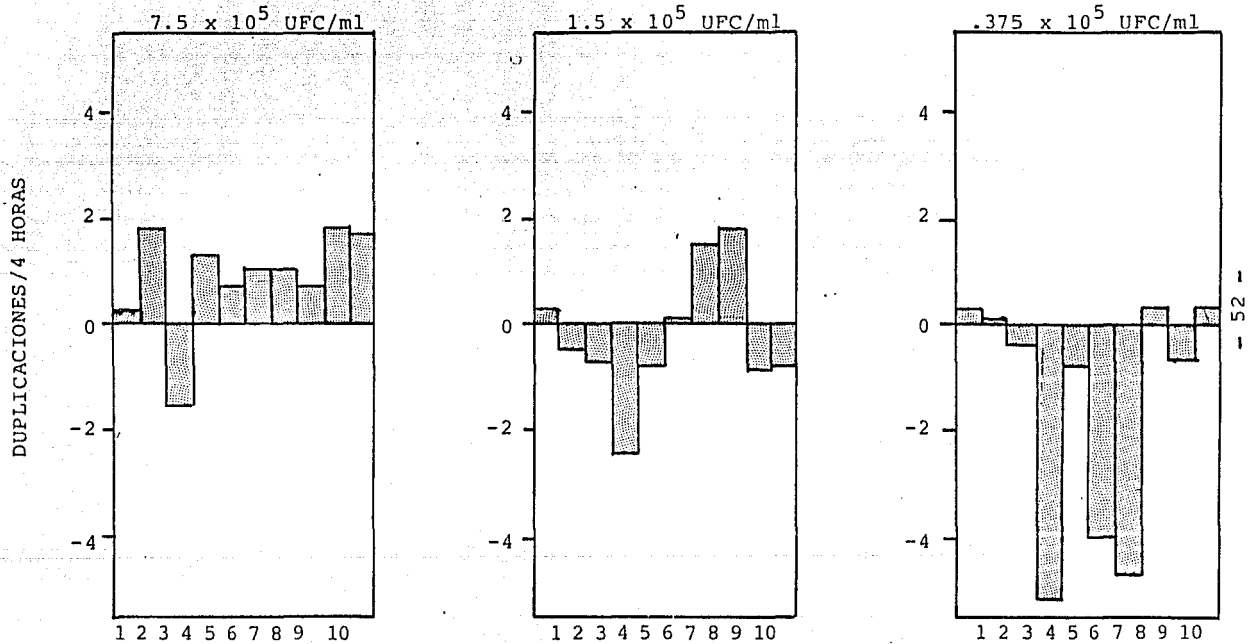


Figura 13. INBICION DE Klebsiella pneumoniae  
 POR SUERO DE CALOSTRO HUMANO



fue la concentración bacteriana inoculada ( $7.5 \times 10^5$  UFC/ml) al suero de calostro humano, menor fue la actividad bactericida de dicho suero, predominando una actividad bacteriostática; en tanto que al ir disminuyendo gradualmente la primera concentración inoculada ( $1.5$  y  $0.375 \times 10^5$  UFC/ml) la cantidad de sueros bactericidas aumentó también gradualmente y disminuyó la cantidad de sueros bacteriostáticos, siendo válida esta observación para las tres especies bacterianas probadas, manifestándose más notablemente este comportamiento del suero en E. coli, en seguida en S. sonnei y finalmente en K. pneumoniae.

Para finalizar, diré que analizando de forma global los resultados obtenidos pudimos observar que de los 30 sueros probados, todos presentaron actividad antimicrobiana ya sea bactericida o bacteriostática sin la obtención de ningún suero no inhibitorio y que independientemente de la concentración utilizada, el espectro bactericida del suero fue mayor para E. coli enteropatógena, siguiendo en orden descendente S. sonnei y, finalmente, K. pneumoniae (cuadro 9).



CUADRO 9. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL CALOSTRO DE MUJERES MEXICANAS CONTRA TRES ENTEROBACTERIAS EN UN SISTEMA ENSAYADO IN VITRO.

C E P A	TOTAL MUESTRAS	BACTERICIDA	BACTERIOSTATICO	NO INHIBITORIO
<u>E. coli</u>	30	16	14	- -
<u>S. sonnei</u>	30	11	19	- -
<u>K. pneumoniae</u>	30	4	26	- -

## VI. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo reportan el espectro de la actividad antimicrobiana del calostro humano contra tres enteropatógenos causantes de diarrea infantil en un sistema ensayado in vitro, demostrando que las tres cepas probadas fueron destruídas ó inhibidas por el suero como ha sido descrito previamente (20, 33).

Se utilizó como medio control de crecimiento bacteriano caldo salino peptonado al 0.1%, a causa de que se obtuvieron resultados esencialmente similares al probar con un pool de suero inactivado por calentamiento a 62.5° C por 30 minutos (2, 3, 5, 39), además de contar con el antecedente de que en el recuento por dilución cualquier medio líquido puede emplearse, siempre que fomente el crecimiento de los microorganismos por estudiar (37).

Los organismos gram negativos fueron inhibidos o destruídos por el suero de calostro, aunque en grado variable. Resumiendo los resultados obtenidos, pudimos comprobar que al probar las tres especies bacterianas a una misma concentración y con un mismo grupo de sueros, la actividad antimicrobiana del calostro humano fue diferente para cada microorganismo a

excepción de E. coli y S. sonnei para las cuales, a una concentración de  $1.5 \times 10^5$  UFC/ml los sueros presentaron el mismo espectro antimicrobiano; en tanto que para K. pneumoniae a esta misma concentración la actividad del suero fue diferente, por lo que se puede establecer, que el calostro humano posee actividad antimicrobiana diferente contra una variedad de microorganismos, dependiendo de algunos factores que afectan la producción y composición de la leche humana, tales como: la edad y el peso al nacer de los niños, el estado nutricional y dieta ingerida por la madre, el tiempo de días, la porción de alimentación, la frecuencia de alimentación, la posibilidad del sexo de los infantes, la paridad de la madre, el estado de hidratación y la variación genética o individual (6, 40); así como la experiencia inmunológica de la madre con enfermedad infecciosa, que es la condición para que en su suero estén presentes los componentes inmunológicamente activos, encargados de la protección específica e inespecífica contra dichos agentes infecciosos (1, 6).

Así pues, los aislamientos de coprocultivo de E. coli enteropatógena y S. sonnei fueron más susceptibles al efecto bactericida del suero, observando que el comportamiento de éste ante los 3 diferentes inóculos bacterianos ensayados fue la persistencia de duplicaciones negativas; mientras que la

(7, 22, 19, 41, 42); siendo altamente probable que este sistema haga una importante contribución a la resistencia especialmente en el intestino grueso. En el intestino delgado las condiciones ligeramente alcalinas son las adecuadas para la inhibición de E. coli por lactoferrina e IgA secretoria, y esto puede ser asistido por la presencia de tripsina, un inhibidor en leche humana quién tiende a retardar la digestión de proteínas.

Otros mecanismos, también pueden ser responsables de los efectos observados con los organismos gram negativos. En adición a lactoferrina e inmunoglobulinas, otros componentes de la leche, tales como lisozima y lactoperoxidasa (1, 5, 19, 43-45), pueden estar involucrados en la acción inhibitoria de bacterias gram negativas como es el caso de E. coli, S. sonnei y K. pneumoniae. Así, la lactoperoxidasa y la lisozima, que tienen actividad bacteriostática o bacteriolítica actúan sinérgicamente con la IgA secretoria y lactoferrina lisando a E. coli y Salmonella (23, 26).

En general, los factores antimicrobianos encontrados en leche humana que son activos in vitro contra los microorganismos gram negativos que probamos en nuestro ensayo son los siguientes: la sIgA ha sido detectada para pili y antígeno

K, O y H de E. coli (5, 41, 46), para K. pneumoniae y Shigella (5, 23, 47, 48).

En adición a sIgA el gangliósido semejante a GM 1 (receptor celular de membrana para las enterotoxinas) inhibe también enterotoxinas de E. coli. Otro factor es un carbohidrato (no lactosa) que protege a los ratones contra la enterotoxina estable al calor de E. coli (23). También el factor de crecimiento bifidobacterium localizado en el oligosacárido de la caseína de la leche humana actúa contra Enterobacteriaceae y patógenos entéricos (7, 41, 49).

Finalmente, las células de la leche pueden fagocitar y destruir a E. coli con o sin actividad opsónica (4, 20, 26).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, muestran que la cepa de E. coli enteropatógena, fue en general susceptible a la inhibición por leche y son consistentes con la observación que la leche materna es protectora contra infecciones entéricas.

La posibilidad de que la alimentación al seno materno ofrece al niño amamantado protección contra otros patógenos bacterianos, incluyendo las especies sensibles a la leche

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

aquí reportadas (E. coli, K.pneumoniae. y S. sonnei), merecen estudios futuros, en cuanto al contenido de sustancias específicas que neutralizan las enterotoxinas (agentes infecciosos) como sería el caso de la IgA secretoria. Asimismo, sería de interés examinar la sensibilidad de la leche a otros agentes infecciosos para definir el rango de los efectos protectores de la alimentación materna, correlacionando su efectividad in vivo en la limitación del crecimiento de los microorganismos, y su asociación con la prevención de infecciones gastrointestinales y respiratorias que requieren hospitalización, así como la disminución de la mortalidad en poblaciones de riesgo (3, 5, 7, 17, 20, 26, 45, 49, 51), como sería el caso de los recién nacidos prematuros y de bajo peso.

## VII. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

1. Los objetivos planteados al inicio, se alcanzaron totalmente ya que se pudo comprobar que existe actividad antimicrobiana en todas las muestras de calostro probadas contra los tres enteropatógenos.
2. Fue mayor la actividad bactericida del calostro contra E. coli y S. sonnei, en tanto que para K. pneumoniae predominó la actividad bacteriostática.
3. En cuanto a la influencia de los diferentes inóculos bacterianos ensayados sobre la actividad antimicrobiana del calostro se puede establecer que: a menor inóculo bacteriano mayor fue la actividad bactericida del calostro.
4. En este trabajo se define el espectro de los agentes bacterianos más comúnmente involucrados en gastroenteritis infecciosa que son inhibidos por el suero de calostro humano in vitro; siendo esto

de importancia, ya que in vivo a la leche humana se le ha asociado con una disminución de los índices de mortalidad y morbilidad, así como disminución de infecciones que requieren hospitalización.

5. De manera general, se puede decir que la leche humana provee al recién nacido de una inmunidad mucosa local y sistémica comparable con la que existe en la madre proveyéndolo de defensas específicas e inespecíficas contra agentes infecciosos mediante alguno de sus componentes inmunológicamente activos como son los linfocitos T y B, macrófagos, IgA secretoria, lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa.

6. La leche humana es un fluido altamente complejo con una composición bioquímica específica, que refleja una adaptación a las necesidades fisiológicas específicas de cada especie para asegurar un óptimo crecimiento y desarrollo del recién nacido.



## VIII. ANEXOS

### MATERIAL

### INSTRUMENTOS

#### EQUIPO UTILIZADO PARA OBTENCION DE LA MUESTRA\*

Biberón estéril de 120 ml

Gasa estéril

Tiraleche estéril

Cubrebocas

Gorro

Agua

Jabón

#### EQUIPO UTILIZADO PARA LA OBTENCIÓN DE SUEROS

Pipetas graduadas de 10 ml estériles

Pipetas graduadas de 5 ml estériles

Pipetas graduadas de 1 ml estériles

Pipetas Pasteur estériles

Gradillas metálicas

Tina de plástico de 10 x 30 cm

\* Proporcionado por el Laboratorio de Leches del Instituto Nacional de Perinatología.

Hielo

Refrigerador

Tubos de polialomero de 11 x 60 mm estériles

Tapones metálicos estériles

Ultracentrífuga Backman L5-50 B

Rotor serie N° 4489

Aplicadores de madera estériles

Tubos con tapón de rosca de 16 x 150 mm estériles

Frascos ámbar para reactivos con tapón esmerilado

Matraz aforado de 250 ml

Matras aforado de 50 ml

Algodón

Benzal

Indicador universal de pH Merck

## EQUIPO UTILIZADO PARA IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

### BACTERIANAS

Tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm

Pruebas bioquímicas

Caldo de soya tripticaseína

Glicerol al 20%

Agar Mac Conkey

Tabla de identificación de microorganismos

EQUIPO UTILIZADO PARA AJUSTAR LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS  
Y PARA EL ENSAYO IN VITRO

Tubo 1 de la serie Mac Farland

Matraz aforado de 100 ml

Matraz aforado de 50 ml

Espectofotómetro Coleman

Celdas Coleman de 12 x 75 mm estériles

Papel parafilm

Tapones de gasa estériles

Cultivos de 24 horas

Tubos con tapón de rosca de 16 x 150 mm estériles

Mechero de Bunsen

Asa bacteriológica

Cajas de Petri desechables

Estufa

Reloj

Micropipeta Labbpipette de 10 ul

Puntas para micropipeta estériles

Gradilla de plástico para puntas

Matraces Erlenmeyer de 1 litro

Autoclave

Tina de plástico de 15 x 30 cm

Hielo

Gradillas metálicas

Pipetas graduadas de 1 y 5 ml estériles

Agua destilada

## REACTIVOS

HCl 6N

NaOH 6N

BaCl<sub>2</sub> al 1%

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%

Glicerol al 20%

## MEDIOS DE CULTIVO

Agar Mac Conkey Bioxon

Agar de Mueller-Hinton Bioxon

Caldo salino peptonado al 0.1%

Caldo de soya tripticaseína

Pruebas bioquímicas de identificación:

Kliger's	Citrato
MIO	Malonato
LIA	Ureasa

## CONTROLES DE CALIDAD

El control de calidad en el desarrollo del experimento incluyó, condiciones de esterilidad y preparación correcta de los medios de cultivo así como de todos los reactivos utilizados, mismos que a continuación se detallan:

### PREPARACION DE SOLUCIONES

1. Preparar 250 ml de HCl 6N

DATOS:

$$\text{Ensayo} = 36.5\%$$

$$\text{Densidad} = 1.185 - 1.193 \text{ g/ml}$$

$$\text{P.M.} = 36.46 \text{ g/ml}$$

CALCULOS:

$$36.46 \text{ g} - 1\text{N}$$

$$X - 6\text{N}$$

$$X = 218.6 \text{ g}$$

Sustituyendo en 2:

$$V = \frac{218.6 \frac{\text{g}}{\text{g}}}{1.185 \frac{\text{g}}{\text{ml}}} = 184.60 \text{ ml}$$

FORMULA:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad - - - 1$$

Despejando volumen de 1

$$V = \frac{m}{\rho} \quad - - - 2$$

$$\rho = \text{densidad}$$

$$184.60 \text{ ml} - 36.5\%$$

$$X - 100\%$$

$$X = 505.77 \text{ ml}$$

$$505.77 \text{ ml} - 1000 \text{ ml}$$

$$X - 250 \text{ ml}$$

$$X = 126.44 \text{ ml de HCl}$$

Para obtener una solución de HCl 6N, medir 126.44 ml de HCl y aforar a 250 ml de agua destilada.

## 2. Preparar 50 ml de NaOH 6N

DATOS:

P.M. NaOH = 40 g/ml

CALCULOS:

$$0.05 \text{ l} \times 6 \frac{\text{eq}}{\text{l}} \times 40 \frac{\text{g. NaOH}}{\text{eq}} = 12 \text{ g de NaOH}$$

Para la solución de NaOH 6N, pesar 12 g de NaOH y aforar a 50 ml de agua destilada.

## 3. Preparar 100 ml de glicerol al 20% V/V

Medir 20 ml de glicerol y aforar a 100 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121° C y 15 libras de presión, 15 minutos.

## 4. Preparar 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N

El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N equivale a una solución 1% V/V, por tanto se puede medir 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y aforar a 100 ml de agua destilada.

5. Preparar 100 ml de  $\text{BaCl}_2$  al 1%

Pesar 1 g de cloruro de Bario y aforar a 100 ml de agua destilada.

6. Preparar el tubo 1 de la Serie Mac Farland

Mezclar 0.1 ml de  $\text{BaCl}_2$  al 1% más 9.9 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1%.

#### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO (52)

7. Preparar 200 ml de caldo salino peptonado al 0.1%

Preparar 200 ml de solución salina isotónica al 0.85% más polipeptona al 0.1%:

Pesar 1.7 g de  $\text{NaCl}$  más 0.2 g de polipeptona y aforar a 200 ml de agua destilada, depositar volúmenes de 9 y 5 ml en tubos con tapón de rosa de 16 x 150 mm y esterilizar a  $121^\circ \text{C}$  a 15 libras de presión, 15 minutos.

8. Preparar 1 litro de Agar de Mueller-Hinton

Suspender 38 g del medio deshidratado en un litro de

agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto y esterilizar a 121° C (15 libras de presión) por un tiempo de 15 minutos. Enfriar a 40° - 45° C y vaciar en cajas de Petri.

9. Preparar 250 ml de caldo de Soya tripticaseína

Suspender 7.5 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar ligeramente hasta lograr la solución. Distribuir 3 ml en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm y esterilizar a 121° C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

10. Preparar 500 ml de Agar Mac Conkey

Suspender 25 g del medio en 500 ml de agua destilada. Remojar bien entre 10 a 15 minutos y calentar a ebullición agitando continuamente. Hervir durante un minuto. Esterilizar un autoclave a 121° C a 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50° C y vaciar en cajas de Petri unos 20 ml por placa. Dejar solidificar y luego invertir las cajas para evitar que se deposite un exceso de humedad en la superficie del medio.



## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Garza C, Schanler JR, Butte FN, Motil JK: Special properties of human milk. Clin Perinatol 1987; 14:11-32.
2. Davidson CD, Poll AR, Roberts C: Bacteriological monitoring of unheated human milk. Arch Dis Child 1979; 54:760-764.
3. Williams HF, Pittard BW: Human milk banking: Practical concerns for feeding premature infants. J Am Diet Assoc 1981; 79:69-72.
4. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition: Human milk banking. Pediatrics 1980; 65:854-857.
5. May TJ: Antimicrobial properties and microbial contaminants of breast milk-an update. Aust Paediatr J 1984; 20:265-269.
6. Pittard BW: Breast milk immunology. Am J Dis Child 1979; 133:83-87.

7. Lemons P, Stuart M, Lemons AJ: Breast feeding the premature infant. Clin Perinatol 1986; 13:111-122.
8. Echániz AG, Solórzano SF, Conde GC: Leche materna como fuente de protección o vehículo de infección. En: Calderón JE, Arredondo JL, Karchmer KS, Nasrallah RE (eds.): Conceptos actuales en Infectología Perinatal. Ed. Francisco Méndez Cervantes, México 1988; 31-39.
9. Bienenstock J, Strauss H: Evidence for synthesis of human colostrol YA as 11S dimer. J Immunol 1970; 105:274-277.
10. Hanson LA, Ahlsted S, Anderson B, Carlsson B: Immunity mucosal. En: Annals of the New York Academy of Sciences (ed.) The secretory immune system. New York Jerry R. McGhee and Jiri Mestecky, 1983; 409:1-7.
11. Heremans FJ: Structure and function of immunoglobulin IgA. Behring Inst Mitt 1974; 54:1-8.
12. Burrit FM, Calvanico JN, Mehta S, Tomasi BT Jr.: Activation of the classical complement pathway by Fc fragment of human IgA. J Immunol 1977; 118:723-725.

13. Ogra SS, Ogra LP: Immunologic aspects of human colostrum and milk. Distribution characteristics and concentrations of immunoglobulins at different times after the onset of lactation. J Pediatr 1978; 92:546-549.
14. Baum D: Development of human milk banks. Clin Pediatr 126-131.
15. Martin DW, Mayes PA, Wrodwell V: Bioquímica de Harper. 8° ed. México, Manual Moderno 1982; 209-210.
16. Brock HJ, Pickering GM, Mc Dowall CM, Deacon GA: Role of antibody and enterobactin in controlling growth of Escherichia coli in human milk and acquisition of Lactoferrin- and transferrin- bound Iron by Escherichia coli. Infect Immun 1983; 40:453-459.
17. Jason MJ, Nieburg P, Marks SJ: Mortality and infectious disease associated with infant-feeding practices in developing countries. Pediatrics 1984; 74 (suppl):702-727.
18. Nasrallah E: Alimentación materna: beneficios nutricionales y factores de defensa. Infectología 1983; 3:585-586.

19. Pickering KL, Cleary GT, Caprioli RM: Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function by components of human colostrum and mature milk. Infect Immun 1983; 40:8-15.
20. Hernández J, Lemons P, Lemons J, Todd J: Effect of storage processes on the bacterial growth-inhibiting activity of human breast milk. Pediatrics 1979; 63:597-601.
21. Committee on Nutrition: Comentary on breast feeding and infants formulas, including proposed standars for formulas. Pediatrics 1976; 157:278-275.
22. Bullen JJ, Rogers JH, Leigh L: Binding proteins in milk and resistance to Escherichia coli infection in infants. Br Med J 1972; 1:69-75.
23. Wernet P, Breu H, Knop J, Rowleg D: Antibacterial action of specific IgA and transport of IgM, IgA and IgG from serum into the small intestine. J Infect Dis 1971; 124:223-226.

24. Miotti GP, Gilman HR, Ruiz PG et al.: Prevalence of serum and milk antibodies to Giardia lamblia in different population of lactating women. J Infect Dis 1985; 152:1025-1031.
25. Reiner SD, Wang SC, Gillin DF: Human milk kills Giardia lamblia by generating toxic lipolytic products. J Infect Dis 1986; 154:825-832.
26. France LG, Marmer JD, Steele WR: Breast feeding and Salmonella infection. Am J Dis Child 1980; 134:147-152.
27. Asquith MT: Bacteriología de la leche humana. Infectología 1984; 4:203-206.
28. Aquith MT, Peter WP, James RH y col.: Contenido bacteriano de la leche humana. Infectología 1985; 5:5-8.
29. Liebhaber M, Norman JL, Asquith MT, col.: Contaminación bacteriana con dos métodos de recolección de leche humana. Infectología 1985; 5:66-67.

30. Solórzano SF, Echániz AG, Calderón JE, Conde GC, Arredondo JL: Bacteriología de la leche humana en mujeres mexicanas. Bol Med Hosp Infant Mex 1987; 44:654-660.
31. Asquith MT, Sharp RS, Stevenson KD, col.: Disminución de la contaminación bacteriana en la extracción de la leche materna. Infectología 1985; 5:86-88.
32. Asquith MT, Harrod RJ: Reducción de la contaminación bacteriana en la leche humana. Infectología 1984; 4:315-316.
33. Dolan SA, Boesman FM, Finkelstein RA: Antimicrobial activity of human milk against pediatric pathogens. J Infect Dis 1986; 54:722-725.
34. Davis RD, Dubelco R, Eisen HN: Tratado de Microbiología 3a. ed. Salvat, México 1985; 538-540, 545.
35. Academia de Profesores de Bacteriología Médica: Manual de Bacteriología Médica. 4a. ed. México; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN 1983; 24-29, 30-36, 46-48.

36. Joklik WK, Willett HP, Bernard AD: Microbiología Zinnsser.  
17a. ed. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana  
1983; 685, 691, 696.
37. Carpenter LP: Microbiología. 4a. ed. México, Nueva  
Interamericana 1982; 217-223.
38. Garvey SJ, Cremer EN, Sussctorf HD: Methods in  
Immunology. 3th edition. Massachusetts USA: W.A.  
Benjamin Inc. Publishers 1977: 529-530.
39. Reynolds JG, Meade JH, Brown BJ, et al: Simplified banking  
of human milk. Br Med J 1982; 284:560.
40. Brown KH, Akhtar AN: Lactational capacity of marginally  
nourished mothers: Relationship between maternal  
nutritional status and quantity and proximate composition  
of milk. Pediatrics 1986; 78:909-919.
41. Michael GJ, Ringenback R, Mottenstein S: The antimicrobial  
activity of human colostrum antibody in the newborn.  
J Infect Dis 1971; 124:445-448.

42. Reynolds G, Jones L, DJ: Simplified milk banking.  
Lancet 1982; 1126.
43. Asquith MT, Pedrotti WP, Stevenson KD, Sunshine P:  
Clinical uses, collection, and banking of human milk.  
Clin Perinatol 1987; 14:173-185.
44. Pittard BW, Bill KBJ: Human milk banking. Effect of  
refrigeration on cellular components. Pediatrics  
1981; 20:31-33.
45. Pittard BW, Anderson MD, Cerutti RE, Boxerbaum B:  
Bacteriostatic qualities of human milk. J Pediatr  
1985; 107:240-243.
46. Howard JC, Glynn AA: Some physical properties of  
antigens K of Escherichia coli related to their  
biological activity. Infect Immun 1971; 4:6-11.
47. Davis CP, Houston CW, Fader RC, et al: Immunoglobulin A  
and secretory immunoglobulin A antibodies to purified  
type 1 Klebsiella pneumoniae pili in human calostrum.  
Infect Immun 1982; 38:496-501.



48. Mata LJ, Urrutia JJ, García B, et al: Shigella infection in breast fed Guatemalan indian neonates. Am J Dis Child. 1969; 117:142-146.
49. Robertson DM, Paganelli R, Dinwiddie R, Levinsky JR: Milk antigen absorption in the preterm and term neonate. Arch Dis Child 1982; 57:369-372.
50. Larsen AS, Homer RD: Relation of breast versus bottle feeding to hospitalization for gastroenteritis in a middle-class U.S. population. J Pediatr 1978; 92:417-418.
51. Lilling KK, Lackey JC: Economic and social factors influencing women's infant feeding decisions in a rural Mexican community. J Trop Pediatr 1982; 28:240-247.
52. Bioxon: Manual Bioxon. 15, 38, 40, 61.
53. Porter P, Chidlow WJ: Response to E. coli antigens via local and parenteral routes linking against neonatal colibacillosis in the pig. En: Ogra PL, Dayton DH, eds. Immunology of breast milk. New York. Raven Press 1979; 73-90.

54. Sánchez-Rebolledo JM, Gutiérrez G: Gastroenteritis (diarrea infecciosa). En: Kumate J, Gutiérrez G, eds. Manual de Infectología. 5a. ed. México. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México 1977; 1-10.
55. Mc Loren SD: La nutrición y sus trastornos. 3a. edición. México: Manual Moderno 1983; 95-96.
56. Lennette HE, Balows A, Hausler JW, Shadomy JH: Manual of Microbiology. Fourth edition. Washington D.C. American Society for Microbiology 1985; 266-267, 270.