

UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Escuela Profesional de Nutrición Humana



Una Institución Adventista

Efecto de la leche humana y lactancia mixta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal en neonatos pretérmino de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

Por

Jhovanna Lissette Flores de Valgas Velez

Asesora

Lic. Charo Natali Huzco Rutti

Lima, octubre de 2018

**DECLARACIÓN JURADA DE
AUTORÍA DEL INFORME DE TESIS**

Charo Natali Huzco Rutti de la Facultad de Salud / Escuela Profesional de Nutrición Humana, de la Universidad Peruana Unión.

DECLARO:

Que el presente informe de investigación titulado: **"EFECTO DE LA LECHE HUMANA Y LACTANCIA MIXTA SOBRE EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN NEONATOS PRETÉRMINO DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL. LIMA, 2017"** constituye la memoria que presenta la Bachiller Jehovanna Lissette Flores de Valgas Velez para aspirar al título de Profesional de Licenciada en Nutrición Humana, cuya tesis ha sido realizada en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente constancia en *Lima*, a los 12 días del mes de noviembre del año 2018.



Charo Natali Huzco Rutti

Asesora

Efecto de la leche humana y lactancia mixta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal en neonatos pretérmino de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017

TESIS

Presentada para optar el título profesional de Licenciada en Nutrición Humana

JURADO CALIFICADOR



Lic. Olger Dawis Román Vilchez
Presidente



Lic. Daniel Bryan Navarro Azabache
Secretario



Lic. Daniela Edith Armas Aranda
vocal



Lic. Pool Marcos Carbajal
vocal



Lic. Charo Natali Huzco Rutti
asesora

Ñaña, 19 de octubre de 2018

Dedicatoria

Esta tesis la dedico de manera muy especial a una mujer que me hace llenar de orgullo, te amo y no habrá forma de devolvarte todo lo que me haces para ayudarme, este es un logro para mí y sin duda en gran parte ha sido gracias a ti.

Por eso te agradezco tanto mi amada madre Elsa Velez por enseñarme que las cosas buenas no se logran sin esfuerzo.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido un reto, he pasado por diferentes situaciones y jamás hubiera llegado hasta este momento sin la ayuda de Dios quien me da fuerza y sabiduría.

A mi hermana Gema por poner la meta más alta para querer ser mejor, y hacer las cosas bien.

A mis amigas y amigos: Leonor García, Madelen Torres, Adrian Cevallos, Andrea Manzanilla, Mayra Cabrera, Biby Muñoz, Radmila Ramírez, Marcos Quichimbo, Christel Zambrano, Karina Rodriguez, Eugenia Bravo, Luiggi Salavarría y Karem Plaza. Quienes han confiado en mí, quienes han crecido conmigo y me motivan a perseguir mis sueños.

A mi asesora Lic. Natali Huzco, y mis dictaminadores la Lic. Dariela Armas, y el Mg. Pool Marcos; quienes han aportado en la dirección de esta tesis con sus conocimientos y experiencia.

Al comité de ética del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé por la oportunidad de realizar esta investigación en la institución.

Al Dr. Wilfredo Ingar jefe de neonatología y el Dr. Celso Huarcaya jefe de la unidad de cuidados intensivos de neonatología del hospital por permitirme la recolección de datos.

A las madres de los neonatos por su consentimiento, con quienes me sensibilice por su amor hacia sus hijos y su sueño de un futuro mejor para ellos.

Al personal técnico y de enfermería de Neonatología y UCIN del hospital.

Al laboratorio de Bioservice por realizar los análisis microbiológicos con eficiencia.

Índice de contenido

Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de anexos.....	xi
Símbolos usados	xii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
Capítulo I.....	16
El problema.....	16
1. Identificación del problema	16
2. Justificación.....	18
3. Presuposición filosófica.....	19
4. Objetivos de la investigación	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos específicos	20
Capítulo II.....	21
Marco teórico	21
1. Marco teórico.....	21
1.1. Neonato pretérmino o prematuro	21
1.2. Nutrición en el neonato pretérmino	25
1.3. Lactancia materna	27
1.4. Leche humana pasteurizada	32
1.5. Fórmulas	34
1.6. Microbiota.....	37
1.7. Técnicas de estudio de la microbiota intestinal.....	50
2. Antecedentes	61
3. Definición de términos.....	67
Capítulo III.....	69
Materiales y métodos.....	69

1.	Lugar de ejecución	69
2.	Población y muestra.....	69
2.1.	Población	69
2.2.	Muestra	69
2.3.	Criterios de inclusión y exclusión	69
2.4.	Características de los participantes	71
3.	Tipo de estudio y diseño	74
4.	Formulación de la hipótesis	74
4.1.	Hipótesis del investigador.....	74
4.2.	Hipótesis específicas	74
5.	Identificación de variables.....	74
5.1.	Tipo de alimentación.....	74
5.2.	Microbiota.....	75
6.	Matriz de consistencia y operacionalización de variables.....	76
7.	Instrumentos de recolección de datos	77
8.	Técnica de recolección de datos	77
8.1.	Consentimiento informado.....	77
8.2.	Historia clínica.....	77
8.3.	Primera fase: cultivo de meconio para análisis de la microbiota	77
8.4.	Segunda fase: segundo cultivo para análisis de la microbiota	78
8.5.	Evaluación de los resultados	78
9.	Procesamiento y análisis de datos	79
10.	Consideraciones éticas	79
Capítulo IV		81
Resultados y discusión		81
1.	Resultados.....	81
2.	Discusión	86
Capítulo V		90

Conclusiones y recomendaciones.....	90
Conclusiones	90
Recomendaciones	90
Referencias bibliográficas	92
Anexos	107

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Componentes de la LHD que se ven afectados por la pasteurización.</i>	33
Tabla 2. <i>Composición de la fórmula para prematuro y leche materna.</i>	36
Tabla 3. <i>Clasificación de las bacterias encontradas en la microbiota</i>	46
Tabla 4. <i>Cebadores utilizados para qPCR de acuerdo al objetivo microbiano.</i>	51
Tabla 5. <i>Características demográficas de los neonatos pretérmino (n=23).</i>	71
Tabla 6. <i>Características clínicas de los neonatos pretérmino (n=23).</i>	72
Tabla 7. <i>Descripción de la población según variables clínicas.</i>	73
Tabla 8. <i>Prevalencia de géneros en muestras de meconio (n=23).</i>	81
Tabla 9. <i>Prevalencia de géneros en muestras de heces (n=23).</i>	82
Tabla 10. <i>Relación entre los géneros y tipos de alimentación en heces.</i>	84
Tabla 11. <i>Cambios en la abundancia de los géneros de la microbiota intestinal.</i> ...	85

Índice de figuras

Figura 1: Procesos y mediadores posibles del nacimiento prematuro (19).	23
Figura 2. Principales problemas de salud asociados a la prematuridad.	24
Figura 3. Anatomía y fisiología del corazón en el periodo fetal.	25
Figura 4. Teoría de migración activa.	30
Figura 5. Establecimiento del microbioma de la leche humana.	31
Figura 6. Cambios de la flora intestinal desde el nacimiento hasta la vejez (36). ...	39
Figura 7. Anatomía y componentes de la barrera intestinal.	41
Figura 8. Detección inmunosensorial de bacterias intestinales.	42
Figura 9. Funcionamiento de la barrera mucosa	43
Figura 10. Contribuciones de la microbiota intestinal a la fisiología del huésped. ...	44
Figura 11. Secuenciación automática en geles desnaturalizantes (145).	54
Figura 12. Representación de la Pirosecuenciación (147).	55
Figura 13. Representación de la secuenciación de Illumina.	56
Figura 14. Estructura del gen 16S rARN.	57
Figura 15. Representación esquemática de la secuenciación de Sanger.	59
Figura 16. Flujograma de la Muestra	70
Figura 17: Flujograma de proceso de recolección de datos.	78
Figura 18. Abundancia de los géneros de la microbiota intestinal (UFC*10 ⁶).	83

Índice de anexos

Anexo 1: Consentimiento informado.	107
Anexo 2: Historia Clínica (181).....	109
Anexo 3: Primera fase, recolección del primer meconio.	110
Anexo 4: Selección de grupos de estudio.	111
Anexo 5: Solicitud de la escuela profesional de nutrición.....	112
Anexo 6: Aprobación del comité de ética del Hospital.....	113
Anexo 7: Memorando de autorización para ingreso a UCIN.	114
Anexo 8: Modelo de resultados de Laboratorio.	114
Anexo 9: Protocolo de laboratorio para E. coli y bacterias coliformes.	116
Anexo 10: Protocolo de laboratorio para bacterias ácido lácticas (BAL).	121
Anexo 11: Protocolo de laboratorio para <i>Clostridium</i>	129
Anexo 12: Protocolo de laboratorio para <i>Staphylococcus</i>	137

Símbolos usados

OMS: Organización Mundial de la Salud

UNICEF: Fondo internacional de emergencia de las naciones unidas para la infancia

MINSA: Ministerio de Salud

BLH: Banco de Leche Humana

RNPT: Recién nacido pretérmino

BPN: Bajo peso al nacer

MBPN: Muy bajo peso al nacer

EBPN: Extremo bajo peso al nacer

ITU: Infección del tracto urinario

VV: Vulvovaginitis

PP: Parto prematuro

RPM: Rotura prematura de membranas

UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatología

MI: Microbiota intestinal

LH: Leche humana

LM: Lactancia mixta

FPP: Fórmula para prematuro

LHP: Leche humana pasteurizada

LME: Lactancia materna exclusiva

CAP: Conducto arterioso persistente

DBP: Displasia broncopulmonar

SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo

NEC: Enterocolitis necrotizante

NEM: Nutrición enteral mínima

LHF: Leche humana fortificada

HMO: Oligosacáridos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Tm: temperatura de fundición

AMP: péptidos antimicrobianos

DC: células dendríticas

Gm: Gram negativa

HPA: hipotálamo-hipófisis-suprarrenal

Iap: fosfatasa alcalina intestinal

PG: peptidoglicano

PSA: polisacárido A

LPS: lipopolisacárido

Resumen

Una de las mayores complicaciones en neonatos pretérmino es el desarrollo de sepsis, que está relacionado con la disminución de la diversidad microbiana. Siendo que la microbiota intestinal de los recién nacidos pretérmino (RNPT) se modifica por factores como la hospitalización, el uso de antibióticos, la nutrición post natal, entre otros. Esta investigación prospectiva longitudinal tuvo como objetivo analizar el efecto de la leche humana y lactancia mixta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal de neonatos <37 semanas de edad gestacional. Para lo cual, se analizaron las muestras de meconio y heces de 23 neonatos hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos y neonatología, mediante métodos de cultivos según los protocolos del laboratorio Bioservice. Los neonatos estuvieron distribuidos en dos grupos; el primero alimentado con leche humana (LH) (incluyó neonatos alimentados con leche materna exclusiva y leche humana donada) y el segundo grupo alimentado con lactancia mixta (LM) (incluyó neonatos que tomaron leche humana y fórmula para prematuro). Obteniendo como resultados que los RNPT tuvieron prevalencia de *Lactococcus* en meconio y de *E. coli* en heces, mientras que el género más abundante en ambas muestras fue *Lactobacillus*. Además, los neonatos que tomaron LM tuvieron mayor prevalencia de *Bifidobacterium* ($p= 0,01$), y mayor abundancia ($>10^6$ UFC) de *E. coli* ($p=0,05$) que los neonatos que tomaron LH. Por otro lado, a pesar de no existir diferencia significativa en el desarrollo de la microbiota intestinal respecto al tipo de alimentación, se observó una tendencia diferente; los neonatos alimentados con LH aumentaron la abundancia de *Lactococcus* y *Clostridium* mientras disminuyeron *Lactobacillus*, opuesto al grupo alimentado con LM donde aumentó la abundancia de *Lactobacillus* y disminuyó *Lactococcus* y *Clostridium*; sugiriendo una interacción dinámica entre el hospedador y la selección dietética de miembros específicos de la microbiota que se ve alterado por la alimentación.

Palabras clave: *Microbiota intestinal, leche humana, lactancia mixta, neonato pretérmino.*

Abstract

Sepsis developed is one of the major complication in preterm infants, which is related with microbial diversity decrease, because gut microbiota of preterm newborns (PTNB) is modified due to factors such as hospitalization, use of antibiotics, post-natal feeding, among others. The present longitudinal prospective research aimed to analyze the effect of breastmilk and mixed feeding on development of infant gut microbiota, born before 37 weeks of gestational age. For this, the meconium and feces samples of 23 newborns were analyzed, who were hospitalized in intensive care units and neonatology, using laboratory culture methods based on Bioservice laboratory protocols. Neonates were part of two groups. The first one fed with human milk - HM (which included infants fed both by exclusively breastmilk by donated human milk), and the second group fed with mixed lactation – ML (which included who were fed by breastmilk and formula milk for premature). The results show that PTNB had a prevalence of *Lactococcus* in meconium and of *E. coli* in feces, while the most abundant microbiota type in both samples was *Lactobacillus*. Furthermore, infants who were fed with ML showed a higher prevalence of *Bifidobacterium* ($p = 0.01$), and higher abundance ($> 10^6$ CFU) of *E. coli* ($p = 0.05$) than neonates who were fed with HM. On the other hand, despite not having significant difference in gut microbiota development regarding the type of feeding, a different trend was observed. In addition, neonates who were fed with HM increased the levels of *Lactococcus* and *Clostridium*, while *Lactobacillus* decreased, contrary to the group who were fed with ML showed a *Lactobacillus* increased, and *Lactococcus* and *Clostridium* decreased, suggesting a dynamic interaction between the host and the dietary selection of specific microbiota types which is altered by feed.

Key words: gut microbiota, human milk, mixed lactation, preterm neonate.

Capítulo I

El problema

1. Identificación del problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año nacen unos 15 millones de niños pretérmino (<37 semanas de gestación) (1). En 2013, de 6,3 millones de muertes en niños menores de 5 años, 1,09 millones murieron por complicaciones relacionadas con la prematuridad (2,3). Mientras, que en América Latina y México, los nacimientos pretérmino representan aproximadamente 1% de las muertes (4). Según el fondo internacional de emergencia de las naciones unidas para la infancia (UNICEF), el Perú está ubicado en el onceavo lugar, con el 19,6% en la tasa de mortalidad infantil en menores de cinco años por complicaciones del nacimiento prematuro (2).

En el 2015, el Ministerio de Salud (MINSA) reportó que el 6,5% del total de nacidos vivos en Perú fueron pretérmino, de los cuales el mayor porcentaje 86,8% nació entre 32 a 36 semanas, 9% entre 28 a 31 semanas y el 4,2% con menos de 28 semanas (5). En el Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé en el 2015 el 9% del total de partos fue pretérmino; de los cuales el 16,2% de los neonatos presentaron alguna patología y el 2,4% con peso menor a 1000 g. murieron (6).

Los recién nacidos pretérmino (RNPT) a corto o mediano plazo desarrollarán patologías propias de la prematurez; son vulnerables a sepsis (7), hemorragia intraventricular (8), enfermedad de membrana hialina, problemas gastrointestinales, enterocolitis necrotizante (NEC) y malformaciones (atresia intestinal y defectos de pared abdominal), cardiopatías, entre otras (9,10). Mientras que a largo plazo presentan mayor riesgo de sufrir algún tipo de invalidez de por vida (1), en particular, discapacidades neurológicas, problemas de lenguaje y aprendizaje (11), trastorno por déficit de atención, dificultades socioemocionales, deterioro sensorial, visual o auditivo, retraso mental y parálisis cerebral (12–15), mayor riesgo de asma alérgico, menor función pulmonar general y problemas de obstrucción de las vías respiratorias (16,17). También se han reportado problemas cardiovasculares, hipertensión arterial (18), cáncer y diabetes en la edad adulta (19), y probabilidad alta de muerte precoz en la adultez (20).

Las complicaciones en prematuros ocasionan un incremento en la morbilidad y mortalidad neonatal, representando un costo económico y emocional considerable tanto para las familias, las comunidades, y la unidad médica (14,21). De acuerdo con un reporte de la organización March of Dimes de Estados Unidos un nacimiento pretérmino tiene un impacto multimillonario en la economía; los bebés prematuros con bajo peso al nacer (BPN) gastan 12 veces más en costos de atención médica que los bebés que nacen sin complicaciones. El parto y el cuidado del RNPT es una de las condiciones más caras facturadas y representa 7 de los 10 procedimientos hospitalarios individuales mejores remunerados (22).

Una de las mayores complicaciones en neonatos pretérmino es el desarrollo de sepsis (7,23), que está relacionada con la disminución de la diversidad microbiana (disbiosis) (24). Por tanto, la microbiota intestinal o microflora (25) se considera como un órgano que se adquiere posteriormente al nacimiento y está formada por una gran diversidad de bacterias (26) que tienen un gran impacto sobre la salud porque participa en el mecanismo etiopatogénico de diversas enfermedades complejas, multifactoriales y multigénicas, así como las enfermedades inflamatorias, autoinmunes, neoplásicas (27) obesidad (28)(29) y alergias (30). Por tanto, las bacterias entéricas se estiman esenciales para mantener el entorno fisiológico debido a que ejerce efectos protectores, estructurales y metabólicos en el epitelio (31,32).

Los RNPT están expuestos a varios factores que afectan el desarrollo de la microbiota intestinal, como la hospitalización, la edad gestacional, el uso de antibióticos (33,34) la nutrición post natal (35); siendo la alimentación uno de los factores más importantes en la adquisición y diversidad de la flora bacteriana (36). Estudios han concluido que la leche materna es el alimento mejor tolerado y con múltiples beneficios (37–39) por sus componentes bioactivos como los oligosacáridos (40) que previenen la colonización de patógenos entéricos (41,42) evitando así las infecciones (24,43), incluso cuando esta viene de donantes (44,45), siendo así que en Brasil la disminución del 73% de la mortalidad infantil se la atribuyen a los bancos de leche humana (BLH) (46,47); en comparación con las fórmulas artificiales, a las cuales se le otorgan menos beneficios e incluso se le ha atribuido la incidencia de NEC (45,48–50). Sin embargo, Boehm *et al.* (51) reportó que la mezcla de oligosacáridos (HMO) en la fórmula para prematuros puede estimular el desarrollo de una microbiota intestinal similar a los lactantes alimentados con leche materna. Asimismo, Walker *et al.* (52) señaló en su estudio que la fórmula que contiene

prebióticos y probióticos puede superar un proceso de colonización inicial inadecuado y ayudar a establecer un sistema inmune de la mucosa normal.

En ese sentido, se crea la necesidad de investigar el impacto que tiene el tipo de alimentación sobre la microbiota intestinal en neonatos pretérmino.

2. Justificación

Por su relevancia teórica, la investigación realizada recopiló información relevante y los resultados aportan evidencias científicas sobre la influencia del tipo de alimentación sobre la microbiota intestinal, fomentando así nuevas investigaciones que determinen la alimentación más adecuada para el RNPT que ayude a evitar complicaciones y a brindar un tratamiento integral.

Por su relevancia metodológica, basados en el protocolo de recolección de muestras de laboratorio, se adaptaron fichas para la toma de datos, las cuales servirán de base para desarrollar nuevos estudios de investigación y mejorar los tratamientos clínicos.

Por su relevancia práctica – social, la principal razón detrás las complicaciones en los RNPT es la relativa inmadurez fisiológica y metabólica (53); por lo tanto, se ha hecho necesario brindar un manejo integral, que ayude al desarrollo óptimo del prematuro. Y puesto que la nutrición post natal fomenta la maduración gastrointestinal y la diversidad microbiana (35) se crea la necesidad de investigar uno de los factores más importantes para este desarrollo que es la alimentación (36).

Este estudio tuvo como objetivo conocer la microbiota de los neonatos pretérmino, aportando información relevante sobre el desarrollo de la microbiota intestinal, que servirá para que las instituciones puedan buscar mejorar el efecto terapéutico y por tanto una supervivencia sostenible, disminuyendo las complicaciones de la prematuridad (54) con bajo costo económico y mínimos efectos adversos. Como la regulación de la composición de la microbiota intestinal por probióticos y prebióticos ofrece la posibilidad de influir en el desarrollo de la inmunidad mucosa y sistémica, además de prevenir y tratar algunas enfermedades (27).

Finalmente, para que las madres y la sociedad puedan decidir la alimentación que conlleve a los neonatos pretermino a una mejor calidad de vida.

3. Presuposición filosófica

Cada ser humano fue creado para buenas obras (Efesios 2:10), y como profesional de salud con principios éticos cristianos y conocimientos científicos se asume la responsabilidad de trabajar para servir y proteger los derechos humanos, haciendo de la ética y la moral el centro de nuestra acción profesional. La Unicef ha declarado "No hay causa que merezca más alta prioridad que la protección y el desarrollo del niño, de quien dependen la supervivencia, la estabilidad y el progreso de todas las naciones y, de hecho, de la civilización humana" (55). Esto nos hace reflexionar en que los niños que son ahora incapaces de tomar decisiones por sí mismos, se convertirán en hombres y mujeres con vidas significativas que hacen bien a sus semejantes. Por tanto, los padres y el equipo médico responsable del neonato deben proveer toda la atención necesaria para que estos niños tengan un desarrollo integral.

Los niños son un regalo de Dios (Salmos 127:3), por ello "no puede haber una tarea más noble que la de dar a todos los niños un futuro mejor" (56). Los neonatos prematuros tienen más complicaciones que enfrentar desde el momento en que nacen y muchos de ellos cargan con las mismas por mucho tiempo, incluso hasta la adultez. Por ello, esta investigación tiene como objetivo ampliar el conocimiento e impulsar la búsqueda de nuevos tratamientos integrales que mejoren la calidad de vida de los neonatos, con la seguridad que Dios provee de "sabiduría, conocimiento e inteligencia" (Proverbios 2:6).

4. Objetivos de la investigación

4.1. Objetivo general

Analizar el efecto de la leche humana y lactancia mixta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal en neonatos pretérmino de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

4.2. Objetivos específicos

Describir la prevalencia y abundancia de la microbiota intestinal en muestras del primer meconio y heces de neonatos pretérmino de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

Relacionar la concentración de la microbiota intestinal en muestras de heces de neonatos pretérmino que recibieron Leche Humana y Lactancia Mixta de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

Comparar concentración de la microbiota intestinal en muestras de meconio y heces de los neonatos alimentados con leche humana y lactancia mixta de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

Capítulo II

Marco teórico

1. Marco teórico

1.1. Neonato pretérmino o prematuro

1.1.1. *Definición*

Un neonato pretérmino o prematuro se considera a un bebé nacido vivo antes de cumplir 37 semanas de gestación (1).

1.1.2. *Clasificación*

Los niños prematuros se dividen en subcategorías en función de la edad gestacional:

Prematuros extremos (<28 semanas)

Muy prematuros (28 a <32 semanas)

Prematuros moderados a tardíos (32 a <37 semanas) (1,57)

1.1.3. *Etiología*

El nacimiento prematuro es un síndrome con una variedad de causas que se pueden clasificar en dos subtipos amplios:

a) Nacimiento prematuro espontáneo que se puede presentar de dos maneras: 1) Trabajo de parto pretérmino con membranas intactas (espontáneo), 2) Trabajo de parto pretérmino con ruptura prematura de membranas (RPM).

b) Parto pretérmino iatrogénico por causas maternas o fetales (58).

En Latinoamérica, el 70% de los partos pretérmino son espontáneos; el 16-21%, por RPM, y el 11-15%, por indicaciones médicas fetales o maternas. Mientras que en los Estados Unidos, el 40-45% son espontáneos; el 25-40%, por RPM, y el 30-35%, de forma iatrogénica (58).

El nacimiento prematuro espontáneo es un proceso multifactorial, que resulta de la interacción de factores que causan que el útero cambie de inactividad a contracciones

activas y al nacimiento antes de las 37 semanas completas de gestación. Los precursores del nacimiento prematuro espontáneo varían según la edad gestacional (57).

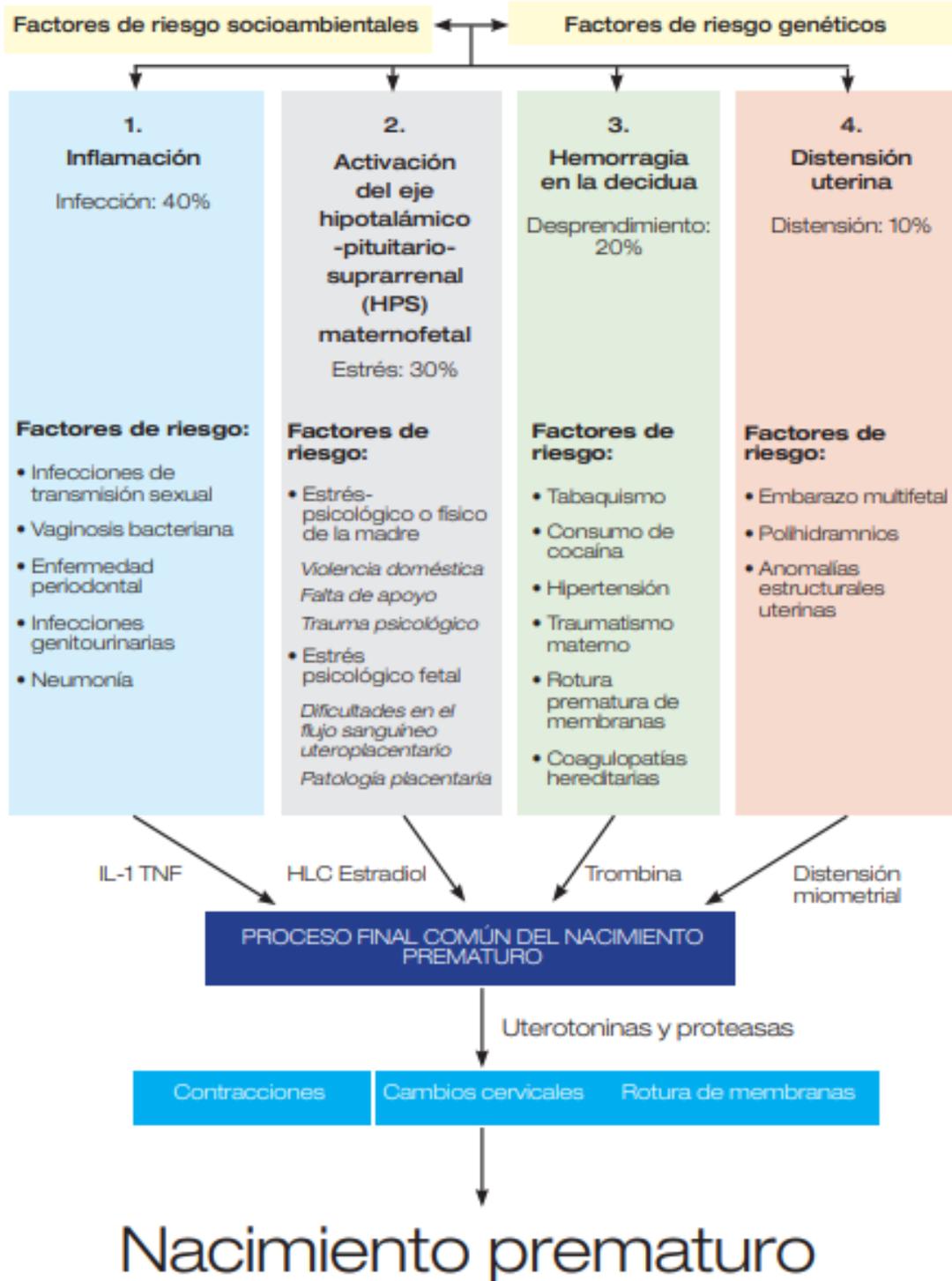
La historia materna de partos prematuros es un fuerte factor de riesgo y probablemente se deba a la interacción de factores de riesgo genéticos, epigenéticos y ambientales. Muchos factores maternos se han asociado con un mayor riesgo de parto prematuro espontáneo, incluida la edad materna joven o avanzada, intervalos cortos entre embarazos y bajo índice de masa corporal materna (57)

Una de las principales causas es la infección, tanto la local uterina (responsable de la mayoría de los partos pretérmino antes de las 28 semanas) como la sistémica; siendo las infecciones del tracto urinario, la malaria, la vaginosis bacteriana, el VIH y la sífilis las asociadas con un aumento en la tasa de mortalidad en los mismos. También están: el estrés materno, la trombosis uteroplacentaria y las lesiones intrauterinas vasculares asociadas con sufrimiento fetal o hemorragia decidual, la sobredistensión intrauterina y la insuficiencia placentaria. Es frecuente que se combinen factores y que ocurra un parto prematuro por infección en la madre y *abruptio placentae*. El tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol, así como la enfermedad periodontal también se han asociado con un mayor riesgo de parto prematuro (1,57–59).

Por otro lado, el parto pretérmino iatrogénico ocurre cuando el parto es iniciado por intervención médica a causa de complicaciones para la madre y/o el feto. Este es programado principalmente por preeclampsia e hipertensión gestacional, diabetes mellitus, hipertiroidismo materno, enfermedad pulmonar restrictiva, nefropatía materna, asma, enfermedad cardíaca materna, lupus. Además, la enfermedad materna limita el flujo uteroplacentario; por tanto, se afecta el aporte de nutrientes y oxígeno para el feto, provocando restricción del crecimiento intrauterino. Otros factores de riesgo son la desnutrición materna, la obesidad o la historia anterior de parto pretérmino (58).

En general, se considera que los partos prematuros (PP), por debajo de las 32 semanas, se deben a infección/ inflamación; mientras que los de 33 a 37 semanas están más relacionados con sobredistensión intrauterina y estrés (58).

Figura 1: Procesos y mediadores posibles del nacimiento prematuro (19)



Fuente: Perkin-Elmer. Nacimiento prematuro. 2009.

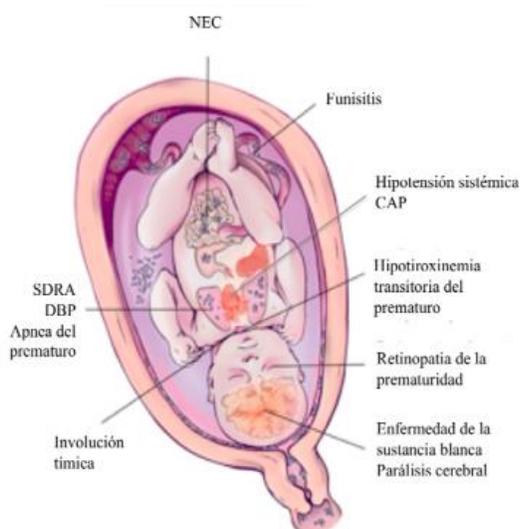
1.1.4. **Fisiología del neonato pretérmino**

En el neonato pretérmino, el desarrollo intrauterino no ha sido completo, por lo cual, fisiológicamente, es diferente a un neonato a término. Los lactantes con bajo peso al nacer (BPN) tienen varios problemas clínicos en el primer periodo neonatal, que dependen del entorno intrauterino, el grado de prematuridad, los traumatismos relacionados con el parto y la función de los sistemas orgánicos inmaduros o sometidos a estrés (60).

Los lactantes prematuros tienen un alto riesgo de sufrir un deficiente estado nutricional por causa de los bajos depósitos de nutrientes (porque los nutrientes fetales se almacenan durante los 3 últimos meses de gestación), la inmadurez fisiológica, la enfermedad (que puede interferir con el tratamiento y las necesidades nutricionales) y las demandas de nutrientes requeridas para el crecimiento. En el neonato pretérmino de 1000 g., las grasas constituyen el 1 % del peso corporal total a diferencia del neonato a término (3500 g.) donde el 16% aproximadamente corresponde a las grasas (60).

Las complicaciones respiratorias asociadas a la prematuridad más frecuentes son: El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) causado por deficiencia de surfactante; la displasia broncopulmonar (DBP) o enfermedad pulmonar crónica, que se presenta comúnmente como una complicación tardía en los neonatos con muy bajo peso al nacer (MBPN) y que se define como la dependencia de oxígeno a las 36 semanas de EG; y la apnea del prematuro (61).

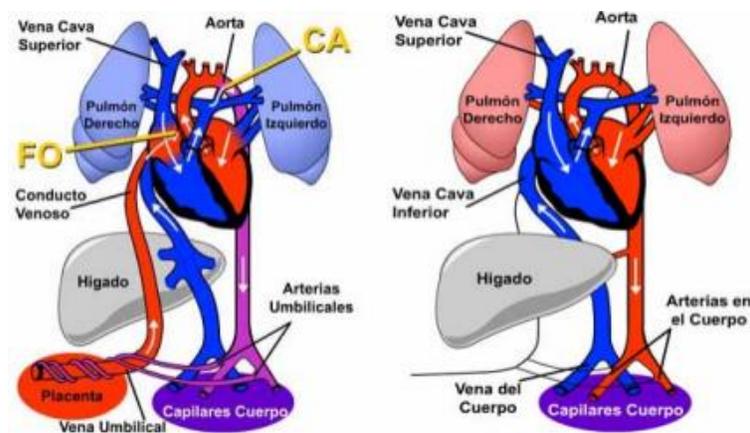
Figura 2. Principales problemas de salud asociados a la prematuridad



CAP, Conducto Arterioso Persistente; DBP, Displasia Broncopulmonar; NEC, enterocolitis necrotizante; SDRA, Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (61).

Por otro lado, entre las complicaciones cardiovasculares, la hipotensión sistémica, la hemorragia intraventricular (HIV) y el CAP que consiste en la permanencia de la comunicación entre la arteria pulmonar y aorta después del nacimiento. En el feto, tiene la función de reducir el flujo de sangre a los pulmones todavía no funcionales. El CAP afecta al 30% de los RNPT, ocasionando un aumento de la circulación pulmonar y disminución de la sistémica, causando SDRA, apnea, e inclusive fallo cardiaco. El tratamiento para esta patología con inhibidores de la ciclooxigenasa puede llevar a la alteración de las plaquetas aumentando el riesgo de HIV. (61).

Figura 3. Anatomía y fisiología del corazón en el periodo fetal



Anatomía y fisiología del corazón en el periodo fetal (izquierda) y en el neonatal (derecha). CA: Conducto arterioso; FO: Foramen oval (61).

Fuente: Moles L. Adquisición y modulación de la microbiota gastrointestinal de niños prematuros. Universidad Complutense de Madrid; 2015.

1.2. Nutrición en el neonato pretérmino

En el recién nacido pretérmino (RNPT), es importante el soporte nutricional que aporte los nutrientes necesarios que favorezcan el ritmo de crecimiento y la composición corporal similares a las de un feto normal, a la misma edad gestacional. Asimismo, también dar inicio a nutrición temprana, ya que esta ayudará a que la masa corporal y densidad ósea sean adecuadas, además de optimizar el neurodesarrollo y prevenir complicaciones colaborando así con una buena salud en la adultez (62,63).

El manejo nutricional depende de las diferencias funcionales según el peso y la edad gestacional:

- RNPT de 24-28 semanas de EG con un peso <1.000 g, o de extremo bajo peso. Se inicia con soporte nutricional parenteral y luego se administran nutrición enteral (NE) lentamente progresiva según la evolución clínica.

- RNPT de 28-32 semanas de EG con un peso de 1.000-1.500 g, o de muy bajo peso. Comúnmente precisan nutrición parenteral (NP), pero rápidamente permiten la transición a la NE.

- RNPT de 32-35 semanas de EG con un peso de 1.500-2.000 g, o de bajo peso. Se puede comenzar directamente con NE si no presentan complicaciones clínicas (64).

Por otro lado, para dar inicio al manejo nutricional es importante conocer los tres períodos de crecimiento en el RNPT, que son:

Transición: desde el nacimiento hasta los siete días de edad. Aquí el objetivo principal debe ser el de prevenir la aparición de deficiencias nutricionales y el catabolismo de sustratos.

Crecimiento estable: desde la estabilización hasta el alta. El crecimiento y la retención de nutrientes es semejante a los que se alcanzan en el útero (± 15 g/kg/día).

Posalta: el aporte nutricional debe ser adecuado para que el crecimiento “recuperacional” se logre (catch-up growth); esto es, alcanzar el mismo crecimiento que un niño nacido a término (RNAT) (65). Además, este crecimiento compensatorio debe producirse de masa magra y no de masa grasa ya que está asociada con alteraciones metabólicas, tomado hasta los 3 a 5 años de vida (62).

De acuerdo al período de crecimiento el aporte nutricional se puede realizar en diferentes etapas:

Etapa inicial: se proporciona nutrición parenteral y nutrición enteral mínima (NEM).

Etapa intermedia: el aporte es enteral con leche humana fortificada (LHF) y/o leche de fórmula para prematuros (FPP).

Etapa post alta: la cual implica alimentación por succión, pecho, LHF y FPP (62).

Se define como aporte enteral mínimo, hasta 24 ml/kg/día, comenzando desde los primeros cuatro días hasta la semana de vida. La incorporación precoz del aporte enteral favorece el crecimiento de los RNPT, acorta el tiempo de nutrición parenteral, disminuye los días de internación y no aumenta la incidencia de enterocolitis necrotizante (ECN),

además de promover la función trófica al enterocito, genera un estímulo neuroendócrino y es beneficiosa para el prematuro (62).

1.3. Lactancia materna

La lactancia materna es un acto natural y un comportamiento que se aprende (66). La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Academia Americana de Pediatría (AAP) y el Comité de Lactancia de la Asociación Española de Pediatría recomiendan la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida y luego continuarla complementando con otros alimentos hasta los 2 años o más (67).

1.3.1. Leche materna

La leche materna o humana (LH) es una secreción de la glándula mamaria (68), considerada un producto vivo de gran complejidad biológica, activamente protectora e inmunomoduladora que estimula el desarrollo adecuado del lactante (69).

1.3.2. Composición

La LH es un sistema que se estructura en tres fases: emulsión-glóbulos de grasa, suspensión-micelas de caseína y solución-constituyentes hidrosolubles (70).

La fracción emulsión corresponde a la fase lipídica de la leche humana, en la cual se concentran las grasas, los ácidos grasos libres, las vitaminas y constituyentes liposolubles. Mientras que la fracción de suspensión corresponde a la fase donde las proteínas plasmáticas caseínas y casi el total del calcio y fósforo se encuentran en forma de micelas, su principal función es nutricional (crecimiento estructural-celular). Por último, la fracción de solución corresponde a la fase constituida por sustancias hidrosolubles; como algunas vitaminas, minerales, carbohidratos, proteínas, enzimas y hormonas; fracción también considerada como suero de la leche (70).

Las principales variaciones en la composición de la leche humana afectan a una u otra de estas fracciones o fases. De hecho, al inicio el lactante recibe una leche compuesta principalmente por constituyentes hidrosolubles mientras que el aumento del contenido energético de la leche al final de la toma, es atribuido al incremento de la concentración de lípidos, es la consecuencia del predominio de la fracción emulsión en la fase del vaciamiento de la mama. De esta forma, a lo largo de una toma completa, el lactante recibe un producto dinámico y variable, con características distintas y ajustadas al momento específico en que se encuentra (69,70).

La leche humana contiene:

1.3.2.1. Macronutrientes

Agua: El 88% de la leche materna está compuesta, por agua; permitiéndole al recién nacido mantener un perfecto equilibrio hidroelectrolítico (71).

Lípidos: Tiene aproximadamente 3.5 g de grasa en 100 ml de leche, esto representa el 40% de las calorías proveniente de las grasa (71). Además contiene ácidos grasos poliinsaturados de cada larga (ácido docosahexanoico: DHA y ácido araquidónico: AA); importantes en el desarrollo neurológico del niño (72).

Las concentraciones de grasa aumentan, en el calostro desde 2g/100ml hasta 4 o 4,5g/100ml a los 15 días post-parto (71).

Hidratos de carbono: contiene 7 g en 100 ml; es la segunda fuente del aporte energético, y el principal carbohidrato de la leche humana es el disacárido lactosa (72) que representa el 90% y favorece la proliferación de la flora acidófila, mientras que el 10% restante está constituido por diferentes oligosacáridos cuya composición no se conoce exactamente (73).

Proteínas: se encuentra en forma de caseína, contiene un equilibrio de aminoácidos adecuada para el lactante. Su concentración es 0.9 g por 100 ml menor que la leche animal, aparte están sus proteínas solubles en suero (72): alfa-lactoalbúmina, lactoferrina, seroalbúmina, beta-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lisozimas, enzimas, moduladores del crecimiento, hormonas (73).

La alfa-lactoalbúmina tiene un papel importante en la síntesis de la lactosa y es fuente de aminoácidos esenciales como triptófano, lisina y cistina. Así también, la lactoferrina tiene acción bacteriostática sobre microorganismo como el E.coli, y contribuye a la absorción del hierro y protege al lactante contra la deficiencia de hierro (73).

1.3.2.2. Componentes bioactivos

La IgA es la principal inmunoglobulina en la leche materna y su función es proteger la glándula mamaria así como las mucosas del lactante. La proporción se modifica progresivamente desde calostro hasta llegar al nivel que se mantendrá en la leche madura (1740 mg/100ml de IgA y 43 mg/100ml de IgG; 100mg/100ml IgA y 4 mg/100ml de IgG respectivamente) (74).

Lisozima: es una enzima y se encuentra en altas concentraciones, tiene propiedades anti-inflamatorias y ayuda a la mantención de la flora intestinal del lactante por su efecto bacteriolítico contra la enterobacterias y bacterias gram positivas (73,75).

Lactoferrina: Tiene acción bacteriostática sobre gérmenes ferro-dependientes como *E. coli* y contribuye a la absorción del hierro en el intestino. En lactantes la terapia de hierro puede saturar los receptores para la lactoferrina e inhibir su función bacteriostática (75).

Nucleótidos: son compuestos que pertenecen a la fracción nitrogenada no proteica de la leche materna que constituye entre el 18-30% del nitrógeno total, un papel clave en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos, tales como procesos de transferencia de energía, precursores de la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y son claves en la síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas. También actúan sobre el sistema inmunitario, metabolismo lipídico y funcionalidad hepática (40).

1.3.2.3. Vitaminas y minerales

La absorción de vitaminas liposolubles en el lactante está relacionada con la variabilidad de la concentración de la grasa presente en la leche. De hecho, el calostro tiene el doble de vitamina A que la leche madura. Su predecesor es el betacaroteno que actúa como antioxidante (71). Ocurre lo mismo con la vitamina K que es mayor en el calostro, y es después de 2 semanas que se establece la provisión de vitamina K por la flora intestinal (71).

Los minerales y elementos traza que aporta la leche materna tiene una alta biodisponibilidad (73).

1.3.3. Beneficios

Ayuda a mejorar la regulación metabólica, favorece un mejor desarrollo emocional e intelectual (vínculo madre – hijo) (76), previene infecciones gastrointestinales como diarreas y NEC, otitis media, dermatitis atopia, mayor protección inmunológica (enfermedad celíaca, Crohn), menor riesgo de sensibilidad alérgica, condiciona una menor incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles (diabetes mellitus), enfermedades respiratorias, algunos cánceres (77).

1.3.4. Microbioma de la leche humana

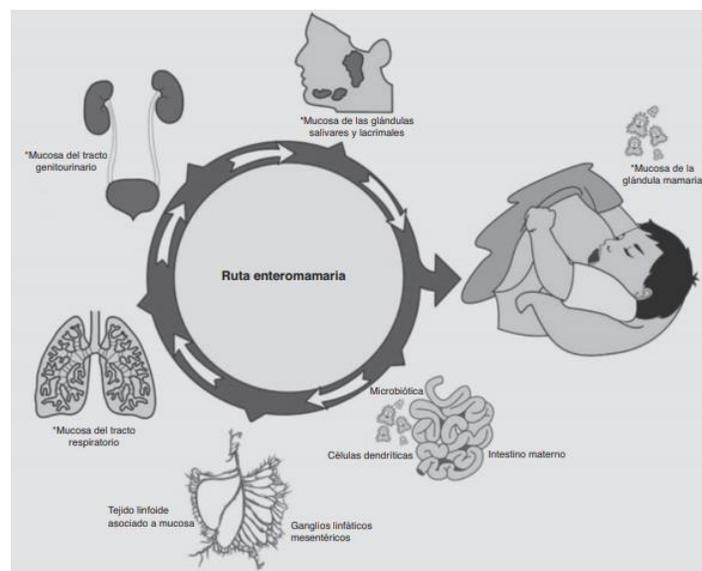
La microbiota de la leche humana, como cualquier otro nicho ecológico en el microbioma humano, no se considera un entorno aislado, sino una red de comunidades interrelacionadas (78).

La transmisión de cepas bacterianas de madre a hijo a través de la lactancia materna se ha demostrado, sin embargo, los mecanismos exactos por los cuales las bacterias llegan a la glándula mamaria no están claros. Inicialmente se creía en la hipótesis de “la

contaminación” que propone que la presencia de bacterias en la leche materna es el resultado de un intercambio con bacterias de la piel de la madre o la cavidad bucal del lactante; los neonatos adquieren bacterias del intestino materno y la microbiota vaginal durante el parto y transfieren estas bacterias de la boca a la piel del seno. El intercambio de bacterias de la boca del bebé a la glándula mamaria podría verse facilitado por un cierto grado de flujo retrógrado en los conductos mamarios durante la succión (78).

Por otro lado, las bacterias pueden aislarse del calostro antes que el bebé nazca, surgiendo la hipótesis de la "migración activa". Se ha demostrado que las CD pueden abrir las uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales y penetrar en el epitelio intestinal con sus dendritas, permitiendo el paso a las bacterias comensales directamente desde la luz intestinal sin dañar la integridad de la barrera epitelial. También, los macrófagos son esenciales para la diseminación extra intestinal de bacterias no invasivas. Asimismo, la capa de células M especializadas de los parches de Peyer y los folículos linfoides muestrean bacterias comensales, después de lo cual las CD residentes recogen las bacterias y las transportan a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM). Por lo tanto, una vez dentro de las CD, las bacterias intestinales podrían propagarse a otros lugares debido a la circulación de células inmunitarias dentro del sistema linfóide asociado a la mucosa. Las células estimuladas con antígeno migran de la mucosa intestinal para colonizar las superficies mucosas distantes, como las de las vías respiratorias y genitourinarias, las glándulas salivales, lagrimales, la glándula mamaria y el lactante (78,79).

Figura 4. Teoría de migración activa

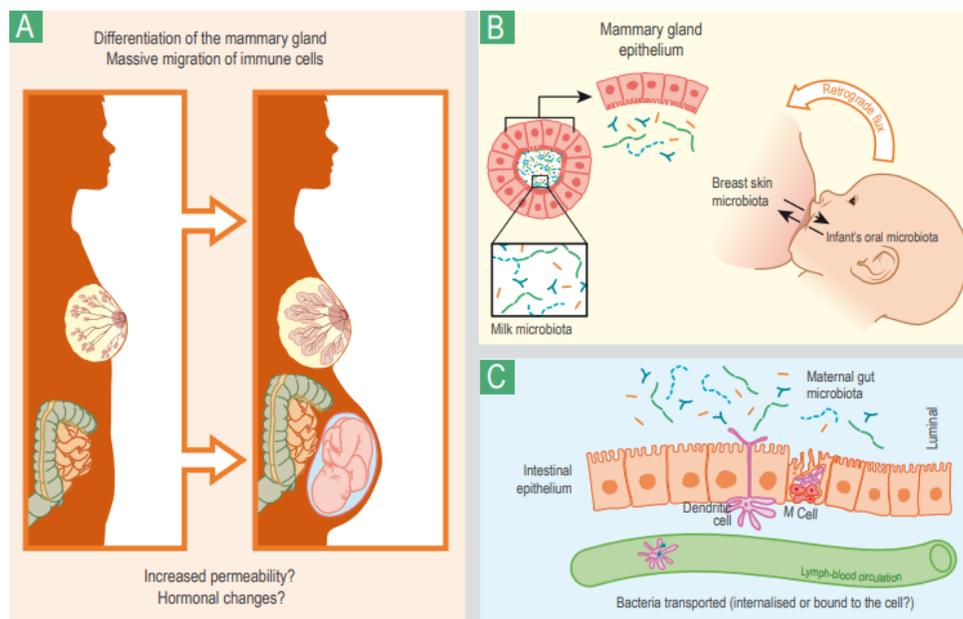


Fuente: Osorio LM, Umbarila AS. Microbiota de la glándula mamaria. *Pediatría (Santiago)*. Revista *Pediatría EU*; 2015;48(1):1–8.

Por otro lado, los cambios hormonales y fisiológicos durante el embarazo y la lactancia pueden proporcionar las condiciones adecuadas para que las células inmunitarias transporten bacterias al GLM. El aumento de la linfa y el suministro de sangre a la glándula mamaria y la liberación de oxitocina, que causa la contracción de las células mioepiteliales, también puede facilitar la presencia de bacterias endógenas en la leche materna. Además, la progesterona desempeña un papel inhibitorio de la respuesta inmune y ayuda a la dilatación de los conductos lácteos. Las gonadotropinas, como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG), también pueden modular las respuestas inmunitarias. Asimismo, las hormonas lactógenas son responsables de la regulación de la migración masiva de células inmunes hacia la glándula mamaria. La prolactina estimula el incremento en el transporte transcelular a través de la alteración de la Claudina. Del mismo modo, el cultivo de células epiteliales de la glándula mamaria en presencia de hormonas del embarazo indujo la producción de citoquinas inflamatorias, promoviendo el reclutamiento y la adhesión de células innatas. Los procesos inflamatorios son necesarios para la remodelación tisular y la angiogénesis y son esenciales para el desarrollo normal de la glándula mamaria (78).

Finalmente, se ha encontrado que el ADN bacteriano en la leche humana, las muestras fecales maternas, las heces infantiles y las células mononucleares maternas de sangre periférica fue la misma, lo que sugiere que las bacterias se translocan a través de la circulación sanguínea (78).

Figura 5. Establecimiento del microbioma de la leche humana



Los cambios fisiológicos durante y después del embarazo facilitan la migración de bacterias a la glándula mamaria. (A) Los cambios hormonales que ocurren en este período pueden influir en la permeabilidad intestinal, lo que podría facilitar la captación bacteriana. (B) A través del flujo retrógrado, la microbiota cutánea de la madre y la microbiota oral del bebé pueden contribuir al establecimiento del microbioma de la leche materna. (C) Las bacterias del tracto intestinal materno pueden ser captadas por diferentes células inmunitarias. La migración masiva de células inmunitarias a las glándulas mamarias podría proporcionar otra ruta posible para alterar el microbioma de la leche humana (78).

Fuente: Jeurink P V., van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LMJ, Fernández L, Garssen J, et al. Human milk: A source of more life than we imagine. *Benef Microbes*. 2013;4(1):17–30.

1.4. Leche humana pasteurizada

La Organización Mundial de la Salud y la Unicef (39) recomiendan para niños prematuros o enfermos, cuando no es posible brindar leche materna de la propia madre, la alimentación con leche humana donada, la cual se somete a pasteurización para reducir los contaminantes bacteriológicos y virales (80), influyendo en sus propiedades bioactivas con menos beneficios que la leche cruda (81,82). Sin embargo, no hay evidencia clínica de beneficios de la leche cruda comparada con pasteurizada (83–85), pero si la leche de donante tiene ventajas documentadas en comparación con la fórmula (44). Siendo así que incluso el Brasil atribuye a los BLH, la disminución del 73% en la mortalidad infantil (46), alcanzando así la meta fijada en los objetivos de desarrollo del milenio: reducir en dos tercios la mortalidad de menores de cinco años entre 1990 y 2015 (47).

1.4.1. Cambios en la leche humana pasteurizada

Existen factores diferentes a la pasteurización que afectan la leche humana donada (LHD) en formas clínicamente significativas, incluyendo la madurez de la glándula mamaria (LME pretérmino versus LHP a término), etapa de lactancia para la cual la LHD reemplaza a LME (p. Ej., LHD madura reemplazando el calostro de la LME y leche transicional), ciclos de congelación-descongelación que son inherentes al almacenamiento y procesamiento de LHD (86).

Tabla 1. Componentes de la LHD que se ven afectados por la pasteurización.

Componente	Función	LHP
Proteínas bioactivas:		
<p>*Inmunoglobulinas *Citocinas protectoras y quimiocinas *Membrana del glóbulo graso de la leche</p>	<p>*Antiinflamatorio *Antiinfeccioso *Protección de barrera intestinal *Epigenético *Inmunomodulación *Puede tener un papel en la programación inmune temprana</p>	<p>*Inferior a la leche madura debido a la congelación y pasteurización *Poca o ninguna bioactividad en algunos componentes *La congelación-descongelación altera la estructura de la membrana de glóbulos grasos *Las transferencias múltiples y la manipulación dan como resultado la adherencia de los lípidos no homogeneizados a las superficies del recipiente.</p>
Factores de crecimiento:		
<p>*Factor de crecimiento epidérmico *Factor de crecimiento transformante *Factor de crecimiento vascular endotelial *Factor de crecimiento similar a la insulina-1 *Eritropoyetina</p>	<p>*Función sinérgica para promover el crecimiento, la maduración y la protección del tracto gastrointestinal *Puede ser especialmente importante para los bebés muy prematuros que tuvieron menos ingestión de líquido amniótico *Potencial de absorción a través de vías paracelulares abiertas en el epitelio intestinal temprano después del nacimiento *Papel especulado en el crecimiento y protección de órganos específicos</p>	<p>*Reducido con la pasteurización *La bioactividad varía con el factor de crecimiento; algunos son erradicados, y algunos se conservan</p>
Macronutrientes:		
<p>*Proteína *Lactosa *Lípido</p>	<p>*Proporcionar sustrato para el crecimiento y desarrollo *Los lípidos de la leche materna madura son los más variables y los más propensos a las deficiencias iatrogénicas en el entorno de UCIN.</p>	<p>*Múltiples ciclos de congelación-descongelación y cambios en los envases reducen los lípidos *Todas las enzimas digestivas transmitidas por la leche humana se reducen significativamente (amilasas y proteasas) se destruyen (lipasas) con la pasteurización, lo que reduce la biodisponibilidad</p>
Hormonas metabólicas:		
<p>*Leptina *Adiponectina</p>	<p>*Regulación metabólica *Puede tener un papel en la programación de nutrición temprana</p>	<p>Reducciones significativas con la pasteurización que son aditivas al declive longitudinal</p>

Microbioma		
*Bacterias comensales transmitidas por leche materna que no son contaminantes de la piel	<ul style="list-style-type: none"> *Importante para la colonización temprana del intestino *Puede estar vinculado a oligosacáridos de la leche materna individuales para sustrato prebiótico *Puede tener un papel en la programación inmune y nutricional temprana *Puede tener un papel en la neuroprotección 	Destruído con pasteurización
*Muy específico para la madre individual		
Oligosacáridos		
Azúcares complejos sin valor nutricional		
*3er soluto más alto en leche materna (mayor que la proteína)	<ul style="list-style-type: none"> *Prebiótico *Antimicrobiano *Antiadherente *Modulación de las células epiteliales e inmunes *Papel potencial en el neurodesarrollo 	*Preservado en gran medida con almacenamiento y pasteurización
*> 200 identificados en LM		
*Variabilidad individual marcada en cantidad y tipo		
CD14 soluble		
Receptor de reconocimiento de patrones	Facilita la diafonía entre enterocitos bacterianos en el intestino inmaduro	88% de reducción con pasteurización y ciclos de congelación-descongelación

Fuente: Meier P-P, Patel A-L, Esquerra-Zwiers A. Donor Human Milk Update: Evidence, Mechanisms and Priorities for Research and Practice. *J Pediatr.* 2017;180:15–21.

1.5. Fórmulas

Los organismos internacionales que elaboran las normas de composición de las fórmulas infantiles y cuyos requerimientos en nutrientes deben cumplirse son: el Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (ESPGAN), el Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría (AAP) y el Comité Científico para la Alimentación de la Comisión de las Comunidades Europeas (CEE) (87).

1.5.1. Fórmulas para prematuros (FPP)

Estas fórmulas están creadas para recién nacidos pretérmino con un peso menor a 2.500 gramos, y no existe un periodo de administración máxima pero se acepta que sea suministrado hasta que la edad corregida alcance las 38 semanas de gestación, o el peso del niño supere los 2.000-2.500 gramos con parámetros bioquímicos (fosfatasa alcalina y albúmina) normales (87).

Las FPP tienen mayor contenido proteico que las fórmulas estándar y tienen un aporte de aminoácidos similar al de la leche humana ya que la relación caseína/seroproteína es 40/60 y esta es la única proteína utilizable por el recién nacido, debido a que su capacidad para metabolizar aminoácidos está limitada por la inactividad de ciertas enzimas a nivel hepático (87).

La cantidad de lactosa se suele sustituir hasta en un 50% del aporte por polímeros de glucosa, para así reducir su carga debido a la deficiencia y vulnerabilidad de lactasa intestinal. Por otro lado, los lípidos son añadidos en una mezcla de grasas vegetales, triglicéridos de cadena media (TCM) y grasa láctea. Se recomienda una relación linoleico/linolénico (L/LN) entre 5 y 15, y complementar con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA) (87) principalmente n-6 (ácido araquidónico) y n-3 (ácido docosahexanoico), ya que en el recién nacido prematuro se consideran esenciales por la inmadurez del sistema enzimático de las desaturasas y enlongasas; además de ser componentes estructurales de las membranas, en los fosfolípidos del sistema nervioso central y en los fotorreceptores de la retina (88)

En las FPP, es más elevado el contenido de electrolitos, calcio y fósforo que en las fórmulas de inicio. Se sigue evaluando la necesidad de añadir taurina, carnitina, colina, inositol y colesterol (87).

Para cubrir los requerimientos del neonato prematuro, se realiza una reconstitución de las fórmulas hasta alcanzar una densidad calórica más elevada que en las fórmulas de inicio (65-85 versus 64-72 Kcal/100ml), lo cual es una ventaja ya que la capacidad gástrica de los bebés es pequeña y el tiempo de crecimiento prolongado. Es por esta concentración de los nutrientes que la osmolaridad oscila entre 280-300 mOsm/kg de agua (87).

La leche de la propia madre se considera la alimentación más adecuada para el niño prematuro, por sus ventajas inmunológicas, nutricionales y psicológicas, aunque pasadas 4 semanas postparto su composición es similar a la leche humana del niño a término y sería insuficiente el aporte de proteínas, calcio, fósforo, vitamina D y sodio, sobre todo en neonatos menores de 1,5 kg (87).

Tabla 2. Composición de la fórmula para prematuro y leche materna.

	FPP (Enfamil)	FPP líquida Enfamil de 24 kcal	Fortificante de LH (Enfamil)	Calostro	Leche madura
	Por 100 g de polvo	Por 100 ml	4 Viales + 100ml de leche materna	Por 100ml	Por 100ml
Valor energético, kcal	2103	82	97	58	70
Valor energético, kJ	503	343	420		
Carbohidratos, g	52	8,8	8,5	5,3 †	7,3 †
Proteínas, g	14	2,7	3,8	2,3	0,9
Grasas totales, g	27	4,1	5,8	2,9	4,2
Colesterol, mg	25	5,8	0,46		
Sodio, mg	185	57	55	48	15
Vitamina A, µg RE	676	330	360	89	47
Vitamina D, µg	8,75	6	4,9	-	0,004
Vitamina E, mg α-TE	3	3,4	4,1*	1,28	0,315
Vitamina C, mg	80	16	20	0,044	0,040
Ácido fólico, µg	130	32	34	-	5,2
Vitamina B1, mg	1	0,13	193 ‡	0,015	0,016
Vitamina B2, mg	1	0,24	290 ‡	25	35
Niacina, mg EN	5	3,2	3,9	0,75	0,2
Vitamina B6, mg	0,3	0,12	146 ‡	0,012	0,028
Vitamina B12, µg	1,5	0,2	0,66	200	26
Biotina, µg	25	3,2	3,9	0,1	0,6
Ácido pantoténico, mg	4,25	0,97	1150	0,183	0,225
Vitamina K, µg	40	7,3	7,8	0,23	0,21
Colina, mg	120	20			
Calcio, mg	600	134	141	23	28
Fósforo, mg	330	73	79	14	15
Yodo, µg	105	20		12	7
Hierro, mg	9	1,5	1,8	0,045	0,040
Magnesio, mg	40	7,3	5,1	3,4	3,0
Zinc, mg	5	1,2	1,3	0,540	0,166
Cobre, µg	600	97	98	46	35
Manganeso, mcg	0,08	5,1	10	-	0,4-1,5
Potasio, mg	525	80	96	74	58
Cloruro, mg	390	86	86	91	40
Selenio, µg	14	4,1			
Taurina, mg	30	4,9	-	-	8

(*) Leche materna recolectada de madres prematuras; (‡) µg; (†) lactosa; (**) µg/dl.

Fuente: Elaboración propia. Compilación de: (89) ¹Vademécum Enfabebé. Mead Johnson. 2017. (90) ²AgUILAR Cordero MJ. Lactancia materna. 1a edición. Madrid, España: Elsevier Science; 2005.p.54. (91) ³

Bianchi-Codo CR, Caldas JP de S-, Alves-Peixoto RR, Lacerda-Sanches V, Guiraldelo TC, Cadore S, et al. Electrolyte and mineral composition of term donor human milk before and after pasteurization and of raw milk of preterm mothers. *Rev Paul Pediatr.* 2018;36(2):1–7. (92) ⁴ Aguayo J, Arena J, Díaz-Gómez M, Gómez A, Hernández-Aguilar MT, Landa L, et al. Lactancia materna: guía para profesionales. Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. 2004. 1-442 p. ⁵ (93) MINSAL, UNICEF. La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. 1995;1–30.

1.6. Microbiota

1.6.1. Definiciones

1.6.1.1. Microbiota

La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos vivos que habitan en el tubo digestivo y es necesaria para el óptimo crecimiento corporal, el desarrollo de la inmunidad y la nutrición (94). Además, coloniza el intestino al nacimiento y permanece allí durante toda la vida del individuo. Siendo aproximadamente el íleon distal y el colon colonizados por 10^{12} - 10^{14} bacterias (94,95).

1.6.1.2. Probiótico y Prebiótico

Los probióticos son los microorganismos vivos que le otorgan salud al huésped (25) y los prebióticos son los oligosacáridos no digeribles que estimulan el crecimiento de bacterias sanas, son alimentos funcionales conocidos por mediar las respuestas inmunes y modular las poblaciones microbianas en el intestino (96).

Para que los probióticos ejerzan su efecto, no siempre colonizan el tracto intestinal; siendo así que algunos se vuelven parte de la microbiota intestinal pero otros no. Los probióticos no colonizadores ejercen indirectamente sus efectos de manera transitoria, remodelando o influenciando la comunidad microbiana existente (97).

1.6.2. Adquisición y desarrollo de la microbiota

La microbiota está compuesta por una variedad y complejidad bacteriana; siendo que cada una asume una función individual (26), este ecosistema incluye a numerosos microorganismos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis (98).

La composición inicial de la microbiota se determina desde el nacimiento y depende principalmente de dos factores: el tipo de parto y la alimentación, aunque en las unidades de cuidados intensivos neonatales, es influenciada por la terapia antibiótica prolongada, nutrición parenteral, alimentación oral retardada e intubación (99). En el parto natural, el

neonato adquiere su microbiota inicial de la vagina (100) y las heces de sus madres (101), mientras que en los nacidos por cesárea al no estar expuestos a la microbiota materna tienen una colonización intestinal tardía (102).

Además, que el genotipo del huésped representa un factor indeterminado cuando se intenta mostrar la transmisión vertical de los microbios de los padres a los hijos debido a que se ha sugerido que este también afecta la composición y función de la comunidad bacteriana en el intestino. Así lo demuestra un estudio realizado en gemelos monocigóticos adultos, hermanos y sus parejas matrimoniales, el cual mostró similitudes entre las comunidades microbianas intestinales de gemelos monocigóticos mientras que sus compañeros conyugales a pesar que viven en el mismo ambiente y que tienen hábitos alimentarios comparables, mostraron baja similitud que no era significativa; asimismo, en gemelos dicigóticos y hermanos su microbiota era tan similar entre sí como la microbiota de gemelos monocigóticos, a pesar de un menor nivel de genética del huésped (103).

Por otro lado, los microbios del ambiente, los orales y cutáneos de la madre serán transferidos mecánicamente al recién nacido mediante varios procesos incluyendo el amamantamiento, los besos y los cuidados (104).

El desarrollo de la microbiota intestinal en los niños se puede dividir en cuatro fases separadas (36):

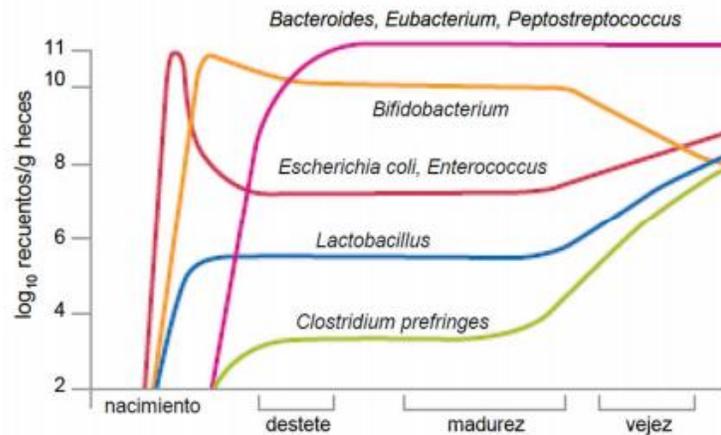
1ª fase: alrededor de la 1ª-2ª semana de vida.

2ª fase: periodo restante de alimentación a pecho exclusivamente.

3ª fase: tiempo entre el comienzo de la alimentación complementaria y del cese de la alimentación a pecho.

4ª fase: periodo de conversión de los patrones de microbiota adulta empezando tras la finalización del destete.

Figura 6. Cambios de la flora intestinal desde el nacimiento hasta la vejez (36)



Fuente: Pérez D, Lopez G, Periago M, Ros G. Evolución de la microbiota intestinal en lactantes: efecto de la leche materna. Aliment Nutr y Salud. 2003;10(4):100–7.

Inicialmente el neonato es colonizado por bacterias aerobias y anaerobias facultativas como la de *E. coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y otras enterobacterias que son las responsables consumo gradual de oxígeno que lleva a un ambiente favorable para el establecimiento de géneros anaerobios estrictos como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* en los primeros días (4-7 días) seguidos por especies *Veillonella*, *Eubacterium* y *Ruminococcus* y alrededor del año las especies anaerobias se expandirán y superarán en número a las bacterias facultativas hacia un perfil microbiano adulto, caracterizado por la preponderancia de *Bacteroides* y **Firmicutes**, común ocurrencia de **Verrucomicrobia** y muy baja abundancia de **Proteobacteria** y bacterias aerobias gram negativas (105–107).

1.6.3. Factores que influyen en el desarrollo de la microbiota

Factores intrínsecos

1. Edad gestacional.- Es la principal causa de dificultad de implantación de *Bifidobacterium*, mientras que las enterobacterias y *bacteroides* colonizan fácilmente el colon (26,108).

Factores extrínsecos

2. Tipo de parto.- En neonatos nacidos por cesárea se retarda la colonización por *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *E.coli*, a diferencia de los nacidos por parto vaginal (26,94,109,110). Asimismo, según un estudio realizado por Goedert los adultos nacidos por cesárea parecen tener una composición claramente diferente de su microbiota fecal, este

estudio desconoce si esta distinción se adquirió durante el nacimiento y si afecta el riesgo de enfermedad durante la edad adulta (111).

3. Tipo de alimentación.- Los recién nacidos alimentados con fórmulas infantiles ricas en oligosacáridos aumentan sus colonias de Bifidobacterias (26,94,109).

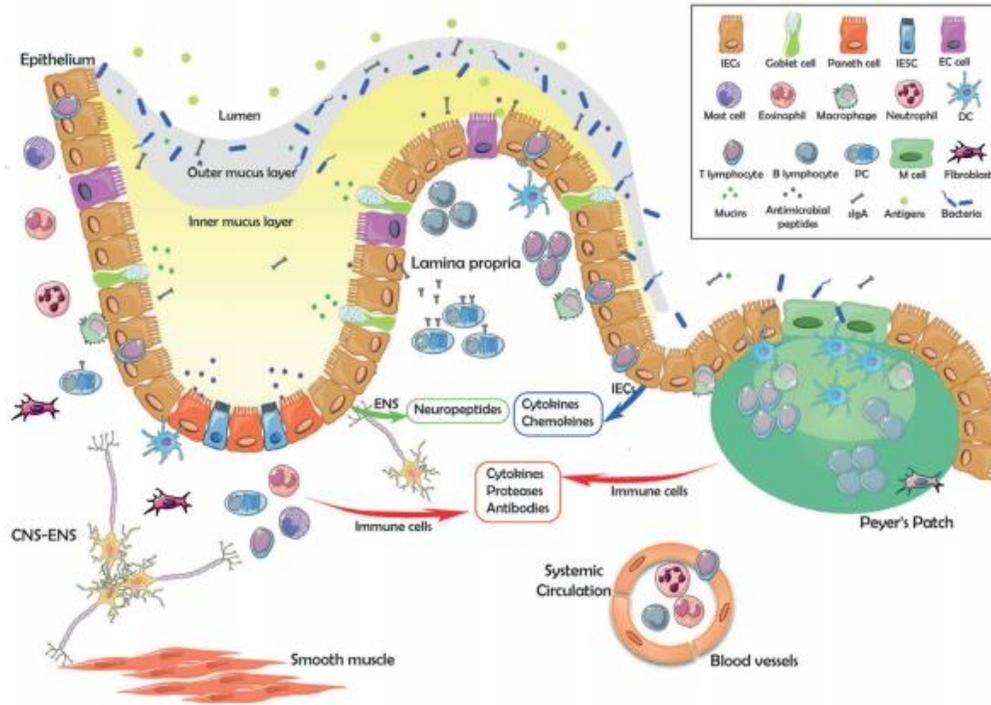
4. Condiciones de higiene.- Malas condiciones se relacionan con colonización temprana por Enterobacterias (26).

5. Antibioterapia.- La exposición temprana a este tipo de fármacos altera la microflora intestinal (26).

1.6.4. Anatomía de la Barrera intestinal

La mucosa intestinal comprende una capa de células epiteliales columnares polarizadas y una región subepitelial que contiene la lámina propia, el sistema nervioso entérico, el tejido conectivo y las capas musculares. El epitelio incluye enterocitos, células Goblet (que sintetizan y liberan mucina), células de Paneth (que sintetizan péptidos antimicrobianos), células enterocromafines (que producen hormonas y otras sustancias) y células madre intestinales. Por encima de la barrera epitelial se encuentra la capa de moco sin agitar, que contiene glicocalix; esta capa, a su vez, subyace a la capa de moco agitado, que contiene microbiota, IgA secretora, mucinas y péptidos antimicrobianos. Los linfocitos intraepiteliales están por encima de la membrana basal, subyacente a la unión estrecha. La lámina propia incluye un tejido linfoide difuso formado por macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos de la lámina propia y, en ocasiones, neutrófilos, y un tejido linfoide estructurado formado por los parches de Peyer, que contienen células M, células dendríticas y linfocitos (112).

Figura 7. Anatomía y componentes de la barrera intestinal



SNC: Sistema nervioso central; ENS: Sistema nervioso entérico; IS: Sistema inmunológico; CEI: Células epiteliales intestinales; ISC: Células madre intestinales; ECC: Células enterocromafines; slgA: IgA secretora (112).

1.6.5. Comunicación huésped-flora en la superficie de la mucosa.

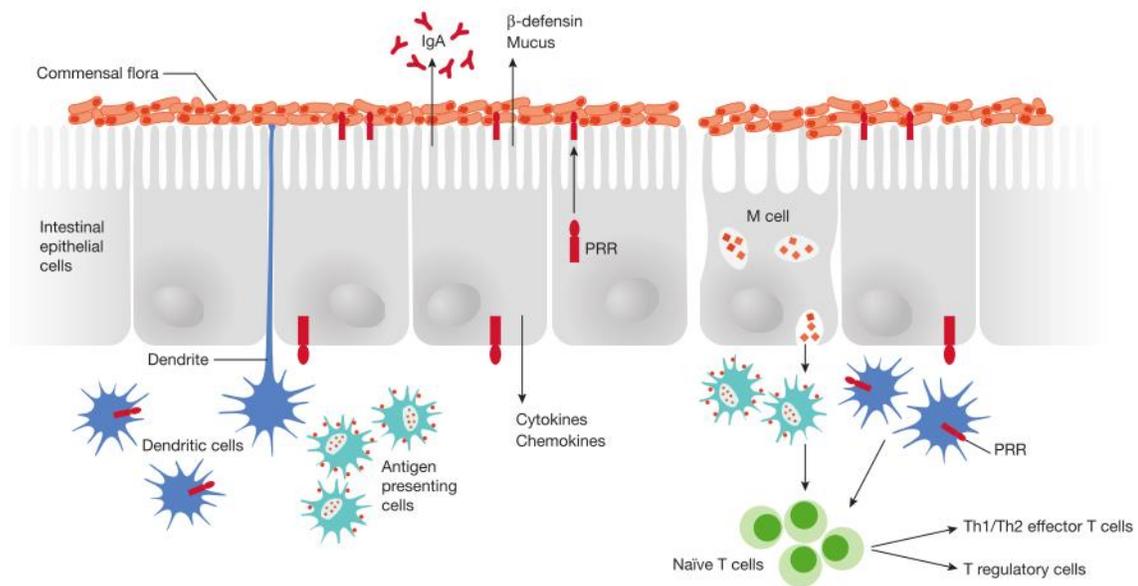
La defensa del huésped necesita distinguir los organismos comensales de los patógenos y presentar una regulación precisa de las respuestas posteriores (31).

El epitelio intestinal forma una barrera selectiva, que favorece la absorción de nutrientes, regula los movimientos de iones y agua, y limita el contacto del huésped con la carga intraluminal masiva de antígenos y microbios en la dieta (113). Por tanto, el epitelio intestinal proporciona la primera línea de defensa mediada por tres tipos principales de células inmunosensoriales. Primero, los enterocitos de la superficie sirven como sensores aferentes de peligro dentro del microambiente luminal al secretar quimiocinas y citoquinas que dirigen respuestas inmunes innatas y adaptativas. En segundo lugar, las células M que recubren los folículos linfáticos toman muestras del microambiente y transportan los antígenos luminales a las células dendríticas adyacentes y otras células presentadoras de antígenos (CPA). En tercer lugar, las células dendríticas (DC) intestinales pueden muestrear directamente los contenidos intestinales mediante las dendritas que se extienden entre los enterocitos de la superficie sin interrumpir las uniones estrechas. Las DC pueden

ingerir y retener bacterias comensales vivas y viajar al ganglio linfático mesentérico, donde son inducidas las respuestas inmunes a las bacterias comensales. Por lo tanto, el ganglio linfático mesentérico impide el acceso de bacterias comensales al medio interno. La capacidad de las células inmunosensoriales para discriminar las bacterias patógenas de las comensales está mediada, en parte, por dos sistemas principales de receptores de reconocimiento de patrones del hospedador (PRR): la familia de los receptores tipo Toll (TLR) y el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos / dominio de reclutamiento de caspasa isoformas (NOD / CARD). Los TLR y las proteínas NOD son expresadas por los enterocitos de la superficie y células dendríticas en los intestinos. Estos PRR tienen un papel fundamental en la activación de las células inmunitarias en respuesta a patrones moleculares asociados con microbios específicos, volviéndose crucial para la comunicación bacteriano-huésped. (31).

Muchos ligandos PRR son expresados por bacterias comensales, pero el intestino sano no provoca respuestas inflamatorias a estas bacterias. A la inversa, algunas bacterias comensales ejercen efectos protectores al atenuar las respuestas proinflamatorias inducidas por diversas bacterias enteropatógenas (31).

Figura 8. Detección inmunosensorial de bacterias intestinales



Los enterocitos de superficie secretan muchos mediadores inmunitarios en respuesta a los antígenos, incluidos los péptidos antibacterianos, la inmunoglobulina A (IgA) y las quimiocinas. Las células epiteliales especializadas, denominadas células M, transportan y suministran antígenos a las células presentadoras de antígenos, que posteriormente procesan los antígenos y los presentan a las células T vírgenes. Las células dendríticas presentadoras de antígenos (DC, por

sus siglas en inglés) también analizan y muestrean el microentorno de la mucosa. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados por las DC y los enterocitos median la detección de antígenos bacterianos, y las DC modulan la capacidad de respuesta inmune o la tolerancia al promover células T efectoras o reguladoras (31).

En el intestino normal, la translocación es mínima o nula, y el sistema inmunitario intestinal se encuentra en un estado de tolerancia, sin signos de inflamación. A la inversa, cuando la barrera de la mucosa falla, aumenta la translocación de moléculas / microorganismos de la luz, con una estimulación de las células inmunitarias residentes, disbiosis y alteraciones en la reparación y permeabilidad epitelial. Esto crea un desequilibrio que en última instancia puede dar lugar a una reacción inflamatoria manifiesta. El equilibrio puede restablecerse mediante la estimulación de los elementos de la función de barrera o mediante la inhibición de la cascada inflamatoria secundaria (114).

Figura 9. Funcionamiento de la barrera mucosa

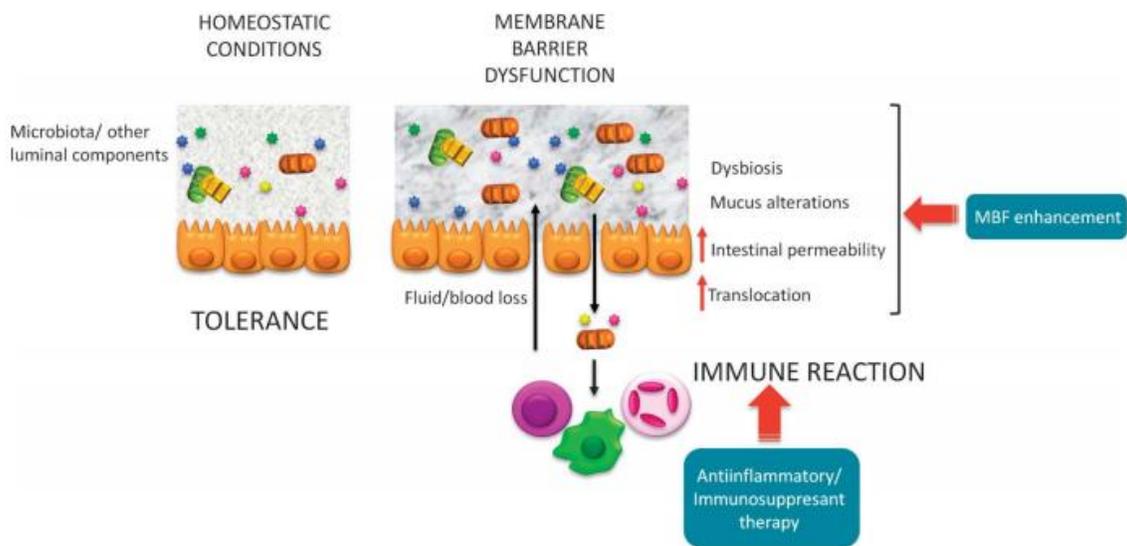


Diagrama que muestra el funcionamiento de la barrera mucosa en condiciones homeostáticas (izquierda) y en el contexto de la disfunción de la barrera (derecha) (114).

1.6.6. ***Papel fisiológico y capacidad metabólica de la microbiota intestinal.***

La flora intestinal degrada los restos no digeribles de la dieta (como: almidón, celulosa, hemicelulosa, inulina, oligosacáridos), dando lugar a ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, butírico y propionico, etanol y ácido láctico); todos ellos contribuyen a acidificar el colon proximal y ciego (pH 5,5 – 5,9), a la vez favorecen la absorción de otros

oligoelementos tales como: hierro, calcio, magnesio y mejorando la biodisponibilidad del zinc, cobre y fosforo (98).

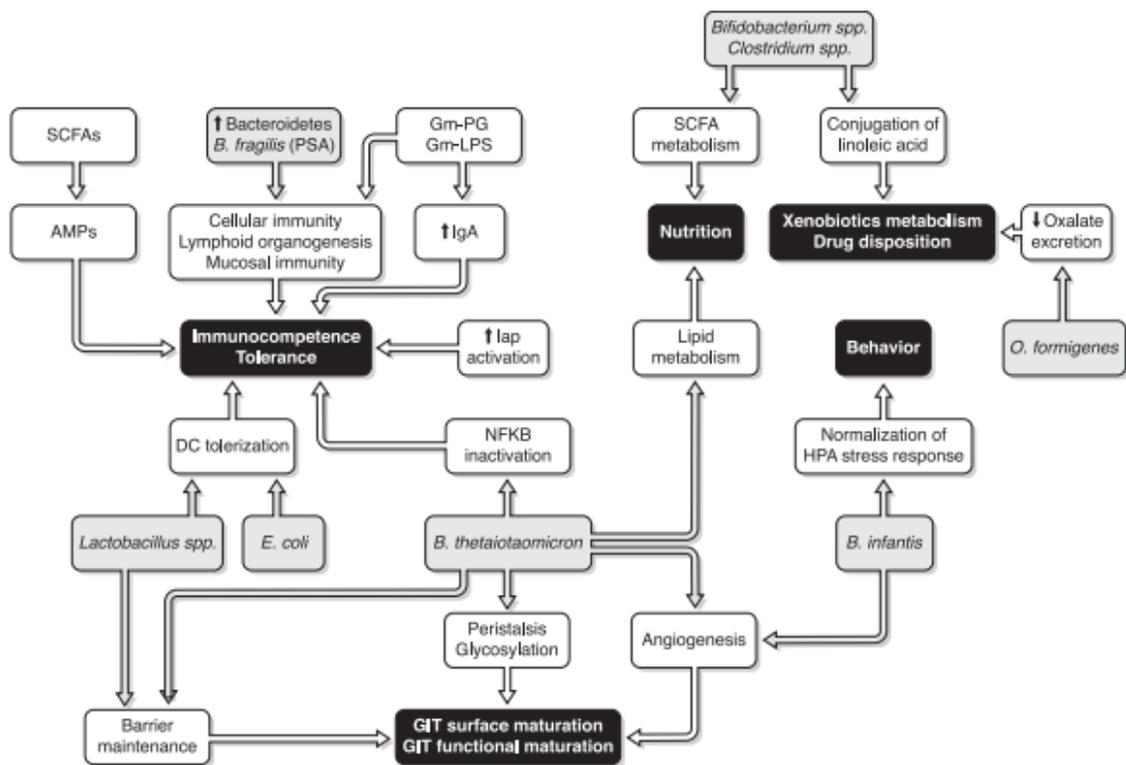
Butirato: es utilizado como fuente de energía por el colonocito, siendo que a la vez contribuye al trofismo, regulando la diferenciación celular y disminuyendo el riesgo de cáncer (98).

Acetato: se utiliza para la síntesis de colesterol y la lipogénesis en el hígado (98).

Propionato: actúa como inhibidor competitivo del transporte del acetato hacia el interior de los hepatocitos (98).

El acetato y propionato intervienen en el metabolismo hepático de la glucosa, reduciendo la glucosa post prandial y la respuesta insulínica (98)

Figura 10. Contribuciones de la microbiota intestinal a la fisiología del huésped



Los diferentes componentes de la microbiota intestinal pueden afectar muchos aspectos del desarrollo normal del hospedador. En gris se muestran miembros de la microbiota, con sus componentes o productos de su metabolismo. En blanco se muestran sus efectos sobre el huésped a nivel celular o de órgano. Las elipses negras representan los fenotipos del hospedador afectados. Solo se muestran algunos ejemplos de miembros / componentes microbianos que contribuyen a un fenotipo dado. AMP, péptidos antimicrobianos; DC, células dendríticas; Gm, Gram

negativa; HPA, hipotálamo-hipófisis-suprarrenal; lap, fosfatasa alcalina intestinal; PG, peptidoglicano; PSA, polisacárido A (115).

Fuente: Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2010;90:859–904.

1.6.7. Implicaciones de la microbiota intestinal en la salud.

1.6.7.1. Enterocolitis necrotizante (NEC).

La enterocolitis necrotizante (NEC) es un trastorno inflamatorio que afecta a los prematuros (116) en especial a los menores de 33 semanas de edad gestacional (117) y peso menor de 1.500g (118). Se caracteriza por una necrosis de la mucosa y/o de las capas más profundas a nivel intestinal, en las zonas del íleon terminal y con menos frecuencia en el colon e intestino delgado proximal (119).

La NEC es una de las urgencias gastrointestinales más frecuente en UCI (120). Y la tasa de mortalidad es alta de 20 a 30%, y aproximadamente un 50% para los lactantes que tienen que recurrir a cirugía (118).

Los factores que predisponen la NEC (121) son: la tendencia genética, la inmadurez intestinal, el desequilibrio en el tono microvascular, una fuerte probabilidad de colonización microbiana anormal en el intestino y una mucosa intestinal altamente inmunorreactiva, siendo el principal factor de riesgo la mala colonización intestinal (116).

Estudios han demostrado las posibles bacterias colonizadoras y originadoras de NEC entre las cuales están: *Enterobacter*, *E. coli*, (122) *Klebsiella* (123), *Serratia marcescens*, *S faecalis*, *Veillonella spp*, *Propionibacterium spp*, *Candida spp* y *E. cloacae* (124), sin embargo en un estudio más reciente predominó *Clostridium perfringens* y *Bacteroides dorei*. Pero se obtiene información limitada sobre la composición de la microbiota ya que estos estudios analizaron las heces, pero no el sitio afectado (pared intestinal) (116).

Por otro lado, Hulzebos *et al.*, encontraron que niveles altos de sales biliares en las heces están presentes en neonatos que desarrollan NEC en comparación a los lactantes sanos, pero se necesitan más estudios para que este sea un marcador bioquímico predictivo de NEC (125).

Varios estudios se han realizado para buscar formas de prevención y tratamiento frente a la NEC (121,126). Schanler *et.al.*, concluyeron que la leche materna y la leche donada de banco ofrecen más ventajas como una menor estancia hospitalaria e incidencia a infecciones que las fórmulas artificiales para prematuros (127); Lin *et al.*, demuestra en su

estudio que los prematuros con extremo bajo peso al nacer, alimentados con lactancia materna exclusiva o probióticos orales (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis*), disminuyen el riesgo de padecer NEC (127); Wu *et.al.*, demostraron en ratas prematuras que la especie *Bifidobacterium adolescentis* previene NEC (128).

1.6.8. Microbiota gastrointestinal.

Más del 99% de la microflora intestinal está compuesta por bacterias que mantienen una relación de simbiosis con el ser humano y se dividen en cuatro phyla, que en neonatos sanos en las 2 primeras semanas de vida se encuentran distribuidos de la siguiente manera: **Firmicutes** (45%), **Bacteroidetes** (7%), **Proteobacterias** (46%) y **Actinobacterias** (2%) (26,94,109).

Tabla 3. Clasificación de las bacterias encontradas en la microbiota.

Phyla	Familia	Géneros	Especies
Firmicutes	Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremonis</i>
		<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus viridans</i>
	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. gasseri</i>
			<i>L. plantarum</i>
			<i>L. salivarius</i>
			<i>L. antri</i>
			<i>L. fermentum</i>
			<i>L. gastricus</i>
			<i>L. johnsonii</i>
			<i>L. lactis</i>
			<i>L. mucosae</i>
			<i>L. oris</i>
	<i>L. reuteri</i>		
<i>L. vaginalis</i>			
Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium leptum</i> <i>Clostridium orbiscindens</i> <i>Clostridium difficile</i>	
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	
Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>		
Peptococcaceae	<i>Peptococcus</i>		
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	
		<i>E. faecium</i>	
Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>		
Lacnospiraceae			
Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus obeum</i>	

Actinobacterias	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i>
			<i>B. bifidum</i>
			<i>B. breve</i>
			<i>B. catenulatum</i>
			<i>B. dentium</i>
			<i>B. gallicum</i>
			<i>B. infantis</i>
			<i>B. longum</i>
			<i>B. pseudocatenulatum</i>
			<i>B. pseudolongum</i>
			<i>B. thermophilum</i>
	Propionibacteriaceae	<i>Propionibacterium</i>	
	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	
Proteobacterias	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>E. Coli</i>
			<i>E. fergusonii</i>
		<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>
			<i>K. pneumoniae</i>
		<i>Yersinia</i>	<i>Y. bercovieri</i>
			<i>Y. frederiksenii</i>
			<i>Y. rohdei</i>
		<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
	<i>S. liquefaciens</i>		
		<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i>
			<i>E. cloacae</i>
		<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
			<i>P. stutzeri</i>
	Pasteurellaceae	<i>Haemophilus</i>	
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>B. fragilis</i>

Fuente: Elaboración propia. Compilación de diferentes autores: ¹Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, Vos W De, et al. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. PLoS One. 2013;8(6):1–13. ²Itani T, Ayoub C, Melki I, Rousseau C. Anaerobe Establishment and development of the intestinal microbiota of preterm infants in a Lebanese tertiary hospital. Anaerobe. 2017;43:4–14. (129) ³Fan W, Huo G, Li X, Yang L, Duan C, Wang T, et al. Diversity of the intestinal microbiota in different patterns of feeding infants by Illumina high-throughput sequencing. World J Microbiol Biotechnol. 2013;29(12):2365–72.

1.6.8.1. *Lactobacillus*.

Los *Lactobacillus* pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico (LAB) y representan las bacterias más estudiadas como los principales microorganismos probióticos (130).

Estos microorganismos por lo general se encuentran en el intestino delgado y la vagina del ser humano, algunas de estas bacterias son consideradas beneficiosas debido a que producen vitamina K, lactasas (130) y sustancias antimicrobianas (131).

Además, algunas especies de este género mejoran el estado clínico e inmunológico de los pacientes afectados por la dermatitis atópica moderada / grave y asma. Esta cepa específica no sólo fue capaz de conducir un aumento significativo en la respuesta T-helper, sino también para modular positivamente la composición de la microbiota intestinal (130,132–135).

1.6.8.2. *Bifidobacterium*.

Son bacterias Gram positivas, anaeróbicas, no esporuladas, normalmente ramificadas, encontrándose en el tracto gastrointestinal humano, la cavidad oral, el tracto genitourinario femenino y la vagina. Son uno de los pocos organismos residentes del tracto gastrointestinal estéril de los recién nacidos. Se han identificado más de 30 especies diferentes de *Bifidobacterium* y pueden considerarse como bacterias no patógenas; además, se han utilizado terapéuticamente en forma de probióticos debido a sus posibles efectos beneficiosos. Sin embargo, hay varios informes de casos que describen especies de *Bifidobacterium* causando peritonitis, infecciones del tracto urinario, infecciones pulmonares, artritis protésica conjunta séptica, bacteriemia y sepsis (136).

1.6.8.3. *Lactococcus*.

Lactococcus es un anaerobio facultativo grampositivo con un metabolismo fermentativo que puede usar diferentes azúcares para producir principalmente ácido L- láctico. Se han examinado los efectos del oxígeno con *Lactococcus lactis* y la oxigenación de los cultivos da como resultado un estado redox alterado y una mayor actividad oxidasa de NADH; como consecuencia, la fermentación de azúcar se desplaza hacia fermentación mixta, y ácido acético, ácido fórmico, CO₂, etanol y acetoína, así como el ácido láctico (137).

Por otro lado, Huynh y Li reportaron en 2015 que *L. lactis* acelera de manera efectiva la migración celular por medio de la expresión dual y la secreción del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor 3 del trébol (TFF3) que puede ayudar a tratar el daño intestinal y la inflamación (138). Se demostró que un aislado de *L. lactis* produce nisina, una bacteriocina de amplio espectro utilizada en la industria alimentaria para prevenir patógenos bacterianos y deterioro (139), además mostró una fuerte actividad inhibitoria contra *S. aureus* (140).

Del mismo modo, Wang et al. (141), realizaron un estudio que tuvo como objetivo construir y expresar EGF en porcinos (pEGF) y utilizar *L. lactis* (LL) como vehículo para producir y administrar pEGF. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es importante en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis. LL-pEGF aumentó la altura de las vellosidades en el duodeno, yeyuno e íleon ($P < 0.05$), también disminuyó *Escherichia coli* y los recuentos de *enterococos* en el íleon y aumentó *Lactobacillus* en el íleon y el ciego ($P < 0.05$). Asimismo, la administración intragástrica de *L. lactis* secretora de IL-10 causó una reducción del 50% en la colitis en ratones tratados con dextrano sulfato de sodio y previno la aparición de colitis en ratones (142).

1.6.8.4. *Staphylococcus*.

Son cocos redondos grampositivos aislados, en parejas, cadenas cortas y, frecuentemente en racimos irregulares y se caracterizan por ser aerobio y anaerobio facultativos, capaz de fermentar la glucosa en anaerobiosis. Forman parte de la flora normal del organismo humano, encontrándose en la mucosa nasal, cavidad oral, intestino grueso, y en la piel. Crecen en medios con elevada concentración de sal (7.5%), en agar sangre originando colonias de 1-3 mm de diámetro.

El género *Staphylococcus* tiene aproximadamente 30 especies, de las cuales son tres las que se destacan más y son de relevancia clínica: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, ya que son los principales patógenos que producen infecciones tanto a nivel hospitalario como en comunidad (143).

1.6.8.5. *Escherichia*.

Dentro de este género se encuentran las siguientes especies: *E. coli*, *E. coli inactiva*, *E. hermannii* (clasificada como entérico grupo 11 del CDC), *E. vulneris* (clasificada como entérico grupo 1 del CDC), *E. fergusonii* (clasificada como entérico grupo 10 del CDC) y *E. blattae* (144).

La sepsis de inicio temprano son causadas por *E. coli*, y las infecciones por *E. coli* resistentes a antibióticos son mayores en neonatos prematuros (145).

1.6.8.6. *Clostridium*.

Clostridium es un género bacteriano compuesto de alrededor de 100 especies. Las especies clostridiales más notables son las que causan enfermedades humanas y animales. En particular la *Clostridium difficile*, que es responsable de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*. En los Estados Unidos y Europa, la *C. difficile* fue

responsable de casi medio millón de infecciones y 29.000 muertes en 2011. Las opciones de tratamiento son siendo limitadas. Además, la aparición de cepas resistentes a los antibióticos actualmente utilizados ha llevado a los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) a incluir la *C. difficile* como una de las principales "Amenazas de resistencia a los antibióticos en los Estados Unidos en 2013" (146).

Clostridium difficile es un bacilo gram positivo, anaerobio estricto, capaz de formar esporas que le permiten su supervivencia en aguas, suelos y en ambientes hospitalarios, donde puede permanecer hasta años. Inicialmente, fue descrito en 1935 como un agente normal de la microbiota intestinal de recién nacidos sanos. Actualmente, se considera el principal agente causal de diarrea nosocomial asociada al tratamiento con antibióticos, donde además de la diarrea, puede causar colitis pseudomembranosa (CSM), enfermedad atribuida, en la mayoría de los casos, a *C. difficile*, e incluso complicaciones como la colitis fulminante, todas ellas englobadas en el término de enfermedades asociadas a *C. difficile* (EACD) (147).

1.7. Técnicas de estudio de la microbiota intestinal

El método más clásico, sencillo y económico para analizar la microbiota intestinal es el aislamiento de las bacterias en medios de cultivo para su posterior identificación, mediante el estudio de sus características fenotípicas y pruebas bioquímicas (148). Pero debido a que una gran cantidad de las bacterias entéricas no pueden cultivarse *ex vivo* mediante técnicas estándar, actualmente la identificación de diversas especies se está trabajando mediante métodos moleculares (97), como los basados en variaciones de la PCR (Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa) para analizar tanto ADN (Ácido Desoxirribonucleico) como ARN (Ácido Ribonucleico).

1.7.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las enzimas ADN polimerasas pueden sintetizar la cadena complementaria de una secuencia de ADN por medio de una mezcla de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) y una secuencia de doble cadena corta (cebado). La síntesis se dirige de 5' a 3' desde la región de cebado. En la PCR, las secuencias de ADN de doble cadena se producen selectivamente agregando un gran exceso de oligonucleótidos de ADN específicos al ADN, bajo condiciones apropiadas. Estos cebadores oligonucleotídicos generalmente están hechos para tener una longitud de 20 a 25 bases (149).

En la práctica, dos cebadores oligonucleotídicos específicos se sintetizan y se agregan al ADN de manera que sitian la región de interés, siendo el cebador 1 una copia de la

cadena codificante y el cebador 2 una copia de la cadena no codificante. Una vez que se han agregado los cebadores, su unión al ADN (recocido) se logra al fundir el ADN de doble cadena a 94 ° C y enfriar la mezcla a 40-55 ° C. La adición de la enzima polimerasa en este punto conducirá a la síntesis de cadenas de ADN complementarias a lo largo de las cadenas codificantes originales y no codificantes de los sitios de unión del cebador. Si el proceso se repite, es decir, se funde a 94 ° C y luego se enfría cíclicamente, entonces el área de ADN entre los dos cebadores se amplificará logarítmicamente porque las cadenas recién sintetizadas se convierten en moldes para los cebadores en exceso (149).

Además, originalmente se utilizó la enzima polimerasa de *Escherichia coli* (ADN polimerasa I del fragmento Klenow), pero esta enzima se destruye a la temperatura de fusión de 94 ° C, lo que requiere la adición de enzima nueva para cada ciclo. La introducción de una enzima polimerasa de ADN termoestable de *Thermus aquaticus* (Taq) que puede sobrevivir a la incubación prolongada a 94 ° C, y que es más activa a aproximadamente 70 °C, eliminó la necesidad de agregar polimerasa en cada ciclo. Esto también significa que a la temperatura relativamente alta (70 ° C) de la etapa de síntesis o extensión, los cebadores tenderán a hibridar específicamente con su secuencia complementaria, reduciendo así la amplificación de áreas no específicas. Por esta razón, actualmente PCR se lleva a cabo utilizando la polimerasa Taq. Los tiempos de incubación para la etapa de desnaturalización o fusión, la etapa de reasociación o recocido y la etapa de extensión son del orden de dos a tres minutos, y se utilizan más de 30 ciclos. Pero los tiempos pueden aumentar a mayor longitud de la secuencia de ADN a amplificar (149).

Después de la PCR, la muestra de ADN se analiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), donde se observa una banda única predominante equivalente en longitud a la distancia entre los extremos 5' de los cebadores oligonucleótidos después de teñir con bromuro de etidio y examinar el gel bajo luz ultravioleta (149).

Tabla 4. Cebadores utilizados para qPCR de acuerdo al objetivo microbiano

Objetivo microbiano	Primer secuencia 5'-3'	Gen objetivo	Ref.
<i>Akkermansia</i>	F: CAGCACGTGAAGGTGGGGAC R: CCTTGCGTTGGCTTCAGAT	16S	Collado <i>et al.</i> (2007)
<i>Atopobium</i> grupo <i>Atopobium</i> - <i>Collinsella</i>	F: GGGTTGAGAGACCGACC R: CGGRGCTTCTTCTGCAGG	16S	Matsuki <i>et al.</i> (2004)

Objetivo microbiano	Primer secuencia 5'-3'	Gen objetivo	Ref.
<i>Bacteroides</i> grupo <i>Bacteroides</i> - <i>Prevotella</i> - <i>Porphiromonas</i>	F: GAGAGGAAGGTCCCCAC R: CGCKACTTGGCTGGTTCAG	16S	Peso Echarri <i>et al.</i> (2011)
<i>Bifidobacterium</i>	F: GATTCTGGCTCAGGATGAACGC R: CTGATAGGACGCGACCCCAT	16S	Gueimonde <i>et al.</i> (2004)
<i>Clostridia</i> IV <i>Clostridium</i> <i>leptum</i> - <i>Faecalibacterium</i> <i>prausnitzii</i>	F: TTAACACAATAAGTWATCCACCTG G R: ACCTTCCTCCGTTTTGTCAAC	16S	Ramirez- Farias <i>et al.</i> (2009)
<i>Clostridia</i> XIVa <i>Blautia</i> <i>coccoides</i> - <i>Eubacterium</i> <i>rectale</i>	F: CGGTACCTGACTAAGAAGC R: AGTTYATTCTTGCGAACG	16S	Rinttila <i>et al.</i> (2004)
<i>Clostridium difficile</i>	F: TTGAGCGATTTACTTCGGTAAAGA R: CCATCCTGTACTGGCTCACCT	16S	Rinttila <i>et al.</i> (2004)
<i>Clostridium perfringens</i>	F: ATGCAAGTCGAGCGAKG R: TATGCGGTATTAATCTYCCTTT	16S	Rinttila <i>et al.</i> (2004)
<i>Desulfovibrio</i>	F: CCGTAGATATCTGGAGGAACATCA R: ACATCTAGCATCCATCGTTTACAG C	16S	Fite <i>et al.</i> (2004)
<i>Enterobacteriaceae</i>	F: TGCCGTAACCTCGGGAGAAGGCA R: TCAAGGACCAGTTCAGTGTC	23S	Matsuda <i>et al.</i> (2007)
<i>Enterococcaceae</i>	F: CCCATCAGAAGGGGATAACACTT R: ACCGCGGGTCCATCCATC	16S	Matsuda <i>et al.</i> (2007)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F: ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT R: TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTTC	16-23S	Liu <i>et al.</i> (2008)

Objetivo microbiano	Primer secuencia 5'-3'	Gen objetivo	Ref.
<i>Lactobacillus</i> grupo <i>Lactobacillus</i> - <i>Weissella</i>	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CATGGAGTTCCACTGTCCTC	16S	Peso Echarri <i>et al.</i> (2011)
<i>Shigella</i>	F: ACCATGCTCGCAGAGAACT R: TACGCTTCAGTACAGCATGC	<i>ipah</i>	Lin <i>et al.</i> (2010)
<i>Estafilococo</i>	F: ACGGTCTTGCTGTCACCTTATA R: TACACATATGTTCTTCCCTAATAA	16S	Matsuda <i>et al.</i> (2007)
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACCTAAAGC	<i>Nuc</i>	Fang y Hedin (2003)
<i>Streptococo</i>	F: GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC R: ACGTTCGATTTTCATCACGTTG	<i>tuf</i>	Picard <i>et al.</i> (2004)
<i>Weissella</i>	F: CGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAG R: GACCATCTCTTAGTGATAGCAGAA CCAT	16S	Arboleya <i>et</i> <i>al.</i> (2012)

Fuente: Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, Solís G, Hernández-Barranco A, et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012;79(3):763–72.

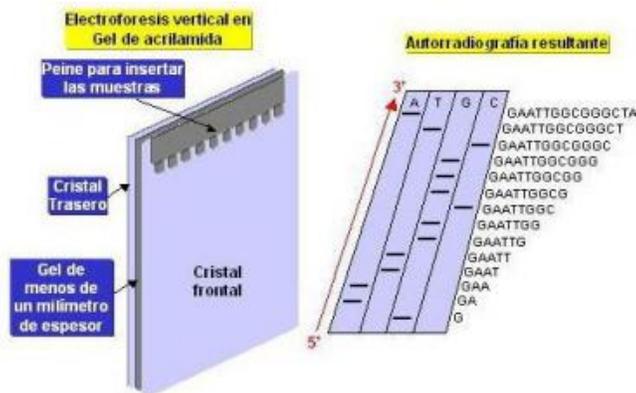
1.7.2. Electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización y electroforesis en gel con gradiente de temperatura.

La electroforesis desnaturalizante en gel de gradiente (DGGE) y la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) son formas de electroforesis en gel que utilizan un gradiente químico o un gradiente de temperatura para separar las muestras a medida que se desplazan a través de un gel de acrilamida. Tanto la DGGE como TGGE, pueden separar fragmentos de ADN de la misma longitud, pero con secuencias diferentes. La separación se basa en la movilidad electroforética reducida de las moléculas de ADN de doble cadena parcialmente fundidas en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente lineal de

desnaturalizante de ADN (una mezcla de formamida y urea) en el caso de DGGE o un gradiente de temperatura lineal en el caso de TGGE (150).

Los dominios de fusión, es decir, los tramos de pares de bases con temperaturas de fusión idénticas (T_m), conducen a la fusión de fragmentos de ADN dentro de dominios discretos. Una vez que un dominio con la T_m más baja alcanza su T_m en una posición particular en el gel de desnaturalización o gradiente de temperatura, y ese segmento de la doble hélice de ADN pasa al ADN monocatenario fundido, la migración de la molécula de ADN prácticamente se detendrá. Las variaciones de secuencia dentro de estos dominios de fusión provocan que las temperaturas de fusión varíen, y las moléculas con diferentes secuencias dejarán de migrar en diferentes posiciones en el gel de desnaturalización o gradiente de temperatura, por lo que se separarán. Las bandas de ADN en los perfiles DGGE y TGGE se pueden visualizar utilizando bromuro de etidio, SYBR Green I o tinción con plata (150,151).

Figura 11. Secuenciación automática en geles desnaturalizantes (148)



Fuente: Hernández N. Diversidad genética de la mitocondria intestinal de *Thorectes lusitanicus*. Universidad Complutense de Madrid; 2014.

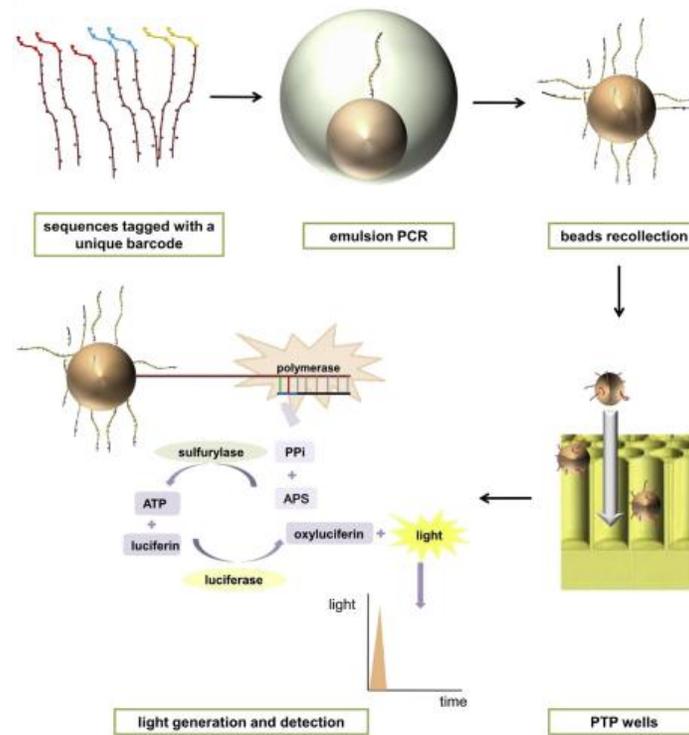
1.7.3. Pirosecuenciación.

Es un método de secuenciación de ADN que se basa en la detección de la liberación de pirofosfato al mismo tiempo que la incorporación de nucleótidos. El ADN se amplifica dentro de gotas de agua en una solución de aceite (PCR en emulsión), y cada gota contiene una única plantilla de ADN unida a un solo cordón recubierto con un cebador. La máquina de secuenciación contiene muchos pocillos de volúmenes picolitros, cada uno con enzimas de secuenciación y un único cordón. La secuencia del ADN monocatenario puede determinarse por la luz emitida tras la incorporación del nucleótido complementario; porque

solo uno de cuatro de los posibles nucleótidos A / T / C / G puede complementar el molde de ADN. La técnica usa luciferasa para generar luz para la detección de los nucleótidos individuales, y los datos combinados se usan para generar la secuencia de plantilla (150).

El método tiene una limitación en la longitud de las lecturas de ADN individuales que es de 300-500 nucleótidos aproximadamente, más corta que la de 800-1000 que se puede obtener usando la secuenciación de Sanger. Esto puede dificultar el proceso de ensamblaje del genoma, particularmente para secuencias que contienen una gran cantidad de ADN repetitivo (150).

Figura 12. Representación de la Pirosecuenciación (150)



Durante la reacción el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I sustrae moléculas de pirofosfato inorgánico (PPi), para la adición de un nucleótido a una cadena sencilla de ADN. La segunda reacción, que catalizada por la ATP sulfurylase, produce ATP usando el PPi liberado en la reacción anterior. El ATP se convierte en una señal luminométrica por acción de la luciferasa, que se detecta sólo cuando el par de bases está formado con el ADN molde y es proporcional al número de bases incorporado. Finalmente, las bases que se han unido y el ATP no usado se degradan por la acción de la enzima apirasa (152).

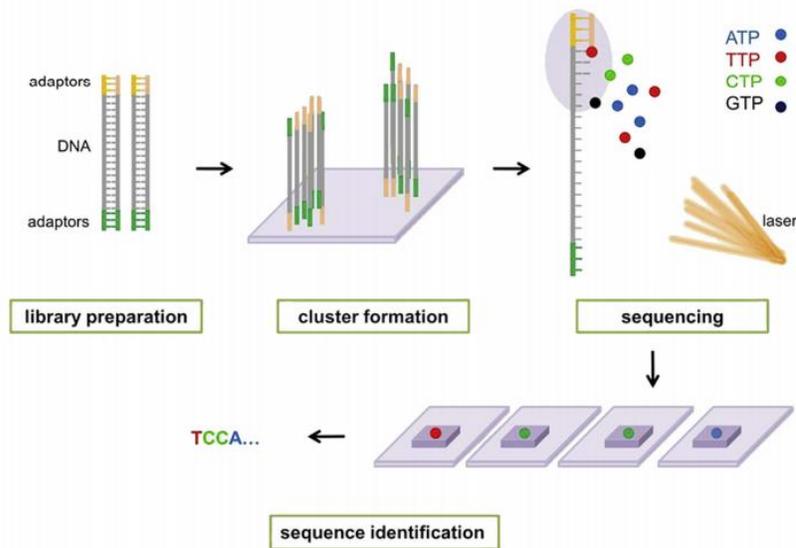
Fuente: Griffin H, Griffin A, editors. DNA Sequencing protocols. Totowa, New Jersey: Human Press; 1993. 386 p.

1.7.4. Secuencia de Illumina.

La secuenciación de Illumina se basa en la incorporación de terminadores de colorantes reversibles que permiten la identificación de bases únicas a medida que se incorporan a las cadenas de ADN. Las moléculas de ADN se unen primero a los cebadores en un portaobjetos y se amplifican para que se formen grupos locales. Se añaden los cuatro tipos (A / T / C / G) de nucleótidos de terminación reversibles, y cada nucleótido se marca fluorescentemente con un color diferente y se une a un grupo de bloqueo. Los cuatro nucleótidos compiten entonces por sitios de unión en el ADN molde a secuenciar, y las moléculas no incorporadas se eliminan por lavado. Después de cada síntesis, se aplica un láser para eliminar el grupo de bloqueo y la sonda. A continuación, se vuelve visible un color fluorescente detectable específico de una de las cuatro bases, lo que permite la identificación de la secuencia e inicia el comienzo del siguiente ciclo. El proceso se repite hasta que toda la molécula de ADN se secuencia (150).

Esta técnica ofrece algunas ventajas sobre los métodos de secuenciación tradicionales como la secuenciación de Sanger. La naturaleza automatizada de la secuenciación de Illumina hace posible secuenciar múltiples hilos a la vez y obtener datos de secuencia reales rápidamente. Además, este método solo utiliza la ADN polimerasa en contraste con las enzimas múltiples y costosas requeridas por la pirosecuenciación (150).

Figura 13. Representación de la secuenciación de Illumina



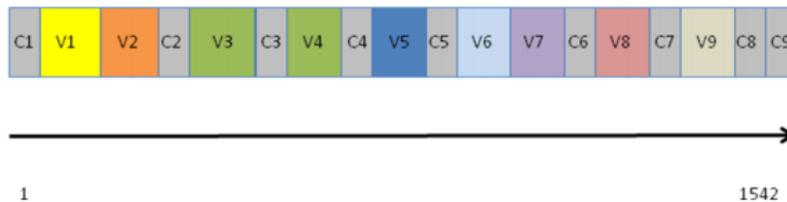
Fuente: Zhou X, Li Y, editors. Techniques for Oral Microbiology. In: Atlas of Oral Microbiology. Elsevier Inc.; 2015. p. 15–40.

1.7.5. **Secuenciación del gen 16S rRNA.**

Existen tres tipos de rARNs procarióticos que se definen por su grado Sverberg o S, refiriéndose al ratio de sedimentación y son 5S, 16S y 23S cuyas secuencias poseen 120, 1550 y 3300 nucleótidos, aproximadamente. Al analizarlos se concluyó que la secuencia del 5S es muy corta y la del 23S demasiado larga, lo cual limitaba la posibilidad de poder caracterizar taxonómicamente las bacterias (148).

Por ello, el gen 16S rARN es el que se analiza en este método, porque brinda información de la clasificación taxonómica sin requerir aislamiento ni cultivo. Forma parte de la subunidad inferior del ribosoma procariótico y consiste en 9 regiones altamente conservadas (C1-C9) y 9 regiones variables a lo largo del dominio (V1-V9) (148).

Figura 14. Estructura del gen 16S rARN



Se observa que la longitud del gen es de 1542 pares de bases divididas en segmentos variables y conservados.

Fuente: Hernández N. Diversidad genética de la mitocondria intestinal de *Thorectes lusitanicus*. Universidad Complutense de Madrid; 2014.

La estructura formada por genes conservados y variables con diferentes ratios de evolución no permite la transferencia lateral de genes. Para obtener la relación evolutiva de las bacterias primero se debe determinar la secuencia de nucleótidos y establecer las comparaciones, siendo el grado de similitud entre las secuencias de los 16S rARN de dos bacterias lo que indica su relación evolutiva.

Para la identificación de bacterias se necesita de bases de datos como Ribosomal Database Project (RDP), Greengenes y BLAST que están en continua expansión (148).

1.7.6. **Hibridación fluorescente in situ (FISH).**

FISH detecta secuencias de ácido nucleico mediante membranas celulares marcadas fluorescentemente e hibridan específicamente con ARNr intracelular dentro de la célula intacta sin alterar la morfología o la integridad de la célula (151).

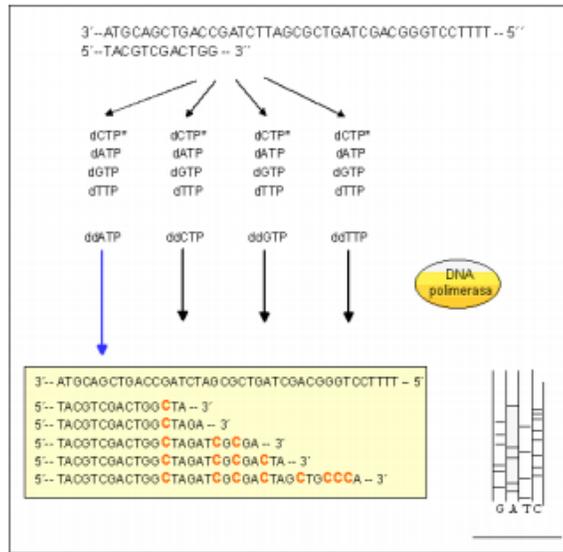
1.7.7. Secuenciación Sanger.

El método de Sanger implica la síntesis de una cadena de ADN a partir de una plantilla monocatenaria mediante una ADN polimerasa. El método depende de que los dideoxynucleótidos (ddNTP) se incorporan a la cadena en crecimiento de la misma manera que los desoxinucleótidos convencionales (dNTP). Sin embargo, los ddNTP difieren de los dNTP porque carecen del grupo 3'-OH necesario para el alargamiento de la cadena. Cuando se incorpora un ddNTP en la nueva cadena, la ausencia del grupo hidroxilo evita la formación de un enlace fosfodiéster con el dNTP subsiguiente y el alargamiento de la cadena termina en esa posición. Al usar la relación correcta de los cuatro dNTP convencionales y uno de los cuatro ddNTP en una reacción con la ADN polimerasa, se produce una población de cadenas de polinucleótidos de diferentes longitudes (152).

La síntesis se inicia en la posición en la que un cebador de oligonucleótidos se hibrida con la plantilla, y cada cadena se termina en una base específica (ya sea A, C, G o T, dependiendo de qué ddNTP se usó). Al usar los cuatro ddNTP diferentes en cuatro reacciones separadas, se puede obtener la información completa de la secuencia. Uno de los dNTP suele estar marcado radiactivamente de modo que la información obtenida mediante la electroforesis de las cuatro reacciones en las pistas adyacentes de un gel de poliacrilamida pueda visualizarse en una autorradiografía (152).

El método original utilizó el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I para sintetizar las nuevas cadenas en las reacciones de secuenciación, y esta enzima todavía se usa en la actualidad. Otras enzimas como Sequenase, T7 polimerasa y Taq (*Thermus aquaticus*) polimerasa también se usan ampliamente. Cada enzima tiene sus propias propiedades y cualidades particulares, y la elección de la polimerasa dependerá del tipo de plantilla y de la estrategia de secuenciación empleada (152).

Figura 15. Representación esquemática de la secuenciación de Sanger.



Se observa la incorporación de los nucleótidos y la acción de la ADN polimerasa en el proceso (148).

Fuente: Hernández N. Diversidad genética de la mitocondria intestinal de Thorectes lusitanicus. Universidad Complutense de Madrid; 2014.

1.7.8. Microarrays.

El microarray o chip es una tecnología que en un solo portaobjetos de cristal o superficie de silicona puede detectar simultáneamente cientos de genes. Esta técnica es usada en análisis de expresión de genes y su identificación, recientemente se usa para la exploración de la diversidad de una comunidad específica y su ambiente. En este caso, se usan secuencias específicas para microorganismos de diferentes taxones (148).

1.7.9. Método de cultivo.

El cultivo de bacterias normalmente requiere de un medio con abundantes nutrientes metabólicos, que por lo general comprende el agar, una fuente de carbono, y un hidrolizado ácido o una fuente de material biológico sometida a degradación enzimática (p. ej., caseína) (153).

Para distinguir entre diversas bacterias de una muestra clínica que contiene numerosos microorganismos, incluidos patógenos potenciales y flora microbiana residente se pueden utilizar medios no selectivos y selectivos. Los medios no selectivos son importantes para aislar bacterias desconocidas en una muestra; por ejemplo: el agar sangre y agar chocolate.

Mientras que los medios selectivos eliminan (o reducen) el número de bacterias irrelevantes en las muestras, estos medios incorporan una sustancia que inhibe de manera selectiva el crecimiento de las bacterias irrelevantes; por ejemplos el agar MacConkey (contiene bilis), que selecciona Enterobacteriaceae y el agar sangre CNA (contiene colistina y ácido nalidíxico) que selecciona estafilococos y estreptococos (153).

Al cultivarse, algunas bacterias producen pigmentos característicos y otras se distinguen con base en su complemento de enzimas extracelulares, pero la identificación bioquímica es importante para clasificar a los microorganismos patógenos; por ejemplo, la prueba de la oxidasa, que utiliza un aceptor artificial de electrones, para diferenciar a los microorganismos con base en la presencia o ausencia del citocromo C que es una enzima respiratoria, cuya ausencia diferencia a las Enterobacteriaceae de otros bacilos gramnegativos (153).

2. Antecedentes

Un estudio realizado por Parra *et al.*, en España en el 2018, con el objetivo de determinar el impacto de la LHP en la microbiota intestinal de neonatos pretérmino que se encontraban en UCIN. El estudio fue de cohorte, observacional y prospectivo. Y participaron 69 neonatos con < 32 semanas de gestación y con un peso al nacer $\leq 1,500$ g., que fueron clasificados en tres grupos según la alimentación que recibió LME, LHP o fórmula infantil. De los cuales se tomaron muestras fecales cuando se logró la alimentación enteral completa (definida como ≥ 150 cc / kg / día). Se analizó mediante secuenciación del gen 16S rRNA para determinar la composición de la microbiota intestinal. Donde tuvieron como resultado que los bebés prematuros alimentados con LME tenían una presencia significativamente mayor de Bifidobacteriaceae y menor de Staphylococcaceae, Clostridiaceae y Pasteurellaceae que los que recibieron LHP. Mientras que el perfil microbiano de los bebés que tomaron fórmula fue diferente a los observados en LME. Siendo así que los bebés prematuros alimentados con LHP mostraron perfiles microbianos más cercanos a los de LME. Además, análisis metagenómicos inferidos mostraron una mayor presencia del género *Bifidobacterium* en el grupo de LME que se relacionó con el enriquecimiento en la ruta de biosíntesis y metabolismo de Glycan que no se identificó en el grupo de LHP ni el de fórmula. Y concluyeron, que la LHP favorece un microbioma intestinal más similar al de LME que la fórmula a pesar de las diferencias entre LME y LHP. Lo cual puede tener posibles efectos beneficiosos a largo plazo sobre la funcionalidad intestinal, el sistema inmunitario y las actividades metabólicas (154).

Otro estudio realizado por Itani *et al.*, y publicado en el 2017, tuvieron como objetivo determinar la composición y dinámica de la microbiota intestinal durante el primer mes de vida para RNPT (n= 66) y RNT (n= 17) en el Líbano. Para lo cual recogieron muestras fecales semanalmente y se analizaron mediante PCR cuantitativa (q-PCR) y electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TTGE). Y observaron diferencias en el establecimiento y la composición de la microbiota intestinal entre los dos grupos. La q-PCR mostró que la microbiota de los RNPT estaba más altamente colonizada por *Staphylococcus* que la de los RNT en las primeras tres semanas de vida; mientras que los RNT estaban más altamente colonizados por los *Clostridium* clusters I y XI. En un mes de vida, las RNPT fueron colonizadas principalmente por anaerobios facultativos y algunos anaerobios estrictos, como *Clostridium* cluster I y *Bifidobacterium*. El tipo de alimentación y los tratamientos con antibióticos afectaron significativamente la colonización intestinal. TTGE reveló baja diversidad de especies en ambos grupos y alta variabilidad interindividual

en RNPT. Sus hallazgos muestran que los RNPT tienen alterada la colonización intestinal con una mayor incidencia de patógenos potenciales (*Enterobacter*, *Clostridium* sp) que los RNT (155).

Cong *et al.* realizaron, en 2017, un estudio exploratorio prospectivo en una UCIN de nivel IV del Connecticut Children's Medical Center, en dos sitios ubicados en Hartford y Farmington, donde participaron treinta y tres bebés prematuros estables nacidos entre las 28 a 32 SG y seguidos durante los primeros 30 días de vida con el propósito de explorar el efecto de los tipos de alimentación sobre la colonización microbiana intestinal de los recién nacidos prematuros en la unidad de cuidados intensivos neonatales. Para ello, usaron la información de alimentación diaria para clasificar a los bebés en seis grupos (LME, LHP, FPP, LME + LHP, LME + FPP y LHP + FPP) durante los días postnatales 0-10, 11-20 y 21-30. Se recogieron muestras de heces diariamente. El ADN extraído de las heces se usó para secuenciar el gen 16S rRNA. Donde se obtuvo como resultados que los bebés prematuros alimentados con LME (al menos 70% de la dieta total) tuvieron mayor abundancia de Clostridiales, Lactobacillales y Bacillales en comparación con los bebés en otros grupos de alimentación, mientras que los bebés alimentados principalmente con LHP o FPP tenían una gran abundancia de Enterobacteriales en comparación con los bebés alimentados con LME. Después de controlar el sexo, la edad postnatal, el peso y la edad gestacional al nacer, la diversidad del microbioma intestinal aumentó con el tiempo y fue constantemente mayor en los lactantes alimentados con LME en comparación con los lactantes con otros tipos de alimentación ($p < .01$) (156).

Asimismo, Cong *et al.*, en el 2016, realizaron un estudio prospectivo longitudinal con el objetivo de explorar los patrones del microbioma intestinal en recién nacidos prematuros durante los primeros 30 días de vida en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) e investigar posibles factores relacionados con el desarrollo del microbioma intestinal del lactante. Se recolectó un total de 378 muestras de 29 lactantes prematuros estables sanos. El ADN extraído de las heces se usó para secuenciar la región V4 del gen 16S rRNA. Donde se obtuvo como resultado que *Proteobacteria* fue el phylum más abundante, representando el 54.3% de las lecturas totales. El resultado mostró un cambio en los patrones de aumento de *Clostridium* y *Bacteroides*, y la disminución de *Staphylococcus* y *Haemophilus* a lo largo del tiempo durante los primeros años de vida. La alfa-diversidad aumentó significativamente a diario en los recién nacidos prematuros después del nacimiento y los modelos lineales de efectos mixtos mostraron que los días posnatales, el tipo de alimentación y el sexo se asociaron con la diversidad α , p

<0,05-0,01. Se encontró que los bebés varones comienzan con una baja diversidad α , mientras que las mujeres tienden a tener una mayor diversidad poco después del nacimiento. Los bebés de sexo femenino tenían más probabilidades de tener una mayor abundancia de *Clostridiales*, y una menor abundancia de *Enterobacteriales* que los hombres durante la vida temprana. Los bebés alimentados con leche materna propia (LME) tenían una mayor diversidad del microbioma intestinal y una abundancia significativamente mayor en *Clostridiales* y *Lactobacillales* que los lactantes no alimentados con LME. En conclusión, la edad posnatal, el sexo y el tipo de alimentación infantil contribuyen significativamente al desarrollo dinámico del microbioma intestinal en los recién nacidos prematuros (157).

Por otro lado, Gregory *et al.*, publicaron en el 2016 un estudio que tuvo el propósito de establecer la influencia de las exposiciones nutricionales en el microbioma intestinal en una cohorte de recién nacidos prematuros a temprana edad. Donde se analizaron 199 muestras de 30 RNPT (<32 semanas) durante los primeros 60 días después del nacimiento, mostró que el microbioma intestinal estaba influenciado por el tiempo postnatal ($p < 0.001$, $R^2 = 0.13$), peso al nacer ($p < 0.001$, $R^2 = 0.08$) y nutrición ($p < 0.001$, $R^2 = 0.21$). Los bebés que fueron alimentados con leche materna tuvieron una mayor diversidad bacteriana inicial y una adquisición de diversidad más gradual en comparación con los lactantes que recibieron fórmula infantil. El microbioma de los bebés alimentados con leche materna fue más similar independientemente del peso al nacer ($p = 0.049$), en contraste con el microbioma de los bebés alimentados con fórmula infantil, que se agruparon de forma diferente según el peso al nacer ($p < 0.001$). Al ajustar las diferencias en la madurez intestinal, se observó una sucesión ordenada de filotipos microbianos en los lactantes alimentados con leche materna, que parecían estar alterados en los alimentados con fórmula infantil. La suplementación con leche humana donante pasteurizada fue parcialmente exitosa en la promoción de un microbioma más similar a los lactantes alimentados con leche materna y en moderados incrementos rápidos en la diversidad bacteriana (158).

Por otra parte, un estudio realizado por Ardisson, *et al.*, en EEUU en el 2014, donde se analizó el microbioma en el meconio con el fin de sugerir mecanismos subyacentes que pueden contribuir al nacimiento prematuro. Tomaron muestras de meconio de 52 lactantes de 23 a 41 semanas de edad gestacional, de las cuales se extrajo el ADN y se analizó 16S rRNA. Y los taxones de microbios resultantes se correlacionaron con las variables clínicas y también se compararon con estudios previos de líquido amniótico y otros nichos de

microbiomas humanos. Dando como resultado que aproximadamente el 61.1% de las lecturas secuenciadas correspondieron a géneros que se han informado en el líquido amniótico. La edad gestacional tuvo la mayor influencia sobre la estructura de la comunidad microbiana ($R= 0.161$; $p= 0.029$); asimismo, el modo de parto (cesárea versus parto vaginal) tuvo un efecto ($R= 0.100$; $p= 0.044$). Mientras que *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Photorhabdus* y *Tannerella*, se correlacionaron negativamente con la edad gestacional y se ha informado que incitan a las respuestas inflamatorias, lo que sugiere un papel causante en el nacimiento prematuro. Y concluyeron que esto proporciona la primera evidencia que apoya la hipótesis de que el microbioma intestinal fetal derivado del líquido amniótico tragado puede estar implicado en la respuesta inflamatoria que conduce al nacimiento prematuro (159).

Otro estudio realizado por Drell *et al.*, en Estonia y publicado en el 2014, investigaron el desarrollo de la microbiota intestinal en recién nacidos críticamente enfermos de muy bajo peso al nacer, donde realizaron el análisis de las comunidades bacterianas mediante la secuenciación específica del gen 16S rRNA y pirosecuenciación, en muestras de heces de 50 neonatos con peso menor a 1200 g, se encontraban en UCIN. Las muestras fueron analizadas a la edad de una semana, un mes y dos meses. Los resultados indicaron que la diversidad de la microbiota intestinal en los RNPT en la primera semana de vida fue baja, pero aumentó significativamente durante los dos meses. En la microbiota intestinal, prevalecieron las bacterias anaerobias facultativas (*Staphylococcus spp.* y *Enterobacteriaceae*) y carecían de colonización con bacterias conocidas por proporcionar resistencia contra los patógenos (*Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) a lo largo del estudio. Mientras que la colonización de *Escherichia coli* y *Veillonella* no cultivada se correlacionó positivamente con la madurez. Y los bebés nacidos de madres con corioamnionitis tenían una diversidad bacteriana significativamente mayor que aquellos que no la tenían. Asimismo, concluyeron que una alta prevalencia y abundancia de bacterias potencialmente patógenas con baja prevalencia y abundancia de bacterias que proporcionan resistencia a la colonización, puede conducir a un alto riesgo de infección a través de la translocación microbiana del intestino (160).

Además, Moles *et al.*, en el 2013, publicaron en España un estudio con el objetivo de caracterizar la microbiota de muestras de meconio y fecales obtenidas durante las primeras 3 semanas de vida de 14 donantes, utilizando técnicas de cultivo y moleculares, incluyendo el análisis DGGE y el chip humano intestinal (HITChip) de 16S amplicones de rRNA. Donde

se detectaron diferencias interindividuales en los perfiles de microbiota, pero la microbiota de meconio fue peculiar y distinta a la de las muestras fecales. Los principales grupos de bacterias detectados en el meconio fueron Bacilos y otros Firmicutes, mientras que los Proteobacterias se identificaron en las muestras fecales. La técnica de cultivo mostró que *Staphylococcus* predominó en meconio y que *Enterococcus*, junto con bacterias Gramnegativas como *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* fueron más abundante en muestras fecales. Además, los resultados de HITChip mostraron la prevalencia de bacterias relacionadas con las muestras de meconio *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus mitisin*, mientras que las relacionadas con *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Yersinia* se clasificaron en las heces de la tercera semana. Concluyendo que el meconio liberado espontáneamente de neonatos prematuros contiene una microbiota específica que difiere de la de las heces obtenidas después de la primera semana de vida. Y que la presencia de *Serratia* está fuertemente asociada con un mayor grado de inmadurez y otros parámetros relacionados con el hospital, incluyendo la antibiototerapia y ventilación mecánica (161).

Asimismo, Madan *et al.*, realizaron en Estados Unidos en el 2012 un estudio de tipo prospectivo longitudinal, donde investigó la colonización microbiana intestinal en neonatos prematuros como predictor de la sepsis neonatal. Para ello se recogieron muestras de heces semanalmente y se extrajo el ADN y se amplificó la región hipervariable V6 del rRNA 16S, seguido por pirosecuenciación de alto rendimiento, comparando sujetos con sepsis y sin la misma. Seis recién nacidos fueron de 24-27 semanas de gestación al nacer y se analizaron 18 muestras. Dos sujetos no tuvieron sepsis durante el período de estudio, dos desarrollaron septicemia positiva tardía y dos presentaron inflamación sistémica negativa. Los resultados indicaron que el meconio no era estéril y tenía predominio de *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Enterobacterias*. Y que los niños que desarrollaron sepsis comenzaron la vida con baja diversidad microbiana, y adquirieron un predominio de *Staphylococcus*, mientras que los bebés sanos tuvieron más diversidad y predominio de *Clostridium*, *Klebsiella* y *Veillonella*. Los autores concluyeron que los antibióticos empíricos y prolongados reducen la diversidad microbiana y promueven una microbiota que está asociada con la sepsis neonatal (23).

De igual manera Jacquot, *et al.*, en Francia en el 2011 llevaron a cabo un estudio prospectivo cuyo objetivo fue determinar las características clínicas basales que influyen en la dinámica de la flora intestinal bacteriana en lactantes prematuros y la relación entre la dinámica de la flora intestinal y la evolución clínica. En el cual participaron 29 RNPT a los

cuales se les recogieron datos sobre crecimiento, tolerancia digestiva, nutrición y uso de antibióticos. Las muestras de heces fueron recogidas entre los 3 y 56 días de vida y se identificó el microbioma con huellas moleculares directas. Obteniendo como resultados que la media del peso corporal (rango intercuartílico) y la edad gestacional al nacer fueron 950 g (760-1060 g) y 27 semanas (27-29 semanas), respectivamente. La puntuación de la diversidad (número de unidades taxonómicas operacionales) aumentó 0.45 unidades/semana ($P < 0.0001$) con los estafilococos como el grupo principal mientras que la bifidobacteria estuvo pobremente representada. La edad gestacional (≥ 28 semanas) y el parto por cesárea se correlacionaron de forma independiente con mejores puntuaciones de diversidad durante el seguimiento ($p < 0,05$). La puntuación de diversidad de 6 semanas se correlacionó inversamente con la duración de la antibioterapia ($p = 0,0184$) y la alimentación parenteral ($p = 0,013$). La dinámica de la microflora se asoció con el perfil de tolerancia digestiva y el incremento de peso se dio con el aumento de la puntuación de diversidad ($P = 0.0428$) (162).

También, Rouge *et al.*, en el 2010, estudiaron diferentes métodos para investigar la dinámica de la microbiota intestinal en RNPT. Para el cual participaron diez bebés prematuros con una edad gestacional media de 29 semanas y un peso promedio al nacer de 1233 g. Durante su estadía en una UCIN se recolectaron muestras fecales semanalmente y se evaluó la colonización bacteriana usando técnicas de cultivo convencionales y métodos de biología molecular (cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (dHPLC), electroforesis en gel con gradiente de temperatura temporal (TTGE) y la secuenciación de bibliotecas de genes de ARNr). Los resultados indicaron que el tracto gastrointestinal de los bebés nacidos con menos de 33 semanas, tiene una baja biodiversidad de bacterias principalmente las cultivables. Finalmente, el dHPLC proporcionó mejoras importantes sobre los métodos de toma de huellas dactilares basados en gel como el TTGE (163).

Por otro lado, Martinez *et.al.*, publicaron en el 2008 una investigación que tuvo como objetivo determinar el efecto de los fructooligosacáridos (FOS) sobre la población de bacterias fecales especialmente sobre las bacterias consideradas benéficas, utilizando como inóculo las heces de un neonato amamantado. Y realizaron fermentaciones anaerobias y microaerobias en lote, utilizando glucosa y fructooligosacáridos (FOS) como sustrato, con el fin de conocer su efecto sobre la microbiota intestinal. Se cuantificaron los siguientes grupos bacterianos en medios selectivos: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Enterobacterium*. Los resultados mostraron

que en condiciones anaerobias la población de *Bifidobacterium* se incrementó con la adición de los FOS. Mientras que con glucosa se promovió la proliferación de *Lactobacillus* tanto en anaerobiosis y microaerobiosis (164).

Finalmente, Boehm *et al.*, publicaron, en el 2004, un estudio en donde analizaron el efecto prebiótico de la mezcla de oligosacáridos en formulas infantiles, la cual se probó en neonatos prematuros y a término al medir la flora fecal utilizando platinado y técnicas de hibridación fluorescente in situ. El efecto de los oligosacáridos sobre el metabolismo bacteriano se estudió midiendo la producción de ácidos grasos de cadena corta in vitro y el patrón de ácidos grasos de cadena corta en las heces de un grupo de recién nacidos a término. Los resultados indicaron que la mezcla de oligosacáridos aumenta significativamente el número de bifidobacterias y reduce el número de patógenos en bebés a término. Mientras, que en neonatos prematuros cuando se compara con un grupo de lactantes alimentados con una fórmula no suplementada. Usando una concentración de 0.8 g de oligosacáridos / 100 ml de fórmula, la cantidad de bifidobacterias es similar a la típica de los bebés amamantados. In vitro, los ácidos grasos de cadena corta producidos por la mezcla de oligosacáridos fueron similares a los producidos por la fracción de oligosacáridos de leche humana. En ensayos clínicos, el patrón de ácidos grasos de cadena corta fecales en lactantes alimentados con la mezcla de oligosacáridos fue similar al de los lactantes amamantados, pero fue significativamente diferente del de un grupo de lactantes alimentados con una fórmula no suplementada. Además, el pH fecal fue significativamente mayor en el grupo alimentado con una fórmula no suplementada que en los grupos alimentados con leche materna o con una fórmula suplementada. Por tanto, concluyeron que la mezcla prebiótica estudiada puede estimular el desarrollo de una flora microbiana similar a la de los lactantes alimentados con leche materna. Sobre esta evidencia, se puede sugerir que los prebióticos pueden desempeñar un papel como modulador del desarrollo postnatal del sistema inmune (51).

3. Definición de términos

Phila: término taxonómico utilizado para clasificar organismos en grupos con otras propiedades similares (165).

Enterotipo: término utilizado para dividir a los humanos en grupos basándose en las bacterias intestinales que presentan (165).

Microbiota: Comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado (94).

Microbioma: Conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos (94).

Microbioma humano: Microorganismos, genes y metabolitos del cuerpo humano: tracto gastrointestinal, genitourinario, tracto respiratorio y piel (94).

Metatranscriptómica: Estudio del ARN total transcrito (94).

Disbiosis: Alteraciones de la microbiota intestinal, en que uno o más microorganismos potencialmente perjudiciales son predominantes en la población microbiana intestinal y la respuesta adversa del hospedero a estos cambios (94).

Simbiosis: Interacción biológica que se refiere a la relación estrecha y persistente entre organismos de distintas especies. La interacción biológica puede ser: mutualista, cuando ambos miembros obtienen beneficio; comensal, cuando uno de los miembros de la simbiosis obtiene beneficio sin generar perjuicio al otro, y parasitaria, cuando uno de los miembros de la simbiosis obtiene beneficio en detrimento del otro (166).

Lactancia materna exclusiva (LME): La lactancia exclusivamente materna consiste en dar al lactante únicamente leche materna: no se le dan otros líquidos ni sólidos, ni siquiera agua, exceptuando la administración de vitaminas, minerales o medicamentos en forma de gotas o jarabes (66).

Calostro: Es una secreción de la glándula mamaria amarillenta y de turbidez y viscosidad variables que se empieza a producir aun antes del parto (167) y dura entre cinco (168) a siete días post parto (90).

Leche de transición: Es la que se produce desde el séptimo día es decir entre el calostro y la leche madura y su composición cambia hasta el día 15 post parto (75).

Leche madura: Se considera a partir de los 15 días post parto, y puede variar entre diferentes madres, entre ambas mamas, entre lactadas, durante una misma mamada y en las distintas etapas de la lactancia (75).

Meconio: Es la primera secreción intestinal del recién nacido, representa material ingerido o secretado por el tracto gastrointestinal (TGI) durante la vida fetal, incluido el líquido amniótico, las células epiteliales y el moco (169).

Capítulo III

Materiales y métodos

1. Lugar de ejecución

El desarrollo de este estudio se llevó a cabo en el Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé y la recolección de datos fue en un periodo de 8 meses (abril-diciembre) del 2017, en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) y en la unidad de Neonatología del mismo hospital.

2. Población y muestra

2.1. Población

La población estuvo conformada por 54 neonatos pretérmino nacidos en el periodo de recolección de datos.

2.2. Muestra

La muestra estuvo conformada 23 neonatos pretérmino (<37ss) que nacieron en los meses de abril a noviembre, los cuáles fueron divididos en dos grupos de acuerdo al tipo de alimentación que recibió hasta el momento del segundo análisis:

- a. Grupo de estudio A: n=11 niños pretérmino que recibieron leche humana ya sea de su propia madre o donada.
- b. Grupo de estudio B: n=12 niños pretérmino que reciben lactancia mixta.

2.3. Criterios de inclusión y exclusión

2.3.1. Criterios de inclusión

Neonatos pretérmino menores a 37 semanas.

Neonatos nacidos por parto espontáneo o cesárea.

Bebés que se realizaron los dos análisis (meconio y heces).

Neonatos cuyas madres firmaron el consentimiento informado.

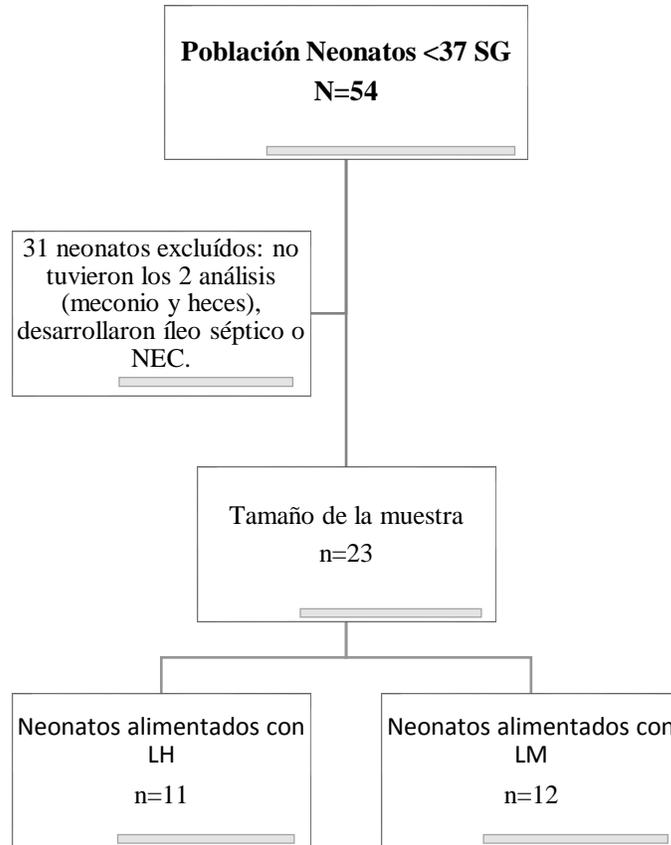
2.3.2. Criterios de exclusión

Neonatos pretérmino que desarrollaron Íleo séptico o enterocolitis necrotizante (NEC).

Neonatos pretérmino con VIH.

Neonatos pretérmino con malformaciones (gastroquisis, atresias) o enfermedades metabólicas.

Figura 16. Flujograma de la Muestra



SG= Semanas de Gestación; LH= Leche Humana; LM=Lactancia Mixta; NEC= Enterocolitis Necrotizante.

Fuente: Elaboración propia

2.4. Características de los participantes

Las características demográficas y clínicas de la muestra se describen a continuación en las tablas:

Tabla 5. *Características demográficas de los neonatos pretérmino (n=23).*

Variables	N	%	
Edad gestacional	Muy prematuros	4	17,39
	Prematuros moderados a tardíos	19	82,61
Peso al nacer	Extremadamente bajo	2	8,70
	Muy bajo	7	30,43
	Bajo	9	39,13
	Normal	5	21,74
Estatura	AEG	10	43,48
	PEG	13	56,52
Perímetro cefálico (cm)*		29.09 ± 3.53	
Sexo	Femenino	14	60,87
	Masculino	9	39,13
Tipo de parto	Espontáneo	3	13,04
	Cesárea	20	86,96
Edad de la madre (años)*		33.48 ± 11.74	
Educación de la madre	Primaria	5	21,74
	Secundaria	6	26,09
	Superior	12	52,17
Infecciones de la madre	No	5	21,74
	Si	18	78,26

*Datos presentados como media ± desviación estándar

Los 23 bebés pretérmino incluidos en este estudio el 82% tenían una edad gestacional que los clasificaba como prematuros moderados a tardíos (32 a <37 semanas) y solo el 4% fueron muy prematuros (28 a <32 semanas). El 39,13% presentó bajo peso al nacer, seguido de muy bajo y normal 30,43 y 21,74% respectivamente, siendo solo el 8,70% los nacidos con bajo peso extremo y el 56,52% fue PEG. El promedio del PC al nacimiento fue de 29.09 cm con un DE ± 3.53.

Por otro lado, el 86,96% (n=20) de los niños nacieron por cesárea, la edad promedio de las madres fue de 33,48 años con una DE ± 11.74. Y el 78,26% de las madres tuvieron algún tipo de infección durante la gestación.

Tabla 6. *Características clínicas de los neonatos pretérmino (n=23)*

Variables	N	%	
Alimentación	LH	11	47,83
	LM	12	52,17
Inicio de nutrición enteral	<24 horas	9	39,13
	>24 horas	14	60,87
Vía de nutrición enteral	ORAL	10	43,48
	SOG	13	56,52
Tiempo de nutrición parenteral (días)*	13.09 ± 14.39		
Transfusión	No	15	65,22
	Sí	8	34,78
Ventilación mecánica	No	4	17,39
	Sí	19	82,61
Presencia de infecciones	No	10	43,48
	Sí	13	56,52
Recibió antibióticos	No	10	43,48
	Sí	13	56,52
Peso final (kg)*	2151.26 ± 767.84		
Estancia hospitalaria (días)*	27.70 ± 25.22		

*Datos presentados como media ± desviación estándar

El 60,87% de los bebés fueron alimentados después de las 24 horas de nacido, el 53% de los bebés usaron SOG (Sonda orogástrica), y fueron distribuidos en 2 grupos de acuerdo al tipo de alimentación que recibieron hasta el momento de la segunda muestra, los alimentados con leche humana ya sea de su propia madre o donada (LH) fueron el 47,83% (n=11) y con fórmula de pretérmino más leche humana (LM) el 52,17% (n=12).

El 82,61% de los bebés necesitaron ventilación mecánica, y el 56,52% de los neonatos recibió antibióticos por presencia o riesgo de enfermedad infecciosa. El 34,78% de los bebés recibió algún tipo de transfusión. El promedio de días que recibieron nutrición parenteral fue de 13.09 con un DE ± 14.39.

Tabla 7. Descripción de la población según variables clínicas

Variables	Alimentación	Promedio ± DE
Nutrición parenteral	LH	18.45 ± 19.08
	LM	8.17 ± 5.29
Terapia Antibiótica	LH	11.09 ± 15.21
	LM	3.92 ± 4.25
Transfusiones	LH	1.73 ± 1.90
	LM	0.42 ± 1.44
Soporte ventilatorio	LH	20.90 ± 20.12
	LM	2.17 ± 2.55
Edad gestacional	LH	32.36 ± 2.98
	LM	34.25 ± 1.48

Los neonatos que pertenecieron al grupo de LH tuvieron una edad gestacional en promedio menor 32,36 (\pm 2.98) que los que tomaron LM 34.25 (\pm 1.48), y el grupo de LH tuvo en promedio más días de NP (18,45), antibióticos (11,09), transfusiones (1,73), soporte ventilatorio (20,90) que los neonatos en el grupo de LM (8,17; 3,92; 0,42; 2,17 días respectivamente).

3. Tipo de estudio y diseño

Este estudio de diseño no experimental, de tipo descriptivo - correlacional porque midió el grado de asociación entre las diferentes variables, mediante herramientas estadísticas de correlación (170), y de periodo y secuencia prospectivo longitudinal ya que se recogieron los datos de la muestra en dos diferentes momentos a lo largo del tiempo.

4. Formulación de la hipótesis

4.1. Hipótesis del investigador

H₁: Existe diferencia significativa en el efecto de la leche Humana y lactancia Mixta sobre el desarrollo la microbiota intestinal en neonatos pretérmino. Lima, 2017.

H₀: No existe diferencia significativa en el efecto de la leche humana y lactancia mixta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal en neonatos pretérmino. Lima, 2017.

4.2. Hipótesis específicas

H₁: Existe relación significativa entre el tipo de alimentación y las bacterias en muestras de heces de los neonatos pretérmino de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

H₀: No existe relación significativa entre el tipo de alimentación y las bacterias en muestras de heces de los neonatos pretérmino de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

H₂: Existen cambios significativos en la microbiota del meconio y heces de los bebés alimentados con Leche Humana y Lactancia Mixta de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

H₀: No existen cambios significativos en la microbiota del meconio y heces de los bebés alimentados con Leche Humana y Lactancia Mixta de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017.

5. Identificación de variables

5.1. Tipo de alimentación

- Leche humana
- Lactancia mixta

5.2. Microbiota

Bacterias consideradas benéficas

-*Lactococcus spp.*

-*Bifidobacterium spp.*

-*Lactobacillus spp.*

Bacterias potencialmente patógenas

-*Staphylococcus spp.*

-*Escherichia Coli*

-*Clostridium spp.*

6. Matriz de consistencia y operacionalización de variables

Matriz de la operacionalización de las variables LH, LM y microbiota intestinal				
Variable	Definición conceptual	Indicadores	Tipo de Variable	Instrumento
Leche Humana (LH)	Es un fluido vivo que se adapta a los requerimientos nutricionales e inmunológicos del niño a medida que este crece y se desarrolla (75).	Prescripción médica del tipo de alimentación	Cualitativo	Historia Clínica
Lactancia Mixta (LM)	Es la alimentación con leche humana y leche artificial.	Prescripción médica del tipo de alimentación	Cualitativo	Historia Clínica
Microbiota intestinal	La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos vivos que habitan en el tubo digestivo. (94)	<p>Cultivo de meconio y heces</p> <p>Unidades formadoras de colonia (ufc) de las especies:</p> <p><i>Lactococcus spp,</i> <i>Bifidobacterium spp,</i> <i>Lactobacillus spp,</i> <i>Staphylococcus spp,</i> <i>Escherichia Coli,</i> <i>Clostridium spp.</i></p> <p>Ausencia: no concentración Presencia: Menor: < 10⁶ UFC Mayor: > ó = 10⁶ UFC</p>	<p>Cuantitativo (Abundancia)</p> <p>Cualitativo (Prevalencia)</p>	<p>- UFC/ml = N° UFC x 10^{-x} x 10</p> <p>-Cámaras de cultivo para anaerobiosis y Agua peptonada, agar Baird Parker, agar MacConkey, agar MRS, agar leche o agar Rogosa.</p> <p>-Microscopio.</p> <p>-Cámara de cultivo anaerobio.</p>

7. Instrumentos de recolección de datos

Para el registro de datos se crearon fichas que organizaron la información, entre las cuales estuvo la historia clínica (Anexo 2), y tuvo el objetivo de registrar las características sociodemográficas, datos pre y peri natales; como el peso al nacer, longitud, edad gestacional, tipo de alimentación, uso de nutrición parenteral, uso de antibióticos, etc. También, se utilizó otra ficha para anotar la fecha de recolección del primer meconio (Anexo 3), donde se registró la fecha y hora de recolección. Por último, otra ficha de recolección de heces (Anexo 4), la cual se utilizó para codificar y registrar la fecha y hora de la recolección de la muestra de heces separando a los neonatos en el grupo que pertenecieron de acuerdo al tipo de alimentación recibida.

8. Técnica de recolección de datos

8.1. Consentimiento informado

Este proyecto fue previamente aprobado por el comité de ética de la Universidad Peruana Unión, y del Hospital Nacional Docente Madre Niño San Bartolomé.

Las muestras e información clínica se obtuvieron después que los tutores legales de los bebés aceptaron participar del estudio (ver anexo 1).

8.2. Historia clínica

Para el llenado de la ficha clínica, la madre fue entrevistada para obtener los datos sociodemográficos pre y peri natales. Mientras que los datos correspondientes al estado de salud del neonato se recolectaron de la historia clínica hospitalaria (ver anexo 2).

8.3. Primera fase: cultivo de meconio para análisis de la microbiota

El primer análisis se realizó cuando el bebé se encontraba en su incubadora en UCIN o en cuidados intermedios de Neonatología, el meconio fue recolectado del pañal del bebé en frascos estériles con la ayuda de hisopos estériles, desde las primeras horas del nacimiento hasta el quinto día. Cada muestra fue codificada y registrada con la fecha y hora de la recolección (ver anexo 3).

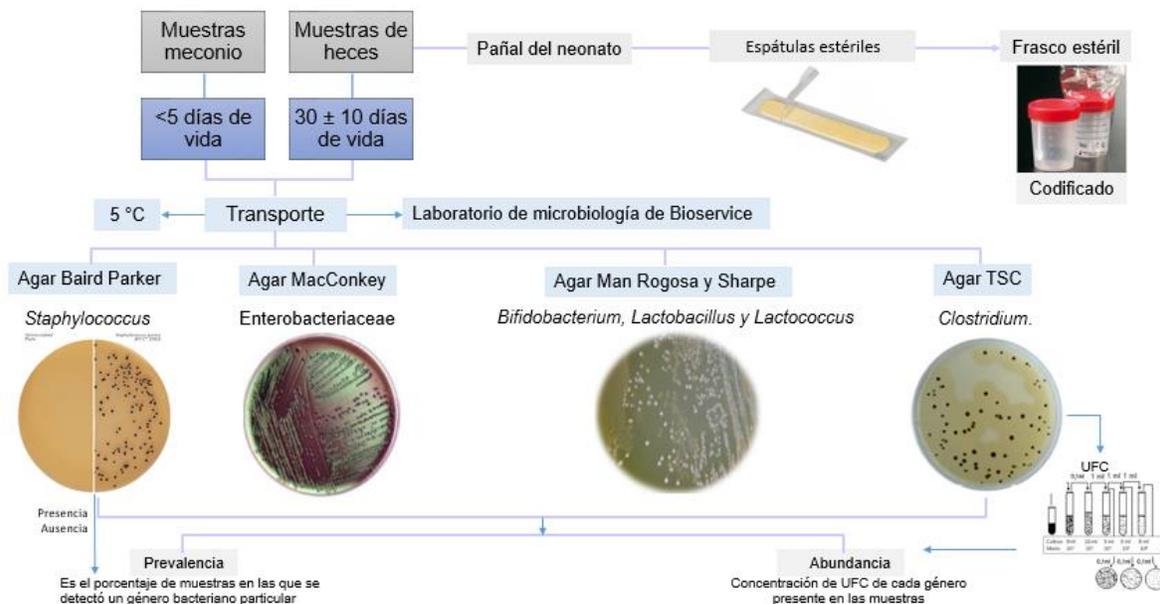
La conservación y el transporte al laboratorio de microbiología de Bioservice se realizó manteniendo las muestras a 5°C, para la respectiva búsqueda y aislamiento de bacterias en Baird Parker para *Staphylococcus*, agar MacConkey para Enterobacteriaceae, en Man Rogosa y Sharpe para *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y agar TSC para *Clostridium*.

La identificación presuntiva de las colonias en los agares se realizó mediante evaluación macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas. Luego para el recuento de las colonias cada placa se multiplicó por el factor de dilución y factor de volumen sembrado ($\text{UFC/ml} = \text{N}^\circ \text{ UFC} \times 10^{-x} \times 10$), para al final reportar el número de colonias/ml (UFC/ml).

8.4. Segunda fase: segundo cultivo para análisis de la microbiota

Para el segundo análisis la muestra fue tomada del pañal del bebé, en promedio el día 30 (± 10 días), en frascos estériles con la ayuda de hisopos estériles y registrados y codificados de acuerdo al tipo de alimentación que recibieron (ver anexo 4). Luego fue transportada en las mismas condiciones que la primera muestra hacia el laboratorio de microbiología de Bioservice, para seguir el mismo proceso del primer cultivo descrito en el punto 7.3.

Figura 17: Flujograma de proceso de recolección de datos.



Fuente: Elaboración propia

8.5. Evaluación de los resultados

La microbiota intestinal se estudió mediante la prevalencia y abundancia de los géneros *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Escherichia*. Donde la abundancia fue medida por la concentración de UFC de cada género presente en los diferentes tipos de alimentación, mientras que la prevalencia es el porcentaje de muestras en las que se detectó un género bacteriano particular.

9. Procesamiento y análisis de datos

La base de datos fue digitada en el programa Microsoft Excel y, posteriormente, fue exportada al paquete estadístico STATA versión 13 para los análisis correspondientes.

En el cual se elaboraron tablas descriptivas con las variables sociodemográficas y clínicas de los neonatos. Donde se mostraron frecuencias para las variables de naturaleza cualitativa mientras que para las variables de naturaleza cuantitativa se mostraron medias y desviaciones estándar. Y se elaboró un gráfico de barras para mostrar las concentraciones de las cepas de la microbiota en meconio y heces.

Por otro lado, las concentraciones de la microbiota en meconio y heces fueron categorizadas según puntos de corte, siendo “ausente” cuando no hubo concentración, “menor” cuando la concentración fue menor a 10^6 UFC y “mayor” cuando la concentración era mayor o igual a 10^6 UFC. De esta manera se pudo obtener variables cualitativas que se expresaron en frecuencias en una tabla descriptiva.

Siendo así, para el análisis estadístico inferencial, se aplicó la prueba Exacta de Fisher relacionando los distintos tipos de cepas de microbiota en meconio y heces con el tipo de alimentación y las distintas variables cualitativas del estudio. En el caso de las variables cuantitativas, la prueba elegida fue ANOVA de una vía previa evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad.

También se ejecutó una comparación de las concentraciones de las cepas de microbiota en meconio y heces de acuerdo al tipo de alimentación recibida mediante la prueba t de student para datos pareados.

Por último, para todos los análisis estadísticos se consideró un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia del 5% por lo que todo valor de p menor o igual a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

10. Consideraciones éticas

Esta investigación tuvo en consideración los principios éticos básicos establecidos en la norma internacional en el informe de Belmont (171) y por los derechos del niño (CDN, 1989) (172).

Los RNPT fueron sujetos de investigación porque las técnicas utilizadas no presentaban ningún riesgo. Además, se le explicó a la madre la importancia e impacto del estudio,

respetando la decisión de su participación. Toda la información recolectada quedó para uso del investigador, de esa manera se aseguró la protección de los derechos y la dignidad, tanto de las madres como de los neonatos.

Asimismo, el estudio de la microbiota intestinal se ha realizado antes, alcanzando hallazgos científicos sin reportarse ningún riesgo. El conocimiento que se pretendió aquí no se puede producir por otro medio que no sea el análisis directo de las muestras de heces, pero fue totalmente seguro para el neonato y la madre.

Por último, los datos fueron recolectados cuando se tuvo la autorización: del representante legal de la institución investigadora (Universidad Peruana Unión) y de la institución donde se realizó la investigación (Hospital San Bartolomé), el Consentimiento Informado de los representantes legales de los participantes y la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética e Investigación de la institución.

Capítulo IV

Resultados y discusión

1. Resultados

Tabla 8. Prevalencia de géneros en muestras de meconio (n=23)

VARIABLES*	MECONIO		
	N	%	
<i>Lactococcus</i> spp.	Ausente	7	41,18
	Menor	3	17,65
	Mayor	7	41,18
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Ausente	22	95,65
	Menor	0	0,00
	Mayor	1	4,35
<i>Lactobacillus</i> spp.	Ausente	18	78,26
	Menor	0	0,00
	Mayor	5	21,74
<i>Staphylococcus</i> spp.	Ausente	16	69,57
	Menor	2	8,70
	Mayor	5	21,74
<i>Clostridium</i> spp.	Ausente	20	95,24
	Menor	0	0,00
	Mayor	3	4,76
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	19	82,61
	Menor	3	13,04
	Mayor	1	4,35

*AUSENTE: sin UFC; MENOR: UFC menor a 10^6 ; MAYOR: UFC mayor a 10^6

Los *Lactococcus* fueron los géneros predominantes en meconio encontrándose en el 58,83% de las muestras, de las cuales el 41,18% tuvieron más de un millón de UFC. Seguida por los *Staphylococcus* y *Lactobacillus* que se presentaron en el 30,4 y 21,74% de las muestras, y en ambos géneros el 21,74% tuvo un recuento mayor de un millón de UFC. Mientras que las *bifidobacterium* estuvieron ausentes el 95,65%, *Clostridium* en el 95,24% y *E. coli* en el 82,61% de las muestras.

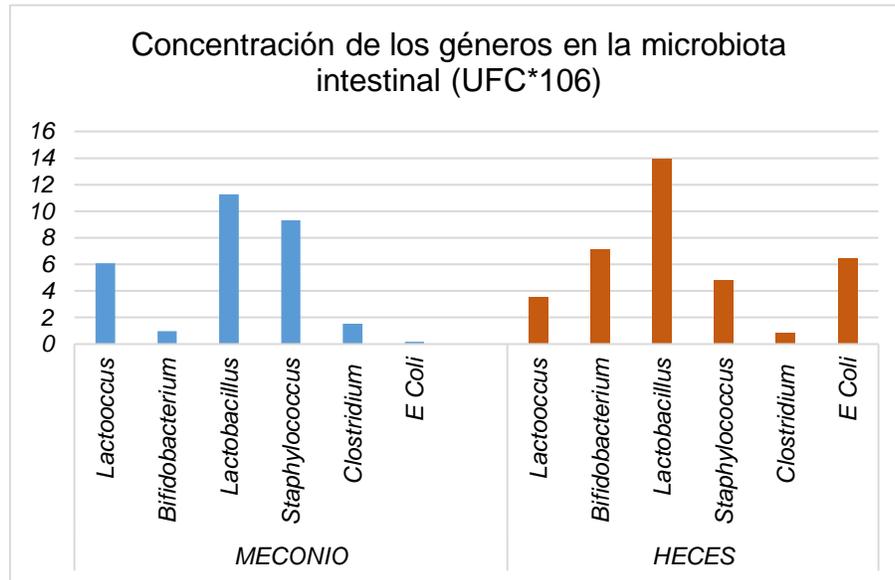
Tabla 9. Prevalencia de géneros en muestras de heces (n=23)

VARIABLES*	HECES		
	N	%	
<i>Lactococcus</i> spp.	Ausente	16	76,19
	Menor	0	0
	Mayor	5	23,81
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Ausente	12	52,17
	Menor	4	17,39
	Mayor	7	30,43
<i>Lactobacillus</i> spp.	Ausente	10	43,48
	Menor	1	4,35
	Mayor	12	52,17
<i>Staphylococcus</i> spp.	Ausente	11	47,83
	Menor	6	26,09
	Mayor	6	26,09
<i>Clostridium</i> spp.	Ausente	16	69,57
	Menor	4	17,39
	Mayor	3	13,04
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	8	34,78
	Menor	9	39,13
	Mayor	6	26,09

*AUSENTE: sin UFC; MENOR: UFC menor a 10^6 ; MAYOR: UFC mayor a 10^6

En el 23,81% de las muestras hubo presencia de *Lactococcus*, mientras que el 56,52% (n=13) tuvieron presencia de *Lactobacillus* de los cuales 12 tuvieron un recuento bacteriano mayor de un millón. Por otro lado, el 52,18% de las muestras de heces presentaron *Staphylococcus*, el 65,22% *Escherichia coli* y el 30,43% *Clostridium*. En cuanto a las *Bifidobacterium* el 47,83% de las muestras tuvieron presencia de este género y en la mayoría observó un recuento mayor a un millón de UFC.

Figura 18. Abundancia de los géneros de la microbiota intestinal (UFC*10⁶).



La concentración del género *Lactobacillus* fue el más abundante tanto en las heces como el meconio de los neonatos, y también se pudo observar un aumento del meconio a heces. Los géneros de *Staphylococcus* y *Lactococcus* también se encontraron abundantemente en el meconio, los cuales disminuyeron en las muestras de heces, por otro lado, en la heces se aumentó la concentración de *Bifidobacterium* y *E coli* mientras que *Clostridium* disminuyó levemente.

Tabla 10. Relación entre los géneros y tipos de alimentación en heces

VARIABLES		HECES			
Géneros	Alimentación	Ausente	Menor	Mayor	P
<i>Lactococcus spp.</i>	LH	8 (80.00)	0 (0.00)	2 (20.00)	0,99
	LM	8 (72.73)	0 (0.00)	3 (27.27)	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	LH	9 (81.82)	0 (0.00)	2 (18.18)	0,01
	LM	3 (25.00)	4 (33.33)	5 (41.67)	
<i>Lactobacillus spp.</i>	LH	7 (63.64)	0 (0.00)	4 (36.36)	0,14
	LM	3 (25.00)	1 (8.33)	8 (66.67)	
<i>Staphylococcus spp.</i>	LH	4 (36.36)	4 (36.36)	3 (27.27)	0,51
	LM	7 (58.33)	2 (16.67)	3 (25.00)	
<i>Clostridium spp.</i>	LH	7 (63.64)	2 (18.18)	2 (18.18)	0,83
	LM	9 (75.00)	2 (16.67)	1 (8.33)	
<i>Escherichia coli</i>	LH	3 (27.27)	7 (63.64)	1 (9.09)	0,05
	LM	5 (41.67)	2 (16.67)	5 (41.67)	

*AUSENTE: sin UFC; MENOR: UFC menor a 10^6 ; MAYOR: UFC mayor a 10^6

En esta tabla se demuestra que existe correlación estadísticamente significativa entre *Bifidobacterium* y *E. Coli* con respecto al tipo de alimentación, mientras que *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Clostridium* no tienen correlación.

Además, se puede observar que el 75% de los neonatos alimentados LM presentaron *Bifidobacterium spp.*, y *Lactobacillus spp* en heces, mientras que las muestras de LH solo tuvieron una prevalencia del 18,18% y 36,36%, respectivamente. Por otro lado, la prevalencia de *E. coli* en las heces del grupo LH fue del 72,73% pero su abundancia fue menor de un millón de UFC a diferencia de los que recibieron LM, donde el 58,34% de las muestras tuvieron *E. coli* pero su concentración fue mayor de un millón.

Tabla 11. Cambios en la abundancia de los géneros de la microbiota intestinal

Géneros	Alimentación	Meconio	Heces	P	D	
<i>Lactococcus spp.</i>	LH	1.18	2.75	0.59	-1.57	↑
	LM	11.56	0.94	0.17	10.61	↓
<i>Bifidobacterium spp.</i>	LH	2	4.73	0.55	-2.73	↑
	LM	0	9.29	0.19	-9.29	↑
<i>Lactobacillus spp.</i>	LH	9.09	5.65	0.76	3.45	↓
	LM	13.25	21.6	0.56	-8.35	↑
<i>Staphylococcus spp.</i>	LH	13.78	5.06	0.44	8.71	↓
	LM	5.23	4.67	0.92	0.57	↓
<i>Clostridium spp.</i>	LH	0	1.15	0.18	-1.15	↑
	LM	3.2	0.6	0.45	2.6	↓
<i>Escherichia coli</i>	LH	0	1.51	0.32	-1.51	↑
	LM	0.37	10.94	0.14	-10.58	↑

Valores correspondientes a heces y meconio están descritos en concentraciones; P representa la significancia; D la diferencia.

Esta tabla muestra la comparación de las concentraciones (UFC) de los distintos géneros de la microbiota intestinal en meconio y heces segregados según el tipo de alimentación que recibieron los neonatos. Los resultados indican que a pesar de haber una diferencia entre las concentraciones de los géneros en las muestras de meconio y heces no es significativa.

2. Discusión

Para el análisis de la microbiota intestinal (MI), se utilizaron métodos de cultivos, tanto para describir la MI en muestras de meconio y el desarrollo en heces, en dos grupos de neonatos prematuros, alimentados con LH (n=11) y LM (n=12).

El 82% de la población total tuvieron una edad gestacional entre 32 a <37 semanas y solo el 4% tuvieron entre 28 a <32 semanas. Además, el 86,96% (n=20) de los niños nacieron por cesárea. Y el 56,52% recibió profilaxis antibiótica, siendo así que las características clínicas y demográficas reportan que los neonatos han sido expuestos a factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal (104).

Una de las limitaciones del estudio, incluyen el tamaño de muestra pequeño; por lo tanto, la inferencia con respecto a la causalidad es limitada. Sin embargo, se han encontrado relaciones significativas entre la microbiota intestinal y el tipo de alimentación. En general, se pudo describir mejor los géneros encontrados en muestras de meconio y heces, además, su relación con el tipo de alimentación. Todos los estudios con los que se discuten los resultados fueron realizados por técnicas moleculares y solo Moles *et al.*, utilizó dos técnicas (cultivo y molecular).

Entre las bacterias encontradas en el meconio predominó el género *Lactococcus* (58,52%) seguido de *Staphylococcus* (30,43%) y *Lactobacillus* (21,74%). Especies similares encontró Moles *et al.*, en España (2013) (161) reportando que el género predominante fue *Staphylococcus* en el 50% de las muestras; asimismo, Drell *et al.*, en Estonia (2014) (160), describió una prevalencia del 70%. Este predominio de la familia Staphylococcaceae en la MI de los recién nacidos. Adlerberth *et al.*, lo ha relacionado con una mejor condición higiénica durante el parto (173), mientras que Itani *et al.*, (155) lo relacionó con el parto por cesárea y la edad gestacional siendo que los neonatos <33 ss de EG tienen mayor prevalencia de *Staphylococcus* (p=0,036). Además, Stoll *et al.* ha considerado que la abundancia elevada de *Staphylococcus* puede aumentar el riesgo de adquirir infecciones por estafilococos coagulasa negativo, puesto que los neonatos prematuros son más vulnerables (174). Aunque, Drell hizo una correlación entre una mayor abundancia del género *Staphylococcus* y la edad gestacional en neonatos de EBPN concluyendo que el riesgo de adquirir estas infecciones a través de la colonización por *Staphylococcus* es máximo en la primera semana de vida (160). Además, según Gosálbes *et al.*, la MI del meconio puede estar agrupada en dos tipos diferentes de acuerdo a la diversidad bacteriana, riqueza y composición, MI menos diversa y dominada por bacterias

entéricas se asocia significativamente con un historial de eccema atópico en la madre ($P = 0.038$), mientras que si es dominada por bacterias ácido lácticas está asociado significativamente con problemas respiratorios en el lactante ($P = 0.040$) (169).

Por otro lado, los resultados del estudio reportaron que en las heces, el género más prevalente fue *Escherichia coli* (65,2%) seguido de *Lactobacillus* (56,52%) y *Staphylococcus* (52,17%). Resultados similares encontró Moles *et al.*, (161) donde la prevalencia fue de *Enterococcus* (93%) seguida de *E. Coli* (71,4%) y *Staphylococcus* (50%). Las diferencias entre los resultados pueden atribuirse a la metodología de los estudios, siendo que Moles utilizó más recursos y medios de cultivos además del método molecular por lo cual pudo describir todas las bacterias presentes en la MI, mientras que en este estudio se cultivaron una limitada cantidad de géneros bacterianos. En contraste, Drell *et al.* (160), encontró mayor prevalencia de *Enterococcus* (aprox. 80%) *Staphylococcus* (aprox. 65%) y *Escherichia* (aprox. 40%). Lo que puede estar relacionado, según Jimenez *et al.*, con el tipo de alimentación, evidenciando que los bebés alimentados con leche materna tuvieron mayor prevalencia de *Staphylococcus Epidermis*, específicamente; a diferencia de los alimentados con fórmula para prematuro (175). Al mismo tiempo, en el presente estudio el 47,83% de las muestras de heces fueron colonizadas por *Bifidobacterium spp.*, prevalencia mayor a la reportada por Moles *et al.*, (<10%) y Jacquot, *et al.*, (11%) quienes reportaron pocos neonatos colonizados por este género (162); tales resultados pueden atribuirse según Jacquot a la edad gestacional, señalando que la diversidad bacteriana aumenta más lentamente en neonatos extremadamente prematuros (EG <28 semanas) que en lactantes prematuros moderados (EG \geq 28 semanas). Resultados de los estudios que pueden ser contrastados con los de esta investigación donde el 82,61% de los neonatos nacieron con una EG >32 semanas, por tanto, desarrollaron mayor prevalencia y abundancia de *Bifidobacterium*, lo que proporciona resistencia a la colonización patógena (162). Por último, el género *Lactobacillus* fue el más abundante en ambas muestras de meconio y heces. Resultados que difieren con Drell *et al.*, (160) donde el género más abundante en meconio fue *Staphylococcus* y en heces *Escherichia / Shigella*. Estas diferencias halladas se pueden atribuir al país de origen, puesto que la microbiota intestinal puede variar significativamente entre países de bajos ingresos y de altos ingresos (176–178).

La relación entre el tipo de alimentación y MI en heces determinó que los neonatos alimentados con leche mixta tuvieron mayor prevalencia y abundancia significativa de

Bifidobacterium ($p= 0,01$) y *Escherichia Coli* ($p = 0,05$) que los alimentados con leche humana. Resultados similares encontraron Cong *et al.*, (2017) (156), donde los neonatos alimentados con LM (LME + FPP) adquirieron la mayor abundancia de Bifidobacteriales durante los primeros 30 días de vida. Asimismo, Gregory *et al.* (158) obtuvo mayor abundancia de Enterobacteriales y Bifidobacteriales en neonatos mayores de tres semanas postnatales que tomaron FPP. Opuesto a los resultados encontrados por Parra *et al.* (154), donde los niños alimentados con LME obtuvieron mayor abundancia significativa de *Bifidobacterium* ($p= 0.027$) y no significativo de Enterobacteriaceae no clasificados, en comparación con el grupo LHP. Este resultado puede variar debido a que Parra, en su estudio, tomó las muestras de heces cuando los bebés alcanzaron la alimentación enteral completa (≥ 150 cc / kg / día); en este sentido, Sakata corrobora que la demora del desarrollo de la flora bifidobacteriana parece estar relacionada con la baja ingesta de leche en bebés de MBPN (179), con la diferencia que este estudio consideró los días de vida. También puede estar relacionado a la edad gestacional, como hace referencia Butel *et al.* (180), que tiene un impacto significativo en la colonización por bifidobacterias ($p= <0.05$), ocurriendo en niños mayores de 32.9 semanas de EG ($p = <0.05$), siendo así que en nuestro estudio los bebés alimentados con LH tenían una edad gestacional de 32.36 (± 2.98) mientras que el grupo LM tuvieron una EG de 34.25 semanas (± 1.48). Así mismo, Gregory sugiere que la EG (o la madurez intestinal) tuvo tanta influencia sobre la diversidad del microbioma como cualquier régimen dietético (158). Del mismo modo, Penders asoció el uso de antibióticos con una disminución del número de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* (104), pudiéndose atribuir también en este estudio, porque los neonatos del grupo LH estuvieron más expuestos al uso de antibióticos (11.09 días en promedio) que los del grupo LM (3,92 días en promedio). Por último, Claud *et al.*, (116) mencionan que el aumento en la concentración de Proteobacteria en la composición de la microbiota intestinal en neonatos prematuros se ha relacionado con la NEC. Y según Zhou *et al.*, (181) *Escherichia / Shigella* mostraron un patrón creciente antes del inicio de la enfermedad, lo que puede llevarnos a inferir que los neonatos alimentados con fórmula están más expuestos a NEC como se ha sugerido antes (45,48–50).

Finalmente, no se observaron cambios estadísticamente significativos en el desarrollo de todos los géneros estudiados desde la primera muestra de meconio (<5 días) a la segunda de heces a los 30 días (± 10) para ninguno de los dos grupos de alimentación. A diferencia, Drell *et al.* (160), que encontró en su estudio que la prevalencia y abundancia de *Escherichia*, aumentó significativamente ($P = 0.04$ y $P < 0.01$, respectivamente) entre una

semana y un mes de edad. Siendo el aumento de la prevalencia de 17% a 41%, valores que presentan una similitud al de este estudio donde la prevalencia aumento de 17% a 65%. También encontró que la abundancia de *Staphylococcaceae* (el género más abundante perteneciente a esta familia fue *Staphylococcus*) disminuyó significativamente ($P < 0.001$), a diferencia de este estudio; donde la abundancia de este género también disminuyo pero no se muestra significativo, pudiendo estar relacionado con la población de estudio (n=50) comparado con la de este estudio (n=23), que además estuvo subdividida en grupos de estudio (LH y LM).

Por otro lado, se pudo observar una tendencia diferente en la MI de acuerdo al tipo de alimentación. Los del grupo de LH aumentaron la abundancia (UFC) de *Lactococcus* y *Clostridium*, mientras que *Lactobacillus* disminuyeron al contrario del grupo LM, donde aumentó el número de UFC de *Lactobacillus* y disminuyó *Lactococcus* y *Clostridium*. Similar a lo reportado por Gregory (158), donde los grupos LME y LHP tuvieron aumento más rápido de *Clostridiales* en comparación con el grupo FPP; sugiriendo una interacción dinámica entre el hospedador y la selección dietética de miembros específicos del microbioma que se ve alterado por la alimentación.

Los resultados indican que el tipo de alimentación tuvo un efecto significativo sobre los conteos bacterianos y la composición de la microbiota fecal, siendo la *E. coli* la especie más prevalente, adquiriendo una menor abundancia en los niños alimentados con LH que los alimentados con LM. En general, el análisis del meconio y las heces de los bebés prematuros revelaron baja diversidad de géneros y alta variabilidad interindividual, descrito anteriormente (160,161). Asimismo, la identificación y caracterización de estos organismos y su interacción con el huésped deberían conducir a nuevas investigaciones que amplíen el efecto del tipo de alimentación sobre la MI. Y nuevas terapias que ayuden a disminuir los patógenos asociados con la sepsis y la NEC que lleve a una homeostasis de la MI (182,183).

Capítulo V

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

En el meconio predominaron las bacterias del ácido láctico. Siendo *Lactococcus spp.* el género prevalente en un 58,83% de las muestras analizadas y *Lactobacillus spp.* el más abundante (11×10^6 UFC).

En cuanto a la prevalencia de los géneros en heces, se evidenció que *E. Coli* fue predominante en un 65,22% de las muestras analizadas, seguido de *Lactobacillus spp.*, 56,52%. Al mismo tiempo que, el género más abundante fue *Lactobacillus spp.* (14×10^6 UFC).

Con respecto a las muestras de heces en neonatos pretérmino relacionadas con el tipo de alimentación:

Los neonatos alimentados con lactancia mixta tuvieron una microbiota intestinal con mayor prevalencia y abundancia significativa de *Bifidobacterium spp.*, ($p=0,01$) y *E. Coli* ($p=0,05$).

Los neonatos alimentados con leche humana tuvieron una microbiota intestinal con un menor desarrollo de bacterias entéricas, siendo la *Escherichia Coli* ($p=0,05$).

Por tanto, el tipo de alimentación sí influye sobre el desarrollo de la microbiota intestinal.

La concentración de la microbiota intestinal en muestras de meconio a heces de los neonatos alimentados con leche humana y lactancia mixta no fue significativo.

Recomendaciones

La mayor restricción de este estudio fue la limitada cantidad de géneros estudiados; por lo tanto, se debe considerar para estudios posteriores ampliar la búsqueda mediante los métodos moleculares complementando con el de cultivo.

También considerar incluir mayor número de muestra en los diferentes grados de prematuridad (extremo, moderado y tardío).

Los grupos de estudios no se tuvieron en su pureza total, para lo cual se recomienda realizar estudios controlados aleatoriamente.

Referencias bibliográficas

1. OMS. Nacimientos prematuros. 2016.
2. UNICEF. El nacimiento prematuro es ahora la principal causa de muerte en niños pequeños. 2013.
3. Lawn JE, Kinney M. Preterm Birth: Now the Leading Cause of Child Death Worldwide. *Sci Transl Med*. 2014;6(263):4.
4. Cornejo K, García M, Huerta S, Cortes C, Castro G, Hernández R. Factores asociados con el parto prematuro en un hospital de segundo nivel. *Rev Espec Médico-Quirúrgicas*. 2014;19(3):308–15.
5. MINSA. Boletín estadístico de nacimientos, Perú: 2015. Perú; 2016.
6. HONADOMANI. Estadística básica partos/abortos. 2015.
7. Mayorga D, Rodríguez E, Ortiz JA, Rivera WI, Hernández N. Perfil epidemiológico y factores de riesgo en recién nacidos prematuros. *Rev Med Hondur*. 2012;80(4):145–52.
8. Cervantes-ruiz MA, Rivera-rueda MA, Yescas-buendía G, Villegas R, Hernandez G. Hemorragia intraventricular en recién nacidos pretérmino en una unidad de tercer nivel en la Ciudad de México. *Patol y Reprod Humana*. 2012;26(1):17–24.
9. Miranda-del-olmo H, Cardiel-marmolejo LE. Morbilidad y mortalidad en el recién nacido prematuro del Hospital General de México. *Rev Med Hospi Gen Mex*. 2003;66(1):22–8.
10. Trembath AN, Payne AH, Colaizy TT, Bell EF, Walsh MC. The problems of moderate preterm infants. *Semin Perinatol*. Elsevier; 2016;1–4.
11. Lucas a, Morley R, Cole TJ. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *BMJ*. 1998;317(7171):1481–7.
12. Schonhaut L, Pérez M, Schonstedt M, Armijo I, Delgado I, Cordero M, et al. Prematuros moderados y tardíos, un grupo de riesgo de menor desarrollo cognitivo en los primeros años de vida. *Rev Chil Pediatr*. 2012;83(4):358–65.
13. Lindstro K, Winbladh B, Haglund B, Hjern A. Preterm Infants as Young Adults: A Swedish National Cohort Study. *Pediatrics*. 2007;120(1):70–7.

14. Villanueva L, Gutiérrez A, Pichardo-Cuevas M, Rosales J. Perfil epidemiológico del parto prematuro. *Ginecol Obs Mex*. 2008;76(9):542–8.
15. Montagna A, Nosarti C. Socio-Emotional Development Following Very Preterm Birth: Pathways to Psychopathology. *Front Psychol*. 2016;7:1–23.
16. EFCNI. Los nacimientos prematuros y los pulmones. European Lung Foundation. 2016.
17. Serrano CA, León M, Harris PR. Desarrollo de la microbiota gastrointestinal en lactantes y su rol en salud y enfermedad. *Rev Ciencias Médicas*. 2016;41(1):35–43.
18. Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, et al. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ*. 1997;315:396–400.
19. Perkin-Elmer. Nacimiento prematuro. 2009.
20. Risnes KR, Pape K, Bjørngaard J, Moster D, Bracken M, Romundstad PR. Premature Adult Death in Individuals Born Preterm: A Sibling Comparison in a Prospective Nationwide Follow-Up Study. *PLoS One*. 2016;11(11):1–14.
21. WHO, March-of-dimes, Save-the-Children, PMNCH. 15 millones de bebés nacen demasiado pronto. 2012.
22. March-of-Dimes. Premature birth. 2013.
23. Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, Toole GAO, Moore JH, et al. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2012;97:456–62.
24. Stecher B, Hardt W-D. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol*. 2008;16(3):107–14.
25. Garmíño A, Minerva B, Cárdenas L, Anaya F, Padilla F. Flora Normal, probióticos y salud humana. *Acta Univ*. 2005;15(3):34–40.
26. Gómez M, Acero F. Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal. *Repert Med y Cirugía*. 2011;20(2):74–82.
27. Tlaskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Hudcovic T, Tučková L, Cukrowska B, Lodinová-Žádníková R, et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*.

2004;93(2–3):97–108.

28. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS*. 2004;101(44):15718–23.
29. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr*. 2010;104(6):919–29.
30. Kalliomäki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Nat Immunol*. 2003;3(1):15–20.
31. O’Hara A, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *Eur Mol Biol Organ*. 2006;7(7):688–93.
32. Belkaid Y, Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*. Elsevier Inc.; 2014;157(1):121–41.
33. Schiffrin EJ, Blum S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56(3):60–4.
34. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Sargent M, Gill SR, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* (80-). 2005;308(5728):1635–8.
35. Kwan Y, Mehbrod E, Gibson D. Consecuencias clínicas de la disbiosis inducida por la dieta. *Ann Nutr Metab*. 2013;63:28–40.
36. Pérez D, Lopez G, Periago M, Ros G. Evolución de la microbiota intestinal en lactantes: efecto de la leche materna. *Aliment Nutr y Salud*. 2003;10(4):100–7.
37. Sagaró E. Diarrea persistente. *Colomb Med*. 2007;38(SUPPL. 1):66–70.
38. Castillo J, Veranes A, Castillo A, Rizo R, Cádiz A. Lactancia materna e inmunidad: Impacto social. *Medisan*. 2009;13(4):1–8.
39. Who, Unicef. Global strategy for infant and young child feeding. Report. 2003.
40. Baró L, Jiménez J, Martínez A, Boza J. Componentes biológicamente activos de la leche materna. *Ars Pharm*. 2001;42(1):21–38.
41. Underwood M a, German JB, Lebrilla CB, Mills D a. *Bifidobacterium longum* subspecies infantis: champion colonizer of the infant gut. *Pediatr Res*. 2015;77(1–2):229–35.

42. Garrido D, Dallas DC, Mills DA. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: Mechanisms and implications. *Microbiol (United Kingdom)*. 2013;159(4):649–64.
43. Sekirov I, Finlay BB. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J Physiol*. 2009;587(17):4159–67.
44. McGuire W, Anthony MY. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(1):F11-4.
45. Quigley M a., Henderson G, Anthony MY, McGuire W. Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(4):1–54.
46. Brasil: Modelo mundial de banco de leche materna. University of Michigan. 2015.
47. Ortiz F. Bancos de leche humana, de Brasil al mundo. Inter Press Service. 2016;
48. Jayanthi S, Seymour P, Puntis JWL, Stringer MD. Necrotizing enterocolitis after gastroschisis repair: A preventable complication? *J Pediatr Surg*. 1998;33(5):705–7.
49. Singh D, Devi N, Raman TSR. Exclusive breast feeding in low birth weight babies. *Med J Armed Forces India*. Director General, Armed Forces Medical Services; 2009;65(3):208–12.
50. Cristofalo EA, Schanler RJ, Blanco CL, Sullivan S, Trawoeger R, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. Randomized trial of exclusive human milk versus preterm formula diets in extremely premature infants. *J Pediatr*. Elsevier Ltd; 2013;163(6):1592–1595.e1.
51. Boehm G, Jelinek J, Stahl B, van Laere K, Knol J, Fanaro S, et al. Prebiotics in infant formulas. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38(6 Suppl):S76-79.
52. Walker W-A. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann Nutr Metab*. 2013;63(SUPPL.2):8–15.
53. Nabi G, Jan M, Rafiq W, Gattoo I, Hussain SQ, Latief M. Morbidity and Mortality Pattern in Late Preterm Infants at a Tertiary Care Hospital. *J Clin Diagnostic Res*. 2015;9(12):1–4.
54. Peterson CT, Sharma V, Elmén L. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clin Exp Immunol*. 2014;179:363–77.

55. Unicef. Plan of Action for Implementing the World Declaration on the Survival, Protection and Development of Children in the 1990s. 1990.
56. Unicef. World Declaration on the Survival, Protection and Development of Children. New York; 1990.
57. March-of-Dimes, PMNCH, Save-the-Children, WHO. Born too soon: The Global Action Report on Preterm Birth. Vol. 13, Eds CP Howson, MV Kinney, JE Lawn. World Health Organization. Geneva; 2012.
58. Palencia A. Parto prematuro. Vol. 9, Curso Continuo de Actualización en Pediatría. 2013.
59. Di Renzo GC, Tosto V, Giardina I. The biological basis and prevention of preterm birth. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. Elsevier Ltd; 2018;
60. Anderson D. Tratamiento nutricional médico para lactantes de bajo peso al nacer. In: Dietoterapia de Krause. 13th ed. Barcelona: Elsevier España S.L.; 2013. p. 972–93.
61. Moles L. Adquisición y modulación de la microbiota gastrointestinal de niños prematuros. Universidad Complutense de Madrid; 2015.
62. Vecchiarelli C. Nutrición enteral en prematuros. Rev Enfermería. 2012;12:7.
63. Dusick AM, Poindexter BB, Ehrenkranz RA, Lemons JA. Growth Failure in the Preterm Infant : Can We Catch Up ? Semin Perinatol. 2003;27(4):302–10.
64. Rodriguez Martinez G, Blanca Garcia JA, De La Mano Hernandez A, Rivero De La Rosa MC, Cortes Mora P, Lama More RA, et al. Practical considerations about enteral nutrition in the premature newborn. Acta Pediatr Esp. 2011;69(7–8):333–8.
65. Baquero H, Velandia L. Nutrición del prematuro. Precop - Soc Colomb Pediatr. 2010;Volumen 9(4):22–32.
66. OMS. Lactancia materna exclusiva [Internet]. 2016. Available from: http://www.who.int/elena/titles/exclusive_breastfeeding/es/
67. Comité de lactancia materna de la asociación española de pediatría. Lactancia materna en niños mayores o prolongada. Asociación Española de Pediatría. 2015.
68. Sarmiento GES. Leche materna y lactancia. Pediatría, Med interna pediátrica. 2013;11(3):5–20.
69. Lozano-de-la-Torre M-J. Lactancia materna. Asoc Española Pediatría. :279–86.

70. AEP. Manual de Lactancia Materna: de la teoría a la práctica. primera. Aguayo J, Gómez A, Hernández T, Lasarte J, Lozano M-J, Pallás C, editors. España: Editorial Médica Panamericana; 2009. 1-457 p.
71. Schellhorn C, Valdés V, Juez G, Niño R, Weason R, Mena P, et al. Manual de lactancia materna. 2010. 238 p.
72. OMS, OPS. La alimentación del lactante y del niño pequeño. 2010. 1-108 p.
73. Aguila A, Burgos J, Castillo S, Catalán J, Correia G, Fernández P. Neonatología. primera. Nazer J, Ramírez R, editors. Chile; 2003. 1-523 p.
74. Moreno J. Guías prácticas sobre nutrición. Alimentación en el lactante. An Españoles Pediatría. 2001;54(2):145–7.
75. Nutrición pediátrica. 1era ed. Caracas: Editorial Médica Panamericana; 2009. 447 p.
76. Cilleruelo M, Calvo C. Alimentación infantil. An Pediatr Contin. 2004;2(6):325–38.
77. Hernández M, Aguayo J. Lactancia materna. An Pediatr Contin. 2003;1(3):175–80.
78. Jeurink P V., van Bergenhengouwen J, Jiménez E, Knippels LMJ, Fernández L, Garssen J, et al. Human milk: A source of more life than we imagine. Benef Microbes. 2013;4(1):17–30.
79. Osorio LM, Umbarila AS. Microbiota de la glándula mamaria. Pediatría (Santiago). Revista Pediatría EU; 2015;48(1):1–8.
80. Gómez-de-Segura A, Escuder D, Montilla A, Bustos G, Pallás C, Fernández L, et al. Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after holder pasteurisation. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012;54(2):197–203.
81. Peila C, Coscia A, Bertino E, Cavaletto M, Spertino S, Icardi S, et al. Effects of Holder pasteurization on the protein profile of human milk. Ital J Pediatr. Italian Journal of Pediatrics; 2016;42(1):36.
82. Peila C, Moro GE, Bertino E, Cavallarin L, Giribaldi M, Giuliani F, et al. The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A review. Nutrients. 2016;8(8):1–19.
83. García-Lara NR, García-Algar O, Pallás-Alonso CR. Bancos de leche humana y lactancia materna. An Pediatr. 2012;76(5):247–9.
84. de Halleux V, Pieltain C, Senterre T, Rigo J. Use of donor milk in the neonatal

- intensive care unit. *Semin Fetal Neonatal Med.* Elsevier Ltd; 2016;1–7.
85. Velasquez G. Comparación entre la ganancia de peso de neonatos prematuros alimentados con lactancia materna exclusiva (con énfasis en la fracción emulsión) y los de lactancia mixta o sucedáneos. *Rev Fac Med.* 2014;62(1):29–34.
 86. Meier P-P, Patel A-L, Esquerra-Zwiers A. Donor Human Milk Update: Evidence, Mechanisms and Priorities for Research and Practice. *J Pediatr.* 2017;180:15–21.
 87. Tamayo G, Saenz A, Hernandez M, Pedrón C, García M. Fórmulas infantiles especiales. *An Esp Pediatr.* 1997;47(4):455–65.
 88. Hernández M, Sastre A. Tratado de nutrición. Díaz de Sa. Madrid; 1999. 857 p.
 89. Vademécum Enfabebé. Mead Johnson. 2017.
 90. García-López DR. Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediatr Mex.* 2011;32(4):223–30.
 91. Bianchi-Codo CR, Caldas JP de S-, Alves-Peixoto RR, Lacerda-Sanches V, Guiraldelo TC, Cadore S, et al. Electrolyte and mineral composition of term donor human milk before and after pasteurization and of raw milk of preterm mothers. *Rev Paul Pediatr.* 2018;36(2):1–7.
 92. Aguayo J, Arena J, Díaz-Gómez M, Gómez A, Hernández-Aguilar MT, Landa L, et al. Lactancia materna: guía para profesionales. Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. 2004. 1-442 p.
 93. MINSAL, UNICEF. La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. 1995;1–30.
 94. Chavez I. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev Gastroenterol México.* 2013;78(4):240–8.
 95. Moreno Villares J. Flora bacteriana intestinal. *An Pediatría.* 2006;4(1):12–9.
 96. Johnson K, Abrahamsson T, You-Wu R, Sherman P. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for the Prevention of Necrotizing Enterocolitis. *Am Soc Nutr.* 2016;7:928–37.
 97. Ohland CL, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(167):807–19.
 98. Hernández A, Coronel C, Monge M, Quintana C. Microbiota, probióticos, prebióticos

- y simbióticos. *Pediatr Integr*. 2015;19(5):337–54.
99. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta paediatr Suppl*. 2003;92(1):48–55.
 100. Mändar R, Mikelsaar M. Transmission of Mother's Microflora to the Newborn at Birth. *Biol Neonate*. 1996;69(1):30–5.
 101. Bettelheim K a, Breadon A, Faiers MC, O'Farrell SM, Shooter R a. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *J Hyg (Lond)*. 1974;72(1):67–70.
 102. Grounlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal Microflora in Healthy Infants Born by Different Methods of Delivery: Permanent Changes in Intestinal Flora After Cesarean Delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28:19–25.
 103. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM. The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microb Ecol Heal Dis*. 2001;13(3):129–34.
 104. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics*. 2006;118(2):511–21.
 105. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol*. 1982;15(2):189–203.
 106. Guaraldi F, Salvatori G. Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2(94):1–4.
 107. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *Plos Biol*. 2007;5(7):1557–73.
 108. Collado MC, Cernada M, Bäuerl C, Vento M, Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*. 2012;3(4):352–65.
 109. C-López M, Mach N. Influencia de la gestación, el parto y el tipo de lactancia sobre la microbiota intestinal del neonato. *Acta Pediatr Esp*. 2014;72(2):37–44.
 110. Mitsou EK, Kirtzalidou E, Oikonomou I, Liosis G, Kyriacou A. Fecal microflora of Greek healthy neonates. *Anaerobe*. 2008;14(2):94–101.

111. Goedert JJ, Hua X, Yu G, Shi J. Diversity and composition of the adult fecal microbiome associated with history of cesarean birth or appendectomy: Analysis of the american gut project. *EBioMedicine*. Elsevier B.V.; 2014;1(2–3):167–72.
112. Salvo-romero E, Alonso-cotoner C, Pardo-camacho C, Casado-bedmar M, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev ESPAÑOLA ENFERMEDADES Dig*. 2015;107(11):686–96.
113. Ménard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosa Immunol*. 2010;3(3):247–59.
114. Medina FS De, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martínez-augustin O. Intestinal Inflammation and Mucosal Barrier Function. *Inflamm Mucosal Barrier Funct*. 2014;20(12):2394–404.
115. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2010;90:859–904.
116. Claud EC, Keegan KP, Brulc JM, Lu L, Bartels D, Glass E, et al. Bacterial community structure and functional contributions to emergence of health or necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome*. 2013;1(1):20.
117. Beeby PJ, Jeffery H. Risk factors for necrotising enterocolitis: the influence of gestational age. *Arch Dis Child*. 1992;67(4 Spec No):432–5.
118. Fitzgibbons SC, Ching Y, Yu D, Carpenter J, Kenny M, Weldon C, et al. Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories. *J Pediatr Surg*. Elsevier Inc.; 2009;44(6):1072–6.
119. Acosta LQ. Enterocolitis necrotizante neonatal. In: *Tratado de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición pediátrica*.
120. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(2).
121. Neu J, Walker WA. Necrotizing Enterocolitis. *N Engl J Med*. 2011;364(3):255–64.
122. Chan K, Saing H, Yung R, Yeung Y, Tsoi N. A study of pre antibiotic bacteriology in 125 patients with necrotizing enterocolitis. *Acta Pediatr*. 1994;83(January 1988):45–8.

123. Westra-Meijer CM, Degener JE, Dzoljic-Danilovic G, Michel MF, Mettau JW. Quantitative study of the aerobic and anaerobic faecal flora in neonatal necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child*. 1983;58(7):523–8.
124. Hoy C, Millar MR, MacKay P, Godwin PG, Langdale V, Levene MI. Quantitative changes in faecal microflora preceding necrotising enterocolitis in premature neonates. *Arch Dis Child*. 1990;65(10 Spec No):1057–9.
125. Hulzebos C V., van Zoonen AGJF, Hulscher JBF, Schat TE, Kooi EMW, Koehorst M, et al. Fecal Bile Salts and the Development of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168633.
126. Grave GD, Nelson SA, Walker WA, Moss RL, Dvorak B, Hamilton FA, et al. New therapies and preventive approaches for necrotizing enterocolitis: Report of a research planning workshop. *Pediatr Res*. 2007;62(4):510–4.
127. Schanler RJ, Lau C, Hurst NM, Smith EOB, Objective A. Randomized Trial of Donor Human Milk Versus Preterm Formula as Premature Infants. *J Am Acad Pediatr*. 2005;116(2).
128. Wu W, Wang Y, Zou J, Long F, Yan H, Zeng L, et al. Bifidobacterium adolescentis protects against necrotizing enterocolitis and upregulates TOLLIP and SIGIRR in premature neonatal rats. *BMC Pediatr*. *BMC Pediatrics*; 2017;17(1):1.
129. Fan W, Huo G, Li X, Yang L, Duan C, Wang T, et al. Diversity of the intestinal microbiota in different patterns of feeding infants by Illumina high-throughput sequencing. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013;29(12):2365–72.
130. Toscano M, De Grandi R, Miniello VL, Mattina R, Drago L, Hemarajata P, et al. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. *Dig Liver Dis*. *Editrice Gastroenterologica Italiana*; 2016;0(0):39–51.
131. Zapata S, Muñoz J, Ruiz OS, Montoya OI, Gutiérrez PA. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*. 2009;16(1):75–82.
132. Liu YW, Liao TW, Chen YH, Chiang YC, Tsai YC. Oral administration of heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* K37 modulated airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *PLoS One*. 2014;9(6).

133. Wang X, Hui Y, Zhao L, Hao Y, Guo H, Ren F. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* L9 attenuates PM2.5-induced enhancement of airway hyperresponsiveness and allergic airway response in murine model of asthma. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171721.
134. Yu J, Jang SO, Kim BJ, Song YH, Kwon JW, Kang MJ, et al. The effects of *Lactobacillus rhamnosus* on the prevention of asthma in a murine model. *Allergy, Asthma Immunol Res*. 2010;2(3):199–205.
135. Drago L, Vecchi E De, Toscano M, Vassena C, Altomare G, Pigatto P. Treatment of Atopic Dermatitis Eczema With a High Concentration of *Lactobacillus salivarius* LS01 Associated With an Innovative Gelling Complex A Pilot Study on Adults. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48:47–51.
136. Bhaskar MM, Sistla S, Kumaravel S. A case of pyometrocolpos with *Bifidobacterium* species. Vol. 44, *Anaerobe*. Elsevier Ltd; 2017. p. 48–50.
137. Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Vido K, Gaudu P, Loir Y Le, et al. Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival †. *J Bacteriol*. 2001;183(15):4509–16.
138. Huynh E, Li J. Generation of *Lactococcus lactis* capable of coexpressing epidermal growth factor and trefoil factor to enhance in vitro wound healing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(11):4667–77.
139. Heredia-Castro PY, Hernández-Mendoza A, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*. 2017;42(6):340–6.
140. Heikkila MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*. 2003;95(3):471–8.
141. Wang D, Xu S, Lin Y, Fang Z, Che L, Xue B, et al. Recombinant porcine epidermal growth factor-secreting *Lactococcus lactis* promotes the growth performance of early-weaned piglets. *BMC Vet Res*. 2014;10(1):1–12.
142. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting. *Science (80-)*. 2000;289:1352–5.

143. García-Martos P, Fernández-del-Barrio M-T, Paredes-Salido F. Microbiología clínica aplicada. España; 1997. 509 p.
144. Herrera M, Moya T, Vargas A, Herrera M, Herrera J-F, Marín J-P. Aislamiento de cepas de *Escherichia* spp. diferentes de *Escherichia coli* en el Hospital Nacional de Niños de 1995 a 2000. *Rev Médica del Hosp Nac Niños Dr Carlos Sáenz Herrera*. 2001;36(1-2):45-9.
145. Alarcon A, Peña P, Salas S, Sancha M, F Omeñaca. Neonatal early onset *Escherichia coli* sepsis: trends in incidence and antimicrobial resistance in the era of intrapartum antimicrobial prophylaxis. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(4):9-295.
146. Walker DJF, Heap JT, Winzer K, Minton NP. A genetic assay for gene essentiality in *Clostridium*. Vol. 42, *Anaerobe*. Elsevier Ltd; 2016. p. 40-3.
147. Walter J, Lina C. Enfermedad asociada a *Clostridium difficile*: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. *Infectio*. 2012;16(4):211-22.
148. Hernández N. Diversidad genética de la mitocondria intestinal de *Thorectes lusitanicus*. Universidad Complutense de Madrid; 2014.
149. Peake I. The polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*. 1989;42:673-6.
150. Zhou X, Li Y, editors. Techniques for Oral Microbiology. In: *Atlas of Oral Microbiology*. Elsevier Inc.; 2015. p. 15-40.
151. Deng W, Xi D, Mao H. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies. *Mol Biol Rep*. 2008;35:265-274.
152. Griffin H, Griffin A, editors. *DNA Sequencing protocols*. Totowa, New Jersey: Human Press; 1993. 386 p.
153. Brooks G-F, Carroll K-C, Butel J-S, Morse SA, Mietzner T-A, editors. *Microbiología Médica*. 25a. edici. 2017.
154. Parra-Llorca A, Gormaz M, Alcántara C, Cernada M, Nuñez-Ramiro A, Vento, Maximo MD P, et al. Preterm Gut Microbiome Depending on Feeding Type: Significance of Donor Human Milk. *Front Microbiol*. 2018;9(June):1376.
155. Itani T, Ayoub C, Melki I, Rousseau C. Anaerobe Establishment and development of the intestinal microbiota of preterm infants in a Lebanese tertiary hospital. *Anaerobe*. 2017;43:4-14.

156. Cong X, Genomics S, Judge M, Xu W, Diallo A, Janton S, et al. Influence of Infant Feeding Type on Gut Microbiome Development in Hospitalized Preterm Infants. *Nurs Res.* 2017;66(2):123–33.
157. Cong X, Xu W, Janton S, Henderson WA, Matson A, McGrath JM, et al. Gut microbiome developmental patterns in early life of preterm infants: Impacts of feeding and gender. *PLoS One.* 2016;11(4):1–19.
158. Gregory KE, Samuel BS, Houghteling P, Shan G, Ausubel FM, Sadreyev RI, et al. Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. *Microbiome.* 2016;4(1):68.
159. Ardisson AN, Cruz DM De, Davis-richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, et al. Meconium Microbiome Analysis Identifies Bacteria Correlated with Premature Birth. *PLoS One.* 2014;9(3):1–8.
160. Drell T, Lutsar I, Štšepetova J, Parm Ü, Metsvaht T, Ilmoja ML, et al. The development of gut microbiota in critically ill extremely low birth weight infants assessed with 16S rRNA gene based sequencing. *Gut Microbes.* 2014;5(3):37–41.
161. Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, Vos W De, et al. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. *PLoS One.* 2013;8(6):1–13.
162. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Jumas-bilak E, Picaud J. Dynamics and Clinical Evolution of Bacterial Gut Microflora in Extremely Premature Patients. *J Pediatr.* 2011;158(3):390–6.
163. Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, Legrand A, et al. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe.* Elsevier Ltd; 2010;16(4):362–70.
164. Martínez Cruz P, Mayorga R. L, Ponce N. T, Roldan J. A, Barranco F. E, González C. R, et al. Efecto de los fructooligosacaridos en la población bacteriana fecal de un neonato, crecida en cultivo por lote. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2008;39(1):32–7.
165. Catassi C. El microbioma intestinal: un universo en desarrollo. In: *Journal for health care professionals.* 2015. p. 1–16.
166. Robles-Alonso V, Guarner F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutr Hosp.* 2013;28(3):553–7.

167. Pérez L, Viada AM, Rojas JM. Determinación de inmunoglobulinas en calostro humano. *Rev Chil Pediatr.* 1980;51(2):117–20.
168. Lawrence R, Lawrence R. Lactancia materna: una guía para la profesión médica. sexta. España: España; 2007. 111-124 p.
169. Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy.* 2013;43(2):198–211.
170. Munares O, Flores D. Formulación de proyectos de investigación en salud. 2005. 214 p.
171. National Institutes of Health. Informe Belmont. Principios y guías éticos para la protección de los sujetos humanos de investigación comisión nacional para la protección de los sujetos humanos de investigación biomédica y del comportamiento. 1979.
172. Asamblea General-Naciones Unidas. Convención sobre los Derechos del Niño. In: UNICEF. 1989. p. Artículo 21.
173. Adlerberth I, Lindberg E, Åberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, et al. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: An effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res.* 2006;59(1):96–101.
174. Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW Infants : Studies From the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol.* 2003;27(4):293–301.
175. Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, García N, et al. *Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol.* 2008;8(143):1–11.
176. Grzeskowiak L, Collado MC, Mangani C, Maleta K, Laitinen K, Ashorn P, et al. Distinct Gut microbiota in southeastern African and northern European infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(6):812–6.
177. Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Björkstén B, Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 1997;86(9):956–61.
178. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: Geographic influence beyond delivery mode,

- breast-feeding, and antibiotic s. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51(1):77–84.
179. Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Desarrollo de la flora intestinal en recién nacidos de muy bajo peso al nacer en comparación con recién nacidos normales a término. *Eur J Pediatr.* 1985;144(2):186–90.
 180. Butel M-J, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, Ferraris L, et al. Conditions of Bifidobacterial Colonization in Preterm Infants: A Prospective Analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;44(5):577–82.
 181. Zhou Y, Shan G, Sodergren E, Weinstock G, Walker WA, Gregory KE. Longitudinal analysis of the premature infant intestinal microbiome prior to necrotizing enterocolitis: A case-control study. *PLoS One.* 2015;10(3):1–16.
 182. Underwood M-A, Gaerlan S, A. De-Leoz M-L, Dimapasoc L, Kalanetra K-M, Lemay D-G, et al. Human Milk Oligosaccharides in Premature Infants: Absorption, Excretion and Influence on the Intestinal Microbiota. *Pediatr Res.* 2016;78(6):670–7.
 183. Veereman-Wauters G, Staelens S, Van De Broek H, Plaskie K, Wesling F, Roger LC, et al. Physiological and bifidogenic effects of prebiotic supplements in infant formulae. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52(6):763–71.
 184. Fescina R, De-Mucio B, Martínez G, Díaz Rossello J, Serruya S, Mainero L, et al. Sistema informático perinatal, historia clínica perinatal y formularios complementarios. OMS, OPS. 2011. p. 1–108.

Anexos

Anexo 1: Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Efecto de la leche humana y lactancia mixta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal en neonatos pretérmino de un hospital de tercer nivel. Lima, 2017”.

Propósito y procedimientos

El objetivo de este estudio es: ***Determinar el efecto de la leche humana y lactancia mixta sobre el desarrollo de la microbiota intestinal en neonatos pretérmino de un hospital de tercer nivel.*** Este proyecto está siendo realizado por Jehovanna Lissette Flores de Valgas Velez, bajo la supervisión de la Licenciada Natali Huzco Rutti docente de la Universidad Peruana Unión.

Tipo de Intervención de Investigación

Esta investigación incluirá recolección de muestras de heces en dos tiempos diferentes (al nacimiento y a los 30 días de nacido).

Selección de participantes

Participan todos los neonatos pretérmino (<37 semanas) nacidos en el Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé.

Riesgos

No hay ningún riesgo físico, químico, biológico y psicológico; asociado con esta investigación.

Beneficios

Este estudio aportara con información relevante sobre el efecto del tipo de alimentación sobre el desarrollo de una microbiota intestinal. Llevando en el futuro a nuevos estudios en beneficio de los neonatos pretérmino.

Participación voluntaria

La participación en este estudio es completamente voluntaria y se conserva el derecho ante una respuesta negativa.

Duración

La investigación durará 30 días/ o 1 mes. Durante ese tiempo, será necesario que venga al hospital 2 días en dos ocasiones diferentes, por 20 min.

Confidencialidad

La información que recojamos para este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. La información acerca del paciente que se recogerá durante la investigación será puesta fuera de alcance y nadie sino los investigadores tendrán acceso a verla. Cualquier información acerca del paciente tendrá un número en vez de su nombre y solamente los investigadores sabrán cuál es su número.

Preguntas e información

Este proyecto no tiene ningún costo económico para el paciente en estudio.

En caso de preguntas acerca de mi consentimiento o acerca del estudio puedo comunicarme con:

**Jhovanna L. Flores De
Valgas V.**

Dirección: Ñaña, Km 19.
Carretera Central

Institución: Universidad Peruana
Unión

Teléfono: 972 473 587

e-mail: lissflores@upeu.edu.pe

Yo _____ identificada (o)
con N° de DNI _____ a los ___ días del mes de _____, 2017. He leído el
consentimiento y mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Como prueba de
mi consentimiento voluntario para participar en este estudio, firmo a continuación.

Firma

Anexo 2: Historia Clínica (184).

HISTORIA CLÍNICA N° 00			
DATOS DE LA MADRE Historia Clínica Hospitalaria _____		Peso Preg. _____ kg	Talla _____ cm
Nombre	Peso final _____ kg	Alfabeta SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	ANTECEDENTES Familiares / personales <input type="checkbox"/> TBC <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Hipertensión <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Preclampsia <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Eclampsia <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Cáncer <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Otra <input type="checkbox"/> Otra _____
Domicilio	ETNIA Blanca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Indígena <input type="checkbox"/> Mestiza <input type="checkbox"/> Otra <input type="checkbox"/>	Estudios Primaria <input type="checkbox"/> Secundaria <input type="checkbox"/> Universitaria <input type="checkbox"/> Ninguno <input type="checkbox"/>	
Nivel socioeconómico			
Teléfono			
Fecha de nacimiento/...../..... Edad			
DNI			
Estado civil Casada__ Unión estable__ Soltera__ Otro__			
DURANTE LA GESTACIÓN Fuma Act. Fuma Pas. Drogas Alcohol SI NO SI NO SI NO SI NO O O O O O O O O Violencia SI NO O O		OBSTETRICOS Partos <input type="text"/> Cesáreas <input type="text"/> Gestas Previas <input type="text"/> Abortos <input type="text"/> Nacidos muertos <input type="text"/> Muerto 1ºss <input type="text"/> Muertos >de 1º ss <input type="text"/> Nacidos vivos <input type="text"/>	Infecciones maternas durante la gestación _____ semana _____ semana Ingesta Fe SI NO Fولات SI NO O O O O
DATOS DEL RECIEN NACIDO		Historia Clínica Hospitalaria _____	
Fecha de Nacimiento...../...../..... Hora: _____ SEXO <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	Perímetro Cefálico _____ cm	INICIO DE PARTO Espontáneo <input type="checkbox"/> Cesárea <input type="checkbox"/> Inducido <input type="checkbox"/> Causa: _____	
Edad Gestacional FUM <input type="checkbox"/> ECO <input type="checkbox"/> ESTIMADA <input type="checkbox"/> CAPURRO <input type="checkbox"/>	NUTRICIÓN Parenteral SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Días _____ Inició días de vida _____	NACIMIENTO Múltiple <input type="checkbox"/> Único <input type="checkbox"/>	Estancia Hospitalaria Antibióticos si_ no_ Esteroides si_ no_ Cual: _____ Tiempo: _____
Peso al nacer _____ g. Longitud al nacer _____ cm.	Inicio de Alimentación Enteral Días de vida _____ NUTRICIÓN Enteral SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Nasogástrica SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Oral SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Días _____	TIPO DE ALIMENTACIÓN Leche Materna Exclusiva <input type="checkbox"/> Leche Humana <input type="checkbox"/> Pasteurizada Fórmula Infantil <input type="checkbox"/> Lactancia Materna Mixta <input type="checkbox"/>	Transfusiones SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> ¿Cuántas? _____ Ventilación Mecánica SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Días _____ Días de vida _____
Puntaje APGAR (min) 1º _____ 5º _____ Enfermedades Infecciosas Neonatales: _____	Leche Materna Numero de tomas _____ Volumen _____	Fórmula % de dilución _____ Numero de tomas _____ Volumen _____	Leche Humana Pasteurizada Numero de tomas _____ Volumen _____

Seguimiento: _____

Anexo 3: Primera fase, recolección del primer meconio.

PRIMERA FASE: LISTA DE RECOLECCIÓN DEL PRIMER MECONIO PARA CULTIVO MICROBIOLÓGICO							
Nº	Apellidos y Nombres del Neonato	Peso (Kg)	Fecha	Hora	Nº de deposición	Nombre y apellidos de la madre	Observaciones*
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							

*Uso de antibióticos, medicamentos, hora de la toma, etc.

Anexo 4: Selección de grupos de estudio.

SEGUNDA FASE: CODIFICACIÓN Y RECOLECCIÓN DE HECES.						
	Código	Apellidos y nombres del neonato	Peso (Kg)	Fecha	Hora	Observaciones
GRUPO DE ESTUDIO A LME	LME01					
	LME02					
	LME03					
	LME04					
	LME05					
	LME06					
	LME07					
GRUPO DE ESTUDIO B LHP	LHP01					
	LHP02					
	LHP03					
	LHP04					
	LHP05					
	LHP06					
	LHP07					
GRUPO DE ESTUDIO C FI	FI01					
	FI02					
	FI03					
	FI04					
	FI05					
	FI06					
	FI07					
GRUPO DE ESTUDIO D LMM	LMM01					
	LMM02					
	LMM03					
	LMM04					
	LMM05					
	LMM06					
	LMM07					

Anexo 5: Solicitud de la escuela profesional de nutrición.



Facultad de Ciencias de la Salud

Ñaña, 26 de Enero de 2017

Doctor
EDGARDO VÁSQUEZ PÉREZ
Director
Hospital Nacional Docente Madre Nifo San Bartolomé
Presente.-

Estimado doctor Vásquez:

Reciba usted un cordial saludo a nombre de la Escuela Profesional de Nutrición Humana de la Facultad de Ciencias de la Salud y el sincero deseo de mucho éxito en la delicada responsabilidad que viene desempeñando.

Como es de su conocimiento, nuestros bachilleres PRISCILA EUGENIA GUTIÉRREZ VELASCO y JEHOVANA LISSETTE FLORES DE VALGAS VELEZ, presentaron su proyecto de investigación, titulado: "Efecto del tipo de la leche materna, leche humana pasteurizada, fórmula infantil y lactancia mixta sobre la microbiota intestinal en neonatos pre término de un hospital de tercer nivel, 2017", en la institución que usted dignamente dirige.

Para la cual solicitamos autorización para la recolección de datos de la tesis en mención la cual fue aprobada y revisada por los dictaminadores asignados por la Escuela Profesional de Nutrición Humana de la Universidad Peruana Unión.

Segura de contar con su gentil ayuda en la preparación profesional de nuestros alumnos, hago propicia la oportunidad para hacerle llegar las muestras de mi especial estima y consideración.

Atentamente,


María Alina Miranda Flores
DIRECTORA
Escuela Profesional de Nutrición Humana
Facultad de Ciencias de la Salud



1276
1276

Anexo 6: Aprobación del comité de ética del Hospital.



PERU

Ministerio de
Salud

Hospital Nacional Docente
Madre Niño "San Bartolomé"

Oficina de Apoyo a la
Docencia e Investigación

"AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"

Lima, 12 de abril de 2017

OFICIO N° 0279-2017-OADI-HONADOMANI-SB

JEHOVANNA LISSETTE FLORES DE VALGAS VELEZ

Investigadora Principal

Presente. -

Exp. N° 01276-17

Tenemos el agrado de dirigirnos a usted para saludarle cordialmente y en atención a su solicitud de revisión y aprobación del Proyecto de Investigación titulado:

"EFECTO DE LA LECHE MATERNA, LECHE HUMANA PASTEURIZADA, FORMULA INFANTIL Y LACTANCIA MIXTA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LOS NEONATOS PRE-TÉRMINO DE UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL, 2017.

Al respecto se informa lo siguiente:

- Las observaciones han sido levantadas correctamente.
- El planteamiento del estudio y la metodología, incluyendo el análisis estadístico propuesto para la evaluación de los resultados son apropiados para el proyecto.

Conclusión:

El proyecto con Exp.N°01276-17, Es aprobado por el Comité de Ética Institucional e Investigación de manera expedita.

Nos es propicia la oportunidad para renovar los sentimientos de nuestra mayor consideración.

Atentamente.

INSTITUTO DE GESTIÓN DE SERVICIO DE SALUD
HONADOMANI SAN BARTOLOMÉ

Dr. EDY VERA LOYOLA
Jefe de la Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación

EVL/ama
cc.archivo

Anexo 7: Memorando de autorización para ingreso a UCIN.



PERU

Ministerio
de Salud

Instituto de Gestión de
Servicios de Salud

Hospital Nacional Madre Niña
SAN BARTOLOMÉ

Servicio de Cuidados
Críticos del Neonato



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

MEMORANDO N° 033.2017.JSCCN.HONADOMANI.SB

A : MED. WILREDO INGAR ARMILLO,
Jefe del Servicio de Neonatología.

ASUNTO : Proyecto de Investigación del Banco de Leche.

REFERENCIA : MEMORANDO N° 017-2017-JSNEO-DP-HONADOMANI-SB

FECHA : Lima, 17 de Abril 2017.

Reciba mediante la presente mi saludo cordial, visto al documento de la referencia se otorga el permiso correspondiente para la realización del estudio que será ejecutado con personal propio, teniendo en cuenta la capacidad de aforo del servicio y cumpliendo con las normas de bioseguridad pertinentes, sin interferir en el normal desarrollo de las actividades asistenciales.

Sin otro particular, me despido de usted.

Atentamente.


MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO DE GESTIÓN DE SERVICIOS DE SALUD
HONADOMANI "SAN BARTOLOMÉ"
Servicio de Cuidados Críticos del Neonato
CELSO HUANCAM HUAYPAR
Médico Jefe de Servicio
CNP. 24351 RNE. 10039

DHH/mgg
C/c: Artila

Anexo 8: Modelo de resultados de Laboratorio.



INFORME DE ENSAYO N° BIO-2584-17

EMPRESA: LISSETTE FLORES DE VALGAS VELEZ

N° FICHA: 1023-17

DATOS DE LA MUESTRA:

Muestra	Código Muestra	Fecha de toma	Hora de toma	Cant. Muestra
Heces de BB – LMM07	1023-001	26/06/2017	12:05	1
Heces de BB – LMM08	1023-002	26/06/2017	12:40	1

TIPO DE ENSAYO: Análisis Microbiológico.

FECHA DE RECEPCION: 27-06-17

FECHA DE ANALISIS: 28-06-17

FECHA DE EMISION: 06-07-17

RESULTADOS :

Identificación Muestra /Cliente	Código de Muestra	Análisis Microbiológicos (UFC/g)					
		<i>E.coli</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Lactococcus sp</i>	<i>Staphylococcus ap</i>	<i>Clostridium sp</i>
Heces de BB – LMM07	1023-001	< 10	24 x 10 ⁵	15 x 10 ⁵	< 10	92 x 10 ⁴	< 10
Heces de BB – LMM08	1023-002	< 10	40 x 10 ⁴	30 x 10 ⁶	< 10	29 x 10 ⁶	< 10

Nota: < 10 = 0 UFC/g

Nota:

- 1.- El informe de Ensayo solo es válido para los ítems ensayados y la cantidad recibida.
- 2.- Prohibido la reproducción total o parcial del documento sin autorización de BIOSERVICE S.R.L.
- 3.- Los resultados de ensayos no deben ser usados como una certificación de Conformidad o como certificado del Sistema de Calidad de quien lo produce.
- 4.- Toda muestra biológica será eliminada posterior a su procesamiento.
- 5.- Estos resultados son de uso exclusivo del cliente y no pueden ser utilizados para controversias de tipo legal con terceros.
- 6.- Muestra proporcionada por el cliente.


 M.V. Arnaldo Alvarado S.
 Director Técnico
 CMVP 2415

Av. Nicolás de Piérola 1228 - V.M.T. - Lima 35 - Perú Telf.: 01 281 2943 Telefax: 01 281 2390 Entel: 998 129 915
 Laboratorio: diagnostico@bioservice.com.pe Ventas: ventas@bioservice.com.pe www.bioservice.com.pe

Anexo 9: Protocolo de laboratorio para E. coli y bacterias coliformes.

	INSTRUCTIVO	Código: IN-089
		Versión: 00
	ENUMERACION DE E COLI Y BACTERIAS COLIFORMES	Fecha: 15/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 1 de 7
	Respons.: AADT/RC/RD	

1. OBJETIVO:

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de bacterias Coliformes y e coli en muestras de alimentos.

2. ALCANCE:

Este procedimiento es aplicado a todas aquellas muestras con sospecha de carga fecal humana, analizadas como Indicadores de contaminación.

3. DEFINICIONES y ABREVIATURAS

Coliformes totales.- Indicadores de contaminación fecal pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas. El grupo Coliformes está formado por los siguientes géneros: Escherichia coli, Klebsiella sp, Enterobacter sp, Citrobacter sp.

4.- RESPONSABILIDAD: Analistas de laboratorio

5. REFERENCIA

- International Commission on Microbial Specifications of Foods (ICMSF)
- FDA methods analytic bacteriologica

6. MATERIALES REACTIVOS Y EQUIPOS

- Caldo MRS
- Agar MRS
- Agar bilactosa rojo neutro cristal violeta VRBA
- Agar Levine
- Agua peptonada 0.1 %
- Anillas en forma de L
- Tubos falcón 15 ml
- Frascos shot tapa rosca
- Micropipetas de 1 ml, 100 ul, 10 ml y los tips correspondientes.
- Vortex
- Trituradora o blender
- Incubadora, 35 ± 1.0 ° C

	INSTRUCTIVO	Código: IN-089
		Versión: 00
	ENUMERACION DE E COLI Y BACTERIAS COLIFORMES	Fecha: 15/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 2 de 7
		Respons.: AA/DT/RC/RD

- Contador de colonias

7. PROCEDIMIENTO

- 7.1. Diluir la muestra en la relación 1:10. Pesar o medir al menos 10g o 10ml representativos de la muestra total (triturar, moer o picar si es necesario) y añadirle un volumen de agua peptonada 0.1% (diluyente) de 90 ml (o 9 veces la muestra), Agite todas las suspensiones 25 veces en 30 cm de arco o mezcla vortex durante 7 s.
- 7.2. Preparación de las demás diluciones: Mezclar el contenido del frasco por agitación manual o mecánica por 3 minutos y pipetear, por duplicado alícuotas de 1 ml en tubos distintos conteniendo 9 ml de agua peptonada de la siguiente manera: Mezclar cuidadosamente aspirando 10 veces con una pipeta estéril y transferir 1 ml a otro tubo conteniendo 9 ml de diluyente, y mezclar utilizando una nueva pipeta. Repetir este paso hasta obtener el número necesario de diluciones, la concentración disminuirá 10 veces en cada dilución sucesiva.
- 7.3. Tomar una alícuota de 0.1 ml de la dilución más elevada y depositarla en la superficie del agar, realizar por duplicado. Repetir esta operación con cada dilución hasta llegar a la más concentrada utilizando siempre la misma pipeta que se vaciará y llenará tres veces antes de transferir a cada placa los 0.1 ml o con una pipeta o tip nuevo para cada dilución. Deben sembrarse por lo menos tres diluciones aun en el caso de que se conozca el número aproximado de microorganismos en la muestra.
- 7.4. Extender las alícuotas de 0.1 ml sobre la superficie del agar tan pronto como sea posible, utilizando las varillas de vidrio en forma de bastón (emplear una varilla de vidrio para cada placa). Dejar secar las superficies de las placas.
- 7.5. Incubar las placas invertidas durante 18 a 24 horas a 35°C
- 7.6. Lectura: Elegir las placas correspondientes a una dilución, que presente entre 30 y 300 colonias, se consideran únicamente como pertenecientes a las bacterias coliformes las colonias de color rojo púrpura de 0.5 mm o más de diámetro y rodeadas por una zona de ácidos biliares precipitados.

	INSTRUCTIVO	Código: IN-089
		Versión: 00
	ENUMERACION DE E COLI Y BACTERIAS COLIFORMES	Fecha: 15/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 3 de 7
Respons.: AA/DT/RC/RD		

7.7. Si se va a realizar la identificación de los Coliformes, realizar las pruebas bioquímicas correspondientes.

7.8. Si se va a realizar la identificación de las E.coli se usa el agar EMB o Levine, las colonias tienen un diámetro de 2-3 mm, un brillo metálico verde reflejado hacia a la Luz, colonias también pueden ser oscura o incluso negro en luz transmitida.

7.9. Para confirmar que las colonias son Coliformes, elija al menos 10 colonias representativas y transfiera cada una a un tubo de caldo BGLB. Incubar los tubos a 35 ° C. Examine a las 24 y 48 h para la producción de gas.

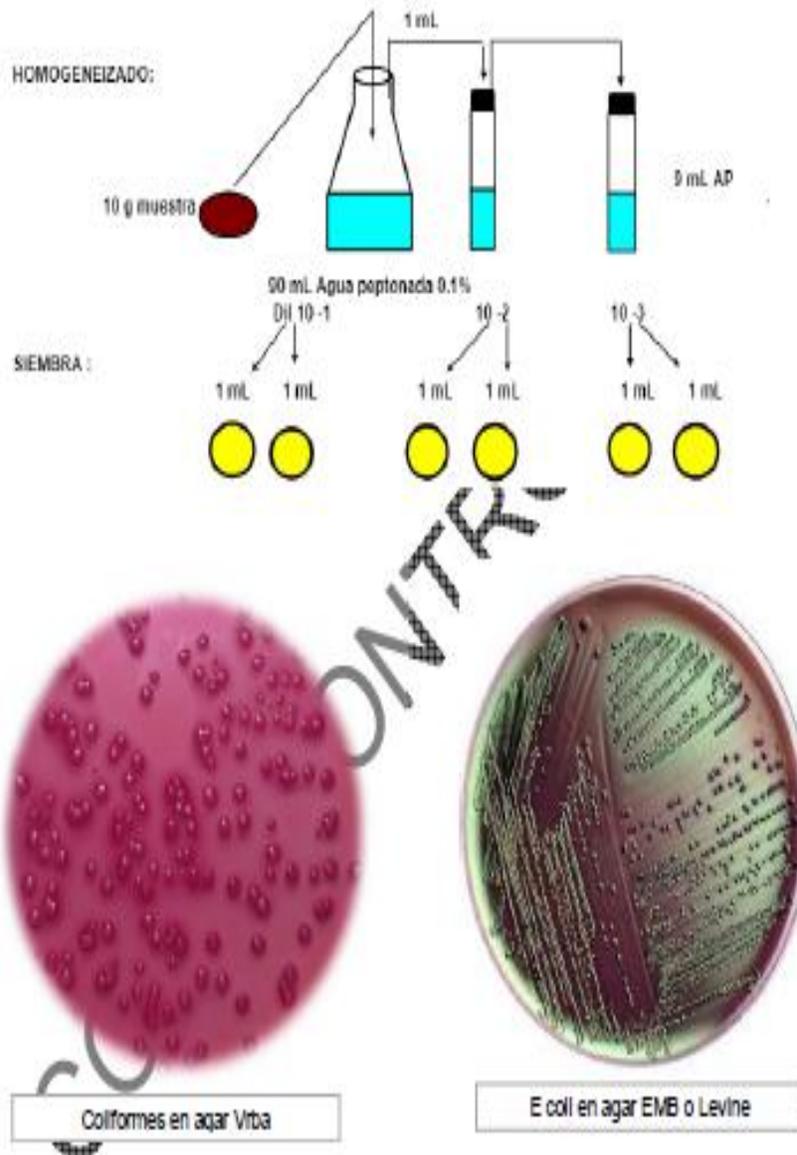
7.10. Expresión de resultados se expresan en UFC/ ml o gr. Contar todas las colonias de cada placa utilizando el contador de colonias. Hallar la media aritmética de los dos valores y multiplicarla por el factor de dilución (la Inversa de la dilución cuyas placas han sido seleccionadas). Dar el valor obtenido como el recuento estándar en placa.

7.11. Cuando no se encuentran colonias en las placas correspondientes a la dilución más concentrada, expresar el recuento como inferior a (-) 1 multiplicado por el factor de dilución más concentrada.

COPIA CONTROLADA

	INSTRUCTIVO	Código: IN-089
	ENUMERACION DE E COLI Y BACTERIAS COLIFORMES	Versión: 00 Fecha: 15/03/2016 Revisión: 001 Págs.: 4 de 7 Respons.: AADT/RC/RD

8. ANEXOS



	INSTRUCTIVO	Código: IN-089
		Versión: 00
	ENUMERACION DE E COLI Y BACTERIAS COLIFORMES	Fecha: 15/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 7 de 7
		Respons.: A/DT/RC/RD

ELABORACION: S. Lovón	REVISION: R.Salazar	APROBACION: A. Alvarado
FECHA: 20-04-16	FECHA: 20-04-16	FECHA: 20-04-16
FIRMA: 	FIRMA: 	FIRMA: 

COPIA CONTRA FIRMADA

Anexo 10: Protocolo de laboratorio para bacterias ácido lácticas (BAL).

	INSTRUCTIVO	Código: IN-152
		Versión: 00
	RECuento DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	Fecha: 20/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 1 de 9
		Respons.: AAVT/RC/RD

1. OBJETIVO:

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de microorganismos de las denominadas bacterias ácidos lácticos.

2. ALCANCE:

Este procedimiento es aplicado a todas aquellas muestras con potencial probiótico.

3. DEFINICIONES y ABREVIATURAS

- Bacterias ácido lácticas o cultivos lácticos comprenden un conjunto de bacterias fermentadoras y productoras de ácido láctico, empleadas en la industria para darle ciertas cualidades a los alimentos y protegerlos contra la acción de otros organismos dañinos.

4.- RESPONSABILIDAD: Analistas de laboratorio

5. REFERENCIA

- ISO 7888:2008 (IDF 117:2008) Yogurt – Enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37 °C.
- ISO/DIS 28981/IDF 220 Milk products – Enumeration of presumptive Bifidobacteria-Colony count technique at 37°C.

6. MATERIALES REACTIVOS Y EQUIPOS

- Caldo MRS
- Agar MRS
- Agar TC y MCF
- Agua peptonada
- Micropipetas de 1 ml, 100 ul
- Vortex o centrifuga
- Estufa de 37 °C
- Campanas de Anaerobiosis
- Sachet generador de anaerobiosis
- Contador de colonias
- Tubos falcón 15 ml

	INSTRUCTIVO	Código: IN-162
		Versión: 00
	RECuento DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	Fecha: 20/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 2 de 9
Respons.: AA/DT/RC/RD		

6. PROCEDIMIENTO

1. A partir de la muestra obtenida se llevó a cabo el pre-enriquecimiento a modo de activación paso opcional (dependiendo de la muestra).
2. Para ello, se pesa 10 g o 10ml o su equivalente en proporción 1:10 representativa de la muestra y añádlle en un volumen de 90 ml caldo MRS, homogenizar a 2.000 rpm x 3 minutos dejar incubar por 24 hr a 37C° en atmosfera microaerofila con 5% CO2.
3. Preparación las diluciones: Tomar una alícuota de 1 ml en tubos distintos conteniendo 9 ml de agua peptonada mezclar cuidadosamente aspirando 10 veces con una pipeta estéril y transferir 1 ml a otro tubo conteniendo 9 ml de diluyente, y mezclar utilizando una nueva pipeta. Repetir este paso hasta obtener el número necesario de diluciones. La concentración disminuirá 10 veces en cada dilución sucesiva.
4. Tomar una alícuota de 0.1 ml de la dilución más elevada y depositarla en la superficie del agar MRS para determinar la presencia de BAL (Lactobacillus sp y Lactococcus sp, Streptococcus sp, Leuconostoc sp, Pediococcus sp), tomar otra alícuota y depositarla en agar selectivo TOS-MUP para el aislamiento de Bifidobacterium sp, se realiza por duplicado. Repetir esta operación con cada dilución hasta llegar a la más concentrada utilizando siempre la misma pipeta que se vaciará y llenará tres veces antes de transferir a cada placa los 0.1 ml o con otra pipeta o tip nuevo para cada dilución.
5. Extender las alícuotas de 0.1 ml sobre la superficie del agar tan pronto como sea posible, utilizando las varillas de vidrio en forma de bastón (emplear una varilla de vidrio para cada placa). Dejar secar las superficies de las placas durante 15 minutos.
6. Incubar las placas de agar MRS invertidas durante 72 hr a 37°C en atmosfera microaerofila con 5% de CO2 y las placas de agar TOS-MUP invertidas durante 72 hr a 37°C en atmosfera anaerobia, usando los sachet de anaerocult.
7. Lectura: Elegir las placas correspondientes a una dilución, que presente preferiblemente menos de 150 colonias características

	INSTRUCTIVO	Código: IN-162
		Versión: 00
	RECuento DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	Fecha: 20/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 3 de 9 Respons.: AA/DT/RC/RD

8. Los resultados se expresan en UFC/ ml o gr. y se efectúa multiplicando el número de colonias contadas en cada dilución de las placas seleccionadas, por el factor de dilución correspondiente.

9. Para realizar la identificación correspondiente se seleccionan las colonias características de cada agar por ejemplo para el *Lactobacillus* sp las colonias blancas presentan un aspecto circular, ligera elevación convexas y de borde entero, a la tinción Gram bacilos gram positivos largos y cortos algunos curvos, para los *Bifidobacterium* sp, colonias crema o blancas olor ácido, a la tinción gram bacilos gram positivos pleomórficos se encuentran individuales en cadenas o grupos.

10. Se realiza la bioquímica básica para las colonias seleccionadas.

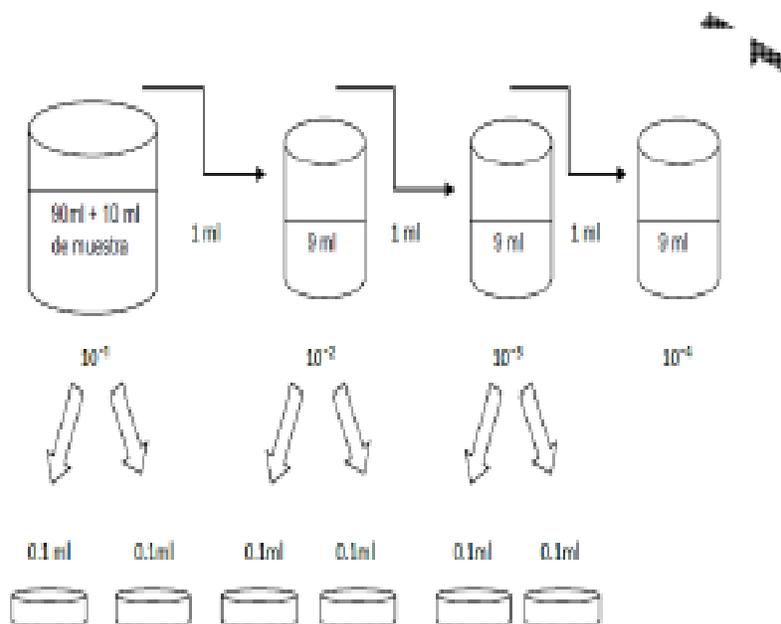
Cuadro comparativo

	Agar selectivo	Atmosfera	Catalasa	Oxidasa	Nitritos	TSI	S	I	M
<i>Lactobacillus</i> sp	MRS	Microaerofilia	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bifidobacterium</i> sp	TOS-MUP	Anaerobia	-	-	-	+	-	-	-

	INSTRUCTIVO	Código: IN-152
		Versión: 00
	RECuento DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	Fecha: 20/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 4 de 9
		Respons.: AADT/RC/RD

7. ANEXOS

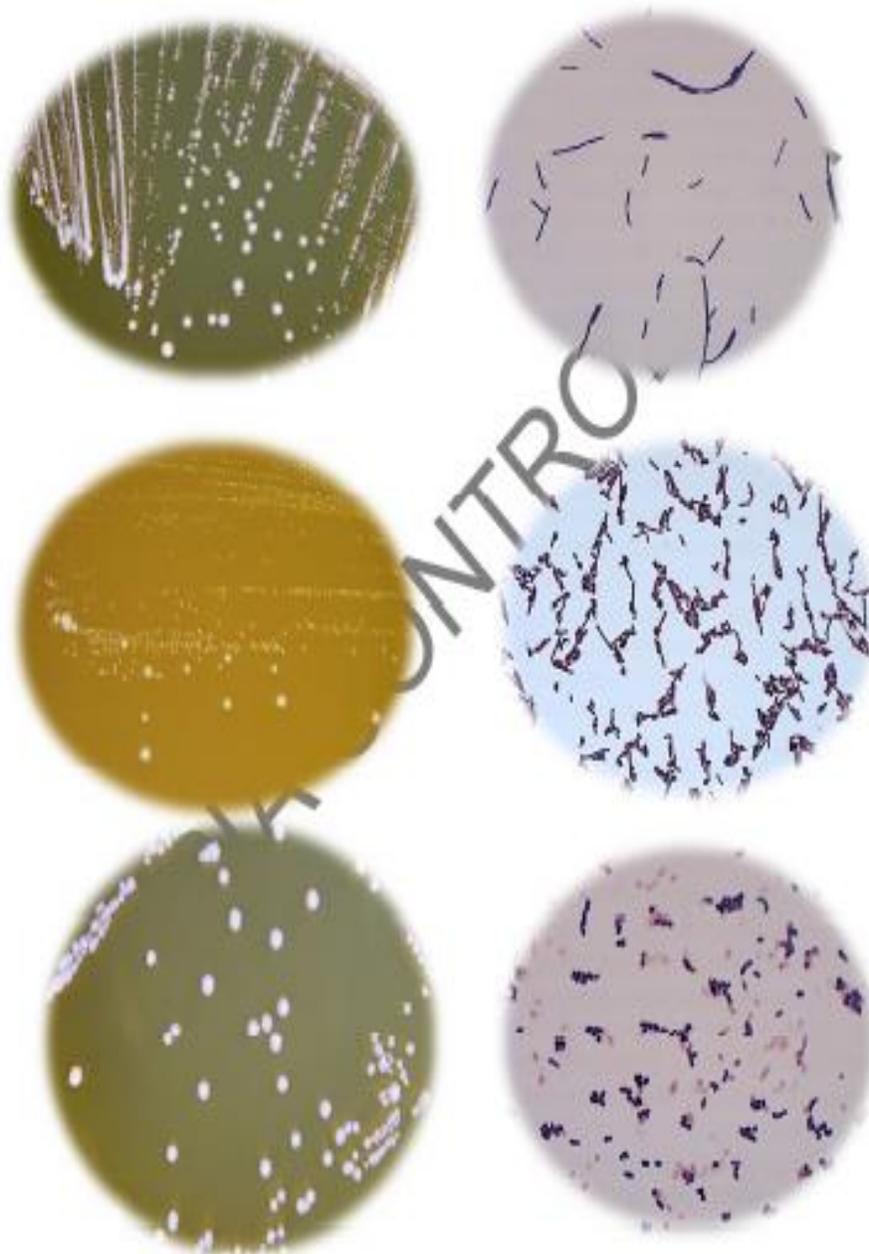
PROCEDIMIENTO PARA HACER LAS DILUCIONES



COPIA

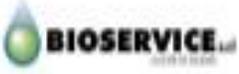
	INSTRUCTIVO	Código: IN-162
		Versión: 00
	RECuento DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	Fecha: 20/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 5 de 9
	Respons.: AA/OT/RC/RD	

FOTOS LACTOBACILLUS

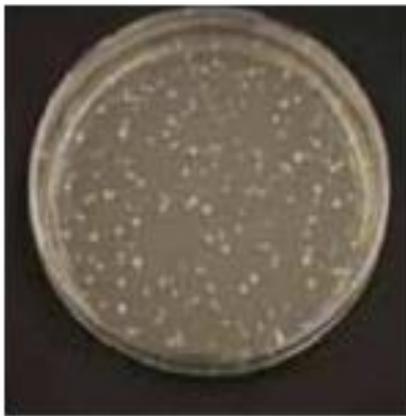


	INSTRUCTIVO	Código: IN-162
		Versión: 00
	RECuento DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	Fecha: 20/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 6 de 9
	Respons.: AAOT/RC/RD	



	INSTRUCTIVO	Código: IN-162
		Versión: 00
	RECuento DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	Fecha: 20/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 7 de 9
	Respons.: AA/DT/RC/RD	

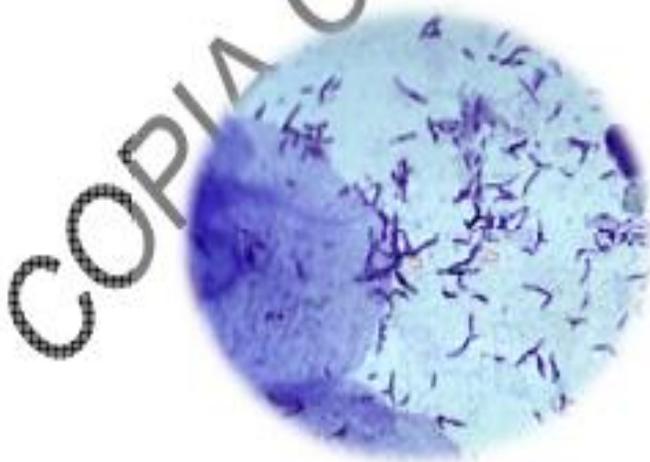
FOTOS BIFIDOBACTERIUM



Bifidobacterium longum
ATCC 15707



Bifidobacterium breve
ATCC 15700



	INSTRUCTIVO	Código: IN-162
		Versión: 00
	RECUESTO DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	Fecha: 20/03/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 9 de 9
	Respons.: AAOT/RC/RD	

ELABORACION: S. Lovón	REVISION: R. Salazar	APROBACION: A. Alvarado
FECHA: 20-04-16	FECHA: 20-04-16	FECHA: 20-04-16
FIRMA: 	FIRMA: 	FIRMA: 

Anexo 11: Protocolo de laboratorio para *Clostridium*.

	INSTRUCTIVO	Código: IN-114
		Versión: 00
	RECuento DE CLOSTRIDIUM PERFRINGES	Fecha: 02/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 1 de 9
		Respons.: AA/DT/RC/RD

1. OBJETIVO:

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de *Clostridium perfringens*.

2. ALCANCE:

Este procedimiento es aplicado diferentes tipos de matrices.

3. DEFINICIONES y ABREVIATURAS

- *Clostridium perfringens* es capaz de reducir los sulfitos a sulfuro y en presencia de Fe se forma Sulfuro ferroso y por tanto las colonias las veremos de color negro, además precipita la lecitina de la yema de huevo, por lo que se observa un halo de precipitación alrededor de la colonia

4.- RESPONSABILIDAD: Analistas de laboratorio

5. REFERENCIA

- Food and Drug Administration "Bacteriological Analytical Manual online carpeta 16.

6. MATERIALES REACTIVOS Y EQUIPOS

- Agar triptosa-sulfito-cicloserina (TSC)
- Emulsión de yema de huevo, 50%
- Medio de fitocolato (fluido)
- Medio de leche de hierro
- Medio de leche-gelatina
- Medio de esporulación AE
- Agua peptonada
- Reactivos de detección de nitrato
- Micropipetas de 1 ml, 100 ul, 10 ml.
- Vortex o centrifuga
- Estufa de 35 °C
- Licuadora
- Baño maria 46 ± 0.5 ° C

	INSTRUCTIVO	Código: IN-114
		Versión: 00
	RECuento DE CLOSTRIDIUM PERFRINGES	Fecha: 02/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 2 de 9
	Respons.: AA/DT/RC/RD	

- Contador de colonias
- Campanas de Anaerobiosis
- Sachet generador de anaerobiosis
- Tubos falcón 15 ml

6. PROCEDIMIENTO

- 6.1. Pesar asepticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de lituadora si la muestra se encontrara sin moler o trabajar directamente en frascos schott si la muestra se encontrara en polvo y adicionar 225 ml del medio de agua peptonada (dilución 1:10); homogenizar 1 -2 minutos a baja velocidad, obtenga homogenizado uniforme con la menor aireación posible.
- 6.2. Realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-4} transfiriendo 10 ml a frascos con 90 ml de agua peptonada, mezclar cada dilución agitando suavemente antes de cada transferencia.
- 6.3. Vierta 6-7 ml de agar TSC sin yema de huevo en cada una de las diez placas de Petri y exténdalas uniformemente en el fondo girando rápidamente el plato. Cuando el agar se haya solidificado, rotule las placas y transfiera asepticamente 1 ml de cada dilución de homogenizado al centro de las placas de agar duplicadas. Vierta 15 ml adicionales de agar TSC sin yema de huevo en el plato y mezcle con inóculo girando suavemente el plato
- 6.4. Método alternativo. Sembrar 0.1 ml de cada dilución en la superficie de agar TSC con emulsión de yema de huevo, empleando una asa de vidrio. Dejar que el medio absorba el inóculo por 3 minutos y cubrir las placas con 10 ml de agar TSC sin emulsión de yema de huevo. Cuando el medio haya solidificado, colocar las placas con la tapa hacia arriba en la jarra de anaerobiosis con un sachet generador de anaerobiosis e Incubar por 20 a 24 h. a 35°C
- 6.5. Después de la incubación, retire las placas del recipiente anaeróbico y seleccione aquellas que contienen 20-200 colonias negras para contar. *C. perfringens* colonias en medio de yema de huevo son negras con una zona blanca opaca de 2-4 mm que rodea la colonia como resultado de la actividad de la lecitinasa. cuente las colonias negras y calcule el número de células de clostridia / g de alimento. Guarde las placas para las pruebas de identificación.

	INSTRUCTIVO	Código: IN-114
		Versión: 00
	RECuento DE CLOSTRIDIUM PERFRINGES	Fecha: 02/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 3 de 9
	Respons.: AA/DT/RC/RD	

6.6. Prueba presuntiva:

- 6.6.1. **Test presuntivo caldo tioglicolato.** - Seleccionar 10 colonias típicas de Clostridios del agar TSC e Inocular cada una en un tubo de medio fluido tioglicolato (el cual debe ser calentado por 10 minutos en baño maría en un tubo tapa rosca y después enfriado inmediatamente en agua corriente antes de ser inoculado, Incubar a 35 °C por 18-24 h. Examinar cada tubo por tinción gram y verificar su pureza e Incubar en anaerobiosis por 24 h. a 35°C.

Si existe evidencia de contaminación traspase cultivo(s) contaminados mediante siembra en estría, a agar TSC con yema de huevo e Incube en jarra anaeróbica por 24 horas a 35° C, las colonias en superficie son de color gris amarillentas, con zona opaca de 2 a 4 mm producto de la actividad de la lecitinasa.

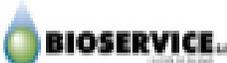
- 6.6.2. **Test presuntivo en medio leche-hierro.** - Inocular el medio hierro-leche modificado con 1 ml de cultivo del medio tioglicolato (en crecimiento activo) e Incubar a 46°C en baño maría por 2 horas. Verificar la presencia de una fermentación turbulenta, caracterizada por una rápida coagulación de la leche seguida por la formación de flocos en la superficie del medio. Retirar los tubos positivos. Los tubos negativos pueden dejarse hasta por 5 horas, los tubos que producen la fermentación en más de 6 horas deben ser confirmados como *C.perfringes*

6.7. Pruebas confirmativas:

- 6.7.1. **Agar nitrato-movilidad (tamponado) y Medio lactosa gelatina.** - Repicar con asa de 2 mm de un cultivo puro del caldo tioglicolato o de colonia aislada en agar TSC, pinchar por picadura el medio nitrato movilidad y el medio lactosa gelatina Incubar a 35 ° C por 24 horas.



Lectura en medio Lactosa-Gelatina Observar cambio de color rojo a amarillo debido a la producción de ácido y gas. Incubar a 5° C por 1 hora y examine la licuación de gelatina. Si el medio presenta gel Incube 24h a 35° C y examine posteriormente licuefacción.

	INSTRUCTIVO	Código: IN-114
		Versión: 00
	RECUESTO DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	Fecha: 02/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 4 de 9
Respons.: AAVT/RC/RD		

Lectura en medio Nitrato-Movilidad.- Examine los tubos, si el desarrollo está a largo de la línea de Inoculación, entonces se trata de cepa Inmóvil (*C. perfringens*); mientras que cepas móviles producen crecimiento difuso a lo largo de la línea de Inoculación.

C. perfringens reduce nitratos a nitritos lo que se evidencia al añadir 0,5 mL del reactivo A y 0,2 mL del reactivo B, el desarrollo de un color violeta dentro de 5 minutos indica presencia de nitritos. Si no se desarrolla color agregar polvos de zinc y si sigue incoloro indica que los nitratos fueron completamente reducidos. Si después de agregar polvos de zinc ocurre coloración, indica que los nitratos no fueron.

6.7.2. **Caldo de esporulación.-** Inocular caldo de esporulación con 1 mL de cultivo en tioglicolato, incubar los tubos sembrados a 35° C ± 1° C por 24 horas, cumplido este periodo, sacar los tubos de la Incubadora. Del caldo de esporulación realizar Gram y examine la presencia de esporas. Mantener a 4° C si nuevas pruebas se requieren.

6.7.3. **Subcultura aislados que no cumplen todos los criterios para *C. perfringens* en medio fluido de tioglicolato.** Incubar 24 ha 35 ° C, preparar la tinción de Gram y examinar la pureza y la morfología celular típica.



RESULTADOS CONFIRMATIVOS para *Clostridium perfringens*

Agar 8FP - T8C	Colonias negras con zona precipitación
GRAM	Bacilo Gram positivo, esporulado
Agar Nitrato Movilidad	Color rojo por reducción de nitrato a nitrito. Desarrollo sólo en la línea de siembra, es inmóvil.
Medio Lactosa Gelatina	Color amarillo por fermentación de la lactosa y gas Permanece líquido después de estar durante 1 hora en refrigeración, por hidrólisis de la gelatina.
Se deben cumplir todas estas pruebas para confirmar las colonias en estudio como <i>C. perfringens</i>	

	INSTRUCTIVO	Código: IN-114
		Versión: 00
	RECuento DE CLOSTRIDIUM PERFRINGES	Fecha: 02/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 5 de 9
		Respons.: AA/DT/RC/RD

6.8. Pruebas adicionales.- Cuando se presentan pruebas dudosas.

Inocular 0,1 mL de cultivo puro del caldo tioglicolato a un tubo que contiene medio de fermentación de Spray con salicina al 1%, un tubo con rafnosa al 1% y un tubo sin carbohidrato, Incubar 24 horas a 35° C, en el medio con salicina observar ácido y gas, el ácido se examina transfiriendo cultivo con asa de 2 mm a un papel de prueba al azul de bromotimol. La ausencia de color o el desarrollo de un ligero color verde indica que el ácido se ha producido .

Alternativamente transfiera 1,0 mL del cultivo a una placa añada 1 ó 2 gotas de azul de bromotimol al 0,04%. Un verde suave o color amarillo indica que el ácido se ha producido, Incubar por 48 horas y realice nuevamente el test si es necesario.

Salicina es rápidamente fermentada con producción de gas por especies similares de Clostridium pero no es fermentada por C. perfringens, la producción de ácido a partir de rafnosa es producida por C. perfringens dentro de 4 días pero no es producida por otras especies similares. Un ligero cambio de pH puede ocurrir en el tubo sin carbohidratos.

6.9. Cultivo de esporulación y producción de Enterotoxina.- Utilizar caldo tioglicolato o cooked meat Incubar por 24 horas a 35° C, seguido por una Incubación a temperatura ambiente por 24 horas, para subcultivos para esporulación y producción enterotoxina mezclar el cultivo de cooked meat con cortex y transferir 0,5 mL de la mezcla a cada uno de los 2 tubos conteniendo 10 mL de medio tioglicolato, calentar un tubo en baño de agua a 75° C por 10 minutos. Luego incubar a 35° C por 18 horas, Incubar el segundo tubo a 35° C por 4 horas y use este cultivo para Inocular el medio AE de esporulación modificado o medio de esporulación de Duncan-Strong, Incubar a 35° C por 18-24 horas en Jara de anaerobiosis, verificar las esporas usando un microscopio de contraste de fase o por examen de frotis tenido.

Se considera buena esporulación a un valor > 5 esporas por campo, centrifugar una porción de cultivo de esporulación por 15 minuto a 10.000 x g y del sobrenadante realice test de toxina por RPLA.

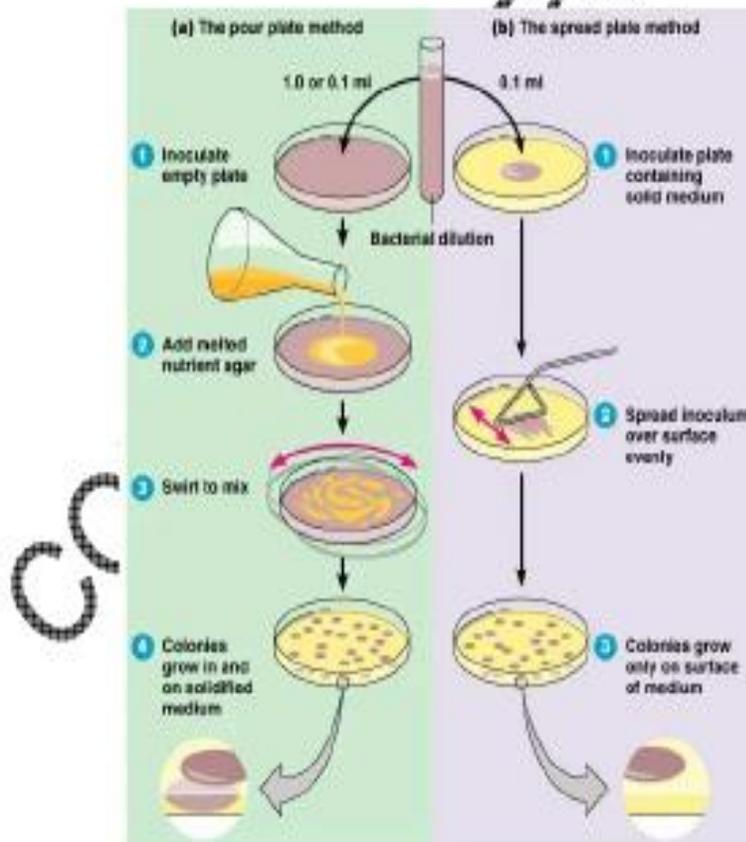
6.10. Cálculo y Expresión de resultados.- calcular el número de unidades formadoras de colonias por g de muestra. El recuento confirmado se obtiene mediante la siguiente fórmula:

	INSTRUCTIVO	Código: IN-114
		Versión: 00
	RECuento DE CLOSTRIDIUM PERFRINGES	Fecha: 02/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 6 de 9
		Respons.: AA/DT/RC/RD

$$\text{Recuento Confirmado} = \text{Promedio de 3to. Plasmático} \times \frac{\text{N}^{\circ} \text{ colonias confirmadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ colonias sembradas a confirmación}}$$

Ejemplo: Si el recuento promedio de placa de 10^{-4} dilución fue de 85, y 8 de 10 colonias sembradas fueron confirmados como *C. perfringens*, el número de *C. perfringens* cells / g frescos es $85 \times (8/10) \times 10,000 = 680,000$. NOTA: El factor de dilución con placas que contienen yema de huevo es diez veces más alto que el de la dilución de muestra porque solo se platearon 0.1 ml.

7. ANEXO



	INSTRUCTIVO	Código: IN-114
		Versión: 00
	RECuento DE CLOSTRIDIUM PERFRINGES	Fecha: 02/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 7 de 9
	Respons.: AA/OT/RC/RD	

FOTOS



	INSTRUCTIVO	Código: IN-114
		Versión: 00
	RECUENTO DE CLOSTRIDIUM PERFRINGES	Fecha: 02/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 9 de 9
	Respons.: AAJDT/RC/RD	

ELABORACION: S. Lovén	REVISION: R. Salazar	APROBACION: A. Alvarado
FECHA: 25-04-16	FECHA: 25-04-16	FECHA: 25-04-16
FIRMA: 	FIRMA: 	FIRMA: 

COPIA CONTROLADA

Anexo 12: Protocolo de laboratorio para *Staphylococcus*.

	INSTRUCTIVO	Código: IN-128
		Versión: 00
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Fecha: 15/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 1 de 11
		Respons.: AA/DT/RC/RD

1. OBJETIVO:

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento en placa de *staphylococcus* sp en muestras de alimentos.

2. ALCANCE:

Este procedimiento se aplica para realizar el recuento y la confirmación de *Staphylococcus* coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies) por técnica de recuento de colonias en placa en diferentes tipos de muestras.

3. DEFINICIONES y ABREVIATURAS

- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).- es la especie más virulenta del género que contribuyen para producir infecciones y enfermedad.
- Coagulasa positiva.- Estrechamente relacionada con *S. aureus*, puede revestir su superficie con fibrina al entrar en contacto con la sangre siendo capaz de resistir la fagocitosis haciendo esta bacteria tenga un factor de virulencia mayor.
- *Termonucleasa*.- enzima que se utiliza para determinar la capacidad de un organismo para hidrolizar el ácido desoxirribonucleico. Para detectar esta enzima, primero los organismos son destruidos por el calor y entonces la DNasa libre reacciona con el medio.

4.- RESPONSABILIDAD: Analistas de laboratorio

5. REFERENCIA

- ISO 6888-1:1999, Método horizontal para la enumeración de *Staphylococcus* coagulasa positiva, *Staphylococcus aureus* y otras especies.

6. MATERIALES REACTIVOS Y EQUIPOS

- Caldo cerebro, corazón, infusión (caldo BHI)
- Agar Baird Parker
- Agar Manitol salado
- Agua peptonada
- Plasma de conejo

	INSTRUCTIVO	Código: IN-128
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Versión: 00
Fecha: 15/04/2015		
Revisión: 001		
Págs.: 2 de 11		
		Respons.: AA/DT/RC/RD

- Micropipetas de 1 ml, 2 ml y 10 ml de capacidad
- Vortex o centrifuga
- Estufa de 35°C ± 1°C o 37°C ± 1°C
- Contador de colonias
- Tubos falcón 15 ml
- Frascos shot tapa rosca
- Espátula de Drigalsky

6. PROCEDIMIENTO

- 6.1. Diluir la muestra en la relación 1:10. Pesar o medir al menos 10g o 10ml representativos de la muestra total (triturar, moler o picar si es necesario) y añadirle un volumen de agua peptonada 0.1% (diluyente) de 90 ml (o 9 veces la muestra), dilución (10⁻¹), homogeneizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento.
- 6.2. Preparación de las demás diluciones: Mezclar el contenido del frasco por agitación manual o mecánica y pipetear, por duplicado alcuotas de 1 ml en tubos distintos conteniendo 9 ml de agua peptonada, mezclar utilizando una nueva pipeta. Repetir este paso hasta obtener el número necesario de diluciones. La concentración disminuirá 10 veces en cada dilución sucesiva.
- 6.3. Cuidadosamente transferir 0,1 ml por cada dilución y dispensar el inóculo sobre la superficie del agar Baird Parker con una espátula de Drigalsky lo más rápido posible, tratando de no tocar los bordes de la placa. Dejar secar las placas sin invertir, luego invertir las placas sembradas e Incubar a 35°C o 37°C durante 24 h ± 2 h y luego 24 h ± 2 h adicionales.
- 6.4. Después de las 24 h de incubación marcar las colonias típicas. Reinocular las placas por 24 ± 2 horas a 35 °C, o 37 °C.
- 6.5. Si para ciertos productos es necesario realizar un recuento de un número bajo de Staphylococcus el límite de detección puede ser elevado por un factor de 10 sembrando 1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10) en caso de otros productos, y 1 ml de las diluciones sucesivas preparadas en una placa de Petri grande (140 mm) con agar Baird Parker o en tres placas de Petri de 90 mm con agar Baird Parker. En ambos casos, sembrar por duplicado utilizando 2 placas grandes o 6 placas de Petri de 90 mm.

	INSTRUCTIVO	Código: IN-128
		Versión: 00
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Fecha: 15/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 3 de 11
Respons.: AAVT/RC/RD		

6.6. Seleccionar para la confirmación un número de colonias (en general 5 colonias típicas si solo hay colonias típicas o 5 colonias atípicas si solo hay colonias atípicas o 5 colonias típicas y 5 colonias atípicas si se encuentran presente ambos tipos en cada placa). Si en la placa hay menos de 15 colonias típicas y/o atípicas Inocular con el producto líquido sin diluir o con la más baja dilución de los otros productos.

6.7. Las colonias típicas son negras o grises, con brillo y convexas (de 1 mm a 1.5 mm de diámetro después de una incubación de 24 h y de 1.5 mm a 2.5 mm de diámetro después de una incubación de 48 h) y rodeadas por una zona de clarificación que puede ser parcialmente opaca. Después de una incubación de por lo menos 24 h puede aparecer un anillo opalescente de precipitación inmediatamente alrededor de la colonia. Las colonias atípicas son del mismo tamaño que las típicas y pueden presentar una de las siguientes morfologías: - Colonias negras con brillo, con o sin un fino borde blanco, la zona de clarificación está ausente o escasamente visible y el anillo opalescente ausente o poco visible. - Colonias grises sin borde de clarificación.

6.8. Confirmación:

6.8.1. **prueba de la coagulasa.** De la superficie de cada colonia seleccionada remover un inóculo con ansa aguja y transferir a un tubo con caldo cerebro corazón Infusión (caldo BHI), Incubar a 35°C ó 37°C durante 24 h ± 2h.

6.8.2. Asepticamente agregar 0.1 ml de cada cultivo en 0.3 ml de plasma de conejo (a menos que otra cantidad sea especificada por el fabricante) en un tubo de hemólisis estéril. Incubar a 35°C ó 37°C. Inclinando el tubo observar la formación de coágulo después de 4 h a 6 h de incubación. Si la prueba es negativa reexaminar después de 24 h de incubación o examinar en el tiempo de incubación especificado por el fabricante.

6.8.3. Considerar un resultado positivo si el volumen del coágulo formado ocupa más de la mitad del volumen del líquido original. Como control negativo para cada lote de plasma agregar 0.1 ml de caldo BHI estéril a 0.3 ml de plasma de conejo e Incubar sin inoculación. Para que la prueba sea válida el control negativo no debe mostrar signos de coagulación.

6.8.4. Opcional colonias sospechosas típicas o atípicas sembrar en agar Manitol salado, para observar la fermentación del manitol se Incuban a 35°C ó 37° durante 24 h ± 2 h, las colonias amarillas rodeadas de un halo del mismo color son consideradas Staphylococcus coagulasa positiva, las colonias de color rojo con halo del mismo color o púrpura son consideradas como colonias que no fermentan manitol, un ejemplo es el Staphylococcus epidermidis,

	INSTRUCTIVO	Código: IN-128
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Versión: 00
Fecha: 15/04/2016		
Revisión: 001		
Págs.: 4 de 11		
Respons.: AAJTR/GRD		

6.8.5. **Opcional 2 para diferencias especies Prueba enzima termonucleasa:** Calentar 0.3 ml de la suspensión del microorganismo que creció en caldo BHI durante 15 min en baño maria con agua hirviendo, hacer orificios circulares en el agar DNA y colocar una gota de la suspensión con ayuda de una pipeta estéril, es recomendable incluir testigos *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228, Incubar a 35°C ó 37° durante 24 h ± 2 h. La formación de un rosa brillante extendido por lo menos un milímetro alrededor del orificio donde se inoculo indica que le microorganismo posee la enzima termonucleasa, cuando es negativo se observa un halo trasparente alrededor de la colonia, seguido de un precipitado color blanco.

6.9. **Expresión de resultados.**

6.10.1 **Cálculo del número a de Staphylococcus coagulasa positiva identificados por cada placa seleccionada:** Calcular para cada una de las placas seleccionadas el número a de Staphylococcus coagulasa positiva identificados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$a = \frac{b_t}{A_t} \times C_t + \frac{b_{at}}{A_{at}} \times C_{at}$$

Donde:

- A_t : es el número de colonias típicas sometidas a la prueba de la coagulasa
- A_{at} : es el número de colonias atípicas sometidas a la prueba de la coagulasa
- b_t : es el número de colonias típicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa
- b_{at} : es el número de colonias atípicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa
- C_t : es el número de total de colonias típicas que se contaron en la placa
- C_{at} : es el número de total de colonias atípicas que se contaron en la placa Redondear a un número entero

6.10.2. **Cálculo del número N de Staphylococcus coagulasa positiva identificados presentes en la porción de muestra sembrada:** Para las placas que contienen un máximo de 300 colonias con 150 colonias típicas y/o atípicas en dos diluciones consecutivas calcular el número de Staphylococcus coagulasa positiva para cada placa como se especifica en 6.8.1 y calcular como un promedio de las dos diluciones sucesivas, el número N de Staphylococcus coagulasa positiva identificados, presentes en la porción de muestra sembrada, utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

	INSTRUCTIVO	Código: IH-128
		Versión: 00
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Fecha: 15/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 5 de 11
	Respons.: AA/DT/RC/RD	

Donde:

- Ea: es el número de colonias de *Staphylococcus coagulasa* Positiva Identificadas en todas las placas seleccionadas
- V: es el volumen de Inóculo en cada placa en mililitros
- n1: es el número de placas seleccionadas de la primera dilución
- n2: es el número de placas seleccionadas de la segunda dilución
- d: es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución seleccionada (si suspensión inicial es una dilución)

Redondear el resultado calculado a 2 cifras significativas.

6.10.3. Informar el resultado como el número de *Staphylococcus coagulasa* positiva por mililitro (productos líquidos) o por gramo.

Ejemplo: El recuento después de la inoculación con 0,1 ml del producto dio los siguientes resultados:

- La primera dilución seleccionada (10^{-2}): 65 colonias típicas y 15 colonias atípicas, ninguna atípica.
- La segunda dilución seleccionada (10^{-3}): 3 colonias típicas y 7 colonias atípicas, ninguna atípica.

Se obtuvieron los siguientes datos:

- De las 65 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y todas dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 65$
- De las 65 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y 3 colonias dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 51$
- De las 3 colonias todas fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y 3 colonias dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 3$
- De las 7 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y todas dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de $a = 7$

$$N = \frac{65 + 51 + 3 + 7}{0.1(2 + 0.1 \times 2)10^{-2}} = 57272$$

El resultado después de redondear se expresa como: 5.7×10^4

	INSTRUCTIVO	Código: IN-128
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Versión: 00
		Fecha: 15/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 6 de 11
	Respons.: AA/DT/RC/RD	

6.10.4. Estimación para un recuento bajo. Si en dos placas correspondientes a la muestra (productos líquidos) o a la suspensión inicial (otros productos), cada una tiene menos de 15 colonias identificadas, informar el resultado de la siguiente manera:

a) Para productos líquidos: estimación del número de *Staphylococcus coagulasa positiva* por mililitro:

$$N_v = \frac{\sum a}{V \times 2}$$

Donde:

- $\sum a$: es la sumatoria de las colonias de *Staphylococcus coagulasa positiva* identificadas
- V: es el volumen sembrado en cada placa

b) Para otros productos: estimación del número de *Staphylococcus coagulasa positiva* por gramo:

$$N_g = \frac{\sum a}{V \times 2 \times d}$$

Donde:

- $\sum a$: es la sumatoria de las colonias de *Staphylococcus coagulasa positiva* identificadas
- V: es el volumen sembrado en cada placa
- d: es el factor de dilución de la suspensión

6.10.5. Si las dos placas correspondientes a la siembra de la muestra (producto líquido) o de la suspensión inicial (otros productos) no contienen colonias de *Staphylococcus coagulasa positiva* y si la inoculación ha sido realizada con 0.1 ml de muestra informar el resultado de la siguiente manera:

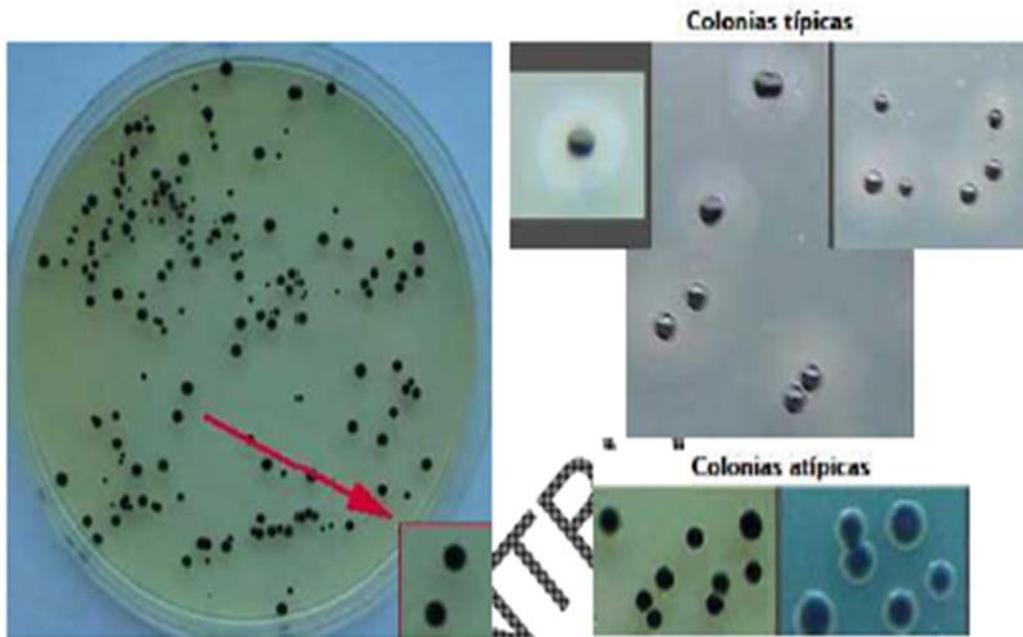
- Menos de 10 *Staphylococcus coagulasa positiva* por mililitro (para productos líquidos)
- Menos de 10/d *Staphylococcus coagulasa positiva* por gramo (para otros productos), donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

Si la inoculación ha sido realizada con 1 ml de muestra informar el resultado de la siguiente manera:

- Menos de 1 *Staphylococcus coagulasa positiva* por mililitro (para productos líquidos)
- Menos de 1/d *Staphylococcus coagulasa positiva* por gramo (para otros productos), donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

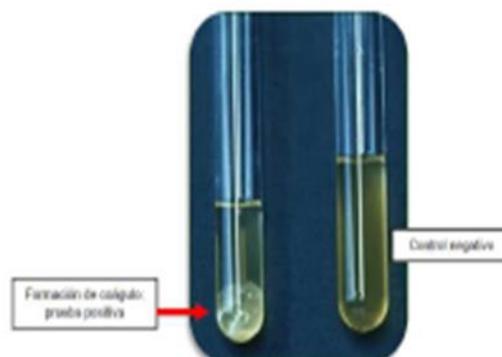
	INSTRUCTIVO	Código: IN-128
		Versión: 00
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Fecha: 15/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 8 de 11
	Respons.: AAOT/RC/RD	

FOTOS



Agar sales y manitol. La caja esta partida en tres, *S. aureus* y *S. saprophyticus* son manitol positivo (amarillo) y *S. epidermidis* es manitol negativo (rosa).

1. Prueba de la coagulasa



	INSTRUCTIVO	Código: IN-128
		Versión: 00
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Fecha: 15/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 9 de 11
	Respons.: AA/DT/RC/RD	

DIFERENCIACION DE ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS.				
Bacteria.	Manitol.	Coagulasa.	Novobiocina.	DNAasa.
<i>S. aureus</i>	Positivo	Positivo	Sensible	Positivo
<i>S. saprophyticus</i>	Variable	Negativo	Resistente	Negativo
<i>S. epidermidis</i>	Negativo	Negativo	Sensible	Negativo

COPIA CONTROLADA

	INSTRUCTIVO	Código: IN-128
		Versión: 00
	RECuento EN PLACA DE STAPHYLOCOCCUS SPP	Fecha: 15/04/2016
		Revisión: 001
		Págs.: 11 de 11
		Respons.: AA/DI/RO/RO

ELABORACION: S. Lovón	REVISION: R. Salazar	APROBACION: A. Alvarado
FECHA: 05-05-16	FECHA: 05-05-16	FECHA: 05-05-16
FIRMA: 	FIRMA: 	FIRMA: 

COPIA CONTROLADA