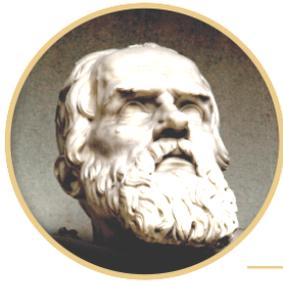


UNIVERSIDAD GALILEO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA BIOLÓGICA

**“CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA FASE PREANALÍTICA DEL BANCO DE
LECHE DEL HOSPITAL NACIONAL PEDRO DE BETHANCOURT DE ANTIGUA
GUATEMALA, SACATEPÉQUEZ”**



Galileo
UNIVERSIDAD

La Revolución en la Educación

INFORME FINAL

PRESENTADO A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD PREVIO A
CONFERIRSE EL TÍTULO DE

QUÍMICO BIÓLOGO

EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, FEBRERO 2020

INTEGRANTES

ANA LAURA GARCÍA AGOSTO
LUISA GABRIELA OSORIO CRUZ
YENNIFER ADELAIDA SOTO RODRÍGUEZ

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la lactancia materna exclusiva (LME) como “la alimentación del lactante con leche materna de la madre o de otra mujer, sin ningún suplemento sólido o líquido”. La OMS recomienda mantenerla durante los primeros seis meses de vida y luego iniciar con la introducción de alimentos combinados. (Aguilar & Fernández, 2014)

En los últimos años, se han investigado con nuevos métodos epidemiológicos y técnicas modernas de laboratorio los beneficios de la lactancia materna. En estos estudios, se encontró que la leche humana beneficia el desarrollo nutricional, inmunológico, psicológico y económico. Además, es una fuente importante de bacterias comensales, mutualistas y probióticas para el intestino infantil. Por otro lado, la lactancia también aporta beneficios para la madre. Entre estos, se encontró la disminución de sangrado postparto y una involución uterina más rápida atribuible al aumento de oxitocina, menor riesgo de cáncer de mama y disminución del riesgo de cáncer de ovario. (Pangkatana & Biddulph, 2013; Section on Breastfeeding, 2012)

Además, la leche humana es factor clave para la iniciación y desarrollo de la microbiota intestinal del lactante. Los datos disponibles de estudios realizados han destacado que se aíslan con mayor frecuencia diversas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, y constituyen la microbiota natural de este fluido biológico. También se ha confirmado que la concentración de lactobacilos es significativamente más elevada en la microbiota de lactantes que en la de niños alimentados con fórmulas. (Rodríguez et al., 2008)

En Guatemala, el primer banco de leche humana fue fundado en 2008 en el Hospital Pedro de Bethancourt en Antigua Guatemala, Sacatepéquez. Este hospital ha recibido cuatro veces la certificación “Hospital Amigo de la Lactancia Materna”, otorgada por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social a través del Programa de Seguridad Alimentaria y Nutricional -PROSAN-, la organización

Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo internacional de emergencia de las naciones unidas para la infancia (UNICEF).

La contaminación de la leche humana donada puede llevar al descarte de grandes cantidades de esta, ya que su uso podría comprometer la vida del lactante. Además, desconocer la microbiota de la leche humana lleva en muchos casos a considerar distintos microorganismos como contaminantes. En un estudio realizado en un hospital de Venezuela, se comprobó que la mayoría de las bacterias patógenas son eliminadas a través de la pasteurización y que muchas bacterias patógenas llegan a la leche cuando no se almacenan a temperaturas adecuadas que impidan el crecimiento e estos microorganismos. (Duran, Guevara, Rodríguez, Carreño Carmona, & Rosas Alcoba, 2008; Jones, Jennison, & D'Souza, 1979; Rodríguez et al., 2008)

El siguiente estudio se realiza con el objetivo de evaluar cuales son las fuentes de contaminación microbiológicas de la leche donada en el banco de leche humana. Las muestras a analizar fueron: pezones de donadoras, manos de operadores, frascos de almacenamiento, extractores y superficies de las diferentes áreas del laboratorio. Para los cuales se utilizaron metodologías distintas, siendo estas: Método por hisopado para pezones, manos y superficies, y para frascos y extractores se utilizó el método por enjuague.

Según los diferentes análisis realizados se pudo confirmar que en la mayor parte de las muestras analizadas se obtuvo crecimiento bacteriano, confirmando así contaminación microbiológica en la fase preanalítica.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	2
CAPITULO I.....	7
MARCO METODOLOGICO.....	7
1.1. Justificación.....	7
1.2. Planteamiento del problema.....	7
1.2.1. Definición del problema.....	7
1.2.2. Especificación del problema.....	8
1.2.3. Delimitación del problema.....	8
1.2.3.1. Unidad de análisis.....	8
1.2.3.2. Tamaño de muestra.....	8
1.2.3.3. Ámbito geográfico.....	9
1.3. Hipótesis.....	9
1.4. Objetivos de la investigación.....	9
1.4.1. Objetivo general.....	9
1.4.2. Objetivos específicos.....	9
1.5. Métodos, técnicas e instrumentos.....	10
1.5.1. Métodos.....	10
Universo.....	10
Población.....	10
Muestra.....	10
Tipo de estudio.....	10
Diseño del estudio.....	10
Cálculo de muestra.....	11
Diseño muestral.....	11
Análisis e interpretación de resultados.....	11
1.5.2. Instrumentos y materiales.....	11
1.5.3. Técnicas.....	12
1.5.3.1. Técnica de muestreo de superficies por hisopado.....	12
1.5.3.2. Técnica de muestreo para manos por hisopado.....	13
1.5.3.3. Técnica de enjuague para instrumentos de uso común (frascos y extractores).....	13
1.5.3.4. Técnica de muestreo para pezones por hisopado.....	14
1.5.3.5. Guía Técnica de Uso de Petrifilm.....	14
1.5.3.6. Interpretación.....	16

1.6. Recursos	16
1.6.1. Recursos humanos	16
1.6.2. Recursos financieros	17
CAPITULO II	18
MARCO TEÓRICO	18
2.1. Antecedentes	18
2.1.1. Lactancia materna	18
2.1.2. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria	19
2.1.3. Composición de la Leche humana	24
2.1.4. Infecciones bacterianas en Neonatos infectados por Leche Humana Contaminada	30
2.2. Bancos de Leche Humana	31
2.2.1. Procedimientos en un Banco de Leche	32
2.3. Buenas Prácticas de Manufactura aplicadas a Bancos de Leche Humana .	38
2.3.1. Alrededores y Ubicación	38
2.3.2. Instalaciones Físicas del área de Proceso y Almacenamiento	39
2.4. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP por sus siglas en inglés)	40
2.5. Norma técnica de muestreo de Superficies en Bancos de Leche Humana .	42
CAPÍTULO III	44
CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA FASE PREANALÍTICA DEL BANCO DE LECHE DEL HOSPITAL NACIONAL PEDRO DE BETHANCOURT DE ANTIGUA GUATEMALA, SACATEPÉQUEZ	44
3.1. Resultados	44
3.5. Discusión de resultados	51
CAPÍTULO IV	55
APORTE O PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	55
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
ANEXOS	57
BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE FIGURAS, CUADROS, TABLAS Y GRÁFICOS

Figuras

Figura 1. Diagrama de la mama.....	20
Figura 2. Ciclo de expresión/succión – deglución respiración.....	24
Figura 3. Procedimientos de la Leche Humana extraída en el Banco de Leche...32	
Figura 4. Croquis Banco de Leche Humana “Dr. Miguel Ángel Soto Galindo”.....	50
Figura 5. Flujo de entrada y salida del Banco de Leche Humana “Dr. Miguel Ángel Soto Galindo”	59
Figura 6. Superficies muestreadas del Banco de Leche Humana “Dr. Miguel Ángel Soto Galindo”	60

Cuadros

Cuadro 1. Variables que modifican con las concentraciones de grasas en la Leche Humana.....	27
Cuadro 2. Inmunología de Leche Humana.....	29

Tablas

Tabla 1. Promedio y Frecuencia absoluta de UFC/mL en muestras obtenidas en el Banco de Leche Humana.....	45
Tabla 2. Promedio y Frecuencia absoluta de UFC/mL en Pezones de madres donadoras por Servicio (n = 100).....	46
Tabla 3. Muestras dentro del Límite “Aceptable” para <i>E. coli</i> /Coliformes Totales y Aerobios.....	47
Tabla 4. Pezones de madres donadoras por Servicio dentro del Límite “Aceptable” para <i>E. coli</i> /Coliformes Totales y Aerobios.....	48
Tabla 5. Cálculo y expresión de Datos en Superficies Vivas.....	57
Tabla 6. Cálculo y expresión de Datos en Superficies Inertes.....	58

Gráficos

Gráfico 1. Promedio y Frecuencia absoluta de UFC/mL en muestras obtenidas en el Banco de Leche Humana.....	45
Gráfico 2. Promedio y Frecuencia absoluta de UFC/mL en Pezones de madres donadoras por Servicio.....	46
Gráfico 3. Muestras dentro del Límite “Aceptable” para <i>E. coli</i> /Coliformes Totales y Aerobios.....	47
Gráfico 4. Pezones de madres donadoras por Servicio dentro del Límite “Aceptable” para <i>E. coli</i> /Coliformes Totales y Aerobios.....	48

CAPITULO I

MARCO METODOLOGICO

1.1. Justificación

Con la finalidad de que los niños prematuros, con patologías graves o impedidos de recibir lactancia materna directa de sus madres puedan ejercer este derecho, se crearon los Bancos de Leche Humana. Estos son centros especializados, responsables de la promoción, protección y apoyo de la lactancia materna; y en los cuales se extrae, almacena, conserva, procesa y distribuye la leche humana garantizándole a los neonatos que la reciben un producto bacteriológicamente seguro y con calidad nutricional óptima, acorde a sus necesidades y requerimientos.

En Guatemala, existen pocos estudios microbiológicos acerca de la presencia de bacterias patógenas en la leche humana. Estas bacterias pueden presentarse por distintas razones, tales como una mala asepsia, manipulación y/o extracción. Es importante analizar la presencia de bacterias para poder definir medidas de prevención, especialmente en la fase pre-analítica de la donación y así evitar el descarte de grandes cantidades de leche donada.

1.2. Planteamiento del problema

1.2.1. Definición del problema

La lactancia materna se considera como el único alimento importante en la vida del neonato, ya que sus aportes nutricionales son irremplazables y potenciales para su supervivencia. Es por ello que cuando las madres no pueden dar este alimento a su bebé, acuden a un banco de leche, que es el encargado de proveerles una leche en condiciones adecuadas, sin ningún tipo de contaminación. Sin embargo en ocasiones esta leche puede llegar a contaminarse con microorganismos externos, que pueden encontrarse tanto en el personal que la manipula, como en los objetos que están en contacto directo con ella, como los

extractores, frascos de almacenamiento, biberones o incluso en la misma donadora, esto debido a una inadecuada limpieza y sanitización previo a estar en contacto con la leche, es por ello que es necesario evaluar cuales son las fuentes de contaminación microbiológicas de la leche donada en un Banco de Leche Humana.

1.2.2. Especificación del problema

Uno de los problemas más grandes que puede enfrentar el banco de leche es el descarte de leche humana por contaminación, que proviene de manos de operadores, superficies o una limpieza inadecuada en la zona del pezón; luego del proceso de Pasteurización el 100% de las bacterias patógenas son eliminadas, de lo contrario esta leche es inadecuada para su uso y debe descartarse.

En los bancos de leche, se realizan procedimientos donde muchas personas están en contacto con la leche humana donada, lo cual puede constituir una fuente importante de contaminación. Por ello, se ha considerado necesario realizar un estudio, para evaluar todas aquellas posibles fuentes que puedan contaminar la misma.

1.2.3. Delimitación del problema

1.2.3.1. Unidad de análisis

Se realizó muestreo en superficies, frascos, extractores de leche, manos de trabajadores y pezones de donadoras, en el área de donación y manipulación de la leche.

1.2.3.2. Tamaño de muestra

Para el muestreo de superficies se eligieron perillas de puertas, 2 mesas de trabajo y 2 superficies de paredes; para frascos, el 5% de frascos de leche producidos o 10; y para extractores el 10% o al menos 5.

En cuanto a trabajadores, se realizó muestreo de todos los empleados en el banco de leche humana de todas las áreas de proceso. Para madres, se realizó un

cálculo con el programa de calculadora muestral GRANMO cuyo resultado es 107 donadoras.

Todos estos muestreos fueron realizados de forma aleatoria.

1.2.3.3. Ámbito geográfico

Banco de Leche Humana en el Hospital Nacional Pedro de Bethancourt ubicado en Antigua Guatemala, Sacatepéquez.

1.3. Hipótesis

Por ser un estudio observacional, descriptivo y transversal, no presenta hipótesis.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo general

Realizar control de microorganismos en la fase preanalítica del Banco de Leche Humana, en el Hospital Nacional Pedro de Bethancourt de Antigua Guatemala, Sacatepéquez.

1.4.2. Objetivos específicos

- Establecer la presencia de *E. coli*, coliformes totales y microorganismos aerobios en pezones de las donadoras del Banco de Leche Humana.
- Definir la presencia *E. coli*, coliformes totales y microorganismos aerobios las manos de los operadores en contacto con la leche humana.
- Determinar la presencia *E. coli*, coliformes totales y microorganismos aerobios instrumentos y superficies en contacto con la leche humana.
- Elaborar un manual de muestreo.

1.5. Métodos, técnicas e instrumentos

1.5.1. Métodos

Las técnicas de muestreo por hisopado de pezones de donadoras, manos de personal, superficies y el método de enjuague de instrumentos de uso común se realizaron mediante el uso de placas de Petrifilm.

Universo

Red Guatemalteca de Bancos de Leche Humana.

Población

Bancos de leche del Hospital Nacional Pedro Bethancourt de La Antigua Guatemala, Sacatepéquez.

Muestra

Superficies, instrumentos de uso común, manos de operadores y pezones de donadoras de leche humana en el banco de leche.

Tipo de estudio

Observacional, descriptivo y transversal.

Diseño del estudio

El siguiente estudio nos permitió describir cuales son las fuentes de contaminación microbiológica de la Leche Humana en el Banco de Leche Humana, por lo cual se realizará el muestreo de superficies inertes (2 mesas de trabajo, 2 perillas y 2 paredes), este se realizó antes del inicio de Operaciones del Banco de Leche Humana; instrumentos de uso común (frascos y extractores), después del procedimiento de esterilización; las manos de operadores del Banco de Leche Humana, el muestreo se realizó en ambas manos con el mismo hisopo y después del procedimiento de lavado de manos; los pezones de las donadoras del Banco de Leche Humana, después del procedimiento de limpieza y se tomaron en cuenta ambos pezones utilizando para el muestreo el mismo hisopo.

Cálculo de muestra

Para el cálculo del número de donadoras, se utilizó el programa de calculadora muestral GRANMO, para una muestra una proporción basada en una población infinita o indeterminada con:

- Nivel de confiabilidad de 95%.
- Estimación de la proporción en la población del 50%.
- Precisión del 10%.
- Proporción estimada de reposiciones del 10%.

Se obtuvo un resultado de 107 donadoras a muestrear.

Para las superficies, mesas de trabajo, paredes, frascos, extractores y manos de trabajadores que dependen del banco de leche, se muestrearon aproximadamente 10 frascos o sea el 5% producidos y el 10% de extractores o al menos 5. Las superficies manejadas fueron perillas de puertas, 2 mesas de trabajo y 2 superficies de paredes. Se realizó muestreo a todos los colaboradores en cuanto a manos sin lavar a excepción de un trabajador donde se evaluó posterior a lavado de manos.

Diseño muestral

Aleatorio simple.

Análisis e interpretación de resultados

Se utilizaron proporciones e intervalos de confianza del 95 % para las variables cualitativas, así como el cálculo de la media y desviaciones estándar para las variables cuantitativas.

1.5.2. Instrumentos y materiales

- Medio de enriquecimiento caldo tripticasa soya, solución salina o caldo/hisopos Lethen
- Agua peptonada
- Hisopos estériles

- Bolsas estériles
- Guantes estériles
- Placas de petrifilm para aerobios
- Placas de petrifilm para *E. coli*/coliformes
- Incubadora de 35°C

1.5.3. Técnicas

1.5.3.1. Técnica de muestreo de superficies por hisopado

2. Colocar la plantilla (10cm x 10cm) sobre la superficie a muestrear.
3. Si no se posee plantilla, calcular un cuadrado de 10cm x 10 cm.
4. Humedecer el hisopo en el tubo de caldo letheen o Trypticasa soya y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución.
5. Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, frotar 3 veces la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior. Asegurar el hisopado en toda la superficie.
6. En el caso de utilizar la plantilla de 5cm x 5cm, repetir esta operación 3 veces más, en lugares diferentes de la misma superficie, para obtener 100 cm².
7. Colocar el hisopo en el tubo nuevamente y quebrar la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos de la persona a muestrear, la cual debe ser eliminada.
8. Para superficies irregulares, en el caso de instrumentos, frotar la superficie con mayor contacto con las muestras de Leche. (Dirección General de Salud Ambiental, 2007; Juárez, 2016)
9. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 – 48 hrs a 35°C ±1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

1.5.3.2. Técnica de muestreo para manos por hisopado

1. Insertar el hisopo en tubo con caldo de enriquecimiento Tripticasa soya o caldo letheen, exprimir el medio sobrante presionando el hisopo contra las paredes del tubo.
2. Frotar la superficie de la palma de la mano (importante las líneas de la mano), entre los dedos y debajo de las uñas.
3. Realizarlo en cada mano con el mismo hisopo, colocar de nuevo el hisopo en el tubo con caldo de enriquecimiento Tripticasa soya o caldo letheen y quebrar el hisopo.
4. Transportar al laboratorio en una gradilla dentro de una hielera a temperatura ambiente.
5. Incubar por 24-48 horas, a una temperatura de 30 a 33°C. (Labs, 2011)
6. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 hrs a 35°C \pm 1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

1.5.3.3. Técnica de enjuague para instrumentos de uso común (frascos y extractores)

1.5.3.3.1. Frascos

1. Colocar en el recipiente que se va a muestrear 10 ml o más si es necesario de la solución que puede ser agua peptonada o caldo Letheen.
2. Cerrar el recipiente, y en seguida agitar vigorosamente para que la solución toque o abarque cada parte del objeto.
3. Al terminar, regresar el caldo al frasco original. (La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008; Juárez, 2016)
4. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 hrs a 35°C \pm 1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

1.5.3.3.2. Extractores

1. En el caso de los extractores se utilizó una bolsa estéril con el agua peptonada para sumergir los objetos a muestrear, de manera que alcance a cubrirlos en su totalidad.
2. Remojarlos por aproximadamente un minuto.
3. Devolver el caldo al recipiente original. (La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008; Juárez, 2016)
4. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 hrs a 35°C ±1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

1.5.3.4. Técnica de muestreo para pezones por hisopado

1. Enjuagar un hisopo estéril en un tubo con medio de enriquecimiento de tripticasa soya y tomar muestra del pezón de la donadora con movimientos circulares.
2. Devolver el hisopo al tubo con medio de enriquecimiento tripticasa soya y romper el hisopo.
3. Incubar 24 horas a 33°C.
4. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 hrs a 35°C ±1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008; Petrifilm, 2000)

1.5.3.5. Guía Técnica de Uso de Petrifilm

Placas para Recuento de Aerobios y recuento de *E. coli*/Coliformes

Almacenamiento

1. Almacenar los paquetes cerrados a una temperatura ≤ 8 °C. Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración.

2. Para cerrar un paquete abierto, se debe doblar el extremo y sellarlo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.

a. Mantener los paquetes cerrados a temperatura ≤ 25 °C y una humedad relativa $\leq 50\%$. No refrigerar los paquetes ya abiertos. Utilizar las Placas Petrifilm máximo 1 mes después de abierto el paquete.

b. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados, colocarlos en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacenarlos en congelación. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008; Petrifilm, 2000)

Inoculación

1. Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada levantando posteriormente la lámina semitransparente superior.

2. Con la pipeta perpendicular a la Placa Petrifilm, se colocó 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.

3. Se liberó la película superior y se dejó caer sobre la dilución. No se deslizó hacia abajo.

4. Con el lado rugoso hacia abajo, se colocó el dispersor o esparcidor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.

5. Presionando suavemente el dispersor o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. No se giró ni deslizó el dispersor.

6. Se levantó el dispersor o esparcidor. Se esperó por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y se procedió a la incubación.

7. Incubación a 35°C las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humedecer el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008; Petrifilm, 2000)

1.5.3.6. Interpretación

a. Placas para recuento de aerobios

El tinte indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Se debe contar todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo. Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz (ver Anexo 1).

Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levantar la película superior y con la ayuda de un asa en punta recoger la colonia del gel. (3M Company, 2004)

b. Placas para el recuento de *E. coli*/Coliformes

Las colonias coliformes que crecen en esta placa producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia (ver Anexo 1).

E. coli como colonias azules con gas, Coliformes como colonias rojas y azules con gas. (3M Food Safety, 2008)

1.6. Recursos

1.6.1. Recursos humanos

Personal de servicio operativo y donadoras del banco de leche del Hospital Nacional Pedro Bethancourt de Antigua Guatemala, Sacatepéquez.

Estudiantes que elaboraron la investigación como parte del proyecto de tesis de la Universidad Galileo, de la carrera de Licenciatura en Química Biológica.

Guía del asesor Licenciado Kevin Ortiz Barrientos y apoyo en estadística del Licenciado Federico Nave.

1.6.2. Recursos financieros

El presupuesto incluyó la cantidad de donadoras, operadores, superficies, extractores y frascos en los cuales se realizó el muestreo. Además, se tomó en cuenta las unidades que se necesitarían de cada material, lo que dio el total de Q3,321.00.

Material	Unidades	Cantidad	Precio	Total
Placas de petrifilm para aerobios	5	25 placas por caja	Q250.00	Q1,250.00
Placas de petrifilm para <i>E.coli</i> /coliformes	5	25 placas por caja	Q305.00	Q1,525.00
Agua peptonada	2	90 mL	Q 6.50	Q 13.00
Tripticasa soya	1	500 gr	Q413.00	Q 413.00
Hisopos estériles, guantes, bolsas estériles.			Q120.00	Q120.00
Total				Q3,321.00

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Lactancia materna

La lactancia materna es el período durante el cual el bebé se alimenta de leche materna. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la lactancia materna exclusiva (LME) como “la alimentación del lactante con leche materna de la madre o de otra mujer, sin ningún suplemento sólido o líquido”. La OMS recomienda mantenerla durante los primeros seis meses de vida y luego iniciar con la introducción de alimentos combinados. Además, es una de las estrategias más costo efectivo para prevenir la morbilidad y mortalidad infantil. (Aguilar & Fernández, 2014)

La lactancia materna ofrece muchos beneficios para el lactante. En diversos estudios se encontró que la leche humana ayuda al desarrollo nutricional, inmunológico, psicológico y económico. Una revisión sistemática (RS) reportó que aquellos niños alimentados con leche materna tenían menor riesgo de presentar enfermedades infectocontagiosas, además, niños amamantados por menor tiempo presentaron mayor frecuencia de alergias alimentarias, asma y rinitis. Para la salud de la mujer, la lactancia materna ha tenido bastante impacto. Diversos estudios han demostrado que en mujeres esta técnica se asocia con menor riesgo de sufrir cáncer de mama, cáncer de ovarios, disminución de sangrado postparto, involución uterina más rápida e incluso prevenir diabetes. (Brahm & Valdés, 2017; González de Cosío, Escobar-Zaragoza, González-Castell, & Rivera-Dommarco, 2013; Section on Breastfeeding, 2012)

En países en desarrollo, las madres que por alguna razón no pueden dar leche a sus hijos, acuden a los bancos de leche que son centros especializados responsables de la recolección, procesamiento, control de calidad y despacho de la leche donada. Además, en varias ocasiones se ha demostrado el abandono

temprano de la lactancia materna. Entre estas razones se encuentran deficientes conocimientos sobre la lactancia materna, factores y tradiciones culturales, estrato socioeconómico, uso de biberón, entre otras. (Alberto, Figuera, Latorre, & Porras, 2011)

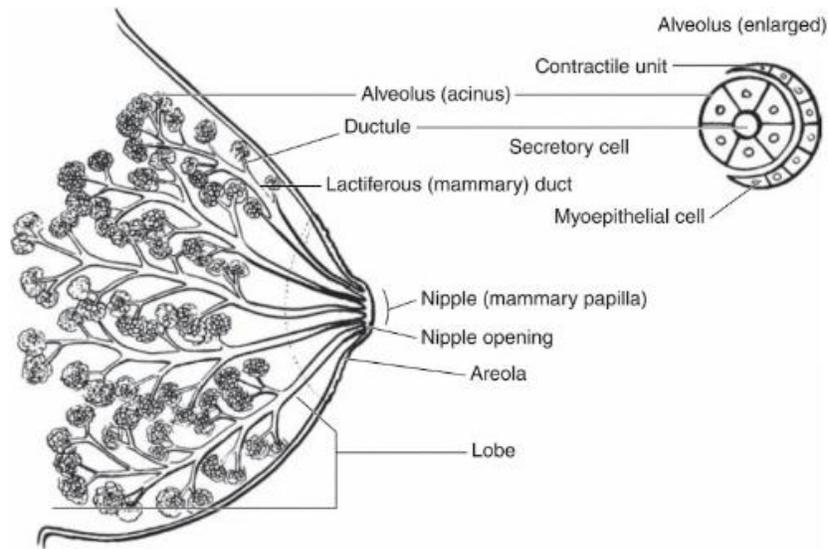
2.1.2. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria

Las mamas femeninas son estructuras glandulares pares situadas en la pared anterior y superior del tórax, específicamente en medio de la segunda y sexta costilla; borde lateral del esternón a la línea axilar anterior. El tejido conectivo suelto en medio de la mama y la fascia profunda forma el llamado “espacio submamario” que le permite su movimiento. (Bernardes, 2011)

A diferencia de otros órganos, la glándula mamaria atraviesa por distintos cambios en forma, tamaño y función. En la pubertad, las mamas se agrandan hasta su tamaño adulto. Durante el embarazo aumentan en peso y tamaño donde pueden llegar a pesar 400 a 600 gramos; y en el período de lactancia llegan incluso a pesar de 600 a 800 gramos. (Lawrence, R. A., & Lawrence, R. M. 2011)

Las unidades básicas del tejido glandular maduro son alveolos, que se componen de unidades acinares secretoras donde terminan los conductos. Cada racimo de las células secretoras de un alveolo está rodeado por células mioepiteliales que son unidades contráctiles responsables de expulsar la leche a los conductos. Estos últimos a su vez, y sin comunicarse unos con otros, llegan a un conducto más grande. Cada mama tiene aberturas en los conductos, muchas veces llamado “poros” del pezón. Los alveolos son una capa simple de células epiteliales rodeadas de: células mioepiteliales, células contráctiles para secreción de leche y tejido conectivo. La leche está continuamente secretada y almacenada en el lumen alveolar hasta que llega el reflejo que permite su contracción y expulsión de la leche. (Lawrence, R. 2011)

Figura 1. Diagrama de la mama



Adaptado de: Wambach, K. & Riordan, J. (2016). *Breastfeeding and Human Lactation*. United States of America: Jones & Bartlett Learning. (pp. 77-100).

La piel de la mama incluye el pezón y la areola. El primero es una elevación localizada en el centro de la areola que contiene alrededor de 23 a 30 conductos, y el segundo, es el área circular pigmentada elástica cuyo color se debe al resultado de melanocitos distribuidos uniformemente. (Lawrence, R. 2011)

El suministro de sangre proviene de las arterias intercostales y la arteria torácica interna. La mayor parte proviene de la arteria mamaria y la arteria torácica interna. El suministro venoso es paralelo al suministro arterial. Las venas terminan en las venas axilares y algunas alcanzan la vena yugular externa. (Lawrence, R. 2011)

Embarazo

Durante el embarazo, las mamas aumentan de tamaño, la piel se torna más delgada y las venas son mucho más prominentes. Las hormonas séricas estimulan el crecimiento de la mama durante el embarazo: crecimiento del pezón se relaciona con niveles altos de prolactina; el crecimiento de la areola se relaciona con el lactógeno placentario; la progesterona promueve aumento de conductos y alveolos. La hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH) trabajan en conjunto con la prolactina y la progesterona para promover el

crecimiento mamario. La oxitocina genera el reflejo de expulsión de la leche, producto de la contracción de las células mioepiteliales que rodean al alveolo. (Wambach, K. & Riordan, J; 2016)

La transición del embarazo al período de lactancia se denomina lactogénesis. El crecimiento y proliferación de los conductos es la primera parte de este proceso mientras que en la segunda parte la actividad secretora se acelera y los alveolos comienzan a acumular calostro. (Wambach, K. & Riordan, J; 2016)

El desarrollo de la capacidad de la glándula mamaria para secretar leche desde medio embarazo al embarazo tardío se llama lactogénesis o estadio I, es decir, es el inicio de la síntesis y secreción de leche. En esta etapa aumenta el tamaño de las mamas y aumenta las concentraciones de lactosa y α -lactoalbúmina. La leche empieza a moverse a través de las membranas celulares desembocando en los conductos. El inicio abundante de secreción de leche después del nacimiento es el estadio II de lactogénesis. En este último sucede la activación secretora e incrementa el volumen de leche, disminución de niveles de sodio, cloro y proteína acompañado de un aumento de lactosa y lípidos. (Wambach, K. & Riordan, J; 2016)

Los siguientes cambios son esenciales una vez inicie la activación secretora o lactancia completa:

- Caída de niveles de progesterona
- Liberación de prolactina de la glándula pituitaria anterior, que estimula la lactogénesis e inicia la secreción de leche
- Extracción de leche materna por el lactante
- Liberación de oxitocina de la glándula pituitaria posterior

Después, con el cierre de las uniones estrechas de las células alveolares y mediante acción del hipotálamo, las células alveolares responden con secreción de leche en la base de estas donde leche en forma de gotas llega mediante los conductos alveolares a la membrana celular. La síntesis de leche está estrechamente relacionada con la succión del lactante, ya que este estímulo

permitirá que se secrete mucho más. La galactopoyesis es la capacidad de mantener la producción de leche. La mama no es un contenedor de leche, es un órgano que necesita producción activa por el estímulo del lactante más que por estímulo hormonal. Este mecanismo ha sido llamado como suministro-demanda-respuesta ya que es el mecanismo control que regula la producción de leche. (Wambach, K. & Riordan, J; 2016)

Fisiología de la succión nutritiva en recién nacidos y lactantes

El proceso mediante el cual un recién nacido o lactante obtiene su alimento se denomina succión nutritiva y se lleva a cabo por medio del seno materno o biberón. En condiciones saludables, desde el nacimiento y durante los primeros seis meses de vida los lactantes obtienen su alimento mediante la succión nutritiva. Después de esto, se adquieren los reflejos y habilidades para continuar con su alimentación. (Rendón, M. & Meneses, G. 2011)

La succión se encuentra conformada por tres fases que se encuentran altamente relacionadas:

1. Expresión-succión
2. Deglución
3. Respiración

También se considera la succión nutritiva como alimentación al seno materno (SNM) y alimentación por medio de un biberón o botella (SNB), depende en la forma de alimentarse del lactante. (Rendón, M. & Meneses, G. 2011)

Los infantes realizan una serie de movimientos orales complejos para obtener suficiente nutrimento de la mama y satisfacer sus requerimientos diarios nutricionales. (Wambach, K. & Riordan, J; 2016)

El reflejo de succión se desarrolla de forma temprana en la gestación donde el promedio es de 24 semanas. Los bebés pretérmino pueden coordinar succión/deglución/respiración por la semana 28. (Rendón, M. & Meneses, G. 2011)

Durante la primera fase de la succión nutritiva, la expresión-succión, el lactante genera una presión de extracción de un fluido hacia su cavidad oral. Una vez formado el bolo, el líquido se dirige hacia la vía digestiva sin pasar por las vías respiratorias. Esta última fase es la de deglución. (Rendón, M. & Meneses, G. 2011)

En recién nacidos sanos, este proceso debe llevarse a cabo de forma rítmica y continua para asegurar la ingesta necesaria y suficiente de alimento y cubrir con demandas metabólicas. (Rendón, M. & Meneses, G. 2011)

La succión nutritiva inicia con la compresión del pezón de la mama o de la botella. La compresión se logra por la contracción del músculo peri orbicular de los labios del niño junto con la mordida de sus encías por el movimiento de la mandíbula en sentido anterosuperior. Cuando se utiliza biberón se puede generar volúmenes más altos de flujo lácteo. En ambos tipos de succión es fundamental que el lactante forme un sello bucal hermético para evitar fuga de leche y perder volúmenes que generen una succión nutritiva ineficiente. Durante la segunda fase de la expresión-succión, se genera una presión de succión subatmosférica o negativa como resultado de la retracción de la mandíbula que baja por contracción de los músculos supra hioideos, acompañada del movimiento de la lengua hacia atrás. (Rendón, M. & Meneses, G. 2011)

Los patrones que se siguen en el proceso de succión nutritiva son: inspirar-deglutir (pausa)- espirar (IDE), espirar-deglutir-inspirar (EDI), inspirar-deglutir-inspirar (IDI) y espirar-deglutir-espirar (EDE). Estas secuencias o patrones son conocidos como tipo 1 (IDE y EDI) y tipo 2 (IDI o EDE). Otro patrón es el 3, sucede cuando hay cese de respiración entre dos o más degluciones definido también como apneas por degluciones múltiples. (Rendón, M. & Meneses, G. 2011)

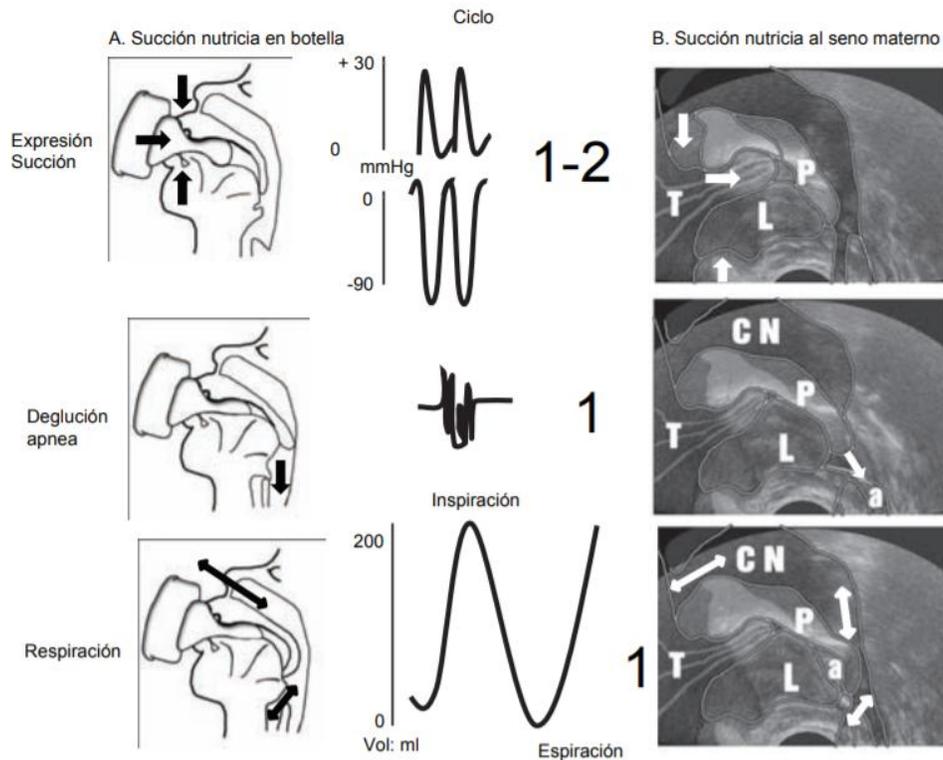


Figura 2. Ciclo de expresión/succión-deglución respiración. **A.** Esquema de la succión nutricia con biberón (Fuente: Mathew OP. Breathing patterns of preterm infants during bottle feeding: role of milk flow. *J. Pediatr* 1991; 119:960-965. Adaptado con permiso). **B.** Ultrasonido de la alimentación al seno materno (Fuente: Geddes DT, Kent JC, Miltoulas LR, Hartman PE. Tongue movement and intraoral vacuum in breastfeeding infants. *Early Hum Dev* 2008; 84:471-477. Adaptado con permiso). Durante la expresión de la mamila de la botella o tetilla de la madre (T) se ejerce una presión positiva. El movimiento de la lengua (L) hacia atrás genera una presión negativa. La deglución se registra por fonometría cervical como la señal del paso del bolo de la cavidad oral al esófago. Durante la deglución se eleva el paladar (P) y se cierra la vía aérea inferior (a). La respiración es registrada por flujo grafía nasal en vol/min a través del paso del aire por la cavidad nasal (CN).

Adaptado de: Rendón Macías, M. E., & Serrano Meneses, G. (2011). Fisiología de la succión nutricia en recién nacidos y lactantes. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex*, 68, 319–327.

2.1.3. Composición de la Leche humana

La leche humana aporta distintos elementos indispensables que fortalecen al neonato, le otorgan protección contra infecciones (inmunidad), además de ser una rica fuente de nutrientes. (M. Macías., S. Rodríguez., 2006)

La leche está compuesta por diversos factores como el agua, que comprende un 87% del total de los componentes y así permite que no requiera de líquidos

suplementarios. Su osmolaridad es semejante al plasma que ayuda al niño mantener un equilibrio electrolítico. (Shelhorn & Valdés, 1995)

La presencia de proteína se compone de 40% caseína y 60% de proteínas del suero, donde se encuentra la α -lactoalbúmina (participa en la síntesis de la lactosa). En menor concentración se encuentra las inmunoglobulinas, son diferentes a la del plasma por su concentración y calidad. La principal inmunoglobulina presente en leche humana es la IgA. La concentración de inmunoglobulinas sufre modificaciones hasta llegar al grado que mantendrá en la leche madura, que es alrededor de los 14 días postparto. (M. Macías., S. Rodríguez., 2006; Shelhorn & Valdés, 1995)

Además se encuentra la lactoferrina, que es bacteriostática sobre ciertas bacterias ferro dependientes como *E. coli*, además contribuye a la absorción de hierro en el intestino del niño. La lisozima funciona como un factor antimicrobiano no específico. Posee un efecto bacteriolítico contra *Enterobacteriaceae* y bacterias Gram positivas. Además, contiene propiedades antiinflamatorias y ayuda al mantenimiento de la microbiota intestinal del niño. (M. Macías., S. Rodríguez., 2006; Shelhorn & Valdés, 1995)

Uno de los aminoácidos importantes de mencionar que se encuentran en la leche es la taurina ya que esta no puede ser producida por el lactante. Es de suma importancia ya que conjuga los ácidos biliares y también ayuda como posible neurotransmisor o neuromodulador del cerebro y la retina. Otro neurotransmisor importante es la cistina, este está combinado con la metionina en una proporción de 2:1, específica para leche humana. (Shelhorn & Valdés, 1995)

En cuanto a los hidratos de carbono, se encuentra la lactosa, monosacáridos como amino azúcares y glucoproteínas. La lactosa es el principal glúcido de la leche humana, se encuentra presente en altas concentraciones. Está compuesto de glucosa y galactosa. La lactosa es un nutriente específico para el primer año de vida, ya que la enzima lactasa que la metaboliza se encuentra específicamente en los infantes mientras se alimentan con leche humana. Además de proveer el 40%

de energía. La lactosa se descompone en glucosa y galactosa antes de ser absorbida por el intestino. La parte de la galactosa ayuda en la formación de los galactolípidos necesarios para el sistema nervioso central. La alta concentración de lactosa en leche humana es de suma importancia. Ayuda a facilitar la absorción de calcio y hierro, además que promueve la colonización intestinal con el *Lactobacillus bifidus*, así como microbiota fermentativa y así permite mantener un ambiente ácido en el intestino, lo que impide el crecimiento de agentes patógenos como hongos, parásitos y bacterias. (Shelhorn & Valdés, 1995)

Independientemente de la lactosa, existen más de 50 oligosacáridos de estructura distinta. Los componentes de estos azúcares complejos incluyen glucosa, galactosa, fructosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico y representan una porción significativa del nitrógeno no proteico de la leche humana. (García, 2011; M. Macías., S. Rodríguez., 2006)

En cuanto a los lípidos, son los encargados de brindar la mayor cantidad de energía. Su composición va a depender de múltiples factores en los que se incluye la dieta de la madre, edad de la lactancia, prematuridad y fase de la mamada. Los principales lípidos de la leche humana son los triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos y esteroides. (García, 2011; M. Macías., S. Rodríguez., 2006)

La lipasa es una enzima que se encuentra en la leche humana más no en la leche de vaca y su función es degradar las grasas. Esta se encuentra inactiva en la glándula mamaria y en el estómago del lactante, al llegar al intestino esta se activa en presencia de las sales biliares. Es importante en la producción de lípidos antimicrobianos. (García, 2011; Shelhorn & Valdés, 1995)

Cuadro 1. Variables que modifican las concentraciones de grasas en la leche humana	
<i>Variable</i>	<i>Característica</i>
Momento del día	<p>La producción de grasa en la leche humana tiene estrecha relación con el volumen total ingerido en 24 horas.</p> <p>Durante el mediodía y tarde se incrementan las concentraciones. Se produce menor cantidad durante la mañana y noche.</p>
Momento de la tetada	<p>Los niveles de grasa aumentan conforme la succión del bebé, en ambos pechos. Después de 10 minutos de succión en cada pecho, la concentración de grasa aumenta hasta 5 – 6% de su concentración inicial.</p>
Variaciones individuales	<p>Adecuada ingesta de grasas por parte de la madre garantiza niveles óptimos en la leche. Mujeres con aumento de peso durante el embarazo ven incrementadas las grasas en la leche.</p> <p>Alteraciones en la función de la delta, 6-saturasa, disminuyen concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados en leche humana.</p> <p>A mayor volumen de leche producida, menor será la concentración de grasas en ella.</p>
Nutrición materna	<p>En madres con desnutrición franca existe hacia el tercer mes de vida del bebé, disminución del aporte de grasas y volumen. Es importante la orientación nutricional desde la etapa prenatal o posnatal, para mejorar su alimentación y así lograr su hijo reciba la mejor opción de alimentación láctea, que es la leche de su madre.</p>

Adaptado de: García, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica de México*, 32, 223–230.

En cuanto a las vitaminas, las vitaminas liposolubles se encuentran afectadas por la ingesta de la madre. Se encuentran las liposolubles que incluyen la vitamina A,

Vitamina D, Vitamina K y vitamina E. Las vitaminas hidrosolubles son aquellas solubles en agua como la Vitamina B12 (cobalamina), B6 (piridoxina), B1 (tiamina), ácido fólico (B9), B3 (niacina) y ácido pantoténico (B5). El ácido fólico es esencial para sintetizar aminoácidos, ADN, ARN y hemoglobina. (M. Macías., S. Rodríguez., 2006; Shelhorn & Valdés, 1995)

Los minerales que están presentes en la leche humana son, el calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc, potasio y flúor y las concentraciones de estos no se ven afectados por la dieta de la madre. La concentración de hierro es baja y de absorción favorable ya que en la misma leche hay altas concentraciones de lactosa y vitamina C que hacen que se facilite su absorción. Entre las hormonas se encuentra la oxitocina, prolactina, esteroides suprarrenales y ováricos, y prostaglandinas. En la leche, en mayor cantidad se encuentra la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y GRF (factor de liberación de hormona del crecimiento). También insulina, somatostatina, relaxina, calcitonina y neurotensina. (García, 2011)

Cuadro 2. Inmunología de la leche humana	
<i>Componente</i>	<i>Función</i>
Celular	
Macrófagos	Fagocitan bacterias, hongos, virus y protozoos por lactoperoxidasas. Maduran enzimas del intestino por factor de crecimiento celular.
Polimorfonucleares	Protege al tejido mamario de mastitis.
Linfocitos	Estimula la inmunidad de memoria por la vía entero-mamaria.
Humoral	
Inmunoglobulinas (A, G, M, E, D)	Ofrecen inmunidad pasiva al recién nacido. Promueven la fagocitosis de neutrófilos. Forma anticuerpos contra bacterias y virus.
Proteínas	
Lactoferrina	Bacteriostático y antimicrobiano al atacar la membrana celular, secuestrar el hierro y bloquear el metabolismo de hidratos de carbono de <i>S. aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> Antiviral (contra VIH, CMV, HSV).
Lisozima	Bactericida por lisis bacteriana de los peptidoglicanos de las bacterias, inmunomodulador y reductor del efecto endotóxico.
K-caseína	Antiadherente, promotor del crecimiento de <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Vitaminas (A, C y E)	Efecto antiinflamatorio por eliminar radicales libres de oxígeno.
Nucleótidos	Maduran células T, incrementan la actividad de las células asesinas, la reacción de anticuerpos frente a vacunas, la maduración intestinal y la reparación entérica después de las diarreas.
Enzimas	
Lipasa	Antibacteriana y contra protozoarios.
Catalasa	Antiinflamatoria, degrada el H ₂ O ₂ .
Glutación peroxidasa	Antiinflamatoria, previene la peroxidación lipídica.
Factor activador plaquetario	Protege contra enterocolitis necrosante.
Hormonas	
Prolactina	Desarrolla linfocitos T y B, promueve la diferenciación del tejido linfoide intestinal.
Cortisol, tiroxina, insulina, y factores de crecimiento	Madura el intestino y desarrolla mecanismo de defensa.
Citocinas	Inmunomoduladores del sistema inmunitario.
Factor bifidus	Estimula el crecimiento de <i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>Lactobacillus bifidus</i> , los cuales acidifican intestino al producir ácido acético, ácido fórmico y ácido succínico contra Gram negativos y Protozoarios.
Complemento (C3 y C4)	Provoca lisis bacteriana junto con anticuerpos específicos (IgG e IgM) y tiene actividad opsonizante, quimiotáctica y bacteriolítica.

Adaptado de: García, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica de México*, 32, 223–230.

2.1.4. Infecciones bacterianas en Neonatos infectados por Leche Humana Contaminada

La leche humana extraída es una fuente importante de bacterias comensales, mutualistas o probióticas para el intestino infantil. Entre las bacterias predominantes destacan diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* o *Leuconostoc*, en consecuencia, estas bacterias constituyen la microbiota natural de la glándula mamaria y por ende, de la leche humana. Por lo tanto, esta representa uno de los factores clave en el desarrollo de la microbiota intestinal infantil. (Flores Meza, 2018)

Sin embargo, la leche humana en ocasiones puede transmitir enfermedades virales y bacterianas graves al neonato. Los bebés que consumen leche contaminada están en riesgo de resultados negativos, especialmente si nacen prematuros o si están comprometidos médicamente. (Flores Meza, 2018)

La leche se puede contaminar en cualquier punto de los procedimientos que se realizan dentro del Banco de Leche Humana. Esto puede producirse durante la extracción, la recogida, el transporte, la conservación y la manipulación de la leche. Los casos documentados de infección con estreptococos del grupo B, especies de *Listeria*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, especies de *Salmonella* y *Mycobacterium tuberculosis*; informan que la infección se ha transmitido por estas vías. (Flores Meza, 2018; Widger, O'Connell, & Stack, 2010)

Widger y colaboradores en el año 2009, informaron tres casos de septicemia neonatal con retraso, uno de ellos causó la muerte del paciente, el cual fue causado por la leche humana extraída contaminada (EBM), en el Hospital Regional de Midwestern, Limerick, Irlanda. En los tres casos se descartó mastitis en las madres, en la mayoría de casos de septicemia se le atribuye a la presencia de mastitis en la madre; en dos de los casos se aisló *Escherichia coli*, el cual se confirmó por medio de tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsado; en el tercer caso la bacteria causante de la sepsis fue *Klebsiella pneumoniae*. (Widger et al., 2010)

En 2013, Keim y colaboradores realizaron un estudio para la cuantificación de la contaminación microbiana de la leche humana comprada a través de un sitio web de Internet como un indicador de riesgo de enfermedad para los lactantes receptores. Dicho estudio reveló que la leche humana comprada a través de Internet tiene un alto crecimiento de bacterias en general y una contaminación frecuente con bacterias patógenas, lo que refleja malas prácticas de recolección, almacenamiento o envío por esta vía de obtención. El 74% de las muestras de leche de Internet fueron colonizadas con bacterias Gram negativas o tenían $> 10^4$ UFC/ml de recuento aeróbico total. Se obtuvo mayores recuentos promedio de aeróbicos totales, gramnegativos totales, coliformes y Staphylococcus que las muestras no pasteurizadas donada a los bancos de leche humana. (Keim et al., 2013)

Schanler en el año 2011 demostró en su estudio “Breastmilk cultures and infection in extremely premature infants”, que a pesar de que la leche humana tiene contacto con la microbiota de la piel de la madre y con microorganismos presentes en el extractor, no existe relación con una posible infección bacteriana en los neonatos prematuros. Realizó cultivos de 813 leches humanas donadas de las cuales se aisló 1963 microorganismos, donde se obtuvo un 60% de bacterias Gram positivo, 39% de Gram negativo y 1% de levaduras. Encontró que la distribución de especies microbianas difería entre la leche, y los aislamientos patológicos (sangre, LCR y orina), sin embargo solamente en dos casos ambos aislamientos coincidieron con el padecimiento del neonato. (Schanler et al., 2011)

2.2. Bancos de Leche Humana

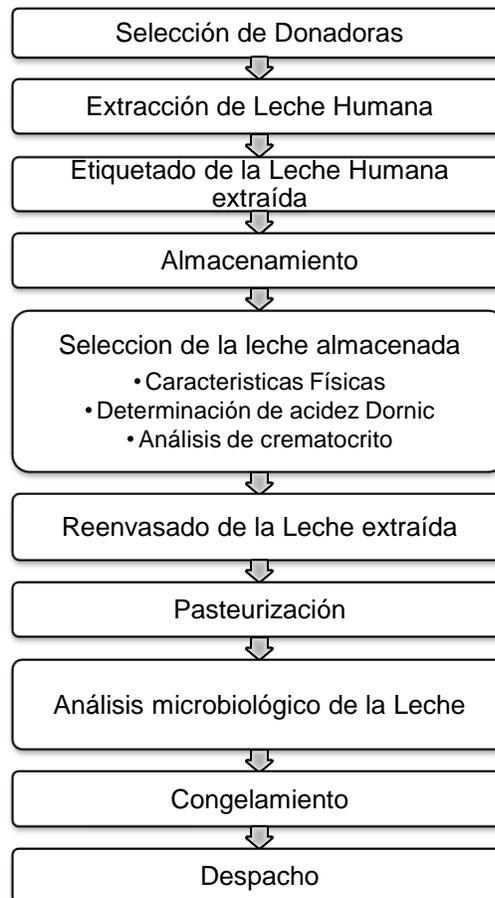
El BLH (Banco de Leche Humana) es un centro especializado de Lactancia Materna de un Hospital Materno Infantil responsable de la promoción, apoyo y protección de la lactancia materna, es decir, responsable de la recolección, procesamiento, control de calidad y despacho de la leche donada para recién nacidos de alto riesgo. Se encarga de recoger la leche donada, analizarla y pasteurizarla. Una vez certificada su calidad, la leche se congela y se distribuye a aquellos bebés que la necesiten bajo prescripción médica. Además, los BLH

también funcionan como centros de apoyo y atención a la mujer en periodo de lactancia. Las madres que tienen dudas o dificultades con respecto a la lactancia pueden acudir a ellos y recibir ayuda para continuar la alimentación a sus bebés. (Winter, Garrido, Pérez, Ramírez, & Toledo, 2011)

2.2.1. Procedimientos en un Banco de Leche

El proceso que se lleva a cabo en los bancos para recolectar, procesar y distribuir la leche es similar. (Winter et al., 2011)

Figura 3. Procedimientos de la Leche Humana extraída en el Banco de Leche



Adapto de: Winter, W., Garrido, A., Pérez, H., Ramírez, L., & Toledo, A. (2011). *Buenas Prácticas de Manufactura, Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control en los Bancos de Leche Materna Exclusiva en Hospitales Nacionales de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala.

2.2.1.1. Selección de Donadoras

La selección de donadoras tiene como fin identificar las condiciones que contraindican la donación, no solo para el interés del receptor, sino que también es de interés para la misma donadora y su propio bebé. Las donadoras de leche humana deben ser personas saludables que presenten secreción láctica superior a las exigencias de su hijo y que donen el excedente por libre y espontánea voluntad. (Arslanoglu et al., 2010)

En esta etapa se busca la presencia de malnutrición, anemia, ictericia, cianosis, disnea, entre otros; la donadora debe aportar la información sobre los medicamentos que consume y dar los antecedentes sobre su salud, en la entrevista. (Barrios, 2015; Arslanoglu et al., 2010)

2.2.1.2. Extracción de Leche Humana

La calidad de la leche humana extraída cruda es el resultado del esfuerzo en dar una orientación adecuada desde la extracción de la leche humana hasta el momento de su consumo. Cuanto menor sea el número de bacterias presentes en la leche humana cruda, mayor es el valor biológico y menor es el riesgo de no conformidades de calidad e inocuidad, recuento menor a 1.0×10^2 UFC/mL, es decir menor es el porcentaje de desecho de producto contaminado. (Arslanoglu et al., 2010; Barrios, 2015)

Debe orientarse a la donante sobre los cuidados básicos de higiene personal de rutina y a la colocación de su propia leche sobre los pezones después de cada extracción, ya que esta leche rica en emulsión contiene sustancias que contribuyen al mantenimiento de la elasticidad del pezón y evita agrietamientos. Así mismo los ácidos grasos de cadena corta actúan como bactericidas como el factor anti-estafilococo que actúa como protector contra los *Staphylococcus* de la piel. (Arslanoglu et al., 2010; Barrios, 2015)

2.2.1.3. Etiquetado de la Leche Humana

Toda leche humana recolectada que sea sometida a procesamiento debe ser obligatoriamente identificada. Todo producto recolectado y procesado debe contener externamente en el embalaje identificador que posibiliten caracterizarlo y rastrearlo cuanto a su origen y a la ocurrencia de posibles no conformidades. (Arslanoglu et al., 2010)

2.2.1.4. Pre-almacenamiento

Después de la extracción, el producto es sometido a enfriamiento rápido, igual o inferior a 5°C. En esta condición de temperatura, tanto las enzimas de la leche humana como aquellas que integran la ruta metabólica de los microorganismos contaminantes tienen una velocidad reducida de acción de forma sustancial, de manera que garantizan que las reacciones indeseables no ocurran por periodos de hasta doce horas, una vez se respete el límite de 5°C. Si el producto se debe almacenar por un periodo superior a 12 horas, se puede conservar hasta 15 días en estado congelado a -18°C antes de ser procesada. (Arslanoglu et al., 2010)

2.2.1.5. Transporte

Cuando la leche no es extraída en el Banco de Leche, esta necesita ser transportada a este mismo bajo ciertas condiciones; o bien cuando la leche pasteurizada necesita ser llevada a una unidad receptora. Debe permanecer en un ambiente aislado térmicamente a través del uso de cajas denominadas isotérmicas, con material que presente baja conductibilidad térmica. Los frascos que contienen leche humana refrigerada y los que tienen leche humana congelada, se deben transportar de forma separada. (Guzmán et al., 2016)

2.2.1.6. Selección y Clasificación de la Leche

El producto que es sometido inmediatamente a selección, clasificación y tratamiento de conservación específica deberá ser almacenado en las mismas condiciones que mantenía desde la colecta. Se debe verificar que el envase

utilizado esté de conformidad con los patrones establecidos. El envase debe estar íntegro. (Winter et al., 2011)

- **Características físicas**

Debe de haber personal capacitado que verifique que el envase utilizado esté íntegro y cumpla con las normas de higiene establecidas. (Barrios, 2015)

- **Determinación del Color**

La primera característica física por evaluarse es el color de la leche, ya que éste es un indicador de calidad. Además del color blanco o amarillo suave, se consideran normales el color anaranjado que corresponde al pigmento caroteno y verdoso a pigmentos vegetales, algas marinas o por el consumo de bebidas deportivas. Si presenta un color rosado, rojizo o café se descarta, por posible presencia de sangre. (Winter et al., 2011) (Barrios, 2015)

- **Determinación del *Flavor***

Se determina la mezcla de olor y sabor de la leche humana extraída, a esta característica se le denomina *flavor*. Éste debe resultar de los propios constituyentes de la leche. La leche humana es un fluido de reacción levemente alcalina o próxima a la neutralidad, cuyo sabor se muestra suavemente endulzado durante los primeros 30 días de lactancia, después su *flavor* se torna ligeramente salado (quinto mes de lactancia). Esto se da como consecuencia de la relación clorato/lactosa. (Winter et al., 2011)

- **Determinación de suciedades**

Se realiza una evaluación para descartar contaminación física de la leche. Se descarta toda muestra que tenga presencia de cuerpos extraños: pelos, restos de alimentos, uñas, insectos, papel, vidrio, etc. (Winter et al., 2011)

- **Características Químicas**

- **Acidez de Dornic**

La leche presenta una acidez original consecuencia de su propia composición, tales como las micelas de caseína, sales minerales (entre las cuales se destacan los fosfatos y citratos), así como las proteínas del suero de la leche, y son los principales responsables por esa propiedad química. La acidez de la leche humana puede ser clasificada como original y desarrollada. La original resulta de la presencia de sus constituyentes y la desarrollada deriva del ácido láctico, producido a partir del crecimiento bacteriano. (Barrios, 2015)

- **Crematocrito**

El crematocrito es semejante al micro-hematocrito, se utiliza la leche en lugar de la sangre. Luego de la centrifugación de los capilares por 15 minutos, ocurre la separación de la crema y del suero de la leche, la crema ocupa la parte posterior del capilar y corresponde a la fracción de coloración más densa. El suero, de aspecto “menos denso”, se queda debajo de la crema. Por lo que en cuanto mayor sea el contenido de grasa (contenido energético), menor será la concentración de inmunoglobulinas, que brindan la protección química y biológica en el tracto digestivo del lactante. (Barrios, 2015)

2.2.1.7. Re-embasado de Leche Humana extraída

El tiempo de almacenamiento de la leche humana extraída, o vida de estantería, depende, entre otros factores, del tipo de embalaje utilizado para acondicionarla. Entre las características deseables en un embalaje destinado al acondicionamiento de la leche humana, se destacan: ser químicamente inerte, no permitir intercambios indeseables con el producto acondicionado; presentar sellado perfecto, impedir contacto con el medio externo; ser resistente a procesos de esterilización/sanitarios y presentar resistencia física al estrés promovido por oscilaciones bruscas de temperatura. (Barrios, 2015)

2.2.1.8. Pasteurización

Se trata de un tratamiento térmico aplicable a la leche humana que adopta como referencia la inactividad térmica del microorganismo más termo resistente, *Coxiella*

burnetti. Una vez observada la temperatura de inactividad y tiempo de exposición capaz de desactivar ese microorganismo, se puede asegurar que los demás patógenos también estarán térmicamente inactivos. (Guzmán et al., 2016)

2.2.1.9. Análisis microbiológico de la Leche Humana pasteurizada

Después del proceso de pasteurización se realiza un análisis microbiológico, en este las bacterias que debe investigarse deben incluir aerobios mesófilos, indicadores de contaminación fecal (Enterobacterias) y *Staphylococcus aureus*. Los criterios microbiológicos, afirman que, para obtener una leche de calidad óptima, esta debe tener menos de 2.5×10^3 UFC/mL y para una calidad aceptable $2.5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^4$ UFC/mL de aerobios mesófilas. (Guzmán et al., 2016)

2.2.1.10. Congelamiento de la Leche Humana pasteurizada

El congelamiento de la leche humana pasteurizada se debe realizar inmediatamente después de la etapa de enfriamiento rápido y la toma de muestra para el control microbiológico. Por lo tanto, la leche deberá permanecer en cuarentena hasta obtener los resultados. (Barrios, 2015)

El congelamiento debe realizarse en congeladores o freezers, que garanticen una temperatura de almacenamiento entre -16°C a -18°C ésta debe ser controlada diariamente. Idealmente se debe utilizar un freezer para mantener la leche a la temperatura de congelamiento y otro freezer solo para la leche almacenada. (Barrios, 2015; Guzmán et al., 2016)

La leche en el congelador puede permanecer almacenada por un período de 6 meses, sin embargo, una vez descongelada, deberá ser consumida de forma rápida. No se debe permitir, bajo ninguna circunstancia, volver a enfriar o congelar el producto de nuevo. (Barrios, 2015; Guzmán et al., 2016)

2.2.1.11. Despacho de Leche Humana

El banco de leche debe distribuir solo el producto final que ha sido sometido al correcto procesamiento y control adecuado de calidad, y así asegurar la inocuidad

de la leche humana. Se debe llevar un registro de la leche procesada que es distribuida. Excepto cuando el receptor sea el hijo de la donante. (Winter et al., 2011)

2.3. Buenas Prácticas de Manufactura aplicadas a Bancos de Leche Humana

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son condiciones de infraestructura y procedimientos que se establecen para todos los procedimientos de producción y control de alimentos, bebidas, entre otros con el único objetivo de brindar un servicio o producto de calidad y que permita seguir las normas aceptadas internacionalmente. (Barrios, 2015; Winter et al., 2011)

Estas normas pueden establecerse para regular Bancos de Leche Humana que procesan o acopian leche, para asegurar la calidad de esta para su consumo. En el manual de BPM se establecen normas en las cuales se deben considerar en las instalaciones, equipo, controles de producción y el proceso de los bancos de leche. (Barrios, 2015; Winter et al., 2011)

Codex alimentarius y las normas FDA (Food and Drug Administration), señalan que para poder implementar las BPM se deben cumplir ciertos criterios los cuales son los siguientes:

2.3.1. Alrededores y Ubicación

Las áreas aledañas al banco de leche deben de contar con condiciones que protejan la leche humana de la contaminación y mantener condiciones asépticas. A su vez, el banco de leche debe estar situado en un lugar de fácil acceso y en una zona libre de contaminación física, química y biológica. Entre estas condiciones se encuentra el correcto almacenamiento del equipo en desuso, mantenimiento adecuado de drenajes y retirar desechos sólidos y desperdicios en su lugar correspondiente. (Barrios, 2015)

2.3.2. Instalaciones Físicas del área de Proceso y Almacenamiento

El área del banco de Leche Humana debe estar distante de cualquier dependencia que pueda comprometer la calidad de la leche humana procesada, de preferencia debe estar cerca del área de cuidados intensivos de Recién Nacidos. (Guzmán et al., 2016)

El tamaño, diseño y construcción debe ser proporcional y exclusivo para este servicio para que permita la separación de las diferentes áreas de procesamiento. (Winter et al., 2011)

Las áreas deben dividirse en

- a. Área de Recepción de Leche Humana y Registro de Donantes
- b. Área de Vestidores y de Higiene
- c. Área de Extracción Interna
- d. Área de Almacenamiento de Leche Humana
- e. Área de Procesamiento
- f. Área de Control de Calidad

En cuanto a la construcción, los pisos deben ser de material no tóxico y fácil limpieza, antideslizante e impermeable. Las paredes no deben contener pintura tóxica y debe ser color claro, además, pueden ser construidas de concreto o ladrillo. Los techos no deben tener grietas o filtración de algún líquido y se debe evitar la formación de mohos o acumulación de suciedad. Los bordes de las ventanas deben construirse con curvatura sanitaria. Se recomienda que las ventanas sean solamente para la iluminación natural del banco. Las puertas deben contar con protección para evitar ingreso de plagas. En cuanto a iluminación, se debe evitar cables colgantes sobre las áreas de procesamiento. La zona de ventilación debe contar con un sistema de extracción de gases o humos y vapores. (Alustiza et al., 2017; Paz & Gómez, 2010)

Por último, todo equipo y utensilios deben ser especiales para su uso destinado. No deben utilizarse materiales que absorban humedad ni ser corrosivos. No se recomienda el uso de madera. Para el mantenimiento de los equipos o mobiliario

se recomienda hacer las reparaciones fuera de las áreas limpias. Se debe contar con un registro del mantenimiento de equipo o instrumentos del banco. (Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos, 2016)

2.4. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP por sus siglas en inglés)

Este sistema se basa en identificar, evaluar, prevenir, y controlar peligros significativos durante la cadena de producción con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), es un “abordaje preventivo y sistemático dirigido a la prevención y control de peligros biológicos, químicos y físicos, por medio de anticipación y prevención, en lugar de inspección y pruebas en productos finales”. (Kolbe, 2009)

HACCP, cuenta con 7 principios:

1. Realizar análisis de peligros e identificar medidas preventivas.
2. Determinar los puntos críticos de control.
3. Establecer límites críticos.
4. Establecer un sistema de control para monitorear el PCC.
5. Establecer acciones correctivas cuando el monitoreo indique que un determinado PCC no está bajo control.
6. Establecer procedimientos de verificación para confirmar si el funcionamiento de HACCP es eficaz.
7. Establecer documentación para todos los procedimientos y registros apropiados para estos principios y su aplicación.

Para lograr su eficacia, se debe formar un equipo multidisciplinario y capacitado el cual sea capaz de tener las competencias para lograr que se lleve a cabo y así evitar fallos. Como primer plano, debe describirse el producto y el uso al que será destinado. Para mayor orden, se deberá incluir un diagrama de flujo que tome en cuenta todas las fases de las operaciones de banco de leche. Luego, al tener ya

toda la información anterior, se deben enumerar todos los posibles riesgos relacionados con cada fase de operación, ejecutar análisis de peligros y estudiar las medidas para controlar aquellos peligros que fueron identificados. Al realizar este análisis, se deberá considerar la probabilidad de que surjan peligros y la gravedad de sus efectos nocivos para la salud. Realizar medida de control para cada peligro. (Kolbe, 2009)

Para determinar los puntos críticos de control PCC, se deberá analizar cada fase de recolección, pasteurización, almacenamiento, distribución u otro y aplicar decisiones de manera flexible. Además, se deben establecer límites críticos para cada PPC, posiblemente para alguna fase se fijará más de un límite crítico. Pueden ser mediciones de temperatura, tiempo, nivel de humedad, pH y cloro disponible, así como sensorial, en el banco de leche. (Kolbe, 2009)

Se debe también establecer un sistema de vigilancia para cada PPC el cual tiene como objetivo detectar pérdida de control y proporcionar información para realizar correcciones que permitan asegurar el control del proceso para impedir que se infrinjan límites críticos. Este documento, deberá estar firmado por el encargado de vigilancia y el funcionario del banco de leche. (Kolbe, 2009)

Seguido a esto, se debe establecer medidas correctivas y procedimientos de comprobación, documentación y registro para permitir el buen funcionamiento del banco de leche. Existen también aspectos fundamentales de sistemas de control de higiene en el banco de leche que se mencionan a continuación:

- Control de tiempo y temperatura

La leche humana donada, que no ha sido sometida a buen control de temperatura en cada uno de los procesos, puede causar enfermedad. Por ello se lleva un registro en cada una de las fases por las que la leche es sometida. Los controles abarcan la duración y temperatura de almacenamiento de la leche humana extraída y donada, pasteurización, enfriamiento rápido, congelamiento y almacenamiento del producto final. Los sistemas que aseguran el control eficaz de temperatura son:

clasificación de leche donada, duración previa de la leche pasteurizada en estado congelado y los métodos de envasado.

- Fases de procesos específicos
El envasado y almacenamiento previo a la pasteurización, pasteurización, enfriamiento rápido y congelamiento de leche humana pasteurizada forma parte de estos procesos.
- Especificaciones microbiológicas y de otra índole
Debe basarse en principios científicos y ajustarse a las normas del banco de leche.
- Contaminación microbiológica
Por medio de manipuladores, superficies o instrumentos, las muestras de leche humana pueden ser contaminadas. Cada muestra que esté sin pasteurizar deberá estar separada de todas aquellas leches que ya se encuentren pasteurizadas.
- Contaminación física y química

Se debe implementar un sistema para reducir riesgos de contaminación de leche por cuerpos extraños como polvo, cabellos, uñas, fragmentos de cualquier material y sustancias químicas indeseables. (Kolbe, 2009)

2.5. Norma técnica de muestreo de Superficies en Bancos de Leche Humana

En la actualidad la red de Bancos de Leche Humana no cuenta con una norma técnica de Muestreo de superficies como tal, sin embargo, para garantizar el control de calidad y el cumplimiento de la normativa dentro de los BLH y CRLH se define la necesidad de realizar el monitoreo de superficies en contacto directo e indirecto con la Leche Humana.

Según la Norma Técnica de El Salvador, “Lineamientos técnicos para la implementación y operativización de bancos de leche humana y centros recolectores”, se recomienda realizar un automonitoreo trimestral de los procesos de limpieza y desinfección de superficies implementados dentro del BLH, con la finalidad del cumplimiento de los procedimientos técnicos establecidos. Así mismo la coordinación de la Red Nacional de cada país debe realizar un monitoreo semestral a cada BLH para verificar el cumplimiento de los procesos normados. (Ministerio de Salud El Salvador, 2017)

La técnica de muestreo de superficies descritas en esta investigación está basada en la “Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas”. (Guía Técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con Alimentos y Bebidas, 2017)

CAPÍTULO III

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA FASE PREANALÍTICA DEL BANCO DE LECHE DEL HOSPITAL NACIONAL PEDRO DE BETHANCOURT DE ANTIGUA GUATEMALA, SACATEPÉQUEZ

3.1. Resultados

Las muestras tomadas de pezones fueron a 100 donadoras, 4 tomas de muestra a manos de trabajadores en constante contacto con los procedimientos realizados dentro del Banco de Leche Humana; 7 superficies de las diferentes áreas del laboratorio (Mesas de trabajo, grifos, dispensador de papel, paredes y bandeja de despacho); 6 embudos de extracción, los cuales se mantienen en contacto directo con los pezones a la hora de la extracción de leche humana; y por ultimo 6 frascos de vidrio estériles para la recolección y almacenamiento de la leche donada.

3.2. Resultados de crecimiento bacteriano en placas Petrifilm

En la tabla 1, se resume los resultados obtenidos del crecimiento bacteriano en las placas Petrifilm para Aerobios y las placas Petrifilm para *E. coli*/Coliformes Totales acorde a las muestras Totales obtenidas de pezones, manos de trabajadores, superficies irregulares/regulares, Embudos de extracción y Frascos de recolección.

Las estadísticas obtenidas demuestran una frecuencia absoluta de 8 para *E. coli*/Coliformes Totales y 79 para Aerobios; un promedio de 392 UFC/mL *E. coli*/Coliformes Totales y 2,270 UFC/mL para Aerobios, de las cuales 93 muestras son “No Aceptables” conforme a los parámetros establecidos. (Guía Técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con Alimentos y Bebidas, 2017; La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008) (Ver Anexo 1)

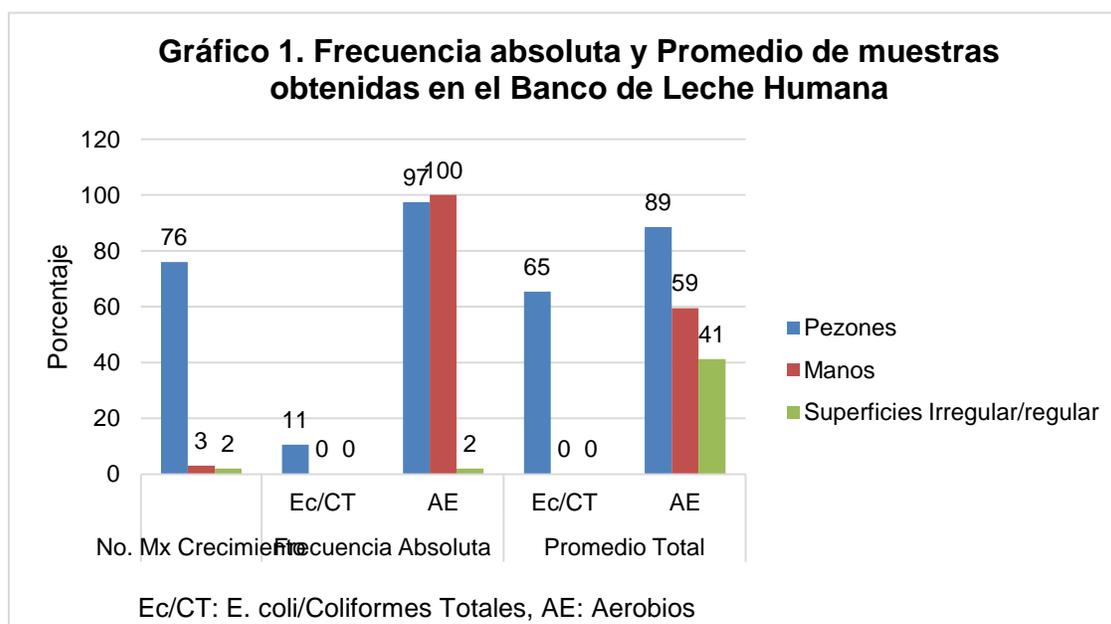
En algunas placas de Petrifilm, el número de colonias fue mayor a 150 para *E. coli*/Coliformes Totales y 300 para Aerobios, superando el límite máximo de recuento de colonias en dichas placas de Petrifilm, por lo tanto al realizar el cálculo de UFC/mL se realizó sobre 150 y 300 colonias respectivamente para cada placa Petrifilm. El valor máximo de para *E. coli*/Coliformes Totales es de 600 UFC/mL y para Aerobios es de 1,200 UFC/mL, ya que no se realizó ninguna dilución. Ninguna muestra presentó colonias características para *E. coli*. (3M Company, 2004; 3M Science Applied to Life, 2019; Center, 2008)

Tabla 1 Promedio y Frecuencia absoluta de UFC/ml en muestras obtenidas en el Banco de Leche Humana

Muestra	Crecimiento Bacteriano (No. De Mx)	Frecuencia Absoluta		Promedio (UFC/mL)	
		Ec/CT*	Ae**	Ec/CT*	Ae**
Pezones (n = 100)	76	8	74	392	1062.65
Manos (n = 4)	3	0	3	0	713.33
Superficies Irregular/regular (n = 5)	2	0	2	0	494
Embudos de Extracción (n = 6)	0	0	0	0	0
Frascos (n = 7)	0	0	0	0	0

**E. coli*/Coliformes Totales

** Aerobios



En la tabla 2 se puede observar los distintos servicios de los cuales provienen las madres donadoras sin tomar en cuenta a aquellas que donan en su domicilio, en cuyo caso la leche solamente es transportada del domicilio al Banco de Leche Humana.

De las 76 muestras de pezones de las donadoras por Servicio, las cuáles no cumplieron con los límites de Aceptabilidad, 8 muestras presentaron crecimiento de *E. coli*/Coliformes Totales mientras que 74 presentaron crecimiento de Aerobios, dichos resultados muestran un número elevado de crecimiento bacteriano en madres donadoras provenientes de la Clínica de Tamizaje, 44 muestras de 55 en total. (Tabla 2).

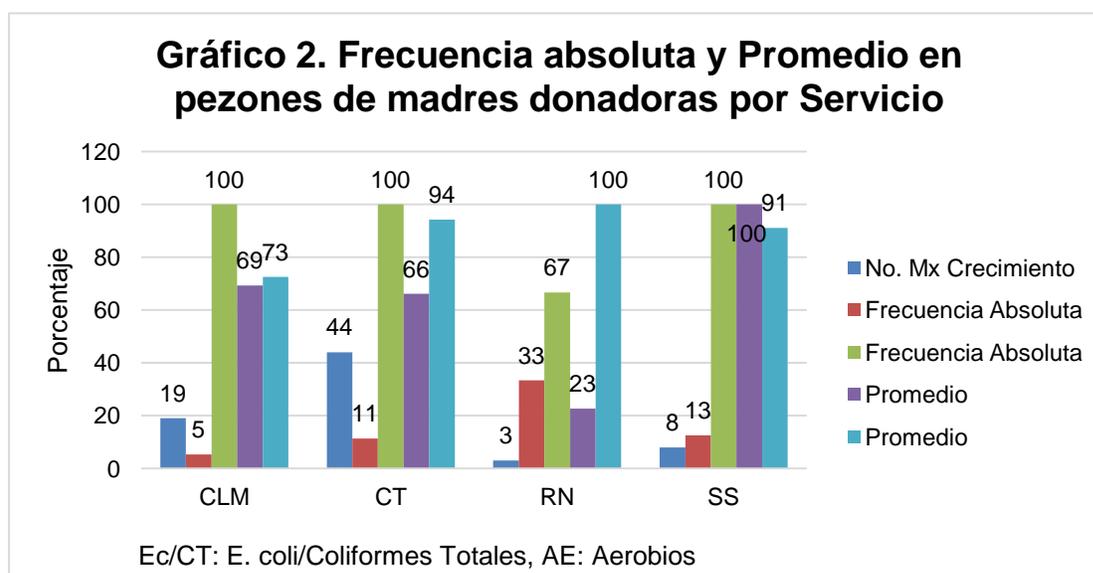
Tabla 2 Promedio y Frecuencia absoluta de UFC/ml en Pezones de madres donadoras por Servicio (n = 100)

Servicio	Crecimiento Bacteriano (No. De Mx)	Frecuencia Absoluta		Promedio (UFC/mL)	
		Ec/CT*	Ae**	Ec/CT*	Ae**
Clínica Lactancia Materna (CLM)	19/26	1	19	416	870.32
Clínica de Tamizaje (CT)	44/55	5	44	396.80	1130.7
Recién Nacidos (RN)	3/8	1	2	136	1200
Pediatría	0/1	0	0	0	0
Emergencia	1/1	0	1	0	800
Sin Servicio ⁺	8/9	1	8	600	1093.5
Total	76/100	8	74	193.6	68.85

* *E. coli*/Coliformes Totales

** Aerobios

⁺ En algunas donadoras no se logró especificar el servicio del cual provenían ya que luego de ser muestreadas no donaron al banco de leche Humana por razones personales.



3.3. Gráficos y rango de aceptabilidad

En el Gráfico 1, se logra observar el número de muestras que cumplen con el rango de “aceptabilidad” para *E. coli*/Coliformes Totales y Aerobios en las placas Petrifilm, según los parámetros establecidos. (Guía Técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con Alimentos y Bebidas, 2017; La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008) (Ver Anexo 1)

Las muestras de manos, superficies, embudos de extracción y frascos resultaron cumplir con el 100% del rango de aceptabilidad para *E.coli*/coliformes totales. Lo cual representa un manejo adecuado del procedimiento de esterilización de dichos

instrumentos y un adecuado lavado de manos. Sin embargo, en muestras de pezones, el 8% corresponde a muestras de pezones que no cumplieron con el límite aceptable para Coliformes Totales. Ninguna muestra fue positiva para *E. coli*.

En cuanto a Aerobios, embudos de extracción y frascos cumplieron con el 100% del rango de aceptabilidad. Las manos de trabajadores cumplieron con el 25% de aceptabilidad para *E. coli*/Coliformes Totales, es decir, el 75% no cumplieron con los parámetros para Aerobios; el 29% de superficies muestreadas no cumplieron con los rangos; y en cuanto a muestras de pezones, solamente el 26% cumplió lo cual prueba que el 74% de madres muestreadas no aplican correctamente la limpieza de pezones.

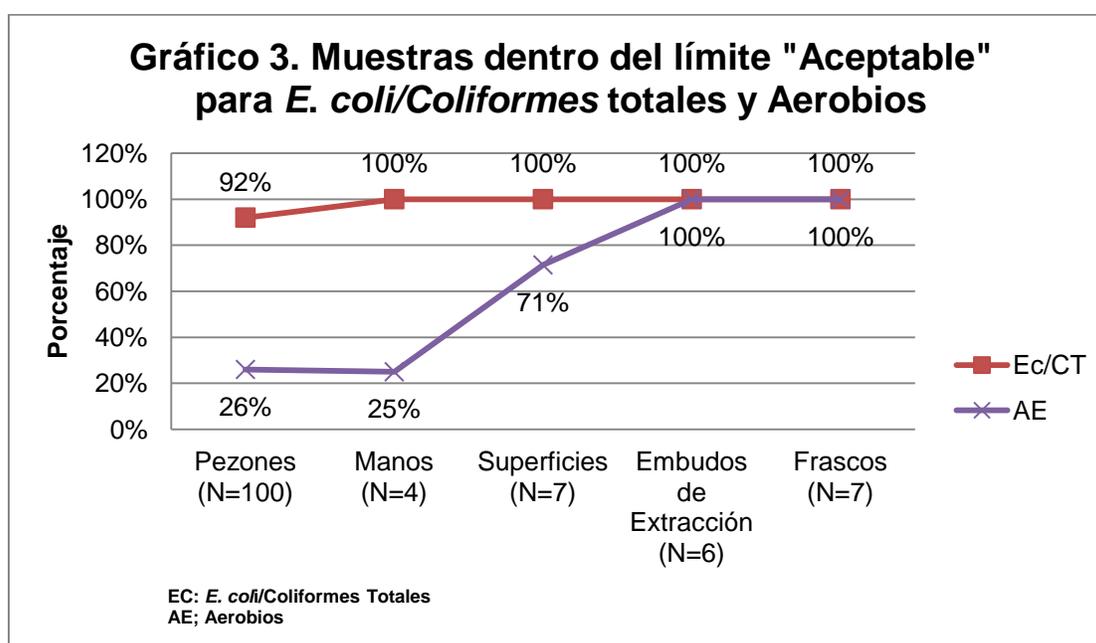


Tabla 3 Muestras dentro del límite "Aceptable" para *E. coli*/Coliformes totales y Aerobios

MX	No. De muestras	Aceptable Ec/CT	Aceptable AE
Pezones (N=100)	100	92%	26%
Manos (N=4)	4	100%	25%
Superficies (N=7)	7	100%	71%
Embudos de Extracción (N=6)	6	100%	100%
Frascos (N=7)	7	100%	100%

Ec/CT: *E. coli*/Coliformes Totales, AE: Aerobios

Para muestras de *E.coli*/coliformes totales, el servicio de pediatría y emergencia fueron los únicos que estuvieron dentro del límite, aunque el número de donadoras fue solamente 1 respectivamente; para la Clínica de Lactancia Materna (CLM) solamente el 4% no estuvo dentro del límite; en Clínica de tamizaje (CT) el porcentaje presentado de donadoras que no cumplieron fue el 9%; en Recién Nacidos (RN) el 12% no se encontró dentro del límite, el cual hasta ahora representa el servicio que mayor porcentaje tiene de incumplimiento; y con el 11% se encontraron aquellas donadoras que no pertenecían a ningún servicio. Ninguna muestra dio positivo para *E. coli* (Grafico 2).

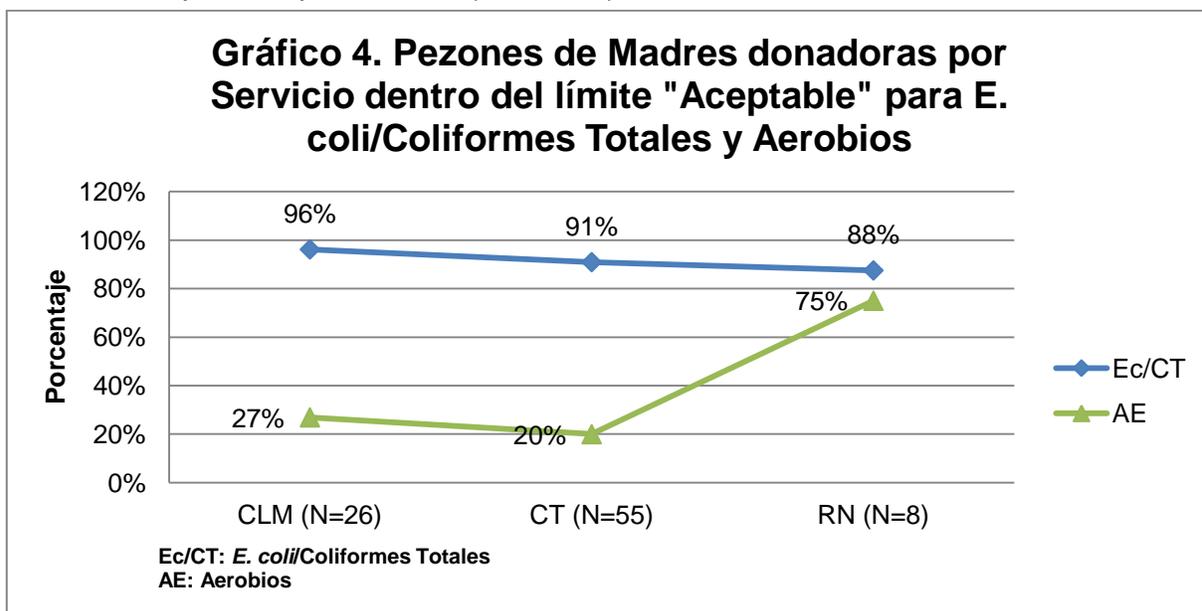


Tabla 4 Pezones de madres donadoras por Servicio dentro del límite "Aceptable" para *E. coli*/Coliformes Totales y Aerobios

Servicio	No. De muestras	Aceptable Ec/CT	Aceptable AE
CLM (N=26)	26	96%	27%
CT (N=55)	55	91%	20%
RN (N=8)	8	88%	75%
Pediatría (N=1)	1	100%	100%
Emergencia (N=1)	1	100%	0%
Sin servicio (N=9)	9	89%	11%

Ec/CT: *E. coli*/Coliformes Totales, AE: Aerobios

En cuanto a Aerobios, fue el análisis que otorgó el mayor porcentaje de donadoras que no entran dentro del límite de aceptabilidad, es decir, el crecimiento de

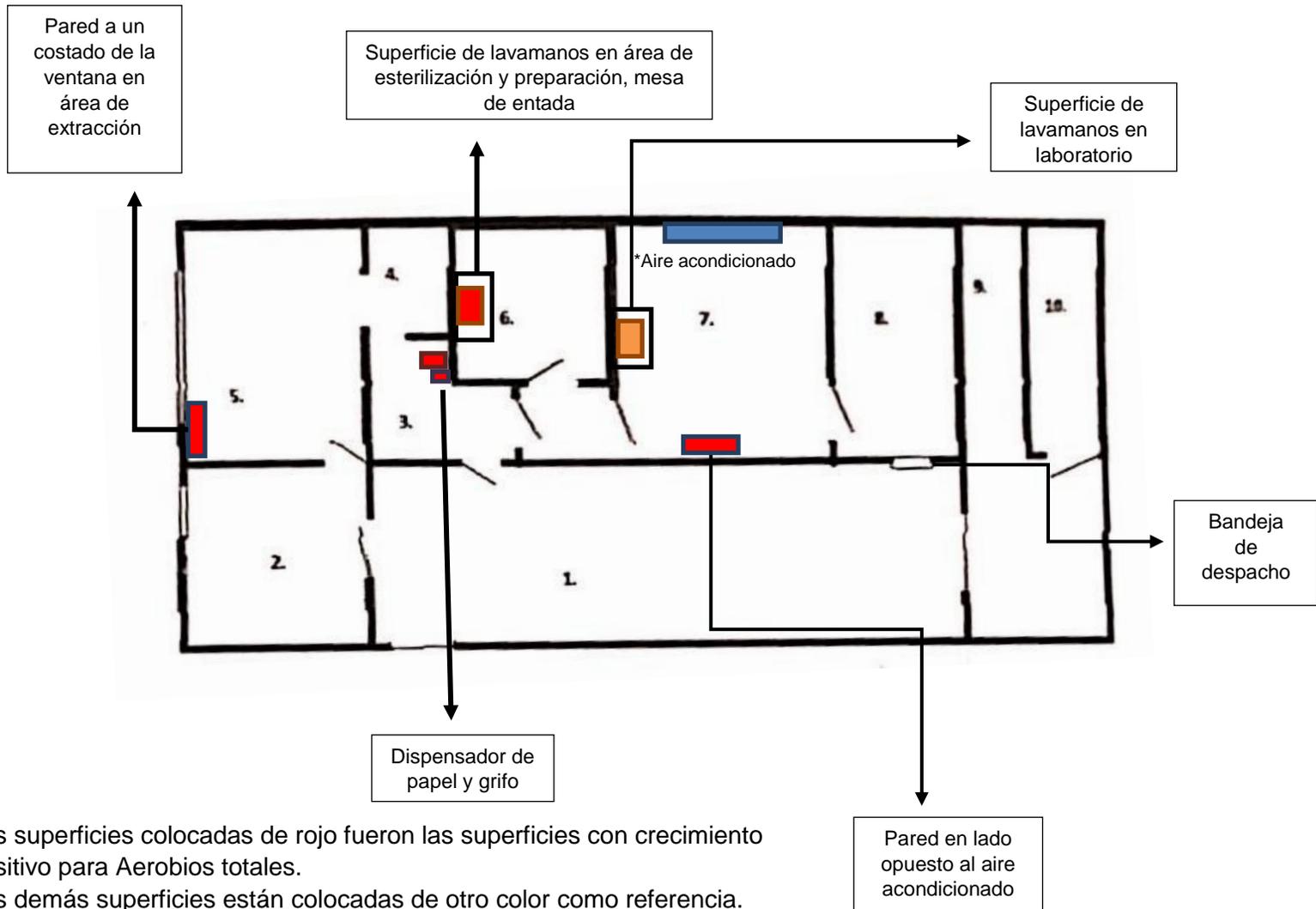
bacterias aerobias sobrepasó el límite permisible y los datos fueron para clínica de lactancia materna solamente el 27% cumplió; para clínica de tamizaje fue el 20%; recién nacidos cumplió el 75%; en emergencia el grupo está conformado por solamente una donadora y no presentó ausencia de aerobios totales; donadoras que no pertenecen a ningún servicio solamente el 11% cumplió; y pediatría presentó el 100% dentro del límite de aceptabilidad, el cual corresponde a solamente una donadora (Grafico 2).

3.4. Mapeo de muestreo del Banco de Leche Humana “Dr. Miguel Ángel Soto Galindo”

Se realizó el muestreo de 7 superficies en cuatro áreas y ciertos puntos donde la leche donada se encuentra más propensa a contaminarse.

De estas áreas, la pared cercana a la ventana del área espacio amigable (5), grifo y dispensador del área de preparación e higiene de madres donadoras (3), superficie de lavamanos en el área de esterilización y preparación de reactivos (6), la mesa donde se coloca la leche donada y la pared al lado opuesto del aire acondicionado en el laboratorio (7) y la bandeja de despacho del área de despacho (8) fueron positivas para recuento total de aerobios. Ninguna superficie fue positiva para *E.coli*/coilformes.

Figura 4. Superficies muestreadas en el Banco de Leche Humana “Dr. Miguel Ángel Soto Galindo



- Las superficies colocadas de rojo fueron las superficies con crecimiento positivo para Aerobios totales.
- Las demás superficies están colocadas de otro color como referencia.

3.5. Discusión de resultados

En el banco de leche humana se realizan procedimientos de higiene para la obtención aséptica de la leche humana donada, por lo tanto se cuenta con equipos e instrumentos esterilizados para extracción, manipulación y almacenamiento; sin embargo factores como la manipulación con las manos y la falta o mala higiene de la glándula mamaria condicionan dicha obtención aséptica, por lo tanto la carga bacteriana debe ser la más baja posible. (Gormaz-Moreno, Roqués Serradilla, Dalmau, Vento, & Vitoria Miñana, 2011)

En este estudio se observó alta frecuencia de bacterias aerobias en pezones con un crecimiento promedio de 1,063 UFC/mL, una presencia grande en comparación con los parámetros para superficies vivas, lo cual representa el 74% de muestras que no cumplen con dichos parámetros. Además de la presencia de Coliformes Totales en algunas muestras las cuales superan los parámetros para superficies vivas con un promedio de 392 UFC/mL, representó el 8% de las muestras obtenidas (Ver Anexo 1).

Estudios realizados por Urbaniak y asociados, en el cual se realizaron cultivos del tejido mamario de mujeres entre 18 a 90 años de edad, originarias de Canadá e Irlanda; se demostró una presencia de bacterias de los géneros *Bacillus* (11.4%), *Acinetobacter* (10%), *Enterobacteriaceae* (8.3%), *Pseudomonas* (6.5%), *Staphylococcus* (6.5%), *Propionibacterium* (5.8%), *Comamonadaceae* (5.7%), *Gammaproteobacteria* (5.0%) y *Prevotella* (5%) en las muestras de mujeres Canadienses; mientras que aquellas muestras provenientes de Irlanda, fueron *Enterobacteriaceae* (30.8%), *Staphylococcus* (12.7%), *Listeria welshimeri* (12.1%), *Propionibacterium* (10.1%) y *Pseudomonas* (5.3%). Con cantidades que variaban de 75 a 2,000 UFC/mL. (Urbaniak et al., 2014)

El estudio de Kathleen Costa (1989) comparó la limpieza en manos y pechos de donadoras, en este estudio se reveló que un grupo de donadoras al cual se les instruyó bañarse con un jabón sin olor antes de presentarse al banco de leche humana y además se les indicó realizar un lavado de manos de por lo menos 3 minutos de duración, presentó disminución importante de carga bacteriana en la leche de *Staphylococcus epidermidis* en comparación con el grupo cuya limpieza fue únicamente en manos. Según las Recomendaciones para la organización y la operación de un banco de leche en Suiza, la microbiota de la leche proviene del seno de la madre, incluso al respetarlas normas de higiene, a menudo se contiene bacterias grampositivas con crecimiento mayor a 10^5 UFC/ml. Se sugiere que cuando la leche causa infección en el paciente receptor es por causa de bacterias como *E. coli* o *Streptococcus* del grupo B. (Frischknecht et al., 2010)

En cuanto a manos de trabajadores del banco de leche humana se observó alta frecuencia de bacterias aerobias con un crecimiento promedio de 713 UFC/mL, lo cual representa el 75% de muestras que no cumplen con dichos parámetros. Sin embargo, se demostró la completa ausencia de *E. coli*/Coliformes Totales (Ver Anexo 1). En los bancos de leche y hospital en general, se recomienda que los trabajadores lleven adecuada higiene para evitar propagación de bacterias, transmisión de enfermedades, como lo explica la guía de Children's Hospital of Orange County, United States, recomienda siempre utilizar uñas cortas y sin pintauñas (Steele, 2018).

Moolenaar y asociados, publicaron un estudio donde evaluaron las uñas de enfermeras de una unidad intensiva neonatal reveló que las uñas cortas del grupo C, fueron las únicas que no presentaron riesgo de transmisión de *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con el grupo A, que presentaban uñas largas naturales y el grupo B, que presentaban uñas largas artificiales y con pintauñas. Estos últimos dos grupos representaron riesgo de transmisión de enfermedades en dicha unidad. (Moolenaar et al., 2014) En comparación con el estudio que realizó Noemi Zuta en donde se buscó la microbiota de manos y uniformes de enfermeros en áreas asistenciales en un hospital de Callao, se aislaron tanto de manos como uniformes *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa, no hubo aislamientos de bacterias patógenas. (Zuta, 2018)

En el 2003, Ingrid Berganza realizó un estudio de la microbiota predominante en manos y uñas de cirujanos y personal paramédico de las áreas de cirugía, recién nacidos y post parto en el hospital nacional de Chimaltenango, se evaluó el impacto del lavado de manos en dos fases; en donde la primer fase se evaluó el lavado de manos sin plan educacional mientras que la segunda fase se evaluó el lavado de manos después de realizar un plan educacional; del cual se logró la ausencia de bacterias entéricas, sin embargo bacterias aeróbicas como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* persistieron en los cultivos en bajo porcentaje. (Berganza, 2003)

Los resultados obtenidos acerca de extractores y frascos de almacenamiento de leche humana donada demostró la ausencia en un 100% de *E. coli*/coliformes totales y aerobios, lo cual representa un manejo adecuado del procedimiento de esterilización de dichos instrumentos.

No se cuenta con bibliografía acerca de extractores o frascos de almacenamiento de leche que hayan sido analizados y que refieran ser fuente principal de contaminación. Sin embargo, en el Children's Hospital of Orange County, United States, recomiendan que si se utiliza contenedores de leche desechables deban estar debidamente sanitizados para evitar contaminación de la leche si en caso hubiese bacterias. El equipo a utilizar preferiblemente debe ser estéril, basándose

en la Guía de preparación de leche humana y fórmula para unidades de salud. (Steele, 2018; Steele & Collins, 2018)

En hospitales de Bélgica y Luxemburgo, refieren que no aceptan leche recolectada de madres en sus hogares ya que no es posible conocer si el extractor de leche ha sido sanitizado y es práctica hospitalaria desinfectar estos extractores en el hospital o proveer nuevos. (Cossey, Johansson, de Halleux, & Vanhole, 2012)

En el muestreo de superficies, se logró observar la ausencia de *E. coli*/coliformes totales, sin embargo dos superficies pertenecientes a la zona de riesgo nivel 2, las cuales son superficies sin contacto directo con la leche pero se encuentran en proximidad cercana a ella, dichas superficies fueron el grifo y dispensador de papel que se encuentran en la área de preparación e higiene de madres donadoras. Con un promedio de 494 UFC/mL de bacterias aerobias.

Tal y como lo demostró Fuster en su estudio, la importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas, logró demostrar que la higiene de superficies en contacto directo y/o cercanía con el producto influye en la cantidad de bacterias encontradas en dichos productos. (Fuster, 2006)

Los niveles de aceptabilidad para este estudio en cuanto a pezones de madres donadoras fue de solamente el 26% para aerobias, mientras que para *E. coli*/coliformes totales el rango subió hasta un 92% de aceptabilidad; sin embargo el resultado obtenido de las Manos de los trabajadores resultó ser solo el 25% aceptable puesto que presentaron un número elevado del recuento de aerobios. Además la existencia de 2 superficies las cuales no cumplen con los rangos de aceptabilidad para bacterias aerobias (29%). Se logró demostrar un buen manejo del proceso de esterilización de los embudos para la extracción de leche y de los frascos de almacenamiento de leche humana al cumplir en un 100% los rangos de aceptabilidad. La baja aceptabilidad obtenida en el presente estudio pone en un elevado riesgo la leche humana recolectada en Banco de Leche Humana y de existir una normativa sobre el recuento bacteriano se incrementaría el rechazo de leche humana para pasteurización.

En Francia, se realiza la detección bacteriana de la leche humana antes y después de la pasteurización como parte de la regulación francesa. Las pruebas de laboratorio deben incluir la identificación de *Staphylococcus aureus* y flora aeróbica total. Cualquier muestra de leche positiva para estas últimas debe ser descartada. La legislación francesa recomienda desechar la leche con un conteo de microorganismos aeróbicos totales > 106 UFC/mL. Cualquier muestra con presencia de *S. aureus* debe ser descartada si es ≥ 104 UFC/ml. En el Banco de leche regional de Lille, Hospital Jeanne de Flandre, Francia, se realizó análisis a 4,715 L de leche donada, de la cual 508 L fueron descartados o destruidos debido a no conformidad bacteriológica. De estos 508 L, 218 L fueron desechados por el análisis pre pasterización cuyo recuento aeróbico fue mayor a 106 UFC/ml, 279 L

debido a presencia de *S. aureus* y 11 L debido a otras bacterias patógenas. En este estudio se demostró que un porcentaje no despreciable de leche es destruido a una tasa de flora aeróbica alta en la fase pre pasteurización y por la presencia de *S. aureus*.(Dewitte et al., 2015)

CAPÍTULO IV APORTE O PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

CONCLUSIONES

De las 100 muestras de pezones analizadas, 76 presentaron crecimiento bacteriano de las cuales 74 no se encontraban dentro del rango de aceptabilidad para microorganismos aerobios, lo cual representa el 26% de muestras aceptables en total; y 8 para coliformes, que representa el 92% de muestras aceptables en total. Esto demuestra que previo a la donación, la higiene de las madres donadoras no es efectiva por lo que se recomienda la implementación tanto de lavado de manos como de pezones previo a la donación para reducir la carga bacteriana. De la muestras de manos de operadores del banco de leche (4 operadores), 3 presentaron crecimiento de microorganismos aerobios cuyo rango de aceptabilidad estaba fuera del límite, lo cual representa el 25% de muestras aceptables en total; así como sucedió con las superficies (7 superficies), 2 presentaron crecimiento fuera el rango de aceptabilidad para aerobios (71% de muestras aceptables en total). Por lo tanto, debe aplicarse mayor control en limpieza de áreas de trabajo cercanas a la leche humana y una buena higiene de manos de los operadores para evitar el aumento de carga bacteriana de aerobios.

En las muestras de frascos y extractores no se obtuvo crecimiento bacteriano en ninguna de las muestras, demostrando así la efectividad de la esterilización y buen almacenamiento.

Realizar un control microbiológico en la fase preanalítica, demostró que efectivamente existe contaminación durante este proceso, por lo tanto se decidió elaborar un manual como aporte de la investigación realizada, así como de apoyo para el muestreo y procesamiento de superficies, equipo, personal y madres donadoras del Banco de Leche Humana.

RECOMENDACIONES

- Deben aplicarse protocolos de limpieza de los pezones antes de la donación de leche para reducir riesgos de contaminación, así como establecer programas de asesoría para el cumplimiento del procedimiento de limpieza de estos mismos.
- Todo aquello que pueda estar en contacto con la leche donada, como lo son los frascos de almacenamiento, embudos de extracción, y superficies deben tener una adecuada limpieza o proceso de esterilización según lo requiera.
- Promover las buenas prácticas de higiene de los operarios del banco de leche humana y todo aquel que manipule la leche humana para su donación.
- Realizar un control microbiológico de ambientes y superficies cercanas a la leche humana para evitar contaminación de la leche humana no pasteurizada.
- Implementar un control interno de calidad trimestral o bien semestral para evaluar el seguimiento correcto de los procesos de limpieza, esterilización y/o lavado.
- Establecer protocolos operativos estandarizados ayuda al correcto manejo de los procedimientos realizados dentro del Banco de Leche humana.

ANEXOS

Anexo 1

Cálculo y expresión de Resultados de hisopado de manos, Instrumentos de uso común (Frascos y Extractores) y Superficies

Para superficies vivas: el número de colonias obtenidas (Unidades Formadoras de Colonias, UFC) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo. Los resultados se expresan en UFC/mano. (Juárez, 2016)

Tabla 5. Cálculo y expresión de Datos en Superficies Vivas

Ensayo	Superficies Vivas
<i>E. coli</i> /Coliformes totales	< 100 UFC/manos
<i>Staphylococcus spp.</i>	< 100 UFC/manos

Adaptado de: Dirección General de Salud Ambiental. (2019). *Guía Técnica Sobre Criterios Y Procedimientos Para El Examen Microbiológico De Superficies En Relación Con Alimentos Y Bebidas*. Perú.

Para superficies regulares: el número de colonias obtenidas (UFC) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo (4 mL) y se dividirá entre el área de la superficie hisopada o muestreada (100 cm²). Los resultados se expresan en UFC/cm².

Para superficies irregulares: el número de colonias obtenido (UFC) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de la solución diluyente usada. Los resultados se expresan en UFC/superficie del objeto. (Guía Técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con Alimentos y Bebidas, 2017)

Anexo 1

Tabla 6. Cálculo y expresión de Datos en Superficies Inertes

Método Hisopo	Superficie Regular		Superficie Irregular		
	Límite de Detección del Método	Límite Permisible	Límite de Detección del Método	Límite de Detección del Método	Límite Permisible
E. coli/ Coliformes Totales	< 10 UFC/cm ²	< 1 UFC/cm ²	< 10 UFC / superficie muestreada	< 10 UFC / superficie muestreada	< 10 UFC / superficie muestreada
Aerobios	<100 UFC/ cm ²	<100 UFC/ cm ²	<100 UFC/ superficie muestreada	<100 UFC/ superficie muestreada	<100 UFC/ superficie muestreada

Adaptado de: Dirección General de Salud Ambiental. *Guía Técnica para el análisis microbiológico de superficies.* , Pub. L. No. 461–2007, 15 (2007)

Para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases o botellas: el número de colonias obtenido (UFC) se multiplica por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizado en el muestreo. En el caso de varias superficies muestreadas, se divide entre el número de superficies muestreadas. ((UNAM), n.d.)

Anexo 2

Cálculo de frecuencia absoluta y promedio

La frecuencia absoluta es el número de veces que un determinado valor aparece en un estudio. Es decir, suma de los datos de interés. En este caso, las muestras positivas para *E. coli/Coliformes* y para aerobios.

$$\sum ni = n1 + n2 + \dots + n = N$$

Promedio

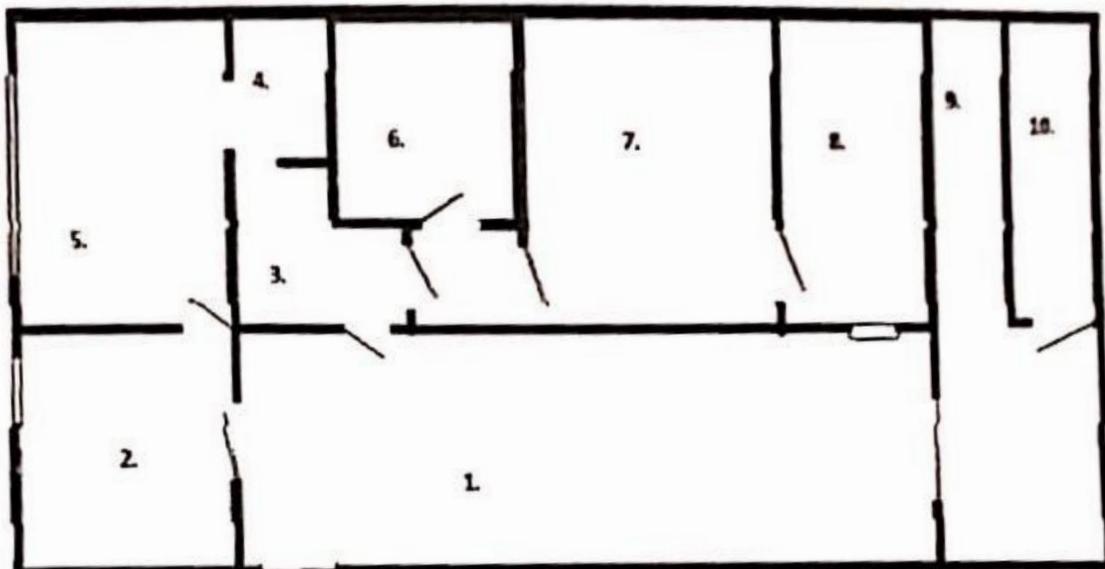
El promedio se calculó realizando la suma de todas las unidades formadoras de colonias dividido el número de muestras.

$$X = \sum Xi / n$$

Anexo 3

MAPA DEL BANCO DE LECHE HUMANA

Figura 5. Croquis Banco de Leche Humana “Dr. Miguel Ángel Soto Galindo”



Fuente: otorgado por el Banco de Leche Humana del Hospital Pedro de Bethancourt de la Antigua Guatemala, Sacatepéquez.

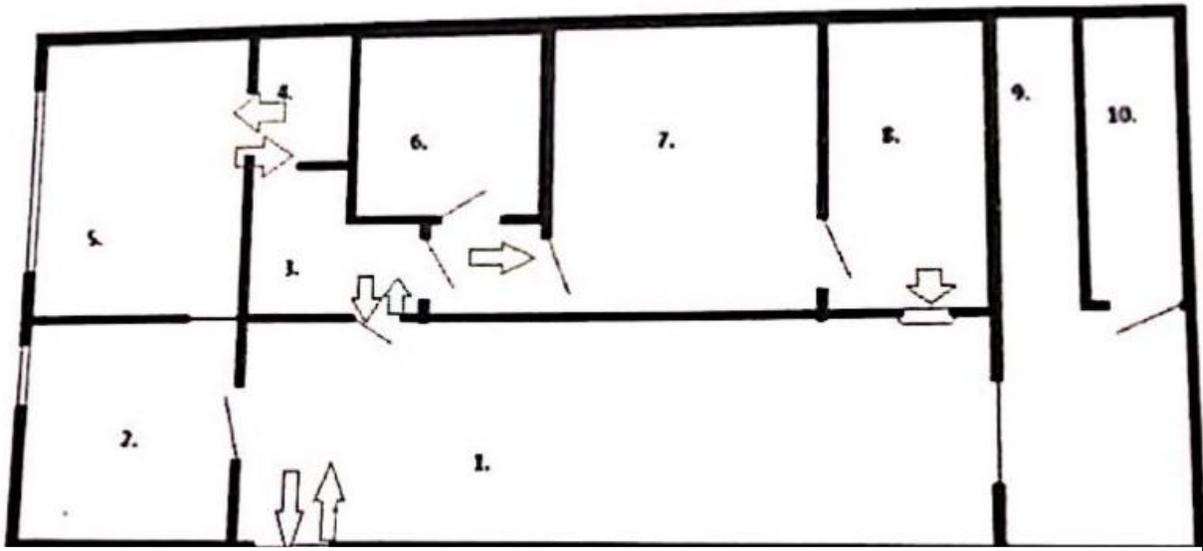
Áreas

1. Sala de espera
2. Secretaría y clínica de Atención Nutricional
3. Preparación e higiene de madre donadoras
4. Almacenamiento previo Leche Humana Cruda
5. Extracción y espacio amigable
6. Esterilización y preparación de reactivos
7. Laboratorio
8. Almacenamiento final y ventana de despacho de Leche Humana Pasteurizada
9. Lavado de frascos
10. Bodega

*Vestidores y sanitarios se encuentran ubicado fuera del espacio físico de BLH.

Anexo 3

Figura 6. Flujo de entrada y salida del Banco de Leche “Dr. Miguel Ángel Soto Galindo”



Fuente: otorgado por el Banco de Leche Humana del Hospital Pedro de Bethancourt de la Antigua Guatemala, Sacatepéquez.

Flujo



ANEXO 4

MANUAL DE MUESTREO DE SUPERFICIES

UNIVERSIDAD GALILEO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA BIOLÓGICA

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA FASE PREANALÍTICA DEL BANCO DE
LECHE DEL HOSPITAL NACIONAL PEDRO DE BETHANCOURT DE ANTIGUA
GUATEMALA, SACATEPÉQUEZ**



GUATEMALA, ENERO 2020

ELABORADO POR
ANA LAURA GARCÍA AGOSTO
LUISA GABRIELA OSORIO CRUZ
YÉNNIFER ADELAIDA SOTO RODRÍGUEZ

REVISADO POR
LIC. KEVIN ALEXANDER ORTÍZ BARRIENTOS
DOC. MIGUEL ANGEL SOTO GALINDO
LICDA. MARION KOLBE RIVERA

INTRODUCCIÓN

El presente Manual de Procedimientos tiene como propósito contar con una guía clara y específica que garantice la aplicación de los diferentes análisis microbiológicos en la fase preanalítica del Banco de Leche Humana.

Comprende de forma ordenada y detallada los diferentes procedimientos para realizar muestreos de superficies, manos y pezones utilizando el método por hisopado y, para instrumentos, método por enjuague.

Así también contiene los métodos para analizar las muestras antes mencionadas. Contempla distintas alternativas de análisis según sea la disponibilidad de material con el que cuente el banco a la hora de llevar a cabo los análisis.

Es importante señalar que este documento está sujeto a actualización en la medida que se presenten variaciones en la ejecución de los procedimientos.

Índice

Objetivo	4
Responsabilidades	4
Definiciones	4
Materiales	4
Técnica de muestreo de superficies por hisopado	5
Técnica de enjuague para instrumentos de uso común (frascos y extractores o embudos de extracción)	9
Técnica de muestreo para pezones por hisopado	11
Guía técnica de uso de petrifilm	12
Interpretación	15
Recomendaciones	20
Referencias Bibliográficas	21

Manual de muestreo de superficies, instrumentos, manos y pezones

Objetivo

Realizar muestreo de superficies, manos y pezones utilizando el método de hisopado y, para instrumentos, método de enjuague como parte del control microbiológico en la fase pre-analítica del Banco de Leche Humana.

Responsabilidades

Es deber del coordinador del Banco de Leche y del personal operativo, velar por el cumplimiento de los métodos y que estos sean aplicados correctamente y con regularidad.

Definiciones

- Agar: elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. (Casado, Torrico, & Medina, 2012)
- *Coliformes*: grupo de microorganismos que se encuentran comúnmente en el medioambiente como suelo y en las plantas. También están presentes en los intestinos y heces de animales y humanos, siendo agentes causales de enfermedades. (División de Salud Pública de Carolina del Norte, 2009)
- *Inocular*: introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. (Santambrosio, Ortega, & Garibaldi, 2009)
- *Mesófilos*: grupo de microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una óptima entre 30°C y 40°C. (Passalacqua & Cabrera, 2014)
- Petrifilm: es un sistema de placas todo en uno. Se utiliza normalmente en industrias y campos relacionados con la microbiología para cultivar diversos microorganismos, siendo un método más eficiente para la detección y enumeración en comparación con las técnicas convencionales. Satisface las necesidades científicas del sector alimentario. (3M Science Applied to Life, 2019)

Materiales

1. Caldo Tripticasa soya o caldo Lethen
2. Agua peptonada
3. Petrifilm para Aerobios o Agar Tripticasa de Soya
4. Petrifilm E. coli/Coliformes o Agar Bilis Rojo Violeta
5. Hisopos estériles

6. Bolsas estériles
7. Guanes estériles
8. Pipeta volumétrica graduada (de 1000 microlitros)

Procedimientos

Técnica de muestreo de superficies por hisopado

1. Colocar una plantilla (10cm x 10cm) sobre la superficie regular a muestrear. Si no se posee plantilla, calcular un cuadrado de 10cm x 10 cm.
2. Humedecer un hisopo estéril en el tubo de caldo letheen o Caldo Tripticasa soya y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución.
3. Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, frotar 3 veces la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior. Asegurar el hisopado en toda la superficie y que este se rote a la hora de muestrear.
 - En el caso de utilizar la plantilla de 5cm x 5cm, repetir esta operación 3 veces más, en lugares diferentes de la misma superficie, para obtener 100 cm².
4. Colocar el hisopo en el tubo nuevamente y quebrar la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos.

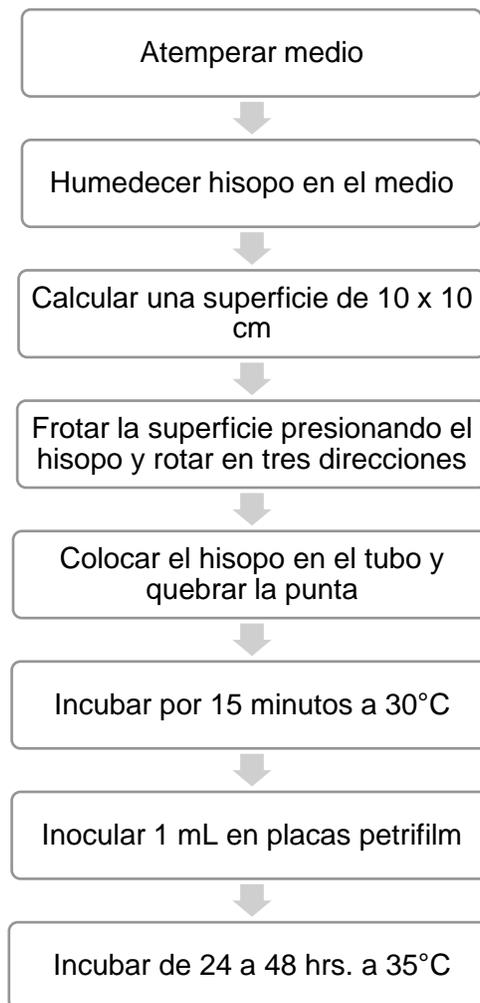
Figura 1. Técnica de muestreo de superficies regulares



Adaptado de: Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos. (2016). *Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf* (pp. 1–66). pp. 1–66.

5. Para superficies irregulares, frotar la superficie con mayor contacto con las muestras de Leche o manos del personal. (Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos, 2016; La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008)
6. Incubar tubo durante 15 minutos en incubadora de 30°C.
7. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 – 48 hrs a 35°C ±1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

Figura 2. Técnica de muestreo de superficies por hisopado



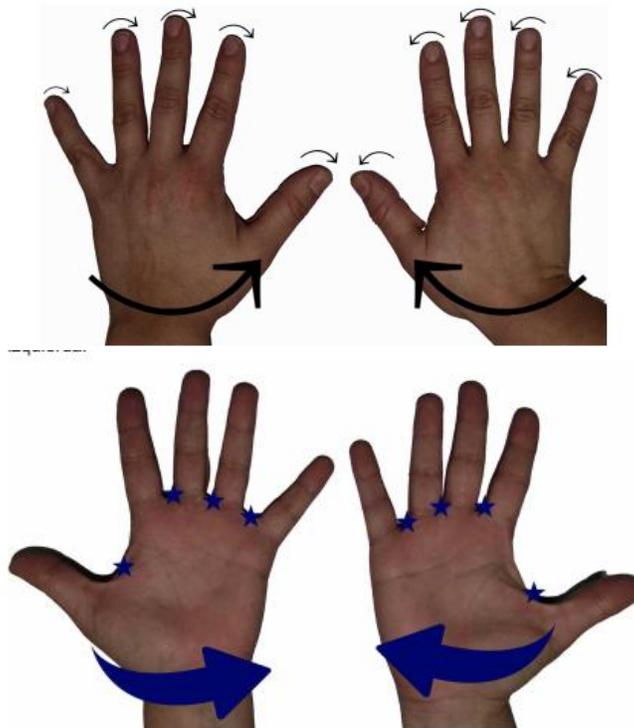
Adaptado de: Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos. (2016). *Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf* (pp. 1–66). pp. 1–66.

La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). (2008). Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. N°071, 1–24.

Técnica de muestreo de manos por hisopado

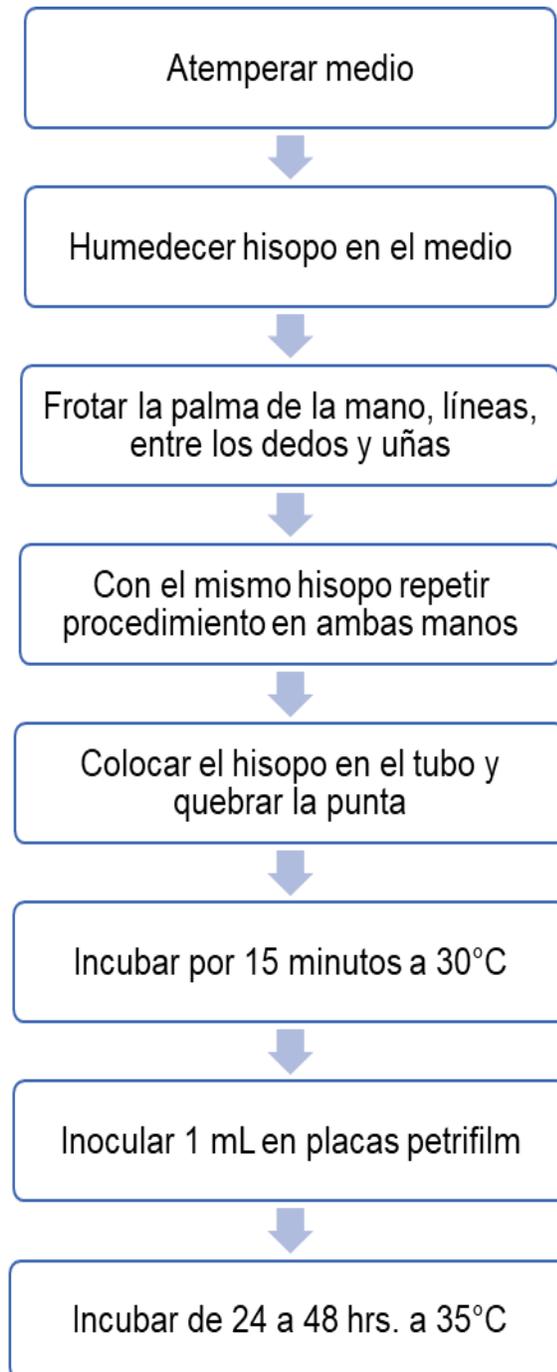
1. Insertar un hisopo estéril en tubo con caldo Trypticasa soya o caldo letheen, exprimir el medio sobrante presionando el hisopo contra las paredes del tubo.
2. Frotar la superficie de la palma de la mano (importante las líneas de la mano), entre los dedos y debajo de las uñas.
3. Realizarlo en cada mano con el mismo hisopo, colocar de nuevo el hisopo en el tubo con Trypticasa soya o caldo letheen y quebrar el hisopo.
4. Incubar por 15 minutos de 30 a 33°C. (Labs, 2011)
5. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 hrs a 35°C \pm 1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

Figura 3. Muestreo de manos por Hisopado



Adaptado de: Bustamante, F.; Nuñez, J.; Arellano, M.; Crot, W.; Navarro, P.; Fuetes, R. Bioluminiscencia: herramienta de medición y análisis en lavado de manos clínico aplicado a la odontología. Int. J. Odontostomat., 12(2):160-168, 2018

Figura 4. Técnica de muestreo de manos por hisopado



Adaptado de: Labs, P. (2011). *Muestreo Microbiológico de Superficies*. 1–3.

Técnica de enjuague para instrumentos de uso común (frascos y extractores o embudos de extracción)

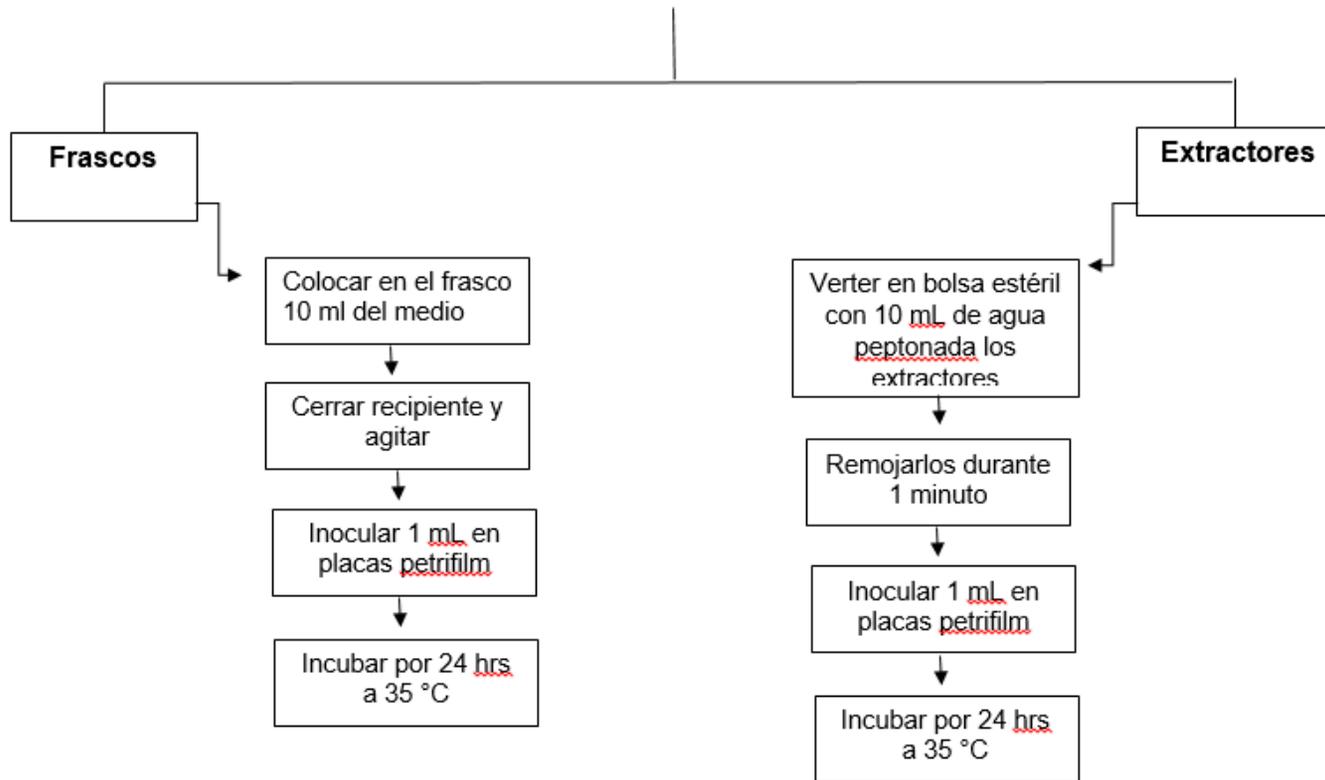
Frascos

1. Colocar en el recipiente que se va a muestrear 10 ml o más, si es necesario, de la solución que puede ser agua peptonada o caldo Lethen.
2. Cerrar el recipiente y agitar vigoroso para que la solución toque o abarque cada parte del objeto. (Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos, 2016; La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008)
3. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 hrs a 35°C ±1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

Extractores

1. Verter en una bolsa estéril de 10 mL agua peptonada para luego sumergir los objetos a muestrear de manera que alcance a cubrirlos en su totalidad.
2. Remojarlos por aproximadamente un minuto. (Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos, 2016; La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008)
3. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 hrs a 35°C ±1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

Figura 5. Técnica de enjuague para instrumentos de uso común (frascos y extractores o embudos de extracción)



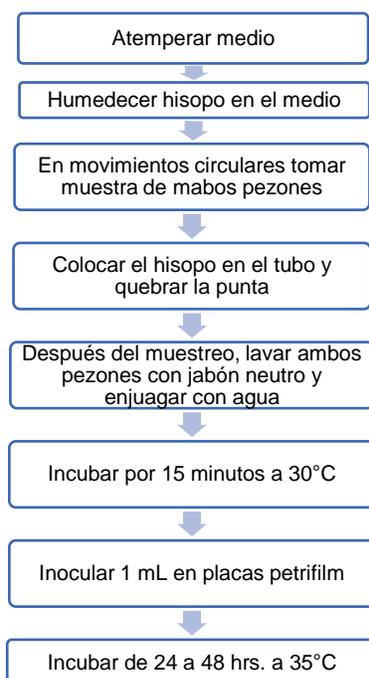
Adaptado de: Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos. (2016). *Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf* (pp. 1–66). pp. 1–66.

La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). (2008). Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. N°071, 1–24.

Técnica de muestreo para pezones por hisopado

1. Sumergir un hisopo estéril en un tubo con caldo Trypticasa soya o caldo Lethen y tomar muestra del pezón de la donadora con movimientos circulares.
 - Después de terminar de tomar la muestra es muy importante lavar ambos pezones con jabón neutro y enjuagar con abundante agua.
2. Devolver el hisopo al tubo con caldo Trypticasa soya o caldo Lethen y romper el hisopo.
3. Incubar 15 minutos a 33°C.
4. Inocular en las distintas placas de petrifilm 1 mL e incubar por 24 hrs a 35°C ±1. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008)

Figura 6. Técnica de muestreo de pezones por hisopado



Adaptado de: Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos. (2016). *Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf* (pp. 1–66). pp. 1–66.

La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). (2008). Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. N°071, 1/24.

Guía técnica de uso de petrifilm

Placas para Recuento de Aerobios y recuento de *E. coli*/Coliformes

Almacenamiento

1. Almacenar los paquetes cerrados a una temperatura ≤ 8 °C. Las placas deben usarse antes de su fecha de caducidad. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se atemperen al ambiente del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración.
2. Para cerrar un paquete abierto, se debe doblar el extremo y sellarlo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y, por lo tanto, la alteración de las placas.
 - a. Mantener los paquetes cerrados a temperatura ≤ 25 °C y una humedad relativa $\leq 50\%$. No refrigerar los paquetes ya abiertos. Utilizar las Placas Petrifilm máximo 1 mes después de abierto el paquete.
 - b. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados se debe colocarlos en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacenarlos en congelación. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008; Petrifilm, 2000)

Figura 7. Almacenamiento de Placas Petrifilm

Almacenamiento

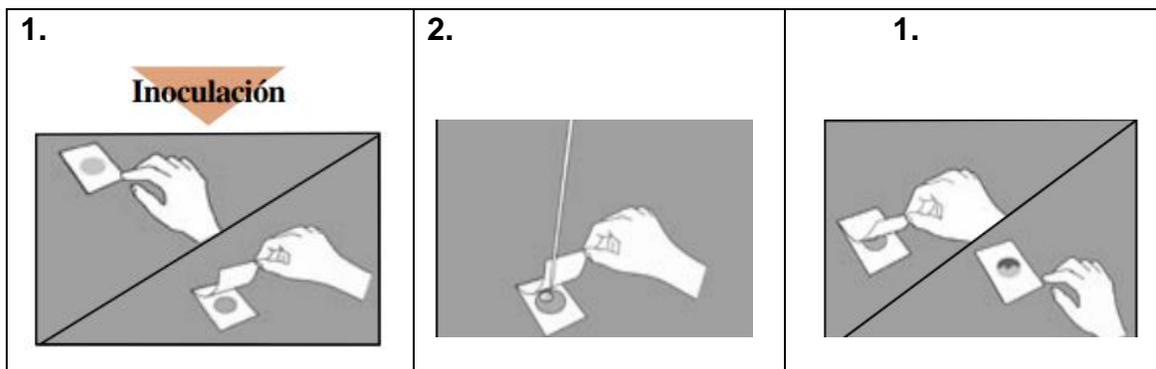


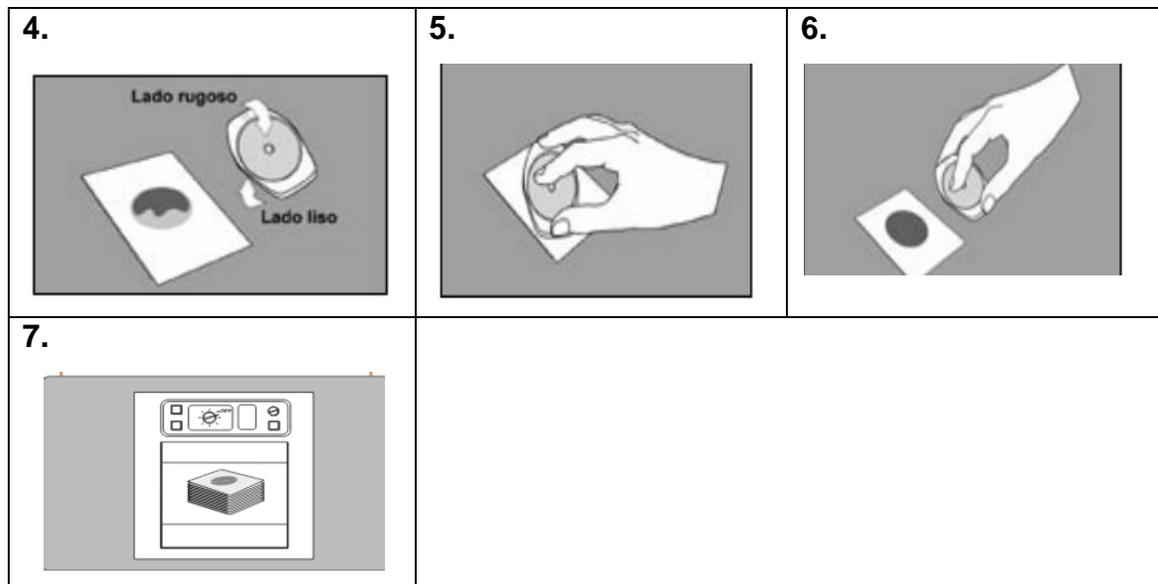
Adaptado de: 3M Company. (2004). *Placas Petrifilm 3M Recuento de Aerobios*.

Inoculación

1. Colocar la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levantar la lámina semitransparente superior.
2. Con la pipeta perpendicular a la Placa Petrifilm, colocar 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.
3. Liberar la película superior y dejar que caiga sobre la dilución. No la deslice hacia abajo.
4. Con el lado liso hacia abajo, colocar el dispersor o esparcidor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.
5. Presionar suavemente el dispersor o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. No girar ni deslizar el dispersor.
6. Levantar el dispersor o esparcidor. Esperar por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceder a la incubación.
7. Incubar a 35°C las placas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humedecer el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad. (3M Company, 2004; 3M Food Safety, 2008; Petrifilm, 2000)

Figura 8. Inoculación de Placas Petrifilm



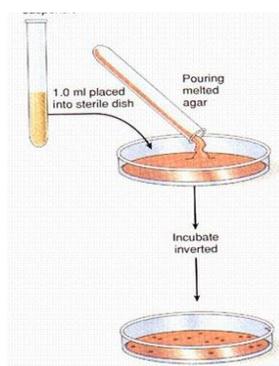


Adaptado de: 3M Company. (2004). *Placas Petrifilm 3M Recuento de Aerobios*.

Inoculación en Agares para aerobios siembra en profundidad

1. Transferir 1 ml de la dilución a cada una de dos placas de Petri estériles.
2. Agregar inmediatamente a cada placa entre 15 y 20 ml del Agar Trypticasa Soya previamente fundido y enfriado a 45 °C.
3. Tapar las placas de Petri, homogeneizar la muestra con el agar por rotación de las placas y dejar solidificar a temperatura ambiente.
4. Invertir las placas de Petri e incubar a 30 - 35 °C no menos de 3 días. (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, n.d.)

Figura 9. Inoculación de Agar por Siembra a Profundidad

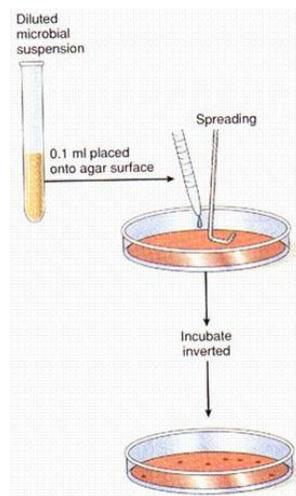


Adaptado de: Shirai, K. (n.d.). *Técnicas utilizadas en Microbiología*. UAM

Siembra en superficie

1. Sembrar en superficie del agar no más de 0,1 ml de la muestra sobre la superficie, al menos dos placas con Agar Tripticasa Soya.
2. Esperar que el agar absorba la mayor cantidad de la muestra. Incubar a 30 - 35 °C durante no menos de 3 días. (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, n.d.)

Figura 10. Inoculación de Agar por siembra en Superficie



Adaptado de: Shirai, K. (n.d.). Técnicas utilizadas en Microbiología. UAM

Inoculación en Agar Bilis Rojo Violeta (para cuenta de coliformes totales)

1. Transferir volúmenes de 1 ml de la muestra a cajas de Petri marcadas con la clave, fecha, medio de cultivo y dilución inoculada.
2. Añadir una doble capa del mismo medio de cultivo una vez solidificada la primera capa para crear condiciones de anaerobiosis.
3. Incubar a 32°C por 18-24 hrs.) ((UNAM), n.d.; MCD Lab, 2016)

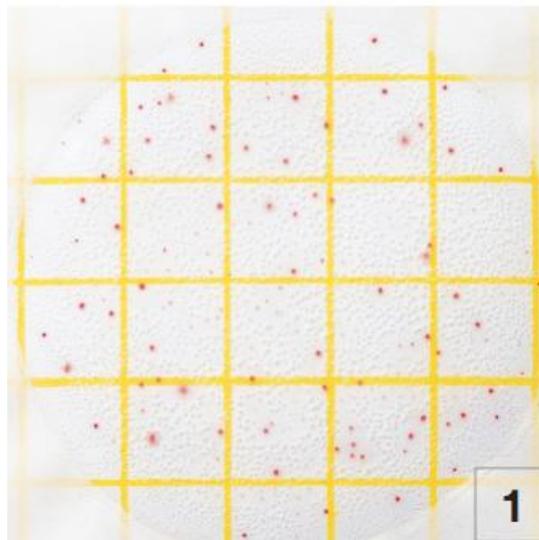
Interpretación

a. Placas para recuento de aerobios

El tinte indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Se debe contar todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo. Las Placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.

Las colonias pueden ser aisladas para su identificación posterior. Levantar la película superior y con la ayuda de un asa en punta recoger la colonia del gel. (3M Company, 2004)

Figura 11. Colonias características de Aerobios en Petrifilm



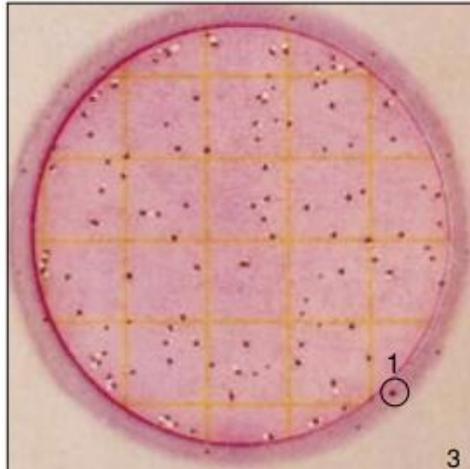
Adaptado de: 3M Company. (2004). *Placas Petrifilm 3M Recuento de Aerobios*.

b. Placas para el recuento de *E. coli*/Coliformes

Las colonias coliformes que crecen en esta placa producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia.

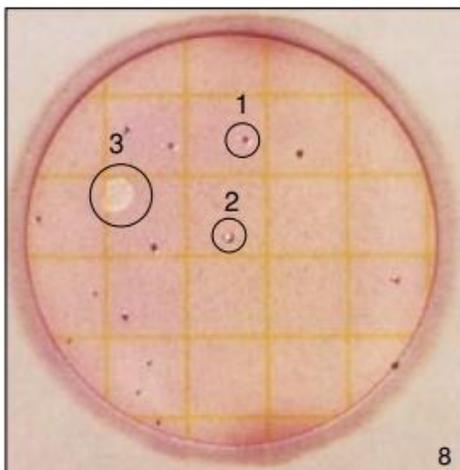
E. coli como colonias azules con gas, Coliformes como colonias rojas y azules con gas. (3M Food Safety, 2008)

Figura 12. Colonias características de Coliformes Totales en Petrifilm



Adaptado de: 3M Food Safety. (2008). Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes. *Microbiology Products*, 3, 1–6.

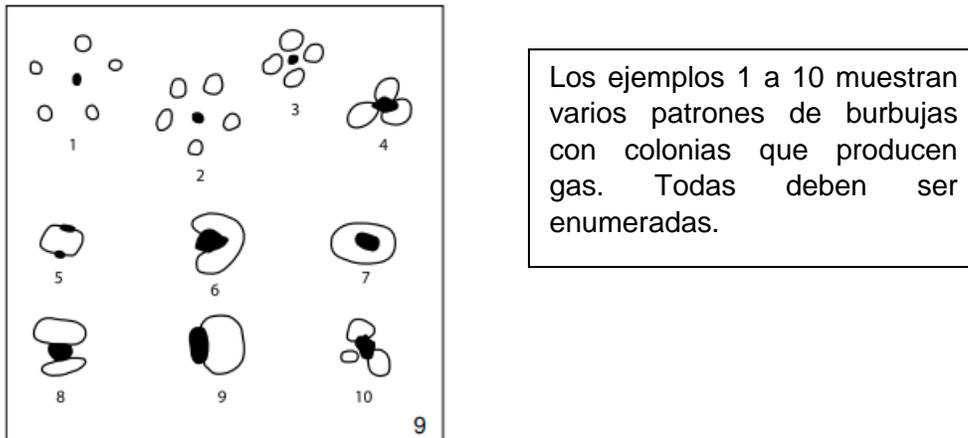
Figura 13. Patrones de gas de Coliformes Totales en Petrifilm



Los patrones de burbujas pueden variar. El gas puede romper la colonia y así, esta última 'delinea' a la burbuja. Vea los círculos 1 y 2. Las burbujas pueden aparecer como resultado de una inoculación impropia o de aire atrapado dentro de la muestra. Tienen una forma irregular y no se asocian con una colonia. Vea el círculo 3.

Adaptado de: 3M Food Safety. (2008). Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes. *Microbiology Products*, 3, 1–6.

Figura 14. Patrones de gas de Coliformes Totales

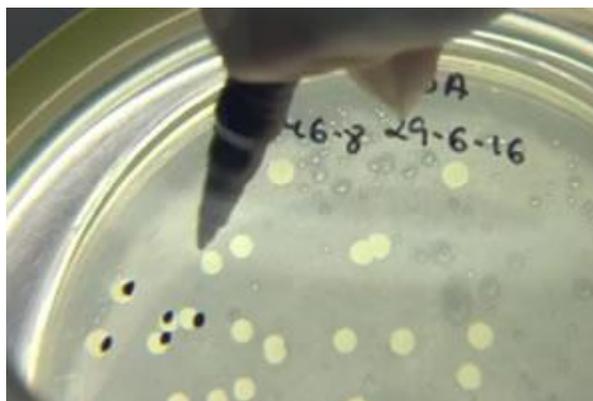


Adaptado de: 3M Food Safety. (2008). Placas Petrifilm™ para el Recuento de E. coli/Coliformes. *Microbiology Products*, 3, 1–6.

c. Siembra profundidad.

Luego de la incubación, examinar las placas para observar si hubo desarrollo. Contar el número de colonias y expresar el promedio para las dos placas en términos del número de unidades formadoras de colonias por g (UFC/g) o por ml de muestra (UFC/ml). (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, n.d.)

Figura 15. Crecimiento de colonias en Agar por siembra a Profundidad



Adaptado de: Pastor, S. (2017). Automatizar la identificación y el Recuento de Cultivos Microbiológicos. *Higiene Ambiental*

d. Siembra en superficie

Examinar las placas para observar si hubo desarrollo. Contar el número de colonias y expresar el promedio para las dos placas como el número de unidades formadoras de colonias por g (UFC/g) o por ml de muestra (UFC/ml). (Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, n.d.)

e. Siembra en Agar Bilis Rojo Violeta

Para calcular el resultado de las colonias se procede contando todas las colonias que se desarrollen en las cajas, hacer el cálculo de las colonias por ml, multiplicar por el volumen de diluyente empleado y dividirlo entre el área de la superficie. Los resultados se expresan en UFC/cm². (La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008)

Figura 16. Características de Colonias en Agar Bilis Rojo Violeta



Adaptado de: MCD Lab. (2016). *Agar bilis y rojo violeta*. Ciudad de México.

Cálculo

Para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, etc.: el número de colonias obtenido (UFC) se multiplica por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizado en el muestreo. En el caso de varias superficies muestreadas, se divide entre el número de superficies muestreadas (Ej. No. de envases, no. de bolsas de plástico, etc.).

Expresión de resultados

Los resultados se expresan en:

Para superficies vivas: UFC/mL

Para superficies internas: UFC/ superficie muestreada (ej. Envases, bolsas de plástico, etc).

- **Interpretación de resultados de acuerdo con los criterios microbiológicos**
 - El límite de detección del método para superficies vivas es < 100 UFC/mL.
 - El límite de detección del método para superficies internas < 100 UFC/superficie muestreada. (La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), 2008)

Recomendaciones

- Atemperar los medios de cultivo antes de su uso.
- Asegurar la limpieza de los Pezones luego de ser muestreados, se debe utilizar jabón neutro y enjuagar con abundante agua.
- Colocar observaciones del estado de manos a muestrear, en el caso de heridas o uñas largas.
- Muestrear superficies que representen un riesgo de contaminación al estar en contacto con la Leche Humana.
- Para el método por profundidad asegurarse que los agares estén a la temperatura correcta ya que de encontrarse a una temperatura muy alta pueden eliminar los microorganismos que puedan encontrarse en la muestra y por el contrario si el agar se encuentra muy frío puede solidificarse antes de servirse sobre la muestra.
- Para el método por profundidad asegurarse de homogenizar bien la muestra con el agar en la placa de Petri, es recomendable realizar movimientos en forma de 8 con la placa sobre una superficie plana.

Referencias Bibliográficas

- (UNAM), U. N. A. de M. (n.d.). *Análisis de superficies inertes*. México.
- 3M Company. (2004). *Placas Petrifilm 3M Recuento de Aerobios*.
- 3M Food Safety. (2008). Placas Petrifilm™ para el Recuento de E. coli/Coliformes. *Microbiology Products*, 3, 1–6.
- 3M Science Applied to Life. (2019). *3M Placas Petrifilm*.
- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. (n.d.). *Farmacopea Argentina* (7th ed.). INAME.
- Casado, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). *Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología*.
- Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos. (2016). *Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf* (pp. 1–66). pp. 1–66.
- División de Salud Pública de Carolina del Norte. (2009). *Protéjase de las Bacterias Coliformes en el Agua de su Pozo*.
- La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). (2008). Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. N°071, 1–24.
- Labs, P. (2011). *Muestreo Microbiológico de Superficies*. 1–3.
- MCD Lab. (2016). *Agar bilis y rojo violeta*. Ciudad de México.
- Passalacqua, N., & Cabrera, J. (2014). *Microorganismos indicadores* (3rd ed.; F. Trinks, Ed.). Argentina.
- Petrifilm, P. (2000). *Placas Petrifilm 3M Placas Petrifilm*.
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). *Siembra y Recuento de Microorganismos*.

- Asegurar la limpieza de los Pezones luego de ser muestreados, se debe utilizar jabón neutro y enjuagar con abundante agua.
- Colocar observaciones del estado de manos a muestrear, en el caso de heridas o uñas largas.
- Muestrear superficies que representen un riesgo de contaminación al estar en contacto con la Leche Humana.
- Para el método por profundidad asegurarse que los agares estén a la temperatura correcta ya que de encontrarse a una temperatura muy alta pueden eliminar los microorganismos que puedan encontrarse en la muestra y por el contrario si el agar se encuentra muy frío puede solidificarse antes de servirse sobre la muestra.
- Para el método por profundidad asegurarse de homogenizar bien la muestra con el agar en la placa de Petri, es recomendable realizar movimientos en forma de 8 con la placa sobre la mesa o alguna otra superficie plana.

BIBLIOGRAFÍA

- (UNAM), U. N. A. de M. (n.d.). *Análisis de superficies inertes*. México.
- 3M Company. (2004). *Placas Petrifilm 3M Recuento de Aerobios*.
- 3M Food Safety. (2008). Placas Petrifilm™ para el Recuento de E. coli/Coliformes. *Microbiology Products*, 3, 1–6.
- 3M Science Applied to Life. (2019). *3M Placas Petrifilm*.
- Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. (n.d.). *Farmacopea Argentina* (7th ed.). INAME.
- Aguilar, M. I., & Fernández, M. Á. (2014). Lactancia Materna Exclusiva. In *Revista Peruana de ginecología y obstetricia* (Vol. 60). Mexico.
- Alberto, F., Figuera, C., Latorre, J., & Porras, J. (2011). Factores Asociados al abandono de la Lactancia Materna Exclusiva. *Hacia La Promoción de La Salud*, 16, 58.
- Alustiza, A., Bados, A., Cuadrado, V., Fernández, J. C., García, J., & Valcarel, F. S. (2017). *Estándar APPCC* (No. VI 352-2017; 2nd ed.). País Vasco, País Vasco: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco.
- Arslanoglu, S., Bertino, E., Tonetto, P., De Nisi, G., Ambruzzi, A. M., Biasini, A., ... Moro, G. E. (2010). Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 23, 1–20.
- Barrios, A. L. (2015). *Evaluación de la Aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura y Diseño de Manual de Mejora en el Banco de Leche Humana del Hospital DEpartamental “José Felipe Flores”, Totonicapán, Guatemala*. Universidad Rafael Landívar.
- Berganza, I. (2003). *Microbiota predominante en manos y uñas de cirujanos y personal paramédico de las áreas de cirugía, recién nacidos y post parto en un Hospital Nacional de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Brahm, P., & Valdés, V. (2017). Beneficios de la lactancia materna y riesgos de no

- amamantar. *Revista Chilena de Pediatría*, 88, 15–21.
- Casado, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). *Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología*.
- Center, 3M. (2008). Placas Petrifilm™ para el Recuento de E. coli/Coliformes. In *Microbiology Products* (Vol. 3).
- Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. (2018). *¿Conoces los bancos de leche? 3*.
- Cossey, V., Johansson, A.-B., de Halleux, V., & Vanhole, C. (2012). The Use of Human Milk in the Neonatal Intensive Care Unit : Practices in Belgium and Luxembourg. *Breastfeeding Medicine*, 7, 302–306.
- Costa, K. (1989). A Comparison of Colony Counts of Breast Milk Using Two Methods of Breast Cleansing. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 18, 231–236.
- Dewitte, C., Courdent, P., Charlet, C., Dumoulin, D., Courcol, R., & Pierrat, V. (2015). Contamination du lait maternel par une flore aérobie: Évaluation des pertes pour un lactarium. *Archives de Pédiatrie*, 22, 461–467.
- Dirección Regional de Inocuidad de los Alimentos. (2016). *Manual de análisis de peligros y puntos críticos de control - HACCP.pdf* (pp. 1–66). pp. 1–66.
- División de Salud Pública de Carolina del Norte. (2009). *Protéjase de las Bacterias Coliformes en el Agua de su Pozo*.
- Duran, Z., Guevara, A., Rodríguez, C., Carreño Carmona, L., & Rosas Alcoba, V. L. (2008). Calidad Microbiológica de la Leche Humana Procesada en el Banco de Leche Materna. Hospital “Ruiz y Paéz”. Ciudad Bolívar. *ARCHIVOS VENEZOLANOS DE PUERICULTURA Y PEDIATRÍA*, 71, 9.
- Flores Meza, D. N. (2018). *Determinación de bacterias mediante la prueba de control microbiológico de la leche materna en mujeres que acuden a donar al banco de leche del hospital General Docente de Calderón durante el periodo Febrero - Marzo*

- 2018 (Universidad Central del Ecuador). Universidad Central del Ecuador.
- Frischknecht, K., Wälchli, C., Annen, C., Fuhrer, T., Gianoli, P., & Stocker, M. (2010). Recommendations pour l'organisation et le fonctionnement d'une banque de lait en Suisse. *Paediatrica*, 21, 24–28.
- Fuster, N. (2006). *SUPERFICIES ALIMENTARIAS MEDIANTE TÉCNICAS RÁPIDAS Y TRADICIONALES PARA EVITAR Y / O MINIMIZAR LAS FUSTER I VALLS*. universidad Autonoma de Barcelona.
- García-Lara, N. R., García-Algar, O., & Pallás-Alonso, C. R. (2012). Human milk banks and breastfeeding. In *Anales de Pediatría* (Vol. 76). <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2011.06.001>
- García, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica de México*, 32, 223–230.
- González de Cosío, T., Escobar-Zaragoza, L., González-Castell, L. D., & Rivera-Dommarco, J. Á. (2013). Prácticas de alimentación infantil y deterioro de la lactancia materna en México TT - Infant feeding practices and deterioration of breastfeeding in Mexico. *Salud Publica Mex*, 55, S170–S179.
- Gormaz-Moreno, M., Roqués Serradilla, V., Dalmau, J., Vento, M., & Vitoria Miñana, I. (2011). Actividad de un banco de leche humana implantado en una unidad neonatal. *Acta Pediátrica Española*, 69, 245–251.
- Guía Técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con Alimentos y Bebidas. , 53 *Journal of Chemical Information and Modeling* § (2017).
- Guzmán, E., Sempé, A., Guzmán, C., & Arroyo, G. (2016). Buenas prácticas de manufactura en Bancos de Leche Humana de la Red Nacional de Bancos de Leche Humana de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 3.
- Jones, C. L., Jennison, R. F., & D'Souza, S. W. (1979). Bacterial contamination of expressed breast milk. *British Medical Journal*, 2, 1320–1322.
- Keim, S. A., Hogan, J. S., McNamara, K. A., Gudimetla, V., Dillon, C. E., Kwiek, J. J., &

- Geraghty, S. R. (2013). Microbial Contamination of Human Milk Purchased Via the Internet. *Pediatrics*, 132, e1227–e1235.
- Kolbe, M. (2009). *Implementación de Buenas Prácticas de Manufactura y Elaboración del Plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control -HACCP- en el Banco de Leche Materna del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, San Felipe de Jesús Antigua Guatemala* (Universidad Rafael Landívar; Vol. 1). Universidad Rafael Landívar.
- La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). (2008). Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. N°071, 1–24.
- Labs, P. (2011). *Muestreo Microbiológico de Superficies*. 1–3.
- M. Macías., S. Rodríguez., & A. R. de F. (2006). Leche materna: Composición y factores condicionantes de la lactancia. *Argent Pediatric*, 5, 424.
- MCD Lab. (2016). *Agar bilis y rojo violeta*. Ciudad de México.
- Ministerio de Salud El Salvador. *Lineamientos técnicos para la implementación y operativización de bancos de leche humana y centros recolectores*. , (2017).
- Moolenaar, R. L., Crutcher, J. M., Joaquin, V. H. S., Sewell, L. V, Hutwagner, L. C., Carson, L. A., ... Sewell, L. V. (2014). *A Prolonged Outbreak of Pseudomonas aeruginosa in a Neonatal Intensive Care Unit: did staff fingernails play a role in disease transmission?* Oklahoma.
- Pangkatana, P., & Biddulph, J. (2013). Promotion of breast-feeding. In *Diarrhoea and Malnutrition in Childhood* (Vol. 285). <https://doi.org/10.1016/b978-0-407-00401-6.50040-3>
- Passalacqua, N., & Cabrera, J. (2014). *Microorganismos indicadores* (3rd ed.; F. Trinks, Ed.). Argentina.
- Paz, R. C., & Gómez, D. gonzález. (2010). NORMAS HACCP: Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control. *Mar Del Plata Universidad Nacional De*, 1, 1.

- Petrifilm, P. (2000). *Placas Petrifilm 3M Placas Petrifilm*.
- Rodríguez, J. M., Jiménez, E., Merino, V., Maldonado, A., Marín, M. L., Fernández, L., & Martín, R. (2008). Microbiota of human milk in physiological conditions [Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas]. In *Acta Pediátrica Española* (Vol. 66).
- Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). *Siembra y Recuento de Microorganismos*.
- Schanler, R. J., Fraley, J. K., Lau, C., Hurst, N. M., Horvath, L., & Rossmann, S. N. (2011). Breastmilk cultures and infection in extremely premature infants. *Journal of Perinatology*, 31, 335–338.
- Section on Breastfeeding. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. In *Pediatrics* (Vol. 129). <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>
- Shelhorn, C., & Valdés, V. (1995). *La Leche Humana, Composición, Beneficios y Comparación con la Leche de Vaca*. Chile.
- Steele, C. (2018). Best Practices for Handling and Administration of Expressed Human Milk and Donor Human Milk for Hospitalized Preterm Infants. *Frontiers in Nutrition*, 5, 1–5.
- Steele, C., & Collins, E. (2018). *Guidelines for Preparation of Human Milk and Formula in Health Care Facilities* (3rd editio). Chicago: Academy of Nutrition and Dietetics.
- Torres Ramírez, R., Acosta Reyes, O., Curiel López, O., Reyes Escobedo, F., & Cázarez de Lira, C. (2018). *Análisis bacteriológico de leche materna del banco de leche humana del Hospital General Fresnillo*. 4.
- Urbaniak, C., Cummins, J., Brackstone, M., Macklaim, J. M., Gloor, G. B., Baban, C. K., ... Reid, G. (2014). Microbiota of human breast tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 3007–3014.
- Widger, J., O'Connell, N. H., & Stack, T. (2010). Breast milk causing neonatal sepsis and death. *Clinical Microbiology and Infection*, 3.

Winter, W., Garrido, A., Pérez, H., Ramírez, L., & Toledo, A. (2011). *Buenas Prácticas de Manufactura, Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control en los Bancos de Leche Materna Exclusiva en Hospitales Nacionales de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Zuta, N. (2018). *Flora Bacteriana de manos y Uniformes de Enfermeros en áreas asistenciales del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión-Callao 2017*. Universidad Nacional del Callao.