

Antimicrobianos en leche materna y su efecto en la flora intestinal aeróbica del recién nacido

*Mariela Bracho, Yasmina Barboza, José Faría, Jorge Ruiz y Enrique Márquez**

*Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria
Universidad del Zulia, Apartado 15252. Maracaibo 4005-A, Venezuela*

Recibido: 30-10-97 Aceptado: 22-01-99

Resumen

En el presente trabajo, se determinó la presencia de antimicrobianos en leche materna y su efecto en la flora intestinal aeróbica del recién nacido. Cuarenta muestras de leche de mujeres recién paridas y 40 muestras de heces de sus respectivos lactantes, fueron analizadas tomándose como principales condiciones, la ingestión de antimicrobianos (Ampicilina o Cefalosporinas de primera generación) en las mujeres inmediatamente después del parto y el amantamiento de los recién nacidos. Para la detección de antimicrobianos, se utilizó el método del Disco-Ensayo establecido por la A.O.A.C., mientras que el coprocultivo fue utilizado para la recuperación de la flora aeróbica. Los resultados obtenidos muestran la presencia de antimicrobianos en la leche materna. Entre los microorganismos aislados en las muestras de heces, predominaron las bacterias Gram positiva con un porcentaje del 57,38% sobre las Gram negativa con un 42,62%. Los Estafilococos coagulasa negativa representaron el mayor género aislado dentro de los Gram positivo 52,86% y *Escherichia coli* 73,09% fue su contraparte dentro de los Gram negativo. En cuanto al efecto de los antimicrobianos sobre la flora aeróbica, se concluyó que la administración de cefalosporinas de primera generación y ampicilina en madres recién paridas, podría haber provocado el desarrollo de resistencia en algunos microorganismos de la flora fecal.

Palabras clave: Antimicrobianos; flora intestinal aeróbica; leche materna; recién nacidos.

Antimicrobial in human milk and its effects of the aerobic intestinal flora of the newborn

Abstract

In the present study, it was determined the presence of antimicrobials in humans milk and its effects on the aerobic intestinal flora of the newborn. Forty samples of milk lately delivered from mother and forty samples of excrements of their respective new born, were analyzed taking as primary conditions, the ingestion of antimicrobials (Ampiciline or Cephalosporine of 1^o generation) for the mother immediately after giving birth, and the sucking of the newborns. The Disk-assay method, established by the A.O.A.C., was the methodology employed to detect antimicrobials while coprocultive was utilized for the recuperation of aerobic flora. The results obtained on the samples of the human milk confirmed the presence of the antimicrobials. In the

* Autor para la correspondencia. Teléfono: +58-61 915420 / 416841. Fax: +58-61 416841 / 422398.

isolated microorganisms of the excrements samples, it predominated the bacteria Gram positive with a 57,38%, over the Gram negative with a 42.62%. The Staphylococci coagulase negative represented the biggest isolated in the Gram positive 52.86% and *Escherichia coli* 73.09% was its counterpart in the Gram negative. As soon as the effect of the antimicrobials over the aerobic flora, it was concluded that the administration of cephalosporine of 1st generation and ampicilina in women newly delivered, could be provoke the development of resistance in some microorganisms of the fecal flora of the newly born.

Key words: Aerobic intestinal flora; antimicrobials; human milk; newborns.

Introducción

En la leche materna normalmente se secretan componentes nutritivos e inmunológicos, así mismo pueden encontrarse residuos de medicamentos que hayan sido administrados a la madre (1-4). Se ha reportado que pueden aparecer en la leche medicamentos como ampicilina, eritromicina, metilina y estreptomina (5). Passmore *et al.*, (6) demostraron la excreción de metronidazol, midiendo su concentración en plasma y leche de madres bajo terapia.

Al momento del nacimiento el intestino del niño es estéril, pero pronto la flora fecal se desarrolla procedente de la flora materna cutánea, fecal, vaginal, o de gérmenes procedentes del ambiente o de la alimentación. Yoshioka *et al.* (7), en un estudio sobre un grupo de 13 recién nacidos, reportaron que en los niños amamantados con leche materna los microorganismos predominantes fueron Enterobacterias, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Bacteroides*. Así mismo Balmer *et al.* (8), al estudiar la flora intestinal de 28 recién nacidos amamantados, encontraron un predominio de Bifidobacterias y *Staphylococcus*.

La presencia de antimicrobianos en la leche materna ha sido motivo de preocupación por el posible efecto que pueda ejercer sobre la flora intestinal del recién nacido. Mohr *et al.* (9), reportaron que con el uso de gentamicina o combinación de gentamicina con oxacilina, azlociclinas y/o cefotaxima no se observaron cambios en la flora aeróbica de prematuros alimentados con leche materna, los cambios se observaron en los

que estaban bajo terapia sólo con cefotaxima. Otros investigadores al emplear flomoxef en neonatos observaron una desaparición de las Bifidobacterias, un descenso o desaparición de las Enterobacterias con preservación de los *Streptococcus* (10).

Los estudios citados con anterioridad han sido realizados en países donde las condiciones del medio, la alimentación y otros factores varían considerablemente con respecto al nuestro. De allí, la importancia de conocer el efecto de los antimicrobianos que pasan a la leche materna sobre la flora intestinal aeróbica de los recién nacidos de nuestra región, puesto que el desarrollo de resistencia por parte de algunos microorganismos podría interferir en posteriores tratamientos al niño o incluso permitir la transferencia de esta resistencia a otras bacterias de su flora intestinal. En virtud de estos planteamientos surge el interés de detectar la presencia de los antimicrobianos en la leche de mujeres recién paridas, identificar la flora bacteriana intestinal aeróbica del recién nacido alimentado con leche materna y determinar la influencia de estos antimicrobianos en la antibiotico-resistencia bacteriana.

Materiales y Métodos

Población en estudio

Para la realización de este estudio se seleccionaron 40 mujeres recién paridas que amamantaban a sus hijos en las secciones de alojamiento en conjunto de la Maternidad "Armando Castillo Plaza" (Maracaibo-

Edo. Zulia). Estas fueron agrupadas de la siguiente manera: Grupo A (control) constituido por 5 madres que no recibieron antimicrobianos. Grupo B constituido por 5 madres que recibieron antimicrobiano durante el embarazo. Grupo C 20 madres que recibieron antimicrobiano (ampicilina o cefalotina) 2 horas después del parto durante tres días. Grupo D 10 madres que recibieron antimicrobiano (ampicilina o cefalotina) durante el embarazo y 2 horas después del parto durante tres días. Los grupos a su vez incluyeron al lactante de cada mujer recién parida.

Recolección de muestras de leche

Las muestras (3-5 mL) fueron tomadas directamente del seno de la mujer previamente lavado, utilizando para ello un tiralече estéril; posteriormente se trasvasó a tubos de ensayo estériles tapados. En el caso de las mujeres con antibioticoterapia, la recolección de la muestra se efectuó a las 24 horas de haberse comenzado la terapia.

Recolección de muestras de heces

A los recién nacidos amamantados se les tomaron muestras de heces recién emitidas 24 horas después de que las madres comenzaran el tratamiento con el antimicrobiano. Las muestras fueron colocadas en el medio de transporte de Cary-Blair. Todas las muestras fueron transportadas bajo refrigeración en hielo hasta el laboratorio para su análisis.

Detección de antimicrobianos en la leche materna

Para la detección de residuos de antimicrobianos en las muestras de leche se utilizó el método del Disco-Ensayo, usando el *Bacillus stearothermophilus* variedad calidolactis, propuesto por la A.O.A.C. (11).

Coprocultivos

Para recuperar la flora aeróbica del recién nacido, las muestras de heces se sembraron en Agar Mac Conkey (AMC), agar

sangre humana (ASH) y agar manitol salado (AMS). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.

Identificación de enterobacterias

A las colonias fermentadoras o no de la lactosa aisladas del AMC, se les estudió la morfología colonial, se inocularon en agar triple azúcar hierro (TSI) y agar nutritivo (AN) y se incubaron a 37°C, por 24 horas. Las colonias oxidasa negativa con TSI ácido/ácido o ácido/alcalino con o sin producción de H₂S se sembraron en caldo indol, agar urea, agar citrato, agar motilidad y caldos ornitina y lisina descarboxilasa; incubados a 37°C por 24 horas para su caracterización según la metodología descrita por Farmer *et al.* (12).

Identificación de *Streptococcus* y *Enterococcus*

A las colonias de estreptococos y enterococos aisladas del ASH se les estudió la morfología colonial, producción de hemólisis y se les realizó un frotis coloreado con la técnica de Gram. La identificación de estos géneros se realizó mediante pruebas de susceptibilidad a la bacitracina (taxo A), Test de Camp, producción de hemólisis en agar sangre carnero (ASC), prueba de crecimiento en bilis e hidrólisis de la esculina y crecimiento en caldo salado al 6,5% de NaCl; siguiendo la metodología descrita por Facklam *et al.*, (12).

Identificación de *Staphylococcus* y *Micrococcus*

A las colonias de micrococos aisladas del ASH compatibles con los miembros de la familia *Micrococcaceae* y a las colonias de *Staphylococcus* recuperadas del agar manitol salado (AMS), se les estudió la morfología colonial, producción de hemólisis (en ASH) y se efectuó un frotis para colorear con Gram; posteriormente se sembraron en medio de AN, OF glucosa y plasma humano; se incubaron a 37°C por 24 horas (a excepción del plasma humano que se incubó por 4 horas) según lo descrito por Kloos *et al.* (12).

Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos

A todas las cepas identificadas se les determinó la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos siguiendo el método del disco único de alta potencia, descrito por Bauer *et al.* (13). Los discos empleados para determinar la susceptibilidad de los microorganismos Gram positivo y Gram negativo aislados en este estudio se muestran en la Tabla 1. Los diámetros de las zonas de inhi-

bición que permiten establecer sensibilidad o resistencia a los agentes antimicrobianos, son leídos y reportados según las especificaciones de la N.C.C.L.S. (14).

Análisis estadístico

Para comparar la cantidad de géneros bacterianos encontrados en los grupos muestreados, se aplicó el estadístico Chi cuadrado.

Tabla 1
Antimicrobianos usados en el método del disco único de alta potencia

Agente Antimicrobiano	Potencia del Disco	Utilizados para Microorganismos	
		Gram(+)	Gram(-)
Betalactámicos			
Ampicilina (AM)	10 µg	x	x
Aztreonan (ATM)	30 µg		x
Cefalotina (KF)	30 µg	x	x
Cefamandol (MA)	30 µg	x	x
Ceftriazone (CRO)	30 µg	x	x
Cefoperazona (CFP)	75 µg	x	x
Cefotaxime (CTX)	30 µg	x	x
Imipenen (IPM)	10 µg	x	x
Oxacilina (OX)	1 µg	x	
Penicilina (P)	10 unid.	x	
Piperacilina (PIP)	100 µg		x
Inhibidores de la Betalactamasa			
Amoxicilina-Acido Clavulánico (AMC)	20 µg - 10 µg	x	x
Aminoglicósidos			
Amikacina (AN)	30 µg	x	x
Gentamicina (GM)	10 µg	x	x
Fluoroquinolonas			
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	x	x
Macrólidos			
Eritromicina (E)	2 µg	x	
Glucopéptidos			
Vancomicina (V)	30 µg	x	
Combinación Sulfonamidas			
Trimetoprim - Sulfametoxazol (SXT)	1,25 µg - 23,75 µg	x	x

Para comparar los porcentajes de resistencia a los antimicrobianos de las cepas aisladas entre los grupos muestreados, se realizó el análisis de la varianza con dos criterios de clasificación, sin repetición, utilizando el paquete estadístico Statistix (NH Analytical Software 1989) versión 1.10. La prueba de Tukey determinó las medias responsables de la diferencia significativa en los análisis de la varianza.

Resultados y Discusión

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la prueba del disco ensayo practicado a las leches maternas. Los grupos A y B, resultaron negativos a la prueba,

no encontrándose presencia de antimicrobianos en ellos. En cuanto a los grupos C y D, las muestras de leche resultaron positivas al disco ensayo.

El porcentaje de bacterias Gram negativa y Gram positiva en los diferentes grupos de lactantes se presentan en la Tabla 3. Un total de 122 aislamientos fueron obtenidos de las heces de los recién nacidos, de ellos 52 cepas (42,62%) corresponden a bacterias Gram negativa y 70 cepas (57,38%) a bacterias Gram positiva; pudiéndose notar la prevalencia de las Gram positiva. Estos resultados concuerdan con los de Balmer *et al.* (8), quienes reportan que las bacterias predominantes en los niños amamantados son las

Tabla 2
Resultados obtenidos del disco-ensayo para la detección de antimicrobianos en leche materna

Grupos	Número de Muestras	Disco Ensayo	
		% (-)	% (+)
A	5	100	0
B	5	100	0
C	20	0	100
D	10	0	100

Los grupos de mujeres recién paridas fueron de la siguiente manera: A control no recibieron antimicrobiano, B: recibieron antimicrobiano durante el embarazo, C: recibieron antimicrobiano después del parto, D: recibieron antimicrobiano durante el embarazo y después del parto.

Tabla 3
Porcentaje de aislamiento de bacterias Gram positiva y Gram negativa en los diferentes grupos de lactantes

Microorganismo	%	A	B	C	D
Gram negativo	42,62	<i>E. coli</i> <i>E. agglomerans</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>C. freundii</i>	<i>E. coli</i> <i>E. agglomerans</i>	<i>E. coli</i> <i>E. agglomerans</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>E. cloacae</i> <i>P. mirabilis</i> <i>S. odorifera</i>	<i>E. coli</i> <i>E. agglomerans</i> <i>K. pneumoniae</i>
Gram positivo	57,38	S.C.N. <i>Enterococcus sp.</i> <i>Streptococcus D</i>	S.C.N. <i>Enterococcus sp.</i>	S.C.N. <i>Enterococcus sp.</i> <i>Streptococcus D</i> <i>Micrococcus sp.</i>	S.C.N. <i>Enterococcus sp.</i> <i>Streptococcus D</i> <i>Micrococcus sp.</i>

S.C.N.= Estafilococos coagulasa negativa.

Gram positiva, Bifidobacterias y *Staphylococcus*, aunque otras literaturas (15, 7) señalan a las Enterobacterias como la flora fecal aeróbica de mayor predominio en neonatos. Es de notar que en los grupos A y C, el número de géneros aislados fue superior al de los grupos B y D. La mayor variedad de cepas identificadas se encuentran en el grupo C, sin embargo al comparar mediante el estadístico Chi cuadrado la cantidad de géneros bacterianos por grupo, no existió diferencia significativa ($P > 0.05$). Así mismo cabe destacar que en los cuatro grupos, las especies bacterianas comunes fueron: *E. coli*, *E. agglomerans*, estafilococos coagulasa negativa y *Enterococcus* sp.; microorganismos que han sido reportados como parte de la flora intestinal del recién nacido, por otros autores (8, 7, 15).

En la Figura 1 se muestra el porcentaje de los diferentes géneros de bacterias Gram positiva identificadas. Se observa que el mayor porcentaje de aislamientos correspondió a estafilococos coagulasa negativa con 52,36% seguido de *Enterococcus* sp. y *Streptococcus* grupo serológico D, ambos con un 17,14%. Reportes anteriores (7, 8) coinciden en señalar al género *Staphylococcus* como las bacterias predominantes en la flora fecal del neonato dentro del grupo de los Gram positivo, sin embargo no llegan a la identificación final de la especie; en esta investigación se logró determinar que la mayor proporción de cepas de *Staphylococcus* se corresponden con los estafilococos coagulasa negativa.

En relación al porcentaje de bacterias Gram negativa aisladas en los coprocultivos de los recién nacidos (Figura 2), se muestra que los primeros lugares fueron ocupados por *Escherichia coli* con el 73,09% seguido por *Enterobacter agglomerans* y *Klebsiella pneumoniae*, ambas con el 7,69%. De estos resultados se puede inferir que de las bacterias Gram negativa aisladas son las Enterobacterias las que predominan y de estas la *E. coli* es la especie que obtiene el mayor por-

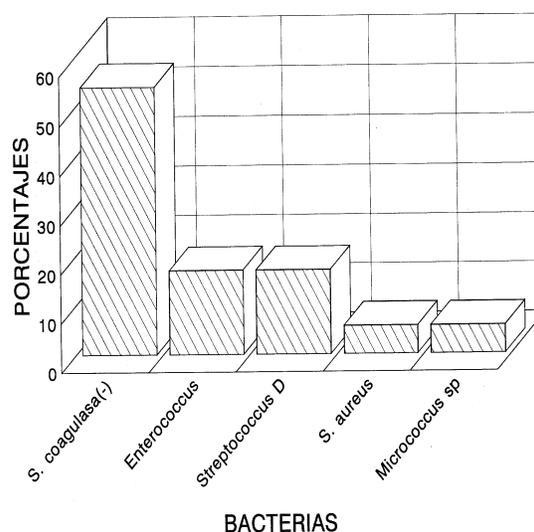


Figura 1. Porcentaje de Bacterias Gram (+) aisladas en los coprocultivos.

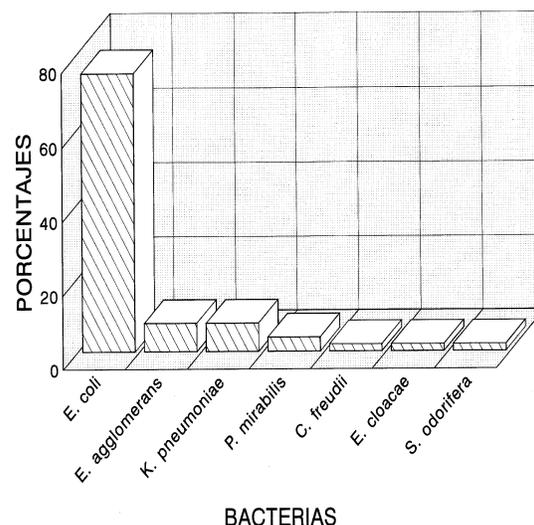


Figura 2. Porcentaje de Bacterias Gram (-) aisladas en los coprocultivos.

centaje, situación que concuerda con la literatura consultada (15, 4, 7).

En la Figura 3 se muestra el porcentaje de resistencia a los diferentes antibióticos de *E. coli* en los grupos A, B, C y D; el cual fue bajo para la mayoría de los antimicrobianos usados. El análisis de la varianza no determinó la existencia de una diferencia signifi-

cativa en la resistencia por grupo, ni por antimicrobianos.

Las cepas de *E. agglomerans* resultaron sensibles a la mayoría de los antimicrobianos empleados en la prueba de difusión en disco. La Figura 4 muestra los casos donde hubo resistencia, encontrándose que esta depende del grupo y del antimicrobiano. Cabe destacar la presencia de *E. agglomerans* 100% resistentes a ampicilina, cefalotina, piperacilina y sulfatrimetoprim, las cuales son drogas recomendadas para el tratamiento de infecciones diversas. No obstante, estas cepas presentan una resistencia natural a la ampicilina y cefalotina, por lo tanto es difícil afirmar que la resistencia presentada sea debido a la utilización de esos antimicrobianos (16).

En la Figura 5, se observa que los estafilococos coagulasa negativa, son resistentes a un número mayor de antimicrobianos. Al aplicar el análisis de la varianza se determinó que existe diferencia significativa tanto para

los grupos como para los antimicrobianos. La prueba de Tukey reveló un mayor porcentaje de estafilococos coagulasa negativa resistentes en los grupos B, C y D; obteniéndose entre ellos medias homogéneas. En cuanto a los antimicrobianos frente a los cuales existió mayor porcentaje de resistencia, la prueba de Tukey destacó la alta resistencia por los estafilococos coagulasa negativa ante la penicilina, ampicilina y eritromicina.

La Figura 6 revela altos porcentajes de resistencia del *Enterococcus* sp. a los antimicrobianos probados en la mayoría de los grupos muestreados. El análisis de la varianza permitió distinguir la existencia de diferencia significativa en los porcentajes de resistencia entre antimicrobianos. Para determinar los productores de esta diferencia significativa la prueba de Tukey permitió identificar a la oxacilina, cefotaxima, cefamandol, como los antimicrobianos frente a los cuales las cepas de *Enterococcus* sp. fueron más resistentes.

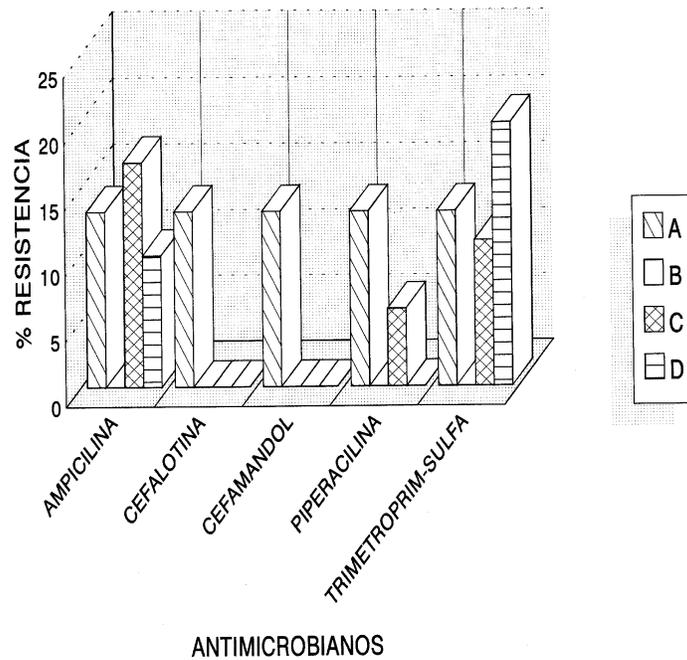


Figura 3. Porcentaje de Resistencia a los Antimicrobianos por *E. coli* en los diferentes grupos de lactantes.

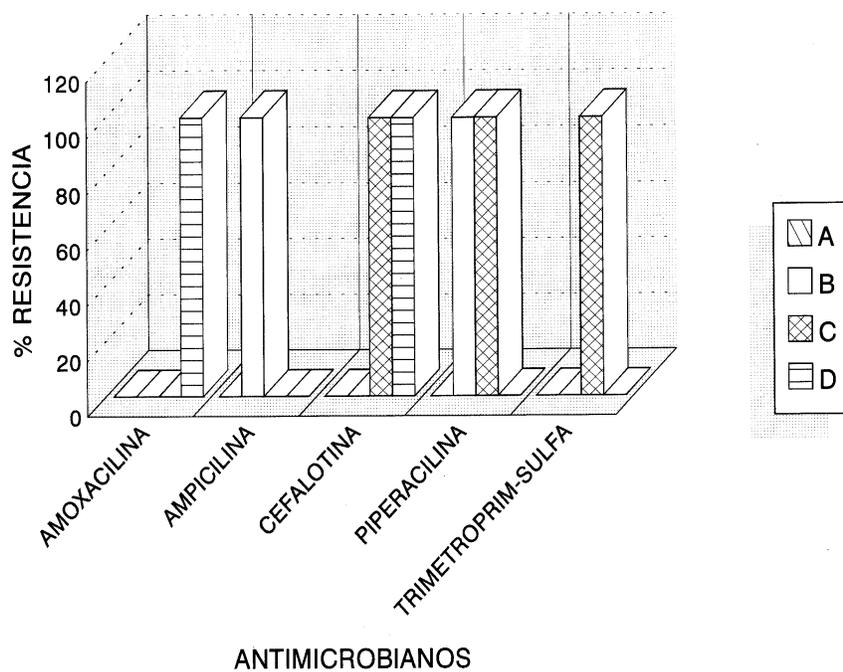


Figura 4. Porcentaje de Resistencia a los Antimicrobianos por *E. Agglomerans* en los diferentes grupos de lactantes.

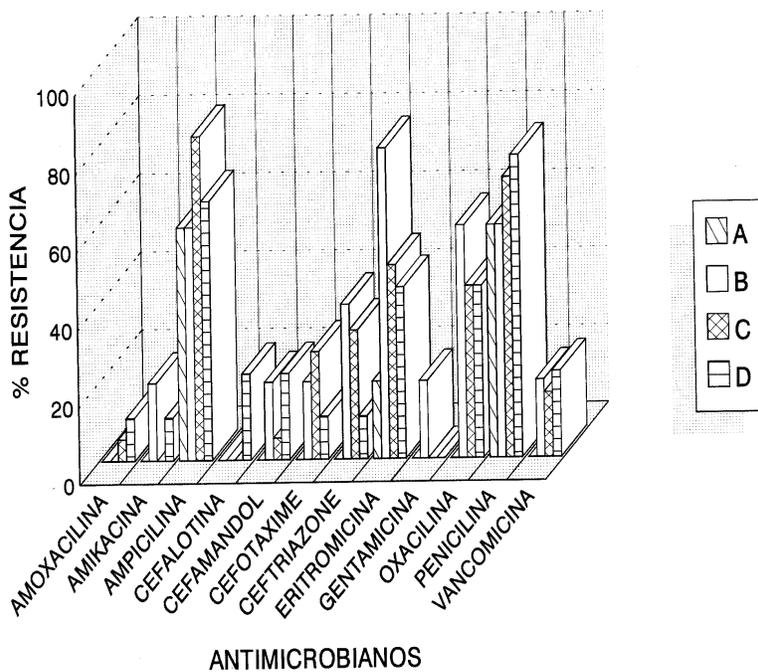


Figura 5. Porcentaje de Resistencia a los Antimicrobianos por *Estafilococos coagulasa* negativa en los diferentes grupos de lactantes.

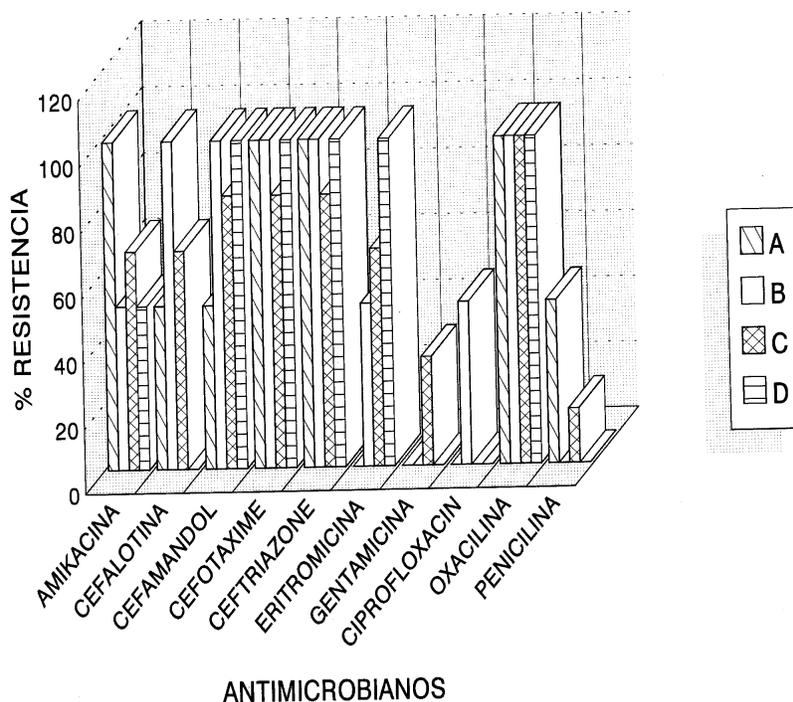


Figura 6. Porcentaje de Resistencia a los Antimicrobianos por *Enterococcus* sp. en los diferentes grupos de lactantes.

Los porcentajes de resistencia encontrados en las cepas bacterianas comunes aisladas en los grupos de lactantes C y D frente a la ampicilina y cefalotina parece indicar que la utilización de estas drogas podría provocar el desarrollo de resistencia por parte de algunos microorganismos de la flora fecal aeróbica del recién nacido, lo cual interferiría en posteriores tratamientos al niño o incluso permitiría la transferencia de dicha resistencia a otras bacterias de la flora intestinal del lactante.

Referencias Bibliográficas

1. ARENA J.M. *Pediatr Ann* 9:452-457, 1980.
2. KNOWLES J.A. *J Pediatr* 66:1068-1070, 1985.
3. SILVER H., KEMPE C.H., BRUYN H.B., FULGINITI V.A. *Manual de Pediatría*, 12a. Edición. El manual moderno, Mexico, pp. 452-457, 1988.
4. SONNENBORN U., STOBERNACK H.P., PROPPERT Y. *Fortchr Med* 108:420-424, 1990.
5. SANDFORD J.P. *Guide to antimicrobial therapy*. Antimicrobial therapy Inc. USA, pp. 100, 1991.
6. PASSMORE C.M., McELNAY J.C., RANEY E.A., D'ARCY P.F. *Clin Pharmac* 26:45-51, 1988.
7. YOSHIOKA H., ISEKI K., FUJITA K. *Pediatrics* 72:317-320, 1983.
8. BALMER S.E., WHARTON B.A. *Arch Dis Child* 12:1672-1977, 1989.
9. MOHR V.C., HEINE W., PLATH CHR., NAUMANN G. *Kinderarztl-Prax* 56:277-281, 1988.
10. FUJITA K., MURONO K., SAIJYO M., KAKUYA F., YOSHIOKA H., MARUYAMA., SAKATA H., HIRAMOTO A., INYAKU F. *Japón J Antibiot* 44:1216-1227, 1991.

-
11. A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemist. **Milk section** N° 982.16. Washington D.C. (USA), pp. 825, 1990.
 12. BALLOWS A., HAUSLER W. J., HERRMANN K. L., INSERBERG H. D., SHADOMY H.J. **American Society for Microbiology**, Fifth Edition. (eds), Washington D.C. (USA), pp. 222-383, 1980.
 13. BAUER A.W., KIRBY W.M., SHERRIS J.C., TURCK M. **J Clin Pathol** 45:493-496, 1966.
 14. N.C.C.L.S. Zone diameter interpretative standars and equivalent Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Break point for organism other than Haemophylus (Table 2). Vol. 8, N° 7, December 1988.
 15. SLEISENGER M.H., FORDTRAN J.S. **Enfermedades Gastrointestinales, Fisiología, Diagnóstico y Tratamiento**, 3a. ed., Médica Panamericana, Buenos Aires (Argentina), pp. 54-56, 1985.
 16. DAVIS B.D., DULBECCO R., EISEN H.N., GINSBERG H.S. **Tratado de Microbiología**, 3a. ed., Editorial Salvat, p. 540, 1984.