

Artículo original

Almacenamiento de leche humana: su influencia en la composición química y desarrollo bacteriano en tres momentos de la lactancia

Dres. MARIA DEL CARMEN COVAS* y ERNESTO ALDA*
Lics. ANA DE BAEZA**, LILIANA FERRER** y CLAUDIA FERRANDEZ**

RESUMEN

Muchos recién nacidos y lactantes no pueden recibir leche humana como resultado de internaciones prolongadas o reintegro laboral materno.

Objetivos. Determinar los componentes químicos de la leche humana (pH, lípidos, proteínas e IgA), como así también el desarrollo bacteriano en diferentes modos de almacenamiento: inmediato a su extracción, después de 4 días en refrigerador y después de 15 días en freezer.

Analizarlos en tres momentos de la lactancia: primera, cuarta y octava semana del posparto.

Diseño. De observación, analítico, prospectivo (tipo cohorte).

Material y métodos. Se analizaron muestras de leche, correspondientes a una cohorte de 35 madres con recién nacidos de término, sanos. De ellas, sólo 16 completaron las 3 muestras requeridas (n: 48). Se determinaron pH, lípidos, proteínas, IgA y desarrollo bacteriano inmediatamente después de la extracción (A); luego de la refrigeración establecida (B) y después de mantenerla en freezer durante 15 días (C). Los momentos fueron al finalizar la primera, cuarta y octava semanas del posparto.

Resultados. Según su modo de almacenamiento, hallamos descenso del pH ($p < 0,001$), proteólisis y lipólisis ($p = NS$) en las muestras mantenidas en refrigerador (B). El almacenamiento en freezer (C) mostró valores similares a la leche recién extraída (A). El desarrollo bacteriano fue negativo en el 49% de las muestras analizadas, cualquiera fuera su forma de conservación. El 46% de ellas estaban contaminadas (desarrollo $< 10^3$) y el 5% infectadas ($> 10^5$).

Según los diferentes momentos de la lactancia hallamos una caída de las proteínas y de la IgA entre las muestras 1 (primera semana) y 2-3 (cuarta y octava semanas de posparto), en coincidencia con un aumento de los lípidos totales.

Conclusiones. La leche humana conservada en freezer mostró similar composición química y desarrollo bacteriano a la leche recién extraída.

A pesar del descenso del pH y la lipólisis-proteólisis halladas en la leche conservada en refrigerador, el desarrollo bacteriano fue similar a la leche recién extraída.

Hallamos aumento de los lípidos y descenso de las proteínas e IgA en leche humana, entre la primera y la cuarta-octava semanas del posparto.

Palabras clave: alimentación a pecho, leche humana, almacenamiento, contaminación bacteriana.

SUMMARY

Many newborns and infants cannot receive fresh maternal milk as a result of illnesses or early return of the mother to the workforce.

Objectives. To determine the chemical composition of human milk (pH, lipids, proteins and IgA) and bacterial contamination, with different storage methods: fresh milk, after 4 days in a refrigerator and after 15 days in a freezer.

To compare them at three different moments: one, four and eight weeks after birth.

Design. Prospective analytic observational study (cohort study).

Material & methods. We analyzed samples from 35 mothers who had delivered healthy term infants; only 16 mothers completed the three samples required (n=48). At one, four and eight weeks postpartum, pH, lipids, total proteins, IgA concentrations and bacterial growth were determined immediately after extraction (A), after refrigerating for four days (B) and after freezing for 15 days (C).

Results. The total number of samples were first analyzed according to storage method. We found a decrease of pH ($p < 0.001$), proteins and total lipids ($p = NS$) in samples kept in the refrigerator (B). The samples kept in freezer (C) showed the same composition than fresh milk (A).

Bacterial growth was negative in 49% of analyzed samples, regardless of the storage method; 46% were contaminated ($< 10^3$) and 5% were infected ($> 10^5$).

Comparisons according to weeks postpartum indicated a decrease in proteins and IgA between samples 1 (first week) and 2-3 (fourth and eighth postpartum weeks), in coincidence with an increase of total lipids concentrations.

Conclusions: Frozen milk showed the same chemical composition and bacterial growth than fresh milk.

Refrigerated milk, regardless of a decrease in pH, protein and total lipids concentration, showed the same bacterial growth of fresh milk.

There was an increase of total lipids and a decrease of proteins and IgA concentration in human milk, between the first and the fourth and eighth postpartum week.

Key words: breast feeding, human milk, storage, bacterial contamination.

* Servicio de Neonatología.

** Laboratorio Central.

Hospital Privado del Sur. Bahía Blanca. Provincia de Buenos Aires.
Correspondencia: Dra. María del Carmen Covas. Las Heras 187. (8000) Bahía Blanca.

INTRODUCCIÓN

El beneficio de la leche humana es un concepto ampliamente difundido, por ser el alimento natural para los recién nacidos y lactantes.¹⁻² Sin embargo, muchos de ellos ven dificultada su ingesta debido a internaciones con ayunos prolongados, ante enfermedades generales o digestivas, en particular, que imposibilitan su utilización.³⁻⁴

Asimismo, el precoz reintegro laboral materno es una de las causas más frecuentes de destete precoz,⁵ con acortamiento de la lactancia, por lo que afecta principalmente a clases sociales más necesitadas, al disminuir el tiempo de los beneficios de la leche humana.⁶⁻⁹

Los "bancos de leche", que funcionaban con donación de leche materna producida en exceso, han caído en desuso ante la posibilidad de transmitir enfermedades infecciosas (CMV, HIV, entre otras).¹⁰⁻¹²

En nuestro medio desconocemos los cambios que pueden presentarse en la estabilidad química y en la contaminación bacteriana, ante habituales formas de conservación de la leche humana: refrigerador y freezer. Asimismo, sabemos que el almacenamiento de leche humana en refrigerador disminuye el crecimiento bacteriano en el calostro y en leche madura a las 24 horas de extraída, principalmente de cepas patógenas.¹³⁻¹⁹

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Determinar los componentes químicos de la leche humana (pH, lípidos, proteínas e IgA) y el desarrollo bacteriano, inmediato a su extracción, después de 4 días en refrigerador y de 15 días en freezer.
- Analizarlos con idénticos modos de almacenamiento en tres momentos diferentes de la lactancia: primera, cuarta y octava semanas del posparto.

Población

Cohorte de 35 madres, residentes en la ciudad de Bahía Blanca, cuyo parto se realizó en el Hospital Privado del Sur, entre abril y septiembre de 1997 (otoño-invierno).

Criterios de inclusión

Embarazo controlado (> 3 controles), finalización en término (•37 semanas de gestación), parto vaginal o cesárea, recién nacidos sanos en el momento del nacimiento.

Durante el puerperio inmediato, se entregó un escrito instructivo, informando a las madres los objetivos del presente estudio y se les solicitó su

consentimiento. Debían regresar al servicio al finalizar la primera, cuarta y octava semanas del posparto.

Criterios de exclusión

Aquellas madres que no cumplieron los tiempos solicitados para la extracción de la muestra de leche.

Material y métodos

Diseño del trabajo

Observacional, analítico, prospectivo (tipo cohorte).

El Servicio de Neonatología del Hospital Privado del Sur (*Hospital Amigo de la Madre y el Niño*, desde 1997) asiste, desde su nacimiento, a 1.500 niños por año. El seguimiento en consultorios externos se realiza, exclusivamente, durante el período neonatal (28 días).

Al concurrir la madre para la extracción de la muestra, se le ofrecía aspirársela en forma neumática (bomba de extracción *Medela* NR) o manual, previa higiene de manos con agua y jabón blanco y de los pezones con agua hervida a temperatura ambiente, según reglas vigentes en el servicio.²⁰⁻²³

El lugar donde se realizó la extracción se halla dentro de la unidad y está destinado exclusivamente a la recolección de muestras lácteas y a su almacenamiento inmediato (en refrigerador o freezer). Se mantiene su temperatura ambiente (22-24° C) y humedad en forma uniforme.

Para evitar cambios diarios que pudieran afectar los componentes de la leche, se realizó la extracción en horas de la mañana (9 a 12 hs.). Las muestras se recolectaron en frascos estériles de plástico²⁴ y se fraccionaron en tres:

- Muestra A: Procesamiento inmediato.
- Muestra B: Almacenamiento en refrigerador a 4° C.
- Muestra C: Almacenamiento en freezer a -20° C.

La muestra A se remitía de inmediato al laboratorio central, situado dos pisos por debajo de la unidad. A los cuatro días, se remitía la muestra B y a los quince días, la muestra C.

Según el momento de la extracción, se definieron las muestras: Al finalizar la primera semana del posparto: muestra 1; a la cuarta semana: muestra 2 y a la octava semana: muestra 3. En esta evaluación analítica, sólo se utilizó la muestra A (procesamiento inmediato).

Determinaciones de laboratorio

pH, por método potenciométrico.

Proteínas, mediante la reacción de Biuret;²⁵ método colorimétrico con EDTA/Cu en Aquil-Aril-Polieter; previa extracción con éter etílico. Se informan gramos por 100 ml.

Lípidos totales, incluyen los ácidos grasos no saturados (libres y esterificados), por el método colorimétrico con fosfovainillínico (solución de vainillina 9,02 mol/l en ácido fosfórico). Se informan gramos por 100 ml.

IgA, por inmunodifusión radial con placas Kallestad NR. Se informan miligramos por 100 ml.

Contaminación bacteriana, por cultivos cuantitativos mediante siembra con anza calibrada, flameada y enfriada. Se obtuvo la muestra en forma perpendicular a la superficie. Los medios de cultivo fueron:

- Agar tripteína soja con 5% de sangre de carnero, incubado en atmósfera al 5% de CO₂.
- Agar CLDE (cisteína-lactosa deficiente en electrolitos).
- Agar manitol salado.
- Los cultivos se incubaron a 35° C, durante 18-24 horas.
- Se informaron como negativas (sin desarrollo), contaminadas (<10³) e infectadas (>10⁵).
- Las cepas aisladas se tipificaban por métodos estándar.

Análisis estadístico

Se utilizaron planillas de cálculo (ACCESS), para determinación de media y desvío estándar de la cohorte estudiada y de las muestras analizadas. Análisis de *variancia* (ANOVA). Los valores con significación estadística fueron calculados por EPI6 (OMS) para una $p < 0,05$.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital Privado del Sur (febrero 1997).

TABLA 1

Mediciones basales de las madres estudiadas

Total de madres	16
Edad	28 ± 2 años
Paridad: primíparas	10 (62%)
Edad gestacional	39 ± 1 semanas
Peso materno habitual	64 ± 12 kg
Peso neonatal	3.053 ± 340 g
Apgar al 1° y 5° minutos	7-9
Forma de terminación:	
Natural	11 (69%)
Cesárea	5 (31%)

RESULTADOS

De las 35 madres enroladas en el estudio, sólo 16 (el 46%) completaron las tres muestras solicitadas en los términos fijados: primera, cuarta y octava semanas del posparto (n= 48). La deserción (el 54%) se debió, principalmente, a la no concurrencia en los plazos fijados en el protocolo, mayoritariamente en la octava semana.

La población analizada se presenta en la *Tabla 1*.

Estabilidad química de los componentes de la leche humana:

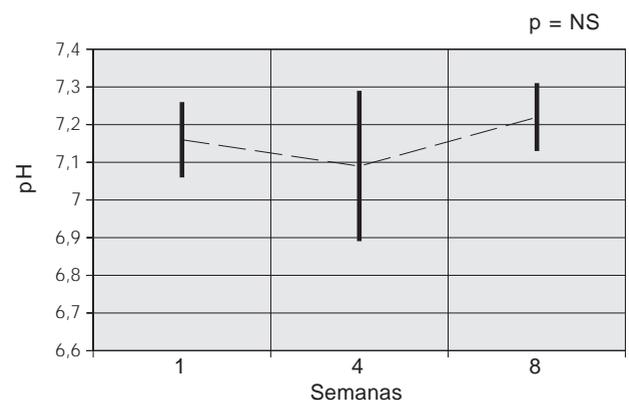
pH:

Según su forma de almacenamiento, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con respecto al descenso del pH en las muestras almacenadas en refrigerador (B), versus las muestras recién extraídas (A) y las conservadas en freezer (C).

No hallamos diferencias del pH, en los tres momentos de la lactancia: al finalizar la primera, cuarta y octava semanas del posparto (*Gráfico 1*).

TABLA 2
pH de las muestras de leche según forma de almacenamiento

A		B		C	
\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE
7,15 ± 0,12		6,39 ± 0,28		7,08 ± 0,18	
$p < 0,001$					



Valor del pH de la leche humana en tres diferentes momentos de la lactancia: al finalizar la primera, cuarta y octava semanas del posparto. Procesamiento inmediato a su extracción. Sin diferencias significativas en el valor del pH ($p = NS$).

GRÁFICO 1

Valor del pH de la leche humana en diferentes momentos de la lactancia

Lípidos

Según su forma de almacenamiento, encontramos lipólisis en las muestras B (refrigerador), comparadas con las A (recién extraída) y C (freezer); sin significación estadística (Tabla 3).

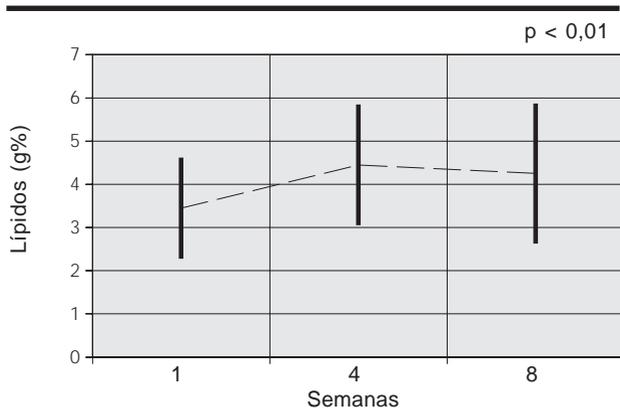
Con respecto al tiempo del posparto, en las muestras analizadas al finalizar las semanas cuarta (muestra 2) y octava (muestra 3), se halló mayor cantidad de lípidos que al finalizar la primera semana (muestra 1); diferencias estadísticamente significativas (Gráfico 2).

TABLA 3					
A		B		C	
\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE
4,05 ± 1,39		3,58 ± 1,47		3,95 ± 1,37	

p: NS

TABLA 4					
A		B		C	
\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE
0,98 ± 0,33		0,82 ± 0,33		0,92 ± 0,33	

p: NS



Lípidos en leche humana (g%) en tres diferentes momentos de la lactancia: al finalizar la primera, cuarta y octava semanas del posparto. Procesamiento inmediato a su extracción. Diferencias significativas entre la primera y cuarta/octava semanas ($p < 0,01$).

GRÁFICO 2
Lípidos (g x 100 ml) en la leche humana, en diferentes momentos de la lactancia

Proteínas

En relación a las proteínas los resultados fueron semejantes a los lípidos: proteólisis en las muestras B (refrigerador) comparadas con A y C, sin significación estadística (Tabla 4).

La cantidad de proteínas disminuyó entre la obtenida al finalizar la primera (muestra 1) y la cuarta y octava semana del posparto (muestras 2 y 3); diferencias, en estos casos, estadísticamente significativas (Gráfico 3).

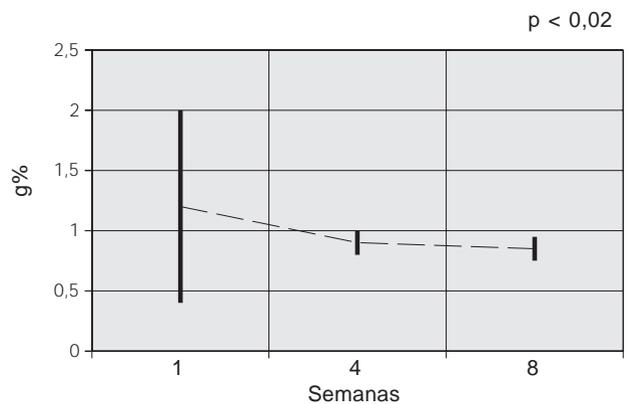
IgA

No encontramos diferencias en la IgA, según su forma de almacenamiento (Tabla 5).

Cuando establecimos las diferencias según el tiempo del posparto, hallamos descenso y menor dispersión entre las muestras 1 y 2-3; con significación estadística (Gráfico 4).

TABLA 5			
Valores de IgA en leche materna según forma de almacenamiento			
	A	B	C
Mediana	27,2	23,9	23,9
(rango)	(4,6-1.500)	(4,6-1.420)	(4,6-1.138)

p: NS



Proteínas en leche humana (g%), en tres diferentes momentos de la lactancia: al finalizar la primera, cuarta y octava semanas del posparto. Procesamiento inmediato a su extracción. Diferencias significativas entre la primera y cuarta/octava semanas ($p < 0,02$). Nótese la gran dispersión del valor de proteínas en la leche humana de la primera semana.

GRÁFICO 3
Proteínas (g x 100 ml) en la leche humana, en diferentes momentos de la lactancia

Desarrollo bacteriano

En las 48 muestras analizadas, cualitativa y cuantitativamente, no encontramos diferencias según su forma de almacenamiento. El desarrollo bacteriano fue similar entre las muestras recién extraídas (A) y las mantenidas cuatro días en refrigerador (B) y quince días en freezer (C).

Los resultados en relación al tiempo de posparto se presenta en la *Tabla 6*.

De las 73 muestras que presentaron desarrollo bacteriano, 56 correspondieron a gérmenes no patógenos: *Staphylococcus epidermidis* (50), *Acinetobacter baumannii* (6); 12 fueron gérmenes patógenos: *Escherichia coli* (3), *Pseudomona aeruginosa* (6), *Klebsiella pneumoniae* (3) y 5, flora mixta.

Como lo demuestran otros estudios,²³⁻²⁷ el 71% de los gérmenes aislados correspondió a *Staphylococcus epidermidis*.

Se hallaron diferencias cuantitativas ($p < 0,02$) en el desarrollo bacteriano entre las muestras 1 y 2.

La mayoría de los gérmenes patógenos (9) se aislaron en la muestra 1 (primera semana del posparto).

TABLA 6
Desarrollo bacteriano de las leches según tiempo del posparto

Muestras	1	2	3	Total
Negativas	16	28	27	71 (49%)
Contaminadas	29	17	21	67 (46%)
Infectadas	3	3	0	6 (5%)

TABLA 7
Resumen de la colonización bacteriana de la leche humana en diferentes momentos de la lactancia

Gérmenes	1º Semana	4º Semana	8º Semana
Negativas	16	28	27
No patógenos			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	16	21
<i>Acinetobacter</i>	6		
Patógenos			
<i>Pseudomona</i>	6		
<i>Escherichia coli</i>	3		
<i>Klebsiella</i>		3	
Mixta	4	1	

Ningún recién nacido presentó signos gastro-intestinales pese a recibir leche de su madre, de quien, posteriormente, se aislaron gérmenes patógenos o con desarrollo bacteriano en las muestras, interpretadas como infectadas ($>10^5$).

DISCUSION

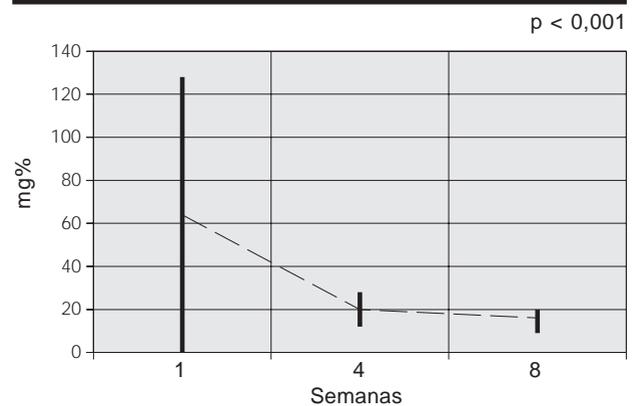
Resultó de interés conocer la composición química de la leche humana y su desarrollo bacteriano ante distintas formas de conservación (refrigerador y freezer) y establecer sus diferencias con la leche recién extraída.

La estabilidad de los componentes químicos y el desarrollo bacteriano ratificaron como seguras las formas de almacenamiento de la leche humana: refrigerador o freezer.

Las caídas del pH, junto a la lipólisis y proteólisis, observadas en muestras de leche conservadas en refrigerador (4° C) durante 4 días coinciden con lo descrito por Hanosch y colaboradores,²⁶ hechos que se interpretan como protectores al inhibir el desarrollo bacteriano, ratificado en nuestros hallazgos.

El almacenamiento en freezer (-20° C) durante 15 días mostró una estabilidad química casi idéntica a la obtenida en la leche recién extraída, junto a un similar desarrollo bacteriano, en cualquiera de los momentos analizados.

Los componentes químicos de la leche humana (pH, lípidos, proteínas e IgA) en tres momentos de la lactancia (primera, cuarta y octava semanas del



Valor de la IgA en leche humana (mg%) en tres diferentes momentos de la lactancia: al finalizar la primera, cuarta y octava semanas del posparto. Procesamiento inmediato a su extracción. Diferencias significativas entre la primera y cuarta/octava semanas ($p < 0,001$). Nótese la gran dispersión del valor de IgA en la leche humana de la primera semana.

GRÁFICO 4
IgA (mg x 100 ml) en la leche humana, en diferentes momentos de la lactancia

posparto) mostraron una caída de la cantidad de proteínas e IgA, junto a un ascenso de los lípidos. Estos datos coinciden con otros autores²⁷ y corroboran las características nutritivas e inmunológicas de la leche humana entre la primera semana y los meses siguientes al parto.

La concentración y gran dispersión de los valores de IgA en la primera semana se deben, seguramente, a las características del calostro y leche de transición, para estabilizarse posteriormente en la leche madura.

El desarrollo bacteriano mostró alta incidencia de gérmenes contaminantes no patógenos (*Staphylococcus epidermidis* y *Acinetobacter baumannii*); mientras que los gérmenes patógenos (gramnegativos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) predominaron en las muestras de la primera semana, probablemente asociada a la colonización del puerperio materno.

Las muestras infectadas (recuento de colonias >10⁵) no superaron el 5%. No obstante, ningún niño presentó signos gastrointestinales (vómitos, diarrea), lo que ratifica las características protectoras de la leche humana.²⁸⁻³¹

Varios factores contribuyen a esta propiedad antiinfecciosa, presente en los niños alimentados a pecho: presencia de proteínas inmunes y no inmunes (IgA y lactoferrina) en el tracto gastrointestinal, mayor desarrollo del propio sistema inmunológico del lactante;³² bifidobacterias como gérmenes predominantes en la flora intestinal,³³ entre otros.

Estudios de esta naturaleza conducen a pensar que estimular, fomentar y enseñar métodos de extracción y de conservación de leche humana podría beneficiar a amplias poblaciones de recién nacidos y lactantes imposibilitados circunstancialmente de recibir su mejor alimento.

CONCLUSIONES

En resumen, encontramos que el almacenamiento de la leche humana en freezer mostró una estabilidad química y desarrollo bacteriano similar al observado en la leche recién extraída.

La conservación en refrigerador, pese a su acidez, lipólisis y proteólisis, no produjo mayor desarrollo bacteriano en ninguna de las muestras analizadas. Consideramos que puede ser el freezer el lugar de elección para el mantenimiento de las leches de madre, tanto en el hogar como en las unidades neonatales o pediátricas.

Forma parte de futuros proyectos analizar las características de la leche humana almacenada en refrigerador o freezer, investigando su viabilidad

celular estructural y funcional.

Agradecimientos

Al personal de Enfermería del Servicio de Neonatología y del Laboratorio Central, por haber contribuido a que este proyecto se realizara. A Mariana de Lasa, por el entusiasmo juvenil que nos brindó al iniciar este proyecto. ■

BIBLIOGRAFIA

1. Hamosh M, Dewey K, Garza C. Nutrition during lactation. New York: National Academy Press 1991; 153-96.
2. Mayans E, Martell M. Control de calidad de la leche materna. Arch.argent.pediatr 1999; 97:109-15.
3. Goldman A, Cheda S, Keeney S. Immunologic protection of the premature newborn by human milk. Semin Perinatol 1994; 18(6):495-501.
4. López N, Ceriani J, Ferrer P. Estudio longitudinal del contenido de nutrientes en leche de madres de recién nacidos de término y pretérmino. Arch.argent.pediatr 1984; 82:93-100.
5. Gielen A, Faden R, O'Campo P. Maternal employment during the early post partum period: Effects on initiation and continuation of breastfeeding. Pediatrics 1991; 87:298-305.
6. Walsh J, Warren K. Selective primary health care. An interim strategy for disease control in developing countries. N Eng J Med 1979; 301:967-74.
7. Jason J, Nieburg P, Marks J. Mortality and infectious disease associated with infant feeding practices in developing countries. Pediatrics 1984; 74:702-27.
8. Feachem R, Koblinsky M. Interventions for the control of diarrheal diseases among young children: promotion of breastfeeding. Bull WHO 1984; 62:271-91.
9. Mata L. Breastfeeding, infections and infant outcomes: An international perspective. In: Atkinson S, Hanson L, Chandra R: Breastfeeding, infection and infant growth in developed and emerging countries. Canada: ARTS Biomed Publ Dist, 1990: 1-23.
10. Asquith M, Pedrotti P, Stevenson D. Clinical uses, collection and banking of human milk. Clin Perinatol 1987; 14(1):173-85.
11. Lucas A. AIDS and human milk bank closures (letter). Lancet 1987; 1(8541):1092-3.
12. Black R. Transmission of HIV in the breast-feeding process. J Am Diet Assoc 1996; 96(3):267-74.
13. Bank M, Kirkey A, West K. Effect of storage time and temperature on folacin and vitamin C levels in term and preterm human milk. Am J Clin Nutr 1985; 41(2):235-42.
14. Silprasert A, Dejsarai W, Keawvichit R. Effect of storage on the creatinocrit and total energy content of human milk. Hum Nutr Clin Nutr 1987; 41(1):31-6.
15. Berkow S, Hamosh M, Freed L. Lipases and lipids in human milk: effect of freeze-thawing and storage. Pediatr Res 1984; 18:1257-62.

16. Friend B, Shahani K, Long C. The effect of precessing and storage on key enzymes, B vitamins and lipids of mature human milk. I. Evaluation of fresh samples and effects of freezing and frozen storage. *Pediatr Res* 1983;17: 61-4.
17. Pardou A, Serruys E, Mascart-Lemone F. Human milk banking: influence of storage processes and of bacterial contaminations on some milk constituents. *Biol Neonate* 1994; 65:302-9.
18. El-Mohandes A, Schatz V, Keiser J. Bacterial contaminants of collected and frozen human milk used in an intensive care nursery. *Am J Infect Control* 1993; 21:226-30.
19. Deodhar L, Joshi S. Microbiological study of breast milk with special reference to its storage in milk bank. *J Postgrad Med* 1991; 37(1):14-6.
20. Hurst N, Myatt A, Schanler R. Growth and development of a hospital-based lactation program and mother's own milk bank. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1998; 27(5):503-10.
21. Pierce K, Tully M. Mother's own milk: guidelines for storage and handling. *J Hum Lact* 1992; 8(3):159-60.
22. Jones L. Mother's own expressed breast milk: guidelines for storage. *Mod Midwife* 1996; 6(6):27-9.
23. Thompson N, Pickler R, Munro C. Contamination in expressed breast milk following breast cleansing. *J Hum Lact* 1997; 13(2):127-30.
24. Manohar A, Williamson M, Koppikar G. Effect of storage of colostrum in various containers. *Indian Pediatr* 1997; 34(4):293-5.
25. Agullo E, Gelos B, Albertengo L. Determinación de proteínas en leche. *Bol Soc Quím Perú* 1993; 59:9-15.
26. Hamosh M, Ellis L, Pollock D. Breastfeeding and the working mother: Effect of time and temperature of short term storage on proteolysis, lipolysis and bacterial growth in milk. *Pediatrics* 1996; 97:492-8.
27. Kunz C, Rodríguez Palmero M, Koletzko B. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins and carbohydrates. *Clin Perinatol* 1999; 26(2):307-33.
28. Caroll L, Davies D, Osman M. Bacteriological criteria for feeding raw breast milk to babies on neonatal units. *Lancet* 1979; 1:732-3.
29. Davidson D, Poll R, Roberts C. Bacteriological monitoring of unheated human milk. *Arch Dis Child* 1979; 54:760-4.
30. Williamson S, Finucane E, Garza C. *Staphylococcus aureus* in raw human milk for neonates. *B M J* 1978; 1:1146.
31. Bullen C, Tearle P, Steward M. Resistance of breastfed infants to gastroenteritis. *B M J* 1971; 3:338-44.
32. Schanler R, Goldblum R, Garza C. Enhanced fecal excretion of selected immune factors in very low birth weight infants fed fortified human milk. *Pediatr Res* 1986; 20:711-4.
33. Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breastfed and bottle fed infants. *Microb Immunol* 1984; 28:975-86.

*"Cuando los hombres jóvenes tienen visión,
los sueños de los viejos se hacen realidad."*

ROSENAU