

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTROAMERICA Y PANAMA (INCAP)
GUATEMALA

Desarrollo de la flora intestinal nativa en lactantes sanos y enfermos *

Por el Dr. LEONARDO J. MATA⁽¹⁰⁰⁾

Mata, L. J. *Desarrollo de la flora intestinal nativa en lactantes sanos y enfermos*. Rev. Cub. Ped. 43: 2, 1971.

Se describen los estudios realizados en un grupo de niños de un pueblo, cuya evolución fue seguida desde su nacimiento hasta la edad de 3 años. El niño está contaminado después del nacimiento por protozoos, bacterias y virus; las bacterias se establecen más fácilmente que los otros. En los primeros días de vida, las aerobias pueden ser tan abundantes como las anaerobias; al final de la primera semana predominan las bifidobacterias con el 10^{11} unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces húmedas. Las coliformes son menos prominentes, de 10^6 a 10^{10} UFC por gramo. Durante el período de alimentación con leche materna (los primeros 3 a 6 meses), las bifidobacterias representan más del 99% de la flora cultivable. La excreción de los enterovirus aumenta con la edad, y en el segundo o tercer año de vida, del 50 al 75% de todos los niños pueden excretar enterovirus en cualquier momento. Con el destete y el deterioro de la nutrición progresivos, aumenta la *Shigella*; los índices son mayores al tercer año de vida. Una disminución relativa o absoluta en los anaerobios y una proliferación de los coliformes, es observado al comienzo de una diarrea grave. Se halla una proliferación bacteriana en el jejuno de niños con diarrea específica y malnutrición.

INTRODUCCION

El tracto digestivo humano es invadido y colonizado tempranamente después del nacimiento, por una variedad de microorganismos que se originan en el ambiente biológico y físico. Una situación semejante se produce en los animales, donde se ha determinado experimentalmente que la colonización del tracto gastrointestinal tiene una profunda importancia biológica. La

flora, especialmente el componente bacteriano: a) influye en las características morfológicas y fisiológicas de la mucosa intestinal y otros órganos hospederos^{20,27}; b) determina, en parte, la suficiencia inmunológica^{1,48}; c) puede actuar como un mecanismo de defensa contra la infección y otras variedades de stress^{4,9,12,50}; d) contribuye a una mejor utilización o metabolismo de algunos nutrientes, o a su síntesis *in situ*^{13,25,52}.

(*) Trabajo presentado en el VIII Congreso Internacional de Nutrición, celebrado en Praga, de agosto 28 a setiembre 5 de 1969.

(100) Jefe de la División de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Aptdo. 1188, Ciudad Guatemala, Guatemala, C. A.

Las observaciones realizadas en pacientes hospitalizados ha permitido la evaluación de la importancia de la flora bacteriana en la naturaleza y evolución de algunos síndromes. La rela-

ción de la microflora con los procesos patológicos ha sido ilustrada para la diarrea^{8,38,41,47,51}, la malabsorción^{10,16,17}, la enfermedad de *Whipple*²² y los fenómenos autoinmunes^{5,46}.

Aunque se ha acumulado una considerable cantidad de información científica con respecto a estas relaciones, queda mucho por aprender. Las deficiencias técnicas en la metodología limitan la importancia del conocimiento disponible tocante a la naturaleza y características de los habitantes intestinales. Los estudios sobre la microflora intestinal del hombre^{19,27} y en especial su desarrollo en los niños, son pocos en número. No se han hecho estudios de la flora en los niños bajo condiciones naturales y en cuanto a su importancia para la salud. Esto es importante en los países preindustriales donde los niños son generalmente alimentados por lactancia materna durante períodos prolongados y están expuestos a un ambiente antihigiénico.

MATERIAL Y METODO

Los datos presentados aquí fueron obtenidos por medio de observaciones prospectivas a largo plazo en niños del pueblo indio de Santa María Cauqué.³² Los estudios fueron llevados a cabo sin cambiar a los sujetos de su ambiente y con el menor trastorno del ecosistema. La comunidad se encuentra en las montañas de Guatemala y tiene aproximadamente 1,300 habitantes de origen maya. Presenta características típicas de las sociedades preindustriales, tales como una alta mortalidad infantil y una alta tasa de natalidad, así como enfermedades infecciosas y desnutrición crónica ampliamente extendidas.

Los estudios de la infección intestinal por enterovirus, bacterias patógenas entéricas y parásitos intestinales, fueron

realizados en un grupo de 50 niños, cuya evolución fue seguida desde su nacimiento hasta la edad de tres años.³²

El fenómeno de la colonización bacteriana del intestino en la primera semana de vida fue estudiado en otros 50 niños adicionales. Se hicieron observaciones del desarrollo de la flora bacteriana en 12 de estos niños, siguiendo el desarrollo de su evolución durante sus primeros años de vida.

Procedimientos sobre el terreno

Todos los partos tuvieron lugar en los hogares, generalmente sobre un piso sucio, con la madre arrodillada o en cuclillas. Los partos fueron atendidos por una de dos comadronas indias del pueblo, que carecían de conocimiento sobre la asepsia y las modernas prácticas de obstetricia.

Había siempre disponible en la clínica del pueblo una enfermera profesional, que estuvo presente en el momento del parto de la mayoría de los niños del estudio. Hizo observaciones tocante al parto, y recogió el cordón umbilical, el meconio y las heces. El recién nacido fue examinado por un médico dentro de las 24 horas después del nacimiento, realizándose una secuencia de investigaciones antropométricas, dietéticas, pediátricas y microbiológicas, según aparece en el cuadro I. Con pocas excepciones, estos exámenes fueron obtenidos satisfactoriamente de acuerdo con el plan.

Cuando se observaba alguna patología en el niño, se aumentaban las visitas pediátricas para obtener una evaluación adecuada de la duración y la evolución de cada episodio. El tratamiento era proporcionado en el terreno, siempre que fuera indicado. Para la diarrea se suministraban líquidos bucales bajo estrecha vigilancia. En caso necesario se

CUADRO I

PROGRAMA DE EXAMENES REALIZADOS A LOS NIÑOS DE LA ALDEA SANTA MARIA CAUQUE, GUATEMALA

Examen	Frecuencia
A. Peso	Al nacer.
Talla	Semanalmente durante el 1er. mes.
Perimetro cefálico	Quincenal hasta el 1er. año. Mensual posteriormente.
B. Patrón de destete Cuantificación de los suplementos al pecho.	Semanalmente.
C. Evaluación clínica	Semanalmente durante el 1er. mes. Quincenal hasta el 1er. año. Mensual posteriormente.
D. Toma de muestras de heces fecales para estudio de virus, bacterias patógenas y parásitos.	semanalmente.
Toma de muestras de heces fecales para estudio de la microflora.	Semanal o quincenal.

utilizaban soluciones intravenosas. No se prescribieron antibióticos o agentes quimioterapéuticos para las diarreas. Sin embargo, se usó siempre la penicilina u otro antibiótico apropiado para la neumonía y otras graves enfermedades infecciosas, excluyendo la diarrea.

Procedimientos de laboratorio

Se les enseñó a las madres cómo recoger muestras de heces fecales en cajas de cartón de media pinta, directamente del pañal, con la ayuda de un depresor de lengua estéril. En muchas ocasiones las muestras fueron recogidas por las enfermeras u otro personal de la clínica. Las muestras fecales fueron transportadas a la clínica del pueblo y procesadas allí dentro de una hora de la evacuación. Para los estudios de la flo-

ra intestinal, el proceso fue completado dentro de 30 minutos de la evacuación.

A) Estudios de la flora fecal

Se prepararon diluciones décuples de heces en agua corriente filtrada y esterilizada tratada con carbón vegetal. Usando un asa calibrada, cantidades de 0.01 ml. de la dilución fueron mezcladas dentro de ocho clases diferentes de agar según descrito anteriormente.²² Se tuvo especial cuidado en cuanto a la inoculación del medio para los organismos anaeróbicos con objeto de terminar dentro de 10 minutos desde el momento en que se abría el recipiente de la muestra hasta que se sellaba el pote anaeróbico.

Las láminas eran incubadas en estados aeróbico, anaeróbico parcial y anaeróbico. La anerobiosis era obtenida en cámaras especiales o era producida y vigi-

lada con el sistema *Gaspak*. Los estudios previos no mostraron diferencias en las clases y las relativas proporciones de la bacteria obtenida a partir de las mismas muestras, cuando se incubaban cultivos duplicados en los dos diferentes sistemas. El número de unidades formadoras de colonias era calculado directamente a partir de la superficie de los varios medios de agar empleados y aproximados al \log_{10} más cercano. Los promedios aritméticos y las desviaciones standard fueron calculadas a partir de los recuentos de \log_{10} de bacterias y fueron expresados por gramo de heces húmedas.

B) Estudios de las bacterias enteropatógenas

Se investigó la presencia de *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatógenos y *Salmonella* por medio de la inoculación de heces en un medio de agar (SS y MacConkey) y caldos de enriquecimiento (Selenita y tetracionato con yodo y verde brillante), dentro de una hora de la evacuación.²⁸ Se aislaron presuntas bacterias patógenas y fueron identificadas por las técnicas normales.¹⁵

C) Estudios de los virus entéricos

Las suspensiones fecales fueron preparadas en una solución salina tampón de fosfato con lactalbúmina y antibióticos y fueron congelados a -60°C hasta ser procesada. Los extractos preparados en una centrifugadora refrigerada fueron inoculados en tres tipos de cultivos celulares: amnión humano primario, riñón humano primario y células HEp-2. Los aislamientos fueron pasados una vez en los mismos sistemas celulares y fueron agrupados presuntivamente como enterovirus o adenovirus por sus efectos citopáticos.²⁴

RESULTADOS

1. Nutrición y crecimiento de los niños del grupo

Por lo general, los niños nacían con un peso promedio una libra menor que los niños europeos.^{32,39} Todos los niños del grupo eran alimentados por lactancia natural por una nodriza inmediatamente después del nacimiento, como era costumbre en el pueblo. Tan pronto como la madre tenía leche, comenzaba a amamantar a su hijo. Durante varios meses ésta era la única fuente de alimento proporcionado. La ab lactación comenzaba a la edad de tres meses o más tarde con administración periódica de pequeñas cantidades de líquidos, y mucho después se le administraba atoles y sólidos (Cuadro II). Por lo general, los suplementos alimenticios eran escasos y de poco valor nutritivo durante el primer año de vida o aún después, según indicado en el Cuadro III. En adición a la deficiencia en el suplemento alimenticio estaban las inadecuadas condiciones sanitarias bajo las cuales se administraban los alimentos.

Durante el curso del destete, los niños estaban expuestos a una alta dosis de agentes infecciosos y frecuentemente contraían enfermedades clínicas.³³

El crecimiento de los niños bajo estas condiciones se apartaba de las normas esperadas desde una temprana edad (Fig. 1), dando como resultado una deficiencia observable a menudo durante el primer año de vida y que no era fácilmente recuperable aun después de establecerse mejores dietas y una inmunización natural.

2. Bacterias en el meconio y en las heces en la primera semana de vida

Se trató de recoger meconio y heces de cada uno de los recién nacidos a in-

CUADRO II

PATRONES ALIMENTARIOS DE 12 NIÑOS DURANTE EL PRIMER AÑO
DE VIDA EN SANTA MARIA CAUQUE, GUATEMALA

Alimento	Edad en meses									
	1 a 4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Leche materna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Azúcar	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tortilla ⁽⁹⁾ y pan	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Caldos (frijoles, carne)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Vegetales	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Frutas	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Arroz y pastas	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

+ = Consumido.
- = No consumido.

⁽⁹⁾ La tortilla es una torta plana de maíz cocinado, previamente tratado con limón.

CUADRO III

VALOR NUTRITIVO DE LOS SUPLEMENTOS DIETETICOS, EN FORMA DE
PORCENTAJE DE REQUERIMIENTOS RECOMENDADOS
SANTA MARIA CAUQUE, GUATEMALA
1964-1968

Período	Número de Niño:	Calorías	Proteínas ⁽⁹⁾	Vitamina A
12no. mes	31, lactados a pecho	20	25	7
24vo. mes	24, a pecho	44	57	19
	7, destetados	53	74	30
36to. mes	10, a pecho	63	82	25
	21, destetados	109	92	42

⁽⁹⁾ Sin corregir de acuerdo a valor biológico.

tervalos frecuentes. El Cuadro IV presenta los resultados de los cultivos de acuerdo con la edad del niño. Se hallaron bacterias en más de la mitad de los especímenes recogidos dentro de las 11 horas de su nacimiento, pero en concentraciones no en exceso de 10^7 por gramo de heces húmedas. Las bacterias estaban presentes en todas las muestras recogidas desde las 12 a las 23 horas después del nacimiento. Además, las concentraciones tendían a ser mayores,

llegando ocasionalmente a 10^{11} por gramo. De ahí en adelante, todas las muestras contenían bacterias en altas concentraciones.

En el primer día de vida, se halló más a menudo abundancia de bacterias aeróbicas que anaeróbicas. Sin embargo, en los ods días siguientes, los anaerobios eran tan numerosos a aun más numerosos que los aerobios (Cuadro IV). Las bacterias aeróbicas que se aislaban

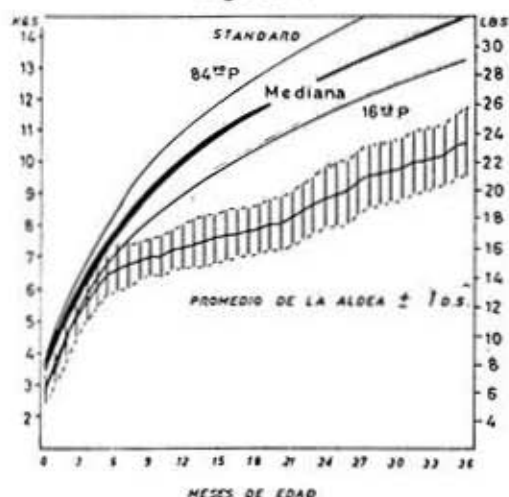
CUADRO IV

BACTERIAS EN EL MECONIO Y HECES FECALES DE NIÑOS MENORES DE 8 DIAS DE NACIDOS
SANTA MARIA CAUQUE, GUATEMALA

Grupo Bacteriano	HORAS DE VIDA				DIA DE VIDA			
	11	12-23	24-35	36-47	3er.	4to.	5to.	6to.-8vo.
Total aeróbicos	9 16 ^(*) (4-7)	6 6 (5-11)	11 11 (5-11)	6 6 (9-10)	14 14 (8-11)	15 15 (8-11)	10 10 (7-11)	12 12 (7-11)
Total anaeróbicos	5 16 (4-6)	6 6 (6-10)	11 11 (8-11)	6 6 (9-11)	14 14 (10-11)	15 15 (11)	10 10 (10-12)	12 12 (11)
Bifidobacterias	0 16	1 6 (9)	4 11 (8-10)	5 6 (9-11)	12 14 (9-11)	11 15 (11)	8 10 (10-12)	11 12 (11-12)
Clostridia	1 16 (4)	3 6 (6-10)	6 11 (8-11)	5 6 (9-11)	10-14 (7-10)	5 15 (8-10)	3 10 (6-10)	3 12 (9-10)
Streptococi	4 16 (6)	5 6 (6-10)	(10-11) (9-11)	5 6 (9-10)	12-14 (8-11)	12 15 (9-11)	(7-10) (9-11)	8 12 (8-11)
Bacteroides	0 16	0 6	2 11 (7-8)	3 6 (10-11)	6 14 (9-11)	2 15 (10-11)	2 10 (9-10)	0 12
Veillonellae	6 16	0 6	2-11 (8-9)	1 6 (9)	3 14 (10)	6 15 (8-11)	3 10 (9-10)	3 12 (8-11)

(*) Número de muestras con bacterias en total cultivado. Las cifras en paréntesis indican las oscilaciones del \log_{10} de la concentración de bacterias por gramo de heces frescas.

Figura 1



generalmente eran enterococos, micrococos y bacilos gramnegativos. Los estreptococos microaerófilos aparecían primero que cualquier otro grupo, aumentando en frecuencia y en concentración al segundo día de vida.

Los componentes anaeróbicos tendían a ser irregulares en el primer día de vida. Por ejemplo, la bifidobacteria no se hallaba durante este período y comenzaba a aparecer al segundo día. Sin embargo, al tercer día de vida estas bacterias se hallaban presentes en todos los cultivos como organismos predominantes con recuentos promedio de 10^{11} por gramo de heces húmedas. Las Clostridia aparecían un poco antes que las bifidobacterias. Se hallaron en alta concentración en casi todos los especímenes recogidos en el segundo y tercer día de vida, aunque su frecuencia disminuía agudamente después. Las bacteroides y las veillonelas eran las menos corrientes de todas las bacterias anaeróbicas, pero cuando eran halladas sus concentraciones podían llegar hasta 10^{11} por gramo (Cuadro IV).

3. Estabilización y desarrollo de la microflora fecal

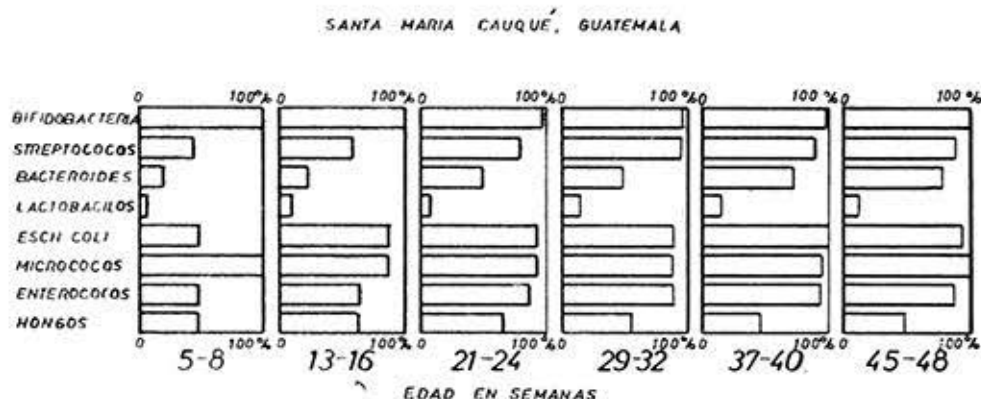
Según indicado anteriormente, al final de la primera semana de vida las bacterias predominantes eran las bifidobacterias, que estaban presentes en concentraciones promedio de 10^{11} por gramo. Los estreptococos eran los que seguían en frecuencia y también eran muy numerosos, aunque menos que las bifidobacterias. La frecuencia de aislamiento y recuentos cuantitativos de otros grupos bacterianos era errática.

Los aerobios u organismos facultativos (enterococos, micrococos, bacilos gramnegativos y levaduras) aparecían constantemente en las heces, pero sus números eran considerablemente menores.

Después de la estabilización inicial de la flora, que se producía al final de la primera semana de vida, se observaba que la evolución de la flora era muy ligera y difícil de descubrir y consistía en (a) una adquisición progresiva de algunas bacterias como una función del tiempo y (b) un cambio en la concentración relativa de los principales grupos bacterianos.

La Figura 2 presenta la frecuencia con la cual fueron descubiertos los varios grupos de bacterias investigadas en el grupo de niños durante el primer año de vida, a una concentración de lo menos 10^5 por gramo. Los datos corresponden a los períodos de buena salud solamente. De las anaerobias, las bifidobacterias fueron halladas en casi el 100 por ciento de los cultivos. Los estreptococos estaban presentes en menos de la mitad de los cultivos recogidos en los primeros cuatro meses de vida, en una concentración de 10^5 por gramo o más. La frecuencia del aislamiento aumentaba con la edad, y a los seis meses se hallaba en las tres cuartas partes de los cultivos y en más del 90 por ciento al final del primer año de vida (Figura 2). Las

Figura 2
Frecuencia de Microorganismos Fecales por edad en 12 niños
desde el nacimiento hasta 11 meses de edad



bacteroides estaban presentes sólo en el 25 por ciento de los cultivos durante los primeros cuatro meses de vida, aumentando al 50 por ciento a los seis meses y al 75 por ciento al final del primer año.

En la Figura 3 se demuestra la evolución de la flora anaeróbica, la cual muestra la concentración promedio, \pm una desviación standard. Solamente fueron empleados en las tabulaciones cultivos que rindieron 10^5 bacterias por gramo de heces húmedas o más y correspondientes a los periodos libres de enfermedades. Puede observarse que el componente anaeróbico, principalmente bifidobacterias, es 3 logaritmos más abundante que el aeróbico en los dos primeros meses de vida; más tarde, la diferencia es de sólo 1 ó 2 logaritmos. Se hallaron anaerobios sistemáticamente en cantidades altas y constantes a través del primer año de vida. Solamente en el primer mes de vida los anaerobios eran variables en título, y esto era un reflejo de la variabilidad de la flora en la primera semana de vida, según explicado anteriormente.

Por el contrario, el componente aeróbico mostraba un cambio progresivo ha-

cia cantidades mayores, especialmente durante los periodos de las edades entre 9 a 12 y 17 a 23 semanas. Este componente estaba formado casi exclusivamente de enterobacteriáceas, de las cuales el grupo más abundante era el formado por las *Escherichia coli*. Según puede verse en la Figura 3, las *Escherichia coli* aumentaban progresivamente hasta llegar a una concentración de más de 10^9 por gramo de heces húmedas. Otros bacilos facultativos gramnegativos, tales como el *Providencia* y el *Klebsiella-Aerobacter* se hallaban también en altos títulos. Los *Proteus* eran raros y los *Pseudomonas* estaban invariablemente ausentes.

La preponderancia de la flora anaeróbica y su cambio progresivo es comparado con los datos obtenidos en este laboratorio para los niños destetados y los adultos²⁷ (Cuadro V). Casi el 100 por ciento de todas las bacterias cultivables en el primer año de vida eran bifidobacterias. En los destetados sanos y en los adultos, los aerobios aumentaron en número y constituyeron ocasionalmente hasta el 10 por ciento de la flora, pero nunca superaron dicha cifra. También

CUADRO V

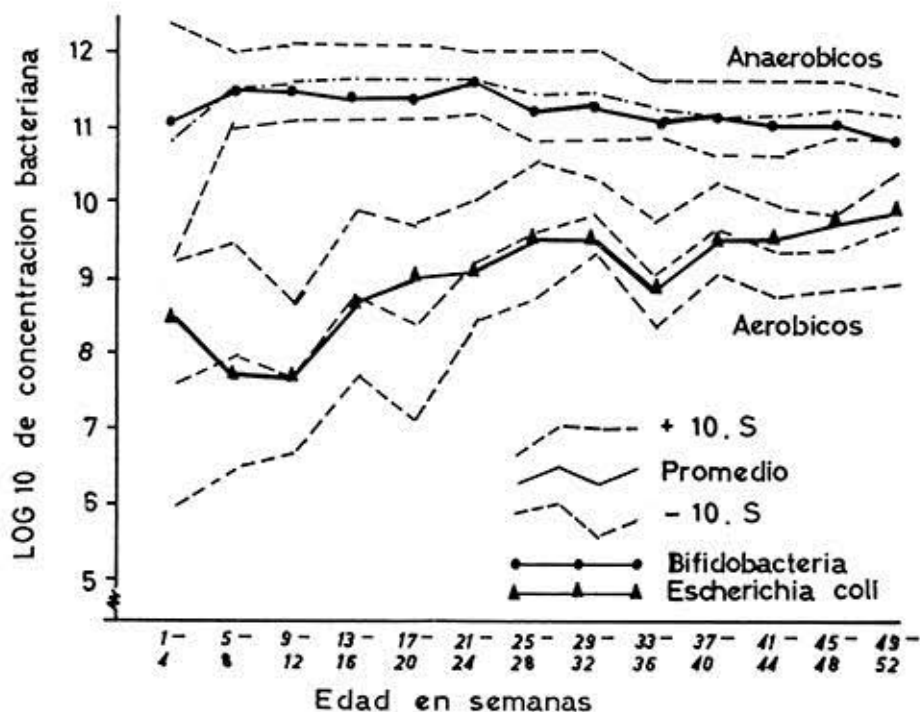
FLORA BACTERIANA FECAL EN NIÑOS LACTADOS A PECHO Y ADULTOS
SANTA MARIA CAUQUE, GUATEMALA

Grupo Bacteriano	12 NIÑOS LACTADOS A PECHO			12 deslactados 2-3 años de edad	12 adultos 13-37 años de edad
	Edad en semanas				
	5-8	13-16	21-24	45-48	
Bifidobacterias	11.1 ^(*) (31 31) ^(**)	11.4 (24 24)	11.6 (22 23)	11.0 (13 13)	10.6 (12 12)
Bacteroides	9.6 (6 31)	10.3 (6 24)	10.2 (11 23)	9.9 (10 13)	9.2 (10 12)
Total anaerobios	11.5	11.6	11.6	11.2	11.0
Total aerobios	8.0	8.8	9.2	9.3	9.0
Relacion anaerobios aerobios	3160 1	6.30 1	250 1	79 1	100 1
% de anaerobios en total	> 99.9	> 99.8	99.7	98.8	99

(*) Tomado de Mata y col.⁽¹⁷⁾

(**) Promedio log₁₀ de conteo bacteriano por gramo de heces húmedas.

Figura 3
Evolución de la flora fecal en niños durante el primer año de vida. Santa Maria Cauque, Guatemala



se produjo un desplazamiento en la calidad de la flora durante el período de destete, consistente de una disminución por un logaritmo en la concentración de los anaerobios y una proliferación de las bacteroides, las cuales, en el adulto, se encontraban eventualmente con más frecuencia y sobrepasaban las bifidobacterias.

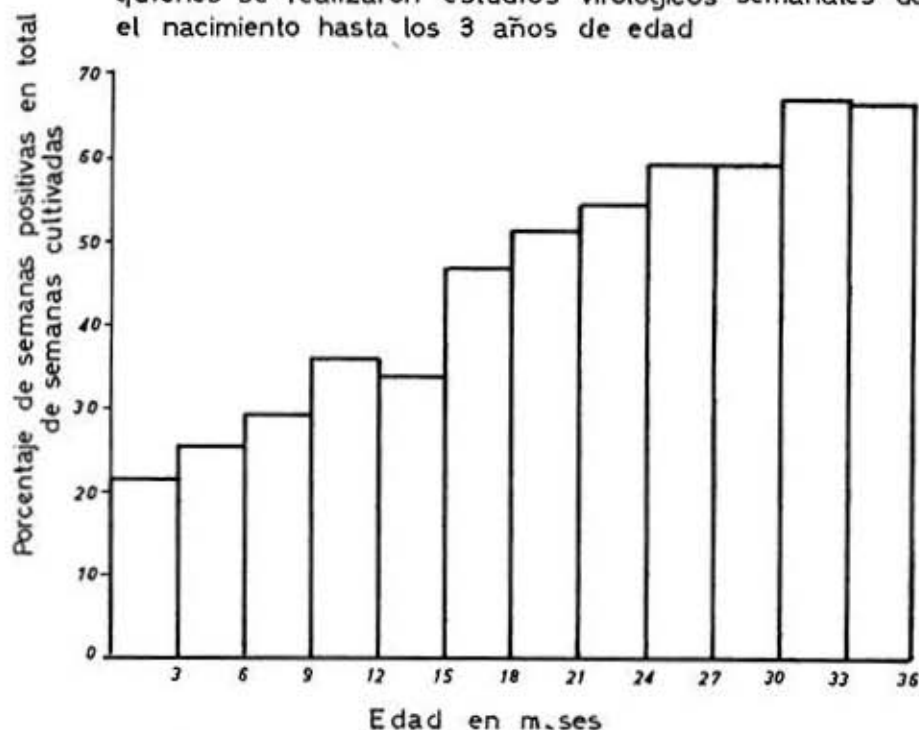
Los otros grupos de anaerobios eran menos prominentes porque no estaban siempre presentes en concentraciones de 10^5 o mayores. Las Clostridias eran halladas raras veces en los niños mayores de un mes, y no eran corrientes en los adultos.

4. Infecciones por bacterias patogénicas

Se halló que la *Shigella*, los *Esch. coli* enteropatogénicos y la *Salmonella* invadían el tracto gastrointestinal y se establecían allí con relativa frecuencia. Se descubrió la *Shigella* en cuatro de una serie de 109 recién nacidos estudiados en el período neonatal.³⁴ La Figura 4 ilustra la infección progresiva por la *Shigella* según evaluado por los cultivos fecales semanales en un grupo de niños. Las shigelosis continuaban siendo bajas hasta la edad de nueve meses, comenzando una grave infección al final del primer año de vida. La infección era ma-

Figura 4

Excreción de enterovirus en heces fecales en 10 niños a quienes se realizaron estudios virológicos semanales desde el nacimiento hasta los 3 años de edad



yor durante el período de destete (segundo y tercer años de edad) Cuadro VI.

Una situación semejante fue observada tocante a los *Esch. coli* enteropatógenos y la *Salmonella*, exceptuando que estos dos grupos de organismos eran menos corrientes y eran responsables sólo de las dos quintas partes de todas las infecciones, mientras la *Shigella* era responsable del resto (Cuadro VI).

5. Infecciones por enterovirus

Aproximadamente una quinta parte de todos los niños estudiados tenían excreciones fecales de enterovirus durante

los primeros días de vida. La excreción viral aumentaba en función de la edad, según se muestra en la Figura 4, para diez niños representativos del grupo (resultados combinados de los cultivos fecales semanales). Hubo una diferencia en el patrón de excreción viral en comparación con la de la *Shigella*. Para ésta, el intestino mostraba una notable resistencia en el primer año de vida, especialmente durante los nueve primeros meses. Por el contrario, el intestino parecía soportar fácilmente la respuesta viral durante el primer año, aunque al igual que con la *Shigella*, la frecuencia de la infección era mayor en el segundo y tercer años de vida.

CUADRO VI

INCIDENCIA DE SHIGELLA, ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENO
Y SALMONELLA EN NIÑOS SEGUIDOS DESDE EL NACIMIENTO
HASTA LA EDAD DE 3 AÑOS

SANTA MARIA CAUQUE, GUATEMALA (*)

Edad (Semanas)	Número de Niños	Shigella	ECP	Salmonella
0- 25	81	4 (0.2) (**)	6 (0.3)	4 (0.2)
26- 51	65	12 (9.3)	9 (0.6)	3 (0.5)
52- 77	52	25 (2.1)	7 (0.6)	4 (0.3)
78-103	42	40 (4.2)	11 (1.2)	3 (0.9)
104-129	26	24 (4.3)	5 (0.9)	11 (1.9)
130-155	12	20 (2.5)	1 (0.4)	4 (1.2)
Total:		125	39	39

(*) Según Mata y col.⁽²³⁾

(**) Número de aislamientos y, entre paréntesis, relación por 100 personas/semana.

6. La flora bacteriana durante la diarrea

Por lo menos hay dos factores que necesitan ser considerados a este respecto. Primero, qué clase de patógenos son hallados en asociación con la diarrea. El segundo se refiere a las posibles alteraciones cuantitativas de la flora bacteriana durante el episodio patológico.

a) Patógenos entéricos

El Cuadro VII muestra la relación de la infección por *Shigella* con la diarrea. El criterio para la asociación consistió en el aislamiento de un nuevo serotipo siete días antes o después del inicio de la diarrea, lo cual aunque arbitrario, está basado en observaciones clínicas y de laboratorio sobre el terreno sobre la shigellosis.

A partir del Cuadro VII es evidente que la totalidad de las diarreas en el primer año de vida no podían estar relacionadas con la *Shigella*, mientras que

en el segundo y tercer año la asociación era evidente. En efecto, la mayoría de las shigellosis neonatales eran asintomáticas, al igual que las halladas en las restantes partes del primer año de vida. Igualmente, la mayoría de las diarreas en el primer año de vida eran de etiología desconocida. En el segundo año de vida, un número mayor de episodios diarreicos estaban asociados con la *Shigella* y aproximadamente la mitad de los observados en el tercer año de vida estaban asociados con estos organismos invasores de los tejidos. Este hallazgo es compatible con la conducta clínica del síndrome en esta población. Las diarreas son ligeras y de corta duración en el primer año de vida, mientras que las disenterías aparecen más tarde, conforme va creciendo el niño, y a menudo se hacen crónicas con recurrencias.^{7,20,29}

Durante la shigellosis aguda, los bacilos *Shigella* son excretados en cantidades que llegan a 10⁸ por gramo.⁷ La excreción de los bacilos disminuye cuando desaparecen los síntomas. Los portado-

Estos datos fueron también tabulados para todos los episodios de enfermedad, para todas las edades de la boca, para todas las enfermedades respiratorias y para todos los ca-

Los cultivos cuantitativos realizados en el primer año de vida. No hubo diferencias notables en los recuentos totales de las bacterias anaeróbicas y aeróbicas en las muestras de diarrea cuando se compararon con las muestras recogidas durante los periodos de salud, captuando una ligera disminución en los anaerobios observada un día antes del comienzo de la diarrea. Para investigar si este ligero cambio había sido ocasionado por causas especiales, sólo se tabularon las diarreas graves (Cuadro VIII). Se observaron entonces notables diferencias, consistentes en una disminución del número de anaerobios y un aumento de las bacterias facultativas gramnegativas, en ocasiones con conteo hasta de 10^{11} por gramo de heces humanas. Debe observarse que en algunos casos, los recuentos de bifidobacterias fueron inferiores a 10^7 por gramo.

Se investigaron las posibles alteraciones de la flora durante la diarrea y otras enfermedades por medio del análisis de

b. La flora indígena

Frente a otros patógenos, los enterovirus deben ser considerados con la reserva de que ellos no forman verdaderamente parte de la flora. Su alta incidencia en los niños de las áreas preindustriales, y la frecuencia con la cual persisten durante periodos prolongados, les concede un cierto status de "componentes indígenas". En los niños de este grupo, se hallaron más frecuentemente los enterovirus (especialmente el virus de Coxsackie) durante los episodios diarreicos que durante los periodos de salud.²²

Los cultivos cuantitativos realizados en el primer año de vida. No hubo diferencias notables en los recuentos totales de las bacterias anaeróbicas y aeróbicas en las muestras de diarrea cuando se compararon con las muestras recogidas durante los periodos de salud, captuando una ligera disminución en los anaerobios observada un día antes del comienzo de la diarrea. Para investigar si este ligero cambio había sido ocasionado por causas especiales, sólo se tabularon las diarreas graves (Cuadro VIII). Se observaron entonces notables diferencias, consistentes en una disminución del número de anaerobios y un aumento de las bacterias facultativas gramnegativas, en ocasiones con conteo hasta de 10^{11} por gramo de heces humanas. Debe observarse que en algunos casos, los recuentos de bifidobacterias fueron inferiores a 10^7 por gramo.

(*) Según Mata y col.⁽²²⁾

Edad (semanas)	Número de niños	D i a r r e a		Por ciento de diarrea asociada con Shigella
		Con Shigella	Sin Shigella	
0-25	81	1 (0.06) (*)	86 (1.8)	1.2
26-51	65	11 (0.7)	109 (7.1)	9.2
52-77	52	20 (1.7)	85 (7.1)	19.0
78-103	42	32 (3.4)	50 (5.3)	39.0
104-129	26	15 (2.7)	21 (3.8)	41.6
130-155	12	10 (4.0)	8 (3.2)	55.5

INCIDENCIA DE DIARREA ASOCIADA Y NO ASOCIADA CON SHIGELLA EN NIÑOS SEGUIDOS DESDE EL NACIMIENTO HASTA LOS 3 AÑOS
SANTA MARIA CAJQUE, GUATEMALA^(*)

CUADRO VII

CUADRO VIII

FLORA FECAL EN NIÑOS DE 1 A 2 AÑOS CON DIARREA SEVERA SANTA MARIA CAUQUE, GUATEMALA

Grupo bacteriano	10 niños sanos	10 niños diarreicos ^(*)
Total Anaerobios	11.5 ^(**) (10-12)	8.3 (8-10) ^(***)
Bifidobacterias	11.2 (10-12)	(8-10) ^(****)
Total Aerobios	9.2 (6-9)	9.7 (8-11)
Enterobacterias	9.2 (6-11)	9.4 (8-11)

^(*) Las muestras fueron recogidas 1-3 días después del inicio de la diarrea.

^(**) Promedio (\log_{10}) del conteo bacteriano y rango en paréntesis.

^(***) Un niño tiene menos de 10^8 anaerobios por gramo.

^(****) Cinco niños tenían menos de 10^8 bifidobacterias por gramo.

sos de sarampión, tos ferina y varicela. No se descubrieron diferencias en las clases y proporciones relativas de la flora en las heces durante estas enfermedades en comparación con las muestras recogidas durante los períodos de salud.

7. Las bacterias intestinales en los niños malnutridos

Los estudios realizados en niños sufriendo de kwashiorkor y de diarrea, no revelaron diferencias en la incidencia de bacterias patogénicas entéricas fecales, cuando fueron comparados con niños con diarrea pero sin kwashiorkor.² Sin embargo, en los niños malnutridos hospitalizados se observaron diferencias en la calidad de la flora, consistentes en una alta incidencia de shigelliasis crónica, y en menores concentraciones de bacterias anaeróbicas y coliformes.⁷

Los niños guatemaltecos hospitalizados fueron intubados en la Unidad Metabólica del INCAP y fueron investigadas las clases y la concentración de bacterias a distintos niveles del tracto gastrointestinal. Hasta ahora han sido estudiados dos niños con kwashiorkor y 20 recuperados de esa enfermedad.³⁵ En los dos casos de kwashiorkor, la concentración de bacterias en el estómago y en el duodeno era insignificante. No se pudieron recoger muestras procedentes del yeyuno. La flora fecal de los niños era anormal en el sentido de que el número de anaerobios era menor que el de organismos aeróbicos.

En los 20 niños restablecidos del kwashiorkor, se halló una importante exuberancia bacteriana en el yeyuno de algunos de ellos. Las bacterias cultivadas incluían estreptococos, *Esch. coli* y anaerobios como bacteroides.

DISCUSION

Este estudio resume la investigación conducida en el INCAP sobre la naturaleza y el desarrollo de la flora intestinal indígena de niños indios guatemaltecos alimentados con leche materna, en buen estado de salud y enfermos. La mayoría de los estudios fueron hechos en niños de un pueblo indio, los que fueron estudiados en su ecosistema, con el menor trastorno para la familia y la vida y las tradiciones de la comunidad.

La implantación y el desarrollo de las bifidobacterias, se asemejan a los informados en otros países para niños que vivían en un ambiente con mejor higiene.^{3,20,43} Se puede suponer que la naturaleza de la colonización microbiana del tracto intestinal de los niños alimentados con leche materna es universal.

En este estudio, se indica que las madres indias no están preparadas especialmente para el parto por las comadronas del pueblo. Las observaciones directas indican que la defecación de la madre durante el parto es la regla, y que el niño está expuesto a una gran contaminación fecal. Por lo tanto, no hay duda que el origen principal de la contaminación del niño es el ambiente biológico, principalmente la madre. El contacto con las manos de la madre, la comadrona, la nodriza y otros acompañantes, indudablemente son factores contribuyentes. Las bebidas y alimentos suministrados al niño en pequeñas cantidades, bajo condiciones antihigiénicas, son otros factores importantes. Hasta la mama desempeña un papel, ya que la leche de las mujeres indias tenía bacterias en cantidad importante; igualmente, casi una tercera parte de todas las muestras de leche examinadas contenían enterobacteriáceas.⁵³

Esta abrumadora contaminación del niño con bacterias fecales en los primeros días de vida, se refleja en la pro-

funda variación en calidad y cantidad de los varios grupos bacterianos cultivados, mostrados por los niños individualmente durante este período. Sin embargo, poco después la flora se estabiliza con las bifidobacterias como el componente bacterico predominante y casi absoluto. Como los niños son alimentados exclusivamente con leche materna durante los primeros meses de vida, cuando se desarrollan las bifidobacterias y se hacen notablemente estables, parece justificado suponer que ambos están íntimamente relacionados.

La infección con patógenos entéricos en la temprana edad no es rara, según evidenciado por la demostración de shigellosis neonatal⁵⁴ y la excreción de virus entéricos⁵² y protozoos intestinales⁵⁵ durante la primera semana de vida. Sin embargo, la mayoría de las infecciones en la edad temprana no van acompañadas por manifestaciones clínicas. La situación, en el caso de los enterovirus, es debida probablemente a la sólida inmunidad pasiva con la cual nacen estos niños.⁵⁶ En el caso de las bacterias patogénicas entéricas gramnegativas, la producción de las inmunoglobulinas por la mucosa intestinal puede ser un factor importante en la resistencia, pero no pudiera explicar la susceptibilidad a la infección y a la enfermedad mostrada por niños alimentados artificialmente. Frecuentemente se hallan sustancias antibacterianas en el calostro y la leche materna de las mujeres de esta comunidad,⁵⁴ un factor que puede tener una función en la resistencia intestinal.

Sin embargo, la evidencia disponible parece indicar que los organismos gramnegativos, no esporulados, anaeróbicos y productores de ácidos son los verdaderos contribuyentes a la alta resistencia del tracto gastrointestinal de los niños alimentados con leche materna a la infección y a las enfermedades infecciosas.

por bacterias entéricas. La flora intestinal de los niños evoluciona durante el destete, un proceso que en los pueblos guatemaltecos comienza alrededor del período de la desintegración de la inmunidad materna, o sea de los 3 a los 6 meses de edad, y termina al segundo o tercer años de vida. Los cambios observados en la composición de la flora eran muy ligeros y consistían principalmente en proliferación progresiva del componente aeróbico y la adquisición de bacteroides. Los estudios realizados en adultos normales,²² indicaron que las "bacteroides" (*Bacteroides*, *Sphaerophorus*, *Fusobacterium*) eran los componentes predominantes y más abundantes de la flora, según reconocido en otras áreas.^{14,18,24,25}

Durante la transición de la microflora indígena, muchos microorganismos patógenos invaden el tracto intestinal y pueden establecerse en él, causando manifestaciones clínicas ocasionales. Entre éstas, hay algunos protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*), enterobacteriáceas (*Shigella*, *Esch. coli* enteropatógenicos, *Salmonella*) y otros. Estos agentes se hallan a menudo en individuos en buen estado de salud. Su incidencia es baja en los países que han alcanzado un buen nivel de higiene y nutrición. Las comunidades como la del presente estudio, característica del mundo preindustrial, presenta una situación diferente. Factores tales como una higiene personal deficiente, un bajo ambiente de saneamiento y un estado nutricional inadecuado contribuyen a mantener altas tasas de infección, hasta el grado que el estado "normal" del niño en edad preescolar es estar infectado con uno o más patógenos en todo momento. Sin embargo, estos agentes aparecen como especies indígenas, pero como están asociadas significativamente con la enfermedad diarreica y otros procesos pato-

lógicos, no pueden ser consideradas como tales; pudieran ser consideradas como "indeseables".

Adicionalmente, en el pueblo indio la evolución de la flora se produce durante el período en el cual el estado nutricional se deteriora como una consecuencia de la deficiente suplementación a la alimentación con leche materna y las frecuentes infecciones. Esta última es agravada naturalmente por la pérdida de la inmunidad materna. Durante el peligroso período del destete, el niño frecuentemente desarrolla diarrea. El fenómeno es igual ya sea en la India, Gambia, o Guatemala; la edad a la cual son más afectados los niños es determinada por la época del destete, que varía de acuerdo con las tradiciones y costumbres de cada región. El síndrome es conocido como "diarrea del destete", y ha sido bien caracterizada.¹⁹

Los cambios en la flora intestinal fueron descubiertos durante el curso de una grave enfermedad diarreica. Esto fue así en cuanto a otras enfermedades infecciosas, tales como enfermedades respiratorias, enfermedades de la boca, tos ferina, sarampión y otras. Se hallaron importantes asociaciones entre algunas bacterias patógenas entéricas y los enterovirus y el síndrome diarreico.

Sin embargo, una proporción considerable de las diarreas permanecen clasificadas como "no específicas" debido a no haberse podido identificar un agente etiológico. A este respecto, la hipótesis de que unas dietas insuficientes durante un largo período de tiempo pudieran favorecer la colonización bacteriana en lugares no muy poblados normalmente, merece ser considerada.

Se demostró la proliferación bacteriana en el yeyuno de pacientes con el síndrome del asa ciega, diarrea y malabsorción.¹⁶ Se observó una mejoría de la situación después de un tratamiento con

drogas antimicrobianas. Se hicieron observaciones semejantes para el esprue.¹⁷ El efecto de las bacterias en las áreas no colonizadas normalmente se atribuye a la hidrólisis de los conjugados de ácidos biliares y a la acción sobre los nutrientes antes de ser absorbidos. Los ácidos biliares libres pudieran causar irritación de las células mucosas; igualmente, si los ácidos son desconjugados, no se produce adecuadamente la formación de las micelas, una situación necesaria para una absorción de los lípidos.^{13,14}

Olarte¹¹ mostró que los niños mexicanos que morían de gastroenteritis aguda de etiología desconocida tenían por lo menos 10^7 bacterias facultativas (él no investigó las anaerobias), por gramo de tejido yeyunal, una cifra en exceso de los niveles habituales hallados en las personas no afectadas por diarrea.¹⁰ Estas observaciones fortalecen el informe anterior hecho por Dammin⁵ en niños guatemaltecos examinados *posmortem*. Dammin describió mayores concentraciones de bacterias en el intestino delgado de los niños con diarrea aguda y malnutrición, que en los niños malnutridos sin diarrea.

Los estudios preliminares realizados en el INCAP en niños que habían sufrido de una malnutrición aguda, muestra-

ron una considerable proliferación bacteriana en el yeyuno y una alteración en la flora fecal en algunos niños.^{5,17} Estas observaciones están siendo ampliadas actualmente para determinar si la malabsorción está presente en niños malnutridos con una flora bacteriana anormal.

Es necesario tener un mayor conocimiento sobre las interacciones entre la flora intestinal por una parte y la dieta y los factores ambientales por la otra, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales. La razón es que estos factores están esencialmente relacionados con la incidencia de la enfermedad diarreica y el deterioro del estado nutricional.

La alimentación con leche materna tiene una importante influencia en la postergación del efecto negativo combinado del ambiente biológico y los deficientes suplementos alimenticios, a una edad menos crítica. El fenómeno de la colonización por los microorganismos indígenas y de la infección con agentes indeseables, está relacionado con las prácticas de la alimentación y la calidad del ambiente. Esta información apoya la necesidad de considerar la nutrición junto con la higiene en el contexto de la salud pública de una determinada población, todo en relación con las características ecológicas de la región.

SUMMARY

Mata, L. J. *Development of intestinal flora in healthy and sick infants*. Rev. Cub. Pediat. 43: 2, 1971.

Studies in village children followed from birth to 3 years of age, are reported. The child is contaminated after birth by protozoa, bacteria and viruses; bacteria establish more easily than others. In the first days of life, aerobes may be as abundant as anaerobes; at the end of the first week, bifidobacteria predominate, with 10^{11} colony-forming-units (CFU) per gram of wet feces. Coliforms are less prominent, from 10^5 to 10^{10} CFU per gram. During breast-feeding, (the first 3 to 6 months), bifidobacteria represent more than 99% of the culturable flora. Excretion of enteroviruses increases with age, and in the second and third years, 50 to 75% of all children may excrete enteroviruses at any time. With progressive weaning and deterioration of nutrition, *Shigella* increase; rates are highest in the third year of life. A relative or absolute decrease in anaerobes, and a proliferation of coliforms is observed at onset of severe diarrhea. Bacterial overgrowth is found in the jejunum of children with non-specific diarrhea and malnutrition.

RESUME

Mata, L. J. *Développement de la flore intestinale native chez les nourrissons sains et malades.* Rev. Cub. Ped. 43: 2, 1971.

On décrit les études réalisées chez un groupe d'enfants d'un village, dont l'évolution a été suivie dès la naissance jusqu'à l'âge de 3 ans. L'enfant est contaminé après la naissance par des protozoaires, bactéries et virus; les bactéries s'établissent plus facilement que les autres. Dans les premiers jours de vie, les aérobies peuvent être si abondants comme les anaérobies, à la fin de la première semaine prédominent les bifidobactéries, avec 10^{11} unités formatrices des colonies (UFC) par gramme des lies humides. Les coliformes sont moins prominentes, de 10^6 à 10^{10} UFC par gramme. Pendant la période d'alimentation avec lait maternelle (les premiers 3 à 6 mois), les bifidobactéries représentent plus du 99% de la flore cultivable. L'excrétion des entérovirus augmente avec l'âge, et dans le deuxième et troisième années de vie, du 50 au 75% de tous les enfants peuvent excréter entérovirus en quelconque moment. Avec le sevrage et la détérioration de la nutrition progressives, augmente la *Shigella*; les index sont plus grandes au troisième année de vie. Une diminution relative ou absolue des anaérobies et une prolifération des coliformes est observée au début d'une diarrhée grave. On trouve une surabondance bactérienne dans le jejunum des enfants avec une diarrhée non spécifique et malnutrition.

РЕЗЬМЕ

Мата Л. Развитие кишечной прироченной флоры у здоровых и больных грудных детей. Rev. Cub. Ped. 43: 2, 1971.

Описывают исследования, произведенные над группой детей, живущих в деревни, эволюция которой была наблюдаема с того момента их рождения до возраста 3 лет. Ребенок заражен после рождения простейшими, бактериями и вирусами. Бактерии фиксируются более легко, чем другие. В первых днях жизни, аэробы могут быть так обильными как анаэробы. В конце первой недели преобладают бифидобактерии, с 10^{11} единиц, образующих колонии (УФС) на грамм влажного кала. Колиформы появляются в меньших количествах, от 10^6 до 10^{10} UFC на грамм. Вовремя периода кормления с материнским молоком (первые 3-6 месяцев), бифидобактерии представляют собой более 99% культивированной флоры. Выделение энтеровирусов увеличивается с возрастом и во втором или третьем году жизни, от 50% до 75% всех детей, может выделить энтеровирусы в любом моменте. С отнятием от груди и ухудшением питания, увеличивает *Shigella*, указатели являются большими к третьему году жизни. Относительные или абсолютное снижение у анаэробов и пролиферация колиформов, наблюдаются в начале тяжелой желого поноса. Нашли бактериальную пролиферацию в толстой кишке детей страдающих неспецифическим поносом и недостаточное питание.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Bauer, H.; Horowitz, R. R.; Levenson, S. M. and Popper, H.: The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. Amer. J. Path. 42: 471, 1963.
- 2.—Beck, M. D. and Béhar, M.: Unpublished INCAP Study.
- 3.—Braun, O. H.; Dehnert, J.; Hoffman, K.; Kienitz, M.; Mayer, J. B.; Reploh, H.; Reuter, G.; Seeliger, H. P. R. and Werner, H.: Bifidus Bacteria in Man. German Medical Monthly, 10: 62, 1965.
- 4.—Bohnhoff, M.; Miller, C. P. and Martin, W. R.: Resistance of the mouse's intestinal tract of experimental *Salmonella* infection. I. Factors which interfere with the initiation by oral inoculation. J. Exp. Med. 120: 305, 1964.
- 5.—Bregman, E., and Kirshner, J. B.: Amino acids of colon and rectum. Possible involvement of diaminopimelic acid of intestinal bacteria in antigenicity for ulcerative colitis colons. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 118: 727, 1965.
- 6.—Breuer, J. H. and Allgeier, D. L.: Safe self-contained carbon Dioxide-Hydrogen anaerobic system. Applied Microb. 14: 985, 1966.

- 7.—*Dale, D. C. and Mata, L. J.*: Studies of diarrheal disease in Central America XI Intestinal bacterial flora in malnourished children with shigellosis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 17: 397, 1968.
- 8.—*Dammin, G. J.*: Pathogenesis of acute clinical diarrheal disease. *Fed. Proc.* 24: 35, 1965.
- 9.—*Dincen, P.*: The effect of alterations in intestinal flora on host resistance to systemic bacterial infection. *J. Infect. Dis.* 109: 280, 1961.
- 10.—*Donaldson, R. M.*: Normal bacterial populations of the intestine and their relation to intestinal function. *New Eng. J. Med.* 270: 938, 994, 1050, 1954.
- 11.—*Donaldson, R. M.*: Role of enteric microorganisms in malabsorption. *Fed. Proc.* 26: 1426, 1967.
- 12.—*Dubos, R. and Schaedler, R. W.*: Some biological effects of the digestive flora. *Amer. J. Med. Sci.* 244: 265, 1962.
- 13.—*Dubos, R.; Schaedler, R. W. and Costello, R.*: Composition alterations and effects of the intestinal flora. *Fed. Proc.* 22: 1322, 1963.
- 14.—*Drasar, B. S.*: Cultivation of anaerobic intestinal bacteria. *J. Path. Bact.* 94: 417, 1967.
- 15.—*Edwards, P. R. and Ewing, W. H.*: Identification of enterobacteriaceae, Burgess Publishing Co., Minn., Minn. 1962.
- 16.—*Goldstein, F.; Wirts, C. W. and Kramer, S.*: The relationship of afferent limb stasis and bacterial flora to the production of postgastroectomy steatorrhea. *Gastroenterology*, 40: 47, 1961.
- 17.—*Gorbach, S. L.*: Comunicación personal. 1969.
- 18.—*Gorbach, S. L.; Nahas, L.; Lerner, P. I. and Weinstein, L.*: Studies of intestinal microflora. I. Effects of diet, age, and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man. *Gastroenterology* 53: 845, 1967.
- 19.—*Gordon, J. E.; Chitkara, I. D. and Wyon, J. B.*: Weanling Diarrhea. *Amer. J. Med. Sci.* 245: 345, 1963.
- 20.—*Gyllenberg, H. and Roine, P.*: The value of colony counts in evaluating the abundance of "Lactobacillus" bifidus in infant feces. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 41: 144, 1957.
- 21.—*Jackson, R. L. and Kelly, H. G.*: Growth charts for use in pediatric practice. *J. Pediat.* 27: 215, 1945.
- 22.—*Kok, M.; Dybkaer, R. and Rostgaard, J.*: Bacteria in Whipple's disease. I. Results of cultivation from repeated jejunal biopsies prior to, during, and after effective antibiotic treatment. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 60: 431, 1964.
- 23.—*Kotcher, E.; Mata, L. J.; Esquivel, R. and Redmond, D. L.*: Acquisition of intestinal parasites in newborn human infants. *Fed. Proc.* 24: 442, 1965.
- 24.—*Lewis, K. H. and Retger, L. F.*: Non-sporulating anaerobic bacteria of the intestinal tract. I. Occurrence and taxonomic relationship. *J. Bacteriol.* 40: 287, 1940.
- 25.—*Levenson, S. M. and Tennant, B.*: Some metabolic and nutritional studies with germfree animals. *Fed. Proc.* 22: 109, 1963.
- 26.—*Luckey, T. D.*: Gnotobiologic evidence for functions of the microflora. *Ernährungsforschung*, 10: 192, 1965.
- 27.—*Mata, L. J.; Carrillo, C. and Villatoro, E.*: Fecal microflora in healthy persons of a preindustrial region. *Appl. Microbiol.* 17: 596, 1969.
- 28.—*Mata, L. F.; Fernández, R. and Urrutia, J. J.*: Infección del intestino por bacterias enteropatógenas en niños de una aldea de Guatemala, durante los tres primeros años de vida. *Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasit.* 11: 102, 1969.
- 29.—*Mata, L. J.*: Infección intestinal en niños de áreas rurales centroamericanas y sus posibles implicaciones nutricionales. *Arch. Latinoamer. Nutri.* 19: 192, 1969.
- 30.—*Mata, L. J.; Catalán, M. A. and Gordon, J. E.*: Studies of Diarrheal disease in Central America. IX. *Shigella* carriers among young children of a heavily seeded Guatemalan convalescent home. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 15: 632, 1966.
- 31.—*Mata, L. J. and Beteta, C. E.*: Colonización del intestino de niños lactantes por virus, bacterias y levaduras. *Guatemala* 16: 127, 1965.
- 32.—*Mata, L. J.; Urrutia, J. J. and García, B.*: Effect of infection and diet on child growth: experience in a Guatemalan village. *Nutrition and Infection*. Wolsstenholme, G. E. W. and O'Connor, M. (Eds.). London, J. & A. Churchill-Ltd., 112 (Giba Foundation, Study Group No. 31), 1967.
- 33.—*Mata, L. J.; Urrutia, J. J. and Gordon, J. E.*: Diarrhoeal disease in a cohort of Guatemalan village children observed from birth to age two years. *Trop. Geograph. Med.* 19: 247, 1967.
- 34.—*Mata, L. J.; Urrutia, J. J.; García, B.; Hernández, R. and Béhar, M.*: *Shigella* infection in breast-fed Guatemalan Indian neonates. *Amer. J. Dis. Child.* 117: 142, 1966.
- 35.—*Mata, L. J.; Viteri, F. and Schneider, R.*: Estudio INCAP. No publicado.
- 36.—*Miller, C. P.; Bonhoff, M. and Drake, B. L.*: The effect of antibiotic therapy on susceptibility to an experimental enteric infection. *Trans. Ass. Amer. Phys.* 67: 156, 1954.
- 37.—*Miyakawa, M.*: The lymphatic system of germfree quinea pigs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 78: 221, 1959.
- 38.—*More, W. E. C.*: Comunicación personal.
- 39.—*Negreros, A. and Mata, L. J.*: Estudio INCAP. No publicado.

- 40.—*Nelson, D. and Mata, L. J.*: Bacterial flora associated with the human gastrointestinal mucosa. In preparation, 1969.
- 41.—*Olarte, J.*: Current problems on the etiology of diarrheal diseases. *Eighth International Congresses on Tropical Medicine and Malaria*. p 455, Therán, Irán, 1968.
- 42.—*Schaedler, R. W., Dubos, R. and Costello, R.*: The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J. Expert. Med.* 122: 59, 1965.
- 43.—*Seeliger, H. P. R. and Werner, H.*: Recherches qualitatives et quantitatives sur la flore intestinale de l'homme, *Ann. l'Institut. Pasteur.* 105: 911, 1963.
- 44.—*Shimada, K., Bricknell, K. S. and Finegold, S. M.*: Deconjugation of bile acids by intestinal bacteria: Review of literature and additional studies. *J Infect. Dis.* 119: 273, 1969.
- 45.—*Tabaqchali, S. and Booth, C. C.*: Relationship of the intestinal bacterial flora to absorption. *Brit. Med. Bull.* 23: 285, 1967.
- 46.—*Taylor, K. B.*: Role of immune responses in the gastrointestinal tract. *Fed. Proc.* 24: 23, 1965.
- 47.—*Thomson, S.*: The role of certain varieties of *Bacterium coli* in gastroenteritis of babies. *J. Hyg. (Cambridge)*, 53: 357, 1955.
- 48.—*Thorbecke, G. J.*: Some histological and functional aspects of lymphoid tissue in germfree animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 78: 237, 1959.
- 49.—*Urrutia, J. J. and Mata, L. J.*: Aspectos Epidemiológicos, clínicos y etiológicos de la enfermedad diarreica en el niño del área rural. *Arch. Latinoamer.* 19: 173, 1967.
- 50.—*Urrutia, J. J. and Mata, L. J.*: Características del recién nacido en Santa María Cauque, Guatemala. *Guatemala Pediat.* 7: 105, 1962.
- 51.—*Weijers, H. A. and Van de Kamer, J. H.*: Causes of (diarrhea in disturbed digestion. *Nutr. et Diet.* 7: 233, 1965.
- 52.—*Wostmann, B. S.*: Nutrition of the germ-free mammal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 78: 175, 1959.
- 54.—*Wyatt, R. and Mata, L. J.*: Bacteria in calostrum and milk of Guatemalan Indian women. *J. Trop. Pedit.* En prensa.
- 51.—*Wyatt, R. and Mata, L. J.*: Estudio INCAP. No publicados.
- 55.—*Zubrzycki, L. and Spaulding, E. H.*: Studies on the stability of the normal human fecal flora. *J. Bacteriol* 83: 968, 1962.