


Revisão da investigação A segurança do leite humano e o controlo de infeções

A UCI neonatal tem de assegurar que as propriedades nutritivas e anti-infeção do leite humano são disponibilizadas ao recém-nascido de uma forma isenta de riscos. A presente revisão realça as evidências que apoiam as práticas seguras de colheita, armazenamento e manuseamento de leite humano necessárias para evitar a contaminação e os erros.



Medela: Soluções completas para amamentação e alimentação com leite humano

Há mais de 50 anos que a Medela contribui para melhorar a saúde de mães e bebês através dos benefícios, essenciais à vida, do leite materno. Ao longo de todo este tempo, a empresa dedicou-se a compreender as necessidades das mães e o comportamento dos bebês. A saúde das mães e dos bebês durante o precioso período de amamentação constitui o centro de todas as nossas atividades. A Medela continua a apoiar a investigação orientada para a exploração do leite humano e da amamentação, incorporando os resultados em soluções de amamentação inovadoras.

Com as novas descobertas sobre os componentes do leite humano, a anatomia da mama lactante e como o bebê extrai o leite da mama, a Medela desenvolveu um conjunto de soluções que apoiam e melhoram a amamentação e a alimentação com leite humano nas Unidades de Cuidados Intensivos Neonatais (UCI neonatal).

A Medela compreende os desafios colocados pela alimentação com leite humano na UCI neonatal. Existe o desafio para que a mãe possa atingir a produção de leite adequada, e, do lado do bebê, para conseguir ingerir o leite; existem ainda as questões relacionadas com a higiene e a logística para lidar com esses desafios. O portefólio da Medela está orientado para a obtenção do leite humano, a promoção da alimentação com leite humano e o apoio à amamentação de todos os bebês o mais cedo possível.

A Medela procura disponibilizar o mais recente conhecimento baseado em evidências para apoiar a amamentação e a utilização do leite humano na UCI neonatal. O objetivo dos inovadores produtos baseados na investigação conjugados com materiais educativos é ultrapassar as dificuldades associadas ao fornecimento de leite humano na UCI neonatal.



Investigação científica

A Medela procura sempre a excelência em investigação científica – uma atitude que permitiu à empresa desenvolver avançados extratores de leite e tecnologias de alimentação com leite materno. A Medela trabalha com médicos experientes e colabora com universidades, hospitais e institutos de investigação em todo o mundo.



Produtos

Ajudar as mães a extrair leite é a competência principal da Medela. Isto inclui a colheita cuidadosa e higiénica do leite materno em recipientes isentos de BPA. Soluções simples de rotulagem, armazenamento, transporte, aquecimento e descongelamento – tudo isto ajuda a manusear, com segurança, o precioso leite humano. E para que o leite humano chegue ao bebê, a Medela desenvolveu uma gama de produtos inovadores para diferentes situações de alimentação.



Educação

Na Medela existe uma forte ligação entre a investigação e a educação. A Medela estabelece ligações entre médicos e académicos que conduzem ao crescimento profissional, à partilha de conhecimentos e à interação com uma vasta comunidade científica.

Para levar as soluções disponíveis e as respetivas funcionalidades e interações ao contexto dos processos hospitalares e à tomada de decisões baseada em evidências, a Medela desenvolveu uma série de revisões de investigação. Estão disponíveis revisões para processos de UCI neonatal em que a amamentação e o leite humano têm um papel significativo. Exemplos destas são a progressão das capacidades de alimentação do bebê e a logística do leite humano.

A segurança do leite humano e o controlo de infeções

Resumo

O leite humano reduz o risco e a gravidade das morbilidades debilitantes nos bebés prematuros. Contudo, conservar a integridade e a segurança do leite extraído é um grande desafio para a UCI Neonatal. Levanta-se um conjunto de problemas complexos relacionados com a colheita, armazenamento e preparação do leite para a alimentação, devido à composição única do leite humano. Dado que o leite humano pode conter um conjunto de vírus e bactérias comensais potencialmente patogénicos, alguns dos quais constituem perigo para os bebés de alto risco, é essencial que o percurso do leite humano seja otimizado para garantir a segurança e o controlo das infeções. É crucial tomar em consideração as práticas de manuseamento baseadas em evidências, para assegurar que o leite é seguro para o bebé prematuro e conserva o formato nutritivo e protetor do leite fresco como na amamentação.

Índice

Introdução	5
Benefícios do leite humano para os bebés prematuros	6
Componentes protetores do leite humano	6
Vantagens económicas do leite humano	8
Questões de higiene e segurança durante o manuseamento e a alimentação com leite humano	9
Bactérias e agentes patogénicos	9
Infeções virais e fármacos	11
Leite de dadoras	13
Evitar a contaminação do leite humano	14
Higiene das mãos	14
Limpeza de extratores e kits de extração	15
I Kits de extração	15
I Extratores	17
Monitorização e transporte do leite	17
Armazenamento do leite na UCI neonatal	18
I Recipientes para armazenamento	19
I Armazenamento à temperatura ambiente	19
I Refrigeração	20
I Congelamento	20
Manuseamento do leite humano na UCI Neonatal	21
I Descongelamento	21
I Fortificação	22
I Aquecimento	23
Conclusão	25
Referências	26

Introdução

A amamentação é unanimemente recomendada a nível internacional como fonte única de nutrição nos primeiros seis meses de vida do bebé¹⁻³. A amamentação proporciona proteção imunológica e nutrição ideais ao bebé⁴, bem como o fortalecimento da ligação entre a mãe e o bebé imediatamente após o parto a termo⁵. Porém, após um parto prematuro, quer a mãe quer o bebé poderão sentir inicialmente dificuldades com a amamentação. As mães precisam de iniciar, estabelecer e manter uma produção adequada de leite num estágio de desenvolvimento prematuro, e os bebés prematuros têm frequentemente dificuldades na alimentação por via oral, não conseguindo mamar até uma fase posterior do internamento na UCI Neonatal (Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal). Assim, é frequentemente necessário recorrer a leite extraído das mães para alimentar os bebés prematuros.

O fornecimento de leite humano extraído a bebés prematuros é especialmente importante nos primeiros meses de vida⁶. O leite humano reduz o risco e a gravidade de morbilidades debilitantes em bebés prematuros de uma forma dependente da dose, com doses mais elevadas de leite humano conduzindo a maior proteção^{6,7}. Porém, até estar pronto a ser dado ao bebé, o leite terá passado por uma série de processos e etapas de manuseamento que podem prejudicar a qualidade do leite. Cada passo desde a extração e colheita inicial do leite ao seu armazenamento, fortificação e aquecimento pode alterar a integridade do leite humano – expor o leite a bactérias e agentes patogénicos e colocar o bebé prematuro em risco de infeção. As práticas baseadas em evidências que minimizam o risco de infeção e maximizam a qualidade do leite humano, quer em integridade quer em volume adequado, são por isso essenciais.

A presente revisão procura disponibilizar aos profissionais da UCI Neonatal um conhecimento aprofundado da investigação mais recente acerca dos benefícios do leite humano, económicos e para a saúde; o modo como as mães podem fornecer leite humano de forma higiénica aos bebés; e as questões que a UCI Neonatal enfrenta relativamente ao manuseamento seguro do leite humano. As práticas baseadas em evidências cujo objetivo é assegurar que o leite permanece num estado de integridade ideal e reduz o risco para o bebé ao mínimo são discutidas com o objetivo geral de maximizar o uso do leite humano na UCI Neonatal.

Benefícios do leite humano para os bebês prematuros

Os bebês prematuros que recebem leite humano durante a sua permanência na UCI Neonatal apresentam um risco mais reduzido de enterocolite necrosante (ECN), doença pulmonar crônica, retinopatia da prematuridade, sepsia, infecção nosocomial, distúrbios cognitivos e neurológicos, síndrome de morte súbita infantil e reinternamento após alta da UCI Neonatal⁹⁻¹⁷. Os benefícios do leite humano são tais que todos os bebês na UCI Neonatal deveriam recebê-lo².

O impacto positivo do leite humano parece estar ligado à exposição precisa no período inicial pós-parto, durante o qual a utilização exclusiva do leite humano e a evitação do leite de substituição são quase vitais⁶. Isto é particularmente importante nos bebês prematuros e hospitalizados². Os bebês prematuros nascem com sistemas anatómicos e fisiológicos imaturos, que dependem de uma nutrição ideal para o normal crescimento e desenvolvimento. Os sistemas gastrintestinal, respiratório, neurológico e imunitário subdesenvolvidos resultam na suscetibilidade aos efeitos prejudiciais das infecções e dos processos inflamatórios observados nas UCI Neonatais. O leite humano pode mitigar ou reduzir significativamente estas vulnerabilidades nos bebês prematuros, contribuindo assim para o controle das infecções^{9, 14, 16-23}.

Componentes protetores do leite humano

O leite humano fornece os componentes necessários para o crescimento e desenvolvimento ideais do bebê de termo saudável. Estes incluem macronutrientes essenciais (gorduras, hidratos de carbono e proteínas); micronutrientes (vitaminas e minerais); e fatores de desenvolvimento (ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, fatores de crescimento e citoquinas). O leite humano também proporciona proteção contra infecções por via dos seus componentes anti-infecciosos e imunológicos^{24, 25} (Quadro 1).

Os macrófagos multifuncionais e os ácidos gordos livres no leite humano, bem como proteínas como a sIgA, a lactoferrina e a lisozima, atuam como agentes anti-infecciosos que são especialmente importantes para o bebê prematuro²⁴. Estes agentes trabalham em conjunto para inativar, destruir ou capturar micróbios específicos, evitando assim que se alojem nas superfícies mucosas²⁵. Outros componentes, como as células maternas, que incluem leucócitos vivos derivados do sangue, células vivas do epitélio mamário, células estaminais e fragmentos de células, proporcionam proteção imunitária ao bebê^{26, 27}. Os oligossacáridos do leite humano também têm uma importante função imunológica, atuando como probióticos que promovem a proliferação intestinal de bactérias comensais²⁸. Também atuam como engodos ou análogos dos recetores para inibir a ligação de agentes patogénicos – incluindo rotavírus – à superfície do intestino²⁹⁻³². O leite humano contém, simultaneamente, bactérias comensais protetoras que integram a microflora intestinal e influenciam os processos inflamatórios e imunomoduladores. As bactérias comensais não só evitam a proliferação excessiva das bactérias patogénicas, como também acidificam o intestino, fermentam a lactose e decompõem os lípidos e as proteínas³³⁻³⁵.

O leite de uma mãe que dá à luz um bebê prematuro é diferente do leite de uma mãe que dá à luz um bebê de termo. Em comparação com o leite de termo, o leite para prematuros tem níveis mais elevados de energia, lípidos, proteínas, azoto, algumas vitaminas e minerais. Para além disso, o leite pré-termo tem níveis mais elevados de anticorpos, incluindo células, imunoglobulinas e elementos anti-inflamatórios^{36, 37}. A composição do leite pré-termo é especialmente importante para o desenvolvimento gastrintestinal e neurológico, bem como para fornecer proteção imunológica aos bebês prematuros⁴. Embora o leite humano seja recomendado para todos os bebês prematuros³⁸, a composição nutricional do

leite pré-termo não cobre completamente as elevadas necessidades nutricionais para o crescimento do bebé prematuro, especialmente quando se trata de recém-nascidos de muito baixo peso (< 1500 g) ^{15, 37}. Assim, para alguns bebés prematuros, o leite humano tem de ser fortificado com proteínas, nutrientes, vitaminas e minerais, para assegurar um bom crescimento e desenvolvimento ³⁹. Isto acrescenta um passo adicional de manuseamento, cujo risco de contaminação tem de ser controlado. Apesar do facto de as propriedades anti-infecciosas do leite o protegerem contra contaminações, existe uma possibilidade de este se tornar uma fonte de infeção, caso não seja manuseado corretamente.

Quadro 1 – Componentes imunológicos do leite humano. Adaptado a partir de Hanson 2007 ²⁵.

Componentes imunológicos do leite humano	Função
Anticorpos (especialmente sIgA)	Os anticorpos sIgA funcionam em primeira linha capturando os micróbios, impedindo-os de atingir as membranas mucosas, tais como os tratos respiratório e gastrointestinal ⁴⁰ .
Lactoferrina	A atividade anti-bacteriana da lactoferrina advém das suas propriedades ligantes do ferro, que privam as bactérias de um elemento necessário para o seu crescimento ⁴¹ .
α -Lactalbumina	A α -Lactalbumina é uma proteína láctea principal, mas pouco se sabe acerca das suas funções. Descobriu-se que tem efeitos anti-tumorais ⁴² .
Oligossacarídeos	Alguns destes glicanos podem atuar como agentes prebióticos, estimulando seletivamente o crescimento de bactérias benéficas no intestino. Contudo, estes têm um papel ainda mais importante, que é inibir a adesão dos agentes patogénicos aos seus recetores alvo na superfície da mucosa do trato gastrointestinal do hospedeiro ²⁸ .
Fator anti-secretório	Parece que a introdução deste componente no leite pode reduzir o risco de mastite na mãe e de diarreia no bebé ^{43, 44} .
Citoquinas, fatores de crescimento e outros sinais da mãe para o bebé	Estes componentes podem funcionar como sinais da mãe para o bebé, possivelmente ajudando à maturação de diversos órgãos e funções ⁴⁵ e melhorando a função anti-infecciosa dos leucócitos ⁴⁶ .
Gordura	Após a degradação enzimática, os lípidos do leite humano fornecem ácidos gordos que podem atacar determinadas bactérias e vírus ⁴⁷ .
Defensinas e catelicidina	A presença de várias defensinas antimicrobianas e peptídeos antimicrobianos da catelicidina no leite humano foi demonstrada ^{48, 49} .
Lisozima	A lisozima é uma enzima que destrói a parede celular e a membrana exterior de diversos microrganismos, provocando a sua lise ⁵⁰ .
Lactaderina	A proteína globular da gordura do leite humano, a lactaderina, inibe o rotavírus, um agente patogénico importante que provoca diarreia desidratante grave em bebés ⁵¹ .
Leucócitos	Incluindo linfócitos, macrófagos e neutrófilos. O principal papel dos neutrófilos e macrófagos presentes no leite pode ser a proteção da glândula mamária de infeções ^{26, 27} .

Vantagens económicas do leite humano

O leite humano contribui para o controlo das infeções ao reduzir a incidência, a gravidade e/ou risco de morbilidades relacionadas com a prematuridade de uma forma dependente da dose, sobretudo nos primeiros meses de vida. Estudos recentes realizados por Patel *et al.*⁷ demonstraram que a relação dose-resposta entre as morbilidades relacionadas com a prematuridade e a dose média diária de leite humano (DMDLH) na UCI neonatal é tão próxima que com cada incremento de leite humano de 10 ml/kg/dia, a probabilidade de ocorrência de sepsia diminuiu 19%. Os bebés que receberam a dose diária de leite humano mais baixa (<25 ml/kg/d DMDLH) não só apresentaram o risco mais elevado de sepsia, como também os custos mais elevados na UCI neonatal (Figura 1). Os autores calcularam que o hospital poderia ter poupado 20 384 dólares americanos por bebé ou um total de 1,2 milhões de dólares americanos através do aumento da DMDLH para 25–49 ml/kg/d nos primeiros 28 dias de vida. O aumento da DMDLH para ≥ 50 ml/kg/d após os primeiros 28 dias e durante toda a estadia no hospital poderia significar uma poupança de 31 514 dólares americanos por bebé e 1,8 milhões de dólares americanos para o hospital.

Estas poupanças com a alimentação com leite humano têm sido replicadas com outras morbilidades relacionadas com a prematuridade. Demonstrou-se que a alimentação com leite humano reduz significativamente a gravidade e os custos diretos da sepsia tardia, displasia broncopulmonar, ECN e retinopatia da prematuridade na UCI Neonatal. A alimentação com leite humano também demonstrou reduzir os custos indiretos da hospitalização na UCI neonatal, diminuindo o custo da hospitalização na UCI neonatal independentemente do seu impacto nas morbilidades relacionadas com a prematuridade. Apesar de a alimentação com leite humano implicar alguns custos para a UCI neonatal⁵², incluindo custos potenciais associados ao controlo das infeções e à segurança, os benefícios económicos da alimentação com leite humano são significativamente superiores aos custos relativamente baixos para a mãe e a instituição⁵².

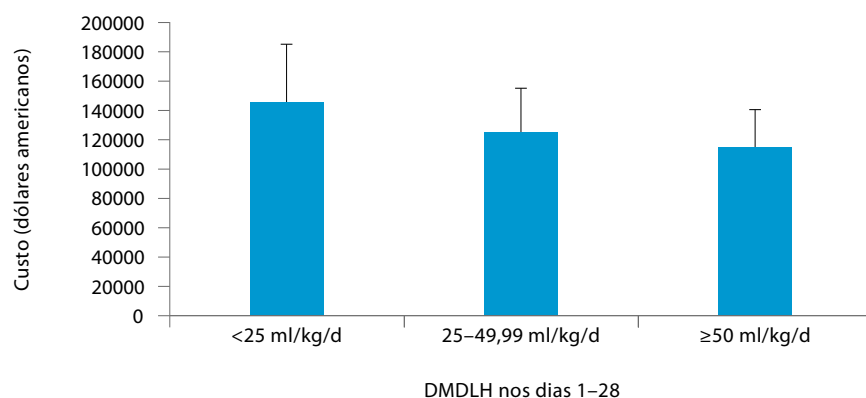


Figura 1 – Diminuição dos custos na UCI neonatal associada ao aumento da dosagem de leite humano. Adaptado de Patel *et al.*⁷

Questões de higiene e segurança durante o manuseamento e alimentação com leite humano

O leite humano é um fluido complexo, vivo e dinâmico. Não é estéril. Pelo contrário, é reconhecidamente uma fonte de transmissão de bactérias comensais e patogénicas, bem como de vírus. É largamente reconhecido o facto de os benefícios de receber leite humano, especialmente da sua própria mãe, se sobreponem aos desafios associados à preparação segura e higiénica do leite para a alimentação. Uma atenção cuidada à higiene e segurança no manuseamento e alimentação com leite humano deve, por isso, assegurar que o leite retém as suas qualidades imunológicas e nutricionais ideais para o bebé⁵³.

Bactérias e agentes patogénicos

Os componentes do leite humano, especialmente as células vivas da mãe do bebé, não podem ser substituído por fontes artificiais. O leite humano fresco, definido como leite oferecido ao bebé por amamentação direta ou acabado de extrair, contém células maternas vivas²⁷ e as quantidades mais elevadas de nutrientes, fatores de crescimento e muitos outros componentes protetores^{25, 28}. O leite humano fresco contém uma grande variedade de organismos vivos, incluindo bactérias não patogénicas, bactérias patogénicas, vírus, micobactérias e fungos⁵⁴⁻⁵⁸. Foram isoladas mais de 700 espécies de bactérias no leite humano⁵⁹. Estas bactérias variam em quantidade e em termos de espécies presentes de mãe para mãe⁶⁰. Pensa-se que muitas delas, incluindo as bactérias intestinais, contribuem para uma programação vital do sistema imunitário do bebé, para que este responda de forma adequada às bactérias comensais e patogénicas⁶⁰. Embora as quantidades de bactérias no leite humano variem bastante, em geral, a maioria dos organismos identificados são a flora da pele normal não patogénica do mamilo ou da mama da mãe, incluindo *Staphylococcus epidermidis* coagulase negativa, difteroides e *Streptococcus viridans*. Organismos que migraram para a mama por *via* enteromamária, como as bifidobactérias ou os lactobacilos, e que protegem o sistema gastrintestinal do recém-nascido também se encontram no leite humano⁶¹.

O leite humano também é um veículo potencial para microrganismos patogénicos originários da mãe e/ou do ambiente. Têm sido identificadas com frequência bactérias patogénicas no leite humano, incluindo o *Staphylococcus aureus* (MRSA), estreptococos beta-hemolíticos, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella*, *Proteus* spp. e enterobactérias^{55, 57, 61, 62}. Diversos surtos e relatos de casos de infeções neonatais foram já associados ao leite humano contaminado contendo os agentes patogénicos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., Citomegalovírus (CMV) e *Acinetobacter baumannii*^{55, 63-65}, o que torna a segurança e o controlo de infeções uma questão fundamental na UCI neonatal.

O leite pode ser contaminado em qualquer ponto ao longo do percurso do leite, podendo ocorrer durante a extração, colheita, transporte, armazenamento e manuseamento do leite⁶⁶. Quando o leite entra em contacto com superfícies exógenas, a flora bacteriana da pele e outras espécies microbianas comuns podem ser introduzidas por via do equipamento de colheita^{57, 67}. Em particular, os extractores contaminados foram identificados como reservatórios de contaminação bacteriana, especialmente depois de serem utilizados por várias mães e incorretamente limpos entre as utilizações⁶⁵. Uma série de estudos de caso mostraram que quase todo o leite apresenta colonização microbiana após a extração das mães de bebés internados nas UCI neonatais^{54, 68, 69}. Atualmente não existem diferenças conhecidas na incidência da contaminação entre a extração com a mão, com extractores manuais ou com extractores elétricos^{42, 54, 70, 71}.

Apesar de diversos estudos de caso terem demonstrado que o leite contaminado pode ser uma fonte de infecção^{64, 72-76}, foram poucos os casos demonstrados de infecções e eventos relacionados com infecção em bebês prematuros alimentados com o leite da sua própria mãe (LPM). Apesar de não ser claro como os diferentes níveis de bactérias normais afetam os bebês prematuros⁵⁴, tem sido sugerido que as propriedades antimicrobianas do leite protegem em grande medida o bebê nestas circunstâncias⁷⁷.

Contudo, alguns médicos pedem culturas bacterianas de rotina do LPM antes de deixarem que este seja fornecido ao bebê⁷⁸. Esta prática tem sido observada com mais frequência nos EUA do que em outros países, apesar dos estudos que demonstram que as culturas do LPM iniciais de rotina não permitem prever os resultados de culturas posteriores nem o risco de infecção para os bebês prematuros^{68, 79}. Determinadas situações podem ainda justificar culturas do leite materno. Por exemplo, podem ser recomendáveis em casos de um bebê internado na UCI neonatal com início tardio de sepsia e/ou infecção recorrente com *Streptococcus* do grupo B (GBS) ou quando existe tratamento materno para GBS, em particular se a mãe sofrer de mastite, apesar de a incidência da transmissão de GBS por *via* do leite materno ser relativamente rara⁸⁰⁻⁸².

Os testes microbiológicos do leite humano fresco na UCI neonatal é um tópico controverso, e a sua prática varia de país para país e entre regiões geográficas^{68, 83}. Não existe um limite superior universalmente aceite para as contagens de colónias bacterianas no leite humano extraído da própria mãe fornecido ao bebê prematuro ou doente. Os critérios aplicados por diferentes organizações de bancos de leite humano ao leite doado pasteurizado fornecido a bebês sem relação familiar sugerem não ser tão relevantes para o bebê prematuro que recebe o LPM^{68, 83}. Num inquérito conduzido em 19 unidades de neonatologia na Bélgica e no Luxemburgo, 47 % das unidades realizavam culturas bacterianas de rotina ao leite fresco; mas, entre essas instituições, as definições das contagens aceitáveis de colónias bacterianas variava significativamente^{68, 83}. Algumas unidades permitiam $<10^5$ unidades formadoras de colónia (ufc) para comensais cutâneas/mL e 10^4 cfu/mL para patogénicas, ao passo que outras permitiam $<10^4$ cfu/mL para comensais e zero patogénicas. O leite que continha bactérias comensais e patogénicas em quantidades superiores a estas era pasteurizado ou, nalgumas UCI neonatais, eliminado, caso as contagens de colónias fossem excessivamente elevadas ou estivessem presentes agentes patogénicos. A eliminação do LPM fresco ocorreu, em particular, caso estivessem presentes *S. aureus* ou vários outros agentes patogénicos⁸³. Contudo, apenas seis das 19 UCI neonatais questionadas tinham acesso a equipamento de pasteurização, o que potencialmente influenciava a decisão de eliminar o leite. Em contraste, nenhuma das 36 unidades na Suécia referiu a realização de culturas ou a pasteurização do LPM antes da alimentação⁸⁴.

Além da variação nos limites bacterianos, o tempo de armazenamento em frigorífico do leite fresco variou entre 24 horas e 7 dias nas UCI neonatais estudadas na Bélgica e no Luxemburgo⁸³. Esta variação pode ser menos comum noutros países, com orientações mais rígidas^{66, 85}. Porém, a variação no tempo de armazenamento poderá provavelmente influenciar o teor bacteriano do leite e o risco de contaminação.

Dada a ausência de limites superiores de segurança em relação às contagens bacterianas e de agentes patogénicos, não é claro se os testes microbiológicos e a pasteurização do LPM serão realmente necessários. Enquanto algumas UCI neonatais pasteurizam o LPM para reduzir os riscos associados à alimentação dos bebês prematuros, existe a preocupação de que os bebês poderão ainda continuar em risco devido ao teor reduzido de agentes bioativos após a pasteurização. A pasteurização implica geralmente o aquecimento dos frascos com leite humano num banho de água a 62,5 °C durante 30 minutos⁸⁶. Este processo permite uma

redução de 10^5 cfu/mL¹⁰ das bactérias presentes no leite humano, mas afeta também os componentes nutritivos bioativos e imunológicos do leite^{87,88}. As importantes proteínas imunológicas sIgA, lactoferrina e lisozima são fortemente afetadas; e são retidas apenas ~72 %, ~22 % e ~39 % respectivamente, após o tratamento térmico⁸⁷. A pasteurização também resulta numa perda significativa de glóbulos brancos^{89,90} e demonstrou afetar a resistência do leite ao crescimento bacteriano. Após inoculação com bactérias, a taxa de crescimento bacteriano no leite humano pasteurizado de Holder foi duas vezes maior do que a taxa de crescimento em leite humano cru⁹¹ (Figura 2). Conseqüentemente, existem diferentes processos de gestão e recomendações para o leite pasteurizado e não pasteurizado.

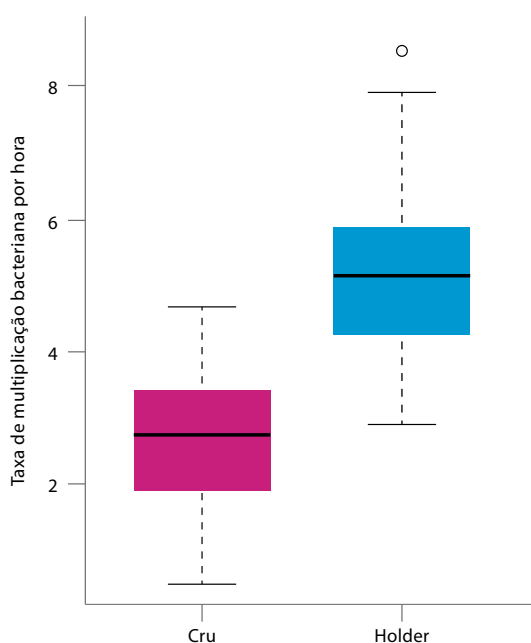


Figura 2 – Crescimento bacteriano em leite humano pasteurizado pelo método de Holder comparado com leite humano cru, após inoculação com bactérias. Adaptado de Christen *et al.*⁹¹.

Infeções virais e fármacos

Ocasionalmente, o leite humano também pode transmitir aos bebês infecções virais graves (Quadro 2). O citomegalovírus (CMV) é um agente patogénico comum encontrado no leite de mulheres seropositivas para esta doença. Normalmente, o CMV não representa um problema de saúde para bebês de termo que tenham adquirido anticorpos contra o CMV no período pré-natal por via da placenta. Porém, os bebês prematuros que não têm esses anticorpos encontram-se em risco de contrair uma infecção por CMV transmitida pelo leite materno⁹². A taxa de transmissão de CMV na população prematura exposta a leite infetado também é altamente variável. Esta varia entre 6 e 55 %⁹²⁻⁹⁴, dependendo da presença de vírus infecciosos no leite, do tipo de estirpe viral, dos fatores imunitários do hospedeiro e do uso de leite fresco ou congelado^{95,96}. As práticas diferem muito entre UCI neonatais no que toca ao uso do LPM fresco em bebês prematuros quando se sabe que as mães são seropositivas para CMV. Apesar de o risco de sepsia clínica grave requerendo tratamento adicional na UCI neonatal devido a CMV adquirido através do leite humano ser relativamente raro, alguns hospitais optam por evitar fornecer LPM fresco aos bebês prematuros, fornecendo em vez disso o leite pasteurizado ou congelado, para eliminar ou reduzir o risco de transmissão do CMV respectivamente^{88,83}. Outros vírus, em particular o VIH e o vírus linfotrópico

de células T humanas (HTLV) tipo I ou II, estão presentes no leite humano e são referidos como contraindicações à amamentação ou alimentação com leite humano na maioria dos países desenvolvidos².

Quando os medicamentos e outras substâncias como o álcool e a nicotina circulam no corpo da mãe, estão presentes também no seu leite em concentrações variáveis. Essas concentrações dependem de múltiplos fatores, incluindo a dose materna, os níveis séricos, o peso molecular, a solubilidade nos lípidos, o pH e o tempo de semivida⁹⁷. A maioria dos relatos de efeitos da medicação baseia-se em relatos de caso e geralmente não implicam a interação de um medicamento com outro. Por isso, apesar da lista de medicamentos contraindicados durante o aleitamento ser relativamente pequena, cada situação materno-infantil tem de ser avaliada individualmente, considerando-se os potenciais efeitos dos fármacos no bebê⁹⁷.

Quadro 2 – Agentes infecciosos transmitidos pelo leite materno⁶⁶

Agentes potencialmente infecciosos transmitidos pelo leite humano	Risco de doença do bebê
Bactérias	Improvável que cause infecção em bebês saudáveis, especialmente se não existirem sinais clínicos de infecção na mãe ⁶⁶ .
VIH	O VIH pode ser transmitido pelo leite humano e provoca doença. Nos países desenvolvidos, a taxa de transmissão é considerada baixa porque a mãe é aconselhada a não amamentar. Nos países em vias de desenvolvimento, observou-se que as taxas de transmissão do VIH são de ~15% quando os bebês são exclusivamente amamentados durante seis meses ^{66, 98} .
Vírus linfotrópico da célula T humana tipo 1 (HTLV-I) e 2 (HTLV-II)	O HTLV-I pode provocar uma doença grave. O risco de transmissão do HTLV-II ainda não é claro ^{66, 99} .
Hepatite B e C	Foram identificadas partículas quer de hepatite B quer de hepatite C no leite humano, mas é improvável que causem doença no bebê ¹⁰⁰ .
CMV	A transmissão do CMV pode ocorrer com frequência, contudo a doença é preocupante essencialmente em bebês prematuros e com muito baixo peso à nascença ^{68, 101, 102} .
Rubéola (tipo selvagem e vacina)	Identificada no leite humano, mas sem evidência que cause doença ⁶⁶ .
Vírus de herpes simplex tipos 1 e 2	Identificado no leite humano, mas a transmissão é improvável, tendo sido associado principalmente a lesões e excreção viral ¹⁰³ .
Vírus de varicela zoster (VZV)	O ADN do VZV foi identificado no leite humano. O risco de doença infantil não é claro ⁶⁶ .

Leite de dadoras

O leite humano de dadoras é a segunda melhor opção, quando o LPM não for aceitável num contexto de UCI neonatal – como é o caso de bebés de mães portadoras de VIH, HTLV-I e II; mães consumidoras de substâncias ilícitas ou medicamentos contraindicados; ou quando não está disponível leite devido a uma produção de leite insuficiente¹. Nos EUA, o leite de dadoras consiste geralmente de leite de várias dadoras agrupado num banco de leite humano após ser pasteurizado pelo processo de Holder¹⁰⁴. Por outro lado, na Europa, as orientações no Reino Unido especificam que não se deve juntar leite de diferentes dadoras. As normas internacionais incluem aspetos específicos de rastreio de dadoras e realização de culturas do leite processado para assegurar a esterilidade e minimizar o risco para os bebés prematuros^{66, 85}. Apesar de existirem orientações rigorosas para o rastreio e pasteurização do leite de dadoras, permanece uma preocupação com a perda de alguns componentes nutricionais e imunológicos após a pasteurização para a alimentação dos bebés prematuros. Os bancos de leite de dadoras na Noruega continuam a basear-se na longa tradição de utilizar leite cru, não pasteurizado, para os bebés prematuros. Apenas um banco de leite na Noruega pasteuriza todo o leite doado e utiliza esse leite para bebés prematuros com menos de 1500g¹⁰⁵. É claro que o LPM é preferível ao leite de uma dadora, e que o leite fresco é preferível ao leite congelado (Figura 3), e que são necessários cuidados especiais para minimizar o risco de infeção e transferência de vírus por via do leite contaminado.

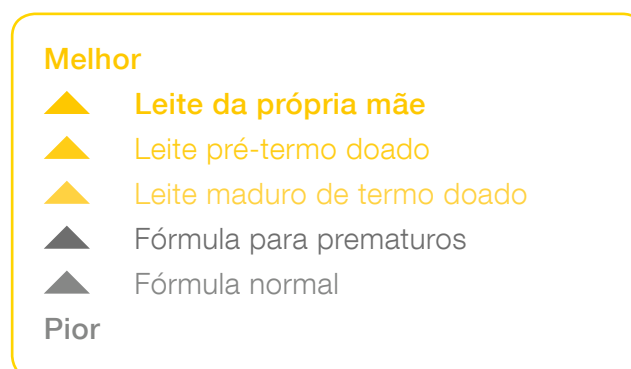


Figura 3 – Recomendações da OMS relativas à alimentação com leite humano na UCI neonatal. Adaptado de Arnold 2002¹⁰⁶.

Evitar a contaminação do leite humano



Figura 4 – Exemplo da mão a lavar todas as superfícies das mãos e dos dedos

O leite humano deve ser ajustado às necessidades de crescimento e desenvolvimento do bebé prematuro, e fornecido sob uma forma otimizada, procurando-se composições de leite que sejam tão nutritivas e protetoras como o leite fresco na amamentação e com um baixo risco de contaminação. Para o conseguir, a UCI neonatal tem de otimizar todo o percurso de segurança do leite humano, desde as práticas de colheita higiénica do leite durante a extração até à alimentação do bebé da forma mais segura possível. As práticas de manuseamento do leite, especialmente o armazenamento, têm de ser otimizadas em termos de tempo, temperatura e rotulagem, a fim de minimizar os riscos de contaminação e os erros no manuseamento de leite de diferentes mães (Quadro 3). Quando o bebé não é amamentado, o objetivo principal é que este receba os benefícios do leite humano seguro do ponto de vista microbiológico e completo do ponto de vista nutritivo e imunológico⁶⁶.

Higiene das mãos

A adesão à higiene das mãos, práticas seguras de colheita de leite e limpeza e secagem dos kits de colheita e do equipamento de extração após cada utilização são passos críticos para evitar a transferência microbiológica indesejada nas UCI neonatais. Lavar as mãos é a primeira linha de defesa para reduzir os agentes patogénicos e as bactérias⁶⁶. Recomenda-se que as mães que extraem leite lavem e sequem bem as mãos antes da extração⁶⁶. Não existem evidências claras em relação à lavagem com sabão antibacteriano ou não antibacteriano. Os sabões antimicrobianos podem resultar em resistência bacteriana^{107, 108} ao remover a flora cutânea normal, que tem um papel na proteção das superfícies de pele¹⁰⁹ e também pode ter um efeito potencial na maturação das células T¹⁰⁹. Porém, tem sido sugerido que usar um volume suficiente de sabão é mais importante¹¹⁰. Adicionalmente à limpeza das mãos, o benefício da limpeza da mama para além da higiene diária não foi demonstrado. A lavagem da mama com agentes de limpeza para a pele não mostrou ser mais eficaz na redução de bactérias do que apenas água, pelo que se recomendam práticas de higiene da mama normais^{58, 111}.

Nos hospitais e noutros locais foram implementadas loções alcoólicas, por serem práticas de usar, especialmente porque não necessitam da presença de um lavatório¹¹². Apesar de a utilização de loções alcoólicas ser recomendada no hospital¹¹³, não existem evidências sobre se existe risco de contacto químico com a mama ou o leite. Por isso, não foram feitas recomendações em relação à utilização de loções ou compressas com álcool antes da extração ou manuseamento do leite humano ou do equipamento de alimentação⁶⁶.

Para os profissionais de saúde, recomenda-se a lavagem das mãos com sabão antimicrobiano ou não antimicrobiano e água. Deve evitar-se a água quente, porque pode danificar a pele. Adicionalmente, recomenda-se a utilização de uma loção alcoólica ou de sabão antimicrobiano para descontaminar as mãos dos profissionais de saúde entre pacientes e antes dos cuidados específicos ao paciente¹¹³. As técnicas de lavagem das mãos com água e sabão variam em termos de tempo de lavagem e quantidade de sabão. Recomenda-se que os profissionais de saúde apliquem a quantidade de sabão recomendada pelo fabricante do sabão, e que cubram todas as superfícies das mãos e dedos antes de as enxaguarem e secarem, todo o processo de lavagem e secagem demorando 40 a 60 segundos¹¹³ (Figura 4). Apesar destes estudos serem referentes aos profissionais de saúde, podem apresentar informações importantes para as mães que fazem a higiene das mãos antes da extração do leite.

A secagem das mãos põe à consideração uma diversidade de opções, incluindo toalhas de papel, de pano e secadores de ar forçado. De todos estes métodos, a secagem com uma toalha descartável é considerada a melhor prática e o

método mais higiénico de secar as mãos ^{114, 115}, quando associado a um modo de fechar a torneira que não volte a contaminar as mãos ¹¹³. A literatura que compara toalhas de papel e de pano em rolos identificou um maior risco de contaminação com as toalhas de pano ^{116, 117}. Os secadores de ar forçado parecem ser seguros na maioria dos ambientes; contudo, nos ambientes hospitalares, os secadores de ar forçado podem dispersar bactérias, podendo contribuir para a contaminação transmitida pelo ar ¹¹⁷, pelo que não são recomendados em vez da secagem com toalhas de papel ¹¹³.

Por fim, em termos da higiene das mãos, observou-se que as unhas e joias são fatores na colonização bacteriana das mãos após a limpeza ¹¹³. As recomendações baseadas em evidências para a higiene das mãos dos profissionais de saúde incluem não utilizar unhas ou extensões artificiais, evitar verniz para as unhas danificado, manter as unhas curtas, com menos de 6,5 mm de comprimento, e as áreas subungueais limpas ¹¹³. Múltiplos estudos sugerem também que a presença de anéis pode afetar negativamente as tentativas de limpar as mãos. A utilização de anéis foi associada a contagens médias de colónias de organismos na pele 10 vezes mais elevadas, contaminação das mãos com *Staphylococcus aureus*, bacilos gram-negativos e espécies de *Candida* ¹¹⁸⁻¹²⁰. Além disso, quanto mais anéis um indivíduo utiliza, maior é a contaminação, mesmo depois de lavar as mãos ¹¹⁹.

Limpeza de extratores e kits de extração

Os extratores e os kits de extração, tal como todo o equipamento hospitalar, são potenciais portadores de microrganismos patogénicos ^{121, 122}. Por isso, são necessários protocolos de limpeza cuidadosa para minimizar o risco de contaminação do extrator utilizado entre mães, bem como os kits de extração utilizados repetidamente por cada mãe.

Kits de extração

Geralmente, os kits de extração são compostos por funis e um tubo utilizado com um extrator elétrico. Dependendo da instituição e do país, os kits de extração podem ter de estar estéreis antes de cada utilização. A utilização de equipamento estéril é particularmente importante na transição de uma mãe para a seguinte ¹²³, mas para muitas instituições, disponibilizar kits de extração antes de cada utilização pode ser um desafio, especialmente num contexto de UCI neonatal com mães a extrair leite mais de seis vezes por dia. A esterilização em autoclave ou eliminação após cada utilização podem mostrar-se caras e pouco práticas. Por isso, a desinfeção tem-se tornado aceitável nalgumas instituições em vez da esterilização. Durante a permanência na UCI neonatal, muitas mães recebem o seu próprio kit de extração, que pode ser reutilizado ou ser descartado após um dia de utilização (aproximadamente 8 sessões de extração). Em ambos os casos, os kits de extração podem ser desinfetados, em vez de serem esterilizados entre utilizações. Eliminar os kits de extração após um dia de utilização também pode ser preferível a esterilizar na autoclave, pois a esterilização em autoclave é geralmente dispendiosa e existe o risco de os kits voltarem incompletos ^{63, 124}.

As peças do extrator que entram em contacto com o leite devem ser completamente separadas e bem lavadas após cada utilização. Mesmo que não haja colheita de leite durante uma sessão de extração, os kits de extração devem ser limpos. Os métodos de descontaminação convencionais para limpar os kits de extração na UCI neonatal incluem a desinfeção química e com vapor, ou a lavagem geral. Num inquérito a 25 unidades neonatais no Reino Unido, a desinfeção química foi o método mais utilizado (56 %), seguido da esterilização em autoclave ou por vapor

(16%), equipamento descartável (8%) e lavagem geral (4%)⁶³. Cada um dos métodos tem vantagens e desvantagens; a descontaminação por desinfecção com liberação de cloro implica lavar os kits de extração antes da sua utilização, substituir a solução a cada 24 horas e a lavagem geral entre utilizações¹²⁵. A lavagem geral exige que o equipamento seja lavado em água com detergente, enxaguado e seco por exposição ao ar. Em ambos os métodos existe um risco de infecção cruzada caso haja alguma troca do equipamento ou este seja usado pela mãe errada; e ambos os métodos são potencialmente perigosos para o bebê, caso a solução ou o detergente não seja corretamente enxaguado do kit de extração¹²⁴. Os métodos com produção de vapor incluem unidades elétricas autônomas de produção de vapor, onde é adicionada água na base, bem como sacos ou cestos que contêm água e são colocados no micro-ondas. Os sacos ou cestos para vapor apresentam vantagens na medida em que podem ser utilizados individualmente pelas mães, a descontaminação é rápida e os sacos são descartáveis. Não obstante, ambos os tipos de dispositivos exigem cuidados para evitar queimaduras¹²⁴, e ambos deixam os kits de extração “molhados”, o que pode permitir potencialmente o crescimento de bactérias^{63, 124}. Se os kits de extração forem utilizados repetidamente, a lavagem geral pode ser o método de limpeza mais simples para as mães. Nas UCI neonatais, onde grande parte da descontaminação ocorre no local sem o envolvimento das mães, o melhor método de descontaminação no local ainda não é óbvio⁶³; é necessária mais investigação sobre o método de descontaminação mais prático, seguro e eficaz em termos de custo¹²⁴.

Para as mães que extraem em casa, a lavagem é o método de limpeza mais comum; apesar de também poder ser utilizada convencionalmente no contexto da UCI neonatal. Depois de serem desmontados, os kits de extração devem ser enxaguados com água fria para remover resíduos de leite, especialmente as proteínas do leite⁶⁶. As peças devem ser lavadas com detergente de loiça e água, sob água corrente ou numa bacia limpa utilizada exclusivamente para este propósito. Podem ser utilizados escovilhões específicos à paciente para limpar as peças, especialmente reentrâncias estreitas¹²⁴. Dados os elevados níveis bacterianos nos ralos e lavatórios e nos punhos das torneiras, as peças não devem ser colocadas no lavatório para lavar e os punhos dos lavatórios devem ser fechados com uma toalha de papel limpa^{66, 113}.

Após a lavagem, as peças devem ser bem enxaguadas e colocadas sobre uma superfície desinfetada para secar. A secagem com uma toalha de pano limpa pode ser aceitável, desde que a toalha não tenha sido usada desde que foi lavada; outra opção é a secagem com ar⁶⁶. Depois de limpas e secas, as peças devem ser retiradas da zona do lavatório para evitar a contaminação por salpicos do lavatório⁶⁶. A limpeza dos kits de extração na máquina de lavar depois de enxaguados, como alternativa à lavagem manual, também tem sido recomendada⁶⁶. Não é necessário limpar peças como os tubos e os conectores do extrator, a menos que estejam contaminados com leite, humidade ou outras substâncias. Os tubos expostos a aerossóis de leite ou água são um motivo de preocupação caso fiquem contaminados com bactérias ou bolores⁶⁶. Nesses casos, deve seguir-se as instruções de limpeza fornecidas pelo fabricante. Os tubos e conectores do extrator não devem ser partilhados entre mães⁶⁶.

Tal como os kits de extração, os frascos utilizados na extração, armazenamento e alimentação de bebês prematuros têm de ser higiénicos, para prevenir a contaminação bacteriana do leite. Os frascos também podem ser estéreis e reutilizáveis após esterilização em autoclave, ou limpos e descartáveis¹²⁶. Curiosamente, não foi demonstrada nenhuma diferença em termos de unidades formadoras de colónias quando o leite é colhido em frascos/recipientes estéreis ou limpos⁷¹. Uma vez que a esterilização em autoclave implica custos adicionais e o risco de perda de peças dos frascos, os recipientes descartáveis poderão ser uma opção mais interessante no contexto da UCI neonatal⁶³.

Quadro 3 – Percurso do leite humano e potenciais riscos na UCI neonatal

Percurso do leite humano na UCI neonatal		Risco potencial	Resposta
Extração:	Extrair em casa ou na UCI neonatal	<ul style="list-style-type: none"> extrator funis recipientes para armazenamento perda de volume 	<ul style="list-style-type: none"> lavagem de mãos adequada e lavagem do extrator/kit de extração antes e depois da extração considerar a utilização de kits de extração e recipientes descartáveis versus reutilizáveis
Transporte:	Transporte de casa ou armazenamento no hospital	<ul style="list-style-type: none"> variações de temperatura trocas perda de volume 	<ul style="list-style-type: none"> rotulagem imediata de todo o leite extraído manter a cadeia de frio durante o transporte
Armazenamento:	Armazenar à temperatura ambiente, no frigorífico ou no congelador. Adicionar fortificantes.	<ul style="list-style-type: none"> proliferação bacteriana perda de componentes bioativos alterações da fortificação 	<ul style="list-style-type: none"> os prazos de armazenamento ideais devem ser respeitados modificar os tempos de armazenamento dependendo de ser fresco, descongelado ou fortificado
Preparar para alimentação:	Descongelar e aquecer	<ul style="list-style-type: none"> proliferação bacteriana perda de componentes bioativos 	<ul style="list-style-type: none"> temperatura ideal considerar dispositivos sem água versus com água

Extratores

De um modo geral, as superfícies externas dos extratores e kits de extração hospitalares, especialmente as superfícies tocadas pelas mães ou pelo pessoal durante o processo de extração, devem ser desinfetadas entre utilizadoras. Tanto as mães como o pessoal da UCI neonatal podem estar envolvidos na limpeza dos extratores hospitalares¹²⁷. Além dos extratores, no hospital e em casa, a superfície sobre as peças limpas do extrator são colocadas antes de secar devem ser desinfetadas com soluções ou toalhetes desinfetantes. Caso seja recomendado pelo fabricante da solução, a superfície deve ser enxaguada com água limpa após a desinfecção, para evitar a contaminação das peças lavadas com a solução. As mãos também devem ser lavadas após a desinfecção dos extratores e das superfícies, para prevenir o contacto da mama ou do leite com os químicos desinfetantes⁶⁶.

Monitorização e transporte do leite

Depois da extração, é necessário considerar o modo como o leite vai ser armazenado e fornecido ao bebé. Após a extração, o leite deve ser rotulado de acordo com as normas do hospital, com a data e a hora da extração, e depois refrigerado o mais brevemente possível, ou congelado caso não vá ser utilizado num curto período de tempo. Cada hospital deve ter recomendações para as mães relativamente aos recipientes, condições e tempos de armazenamento. Apesar de as mães de bebés de termo saudáveis poderem refrigerar o leite fresco e adicioná-lo a leite congelado anteriormente¹²⁸, não existem atualmente recomendações para bebés prematuros.



Figura 5 – Exemplo do tabuleiro usado para o armazenamento individual do leite materno na UCI neonatal

Os hospitais armazenam tradicionalmente o leite materno individualmente, imediatamente após cada sessão de extração ⁶⁶. Tem sido questionado se as mães devem armazenar o seu leite individualmente após cada sessão de extração ou juntá-lo no espaço de 24 horas. Em particular, foi sugerido juntar o leite dado que fazê-lo tem o potencial de assegurar que o leite seja mais consistente em termos nutricionais entre as alimentações. Um estudo ¹²⁹ demonstrou que juntar o leite no espaço de 24 horas não causa diferenças na colonização bacteriana e resulta numa variabilidade reduzida no teor calórico, proteico, de gordura e de hidratos de carbono do leite, em comparação com o leite armazenado individualmente, que variou no teor calórico até 29%. Como o teor de nutrientes das sessões de extração individuais diferiu significativamente do teor de nutrientes das 24 horas, foi sugerido que pode ocorrer uma suplementação imprecisa dos nutrientes e das calorias. Curiosamente, juntar o leite também resultou numa maior satisfação materna do que a recolha individual. Deste modo, juntar o leite pode proporcionar a oportunidade para adaptar a fortificação e melhorar o fornecimento de nutrição ao bebé ¹²⁹. O leite pasteurizado de dadoras cria uma situação diferente, pelo que é possível utilizar um recipiente para mais de um bebé ⁶⁶. A utilização de leite de dadoras não pasteurizado constitui um contexto diferente e pode apresentar limitações à utilização com base nas circunstâncias de doação e na política do hospital.

Juntar o LPM também tem vantagens em termos de rotular um único frasco em comparação com a necessidade de rotular vários frascos ou recipientes após cada extração. O manuseamento e monitorização do leite humano, indispensável na UCI neonatal, pode ser suscetível a erros se os recipientes não estiverem devidamente rotulados ¹³⁰. A rotulagem com o nome da paciente, o tipo de leite, a data e hora da extração e o volume extraído pode ajudar a minimizar as misturas de leite. Outros métodos, como utilizar caixas de armazenamento para cada mãe individual num congelador ou frigorífico dedicado (Figura 5), bem como códigos de barras, mais frequentes em bancos de leite, também podem ser vantajosos ^{66, 131, 132}.

As mães que transportem leite de casa para o hospital necessitarão, provavelmente, de instruções sobre como conservar o leite frio durante o transporte com bolsas de frio e isolar o saco de transporte, como com jornais amachucados para eliminar o espaço vazio em torno dos recipientes de leite e bolsas de frio ⁶⁶. Quando o leite extraído chega ao hospital, as políticas devem estabelecer práticas de manuseamento e administração seguras. No caso de um bebé receber o leite de outra mãe por engano, a política do hospital deve orientar o pessoal com informações relativas à transmissão de doenças por via do leite humano, rastreio de doenças nas mães e no bebé que recebeu o leite, e planos de ação com base nos resultados dos testes ⁶⁶.

Armazenamento do leite na UCI neonatal

O armazenamento seguro do leite na UCI neonatal é essencial para assegurar a nutrição ideal do bebé. As orientações referentes ao armazenamento diferem conforme o bebé (alto risco/prematuro, a termo ou mais velho) e dependem de se o leite é fresco, congelado, descongelado ou fortificado. As células vivas no leite fresco, bem como os nutrientes, fatores de crescimento e muitos outros componentes protetores, como a lactoferrina, IgA secretória e lisozima ²⁵, perdem potência com o tempo de exposição a temperaturas variáveis. Ao mesmo tempo, o risco de contaminação bacteriana e crescimento de agentes patogénicos no leite aumenta. Os efeitos do armazenamento sobre o conteúdo microbiológico, a composição de lípidos, os componentes celulares, as propriedades antibacterianas e a capacidade antioxidante têm sido investigados no leite humano; contudo, conti-

nuam a existir muitas incógnitas no que toca ao descongelamento e fortificação do leite, e existem muitas recomendações baseadas nas opiniões dos especialistas. O que é claro, porém, é que surgem diferentes problemas com o armazenamento a temperaturas variadas, juntamente com as alterações com o tempo e ambiente de armazenamento.

Recipientes para armazenamento

Na UCI neonatal, o leite humano deveria ser colhido e armazenado de modo a garantir um impacto mínimo na composição nutricional e imunológica do leite. O leite conserva a maior parte das suas propriedades imunológicas em recipientes de vidro ou de plástico rígido que não contenha polietileno¹³³; por isso, o plástico rígido ou o vidro são os materiais preferidos para armazenar o leite humano^{66, 134, 135}. O uso de recipientes de polietileno foi associado a uma perda de 60% de imunoglobulina A¹³³ e os recipientes de aço inoxidável podem ser correlacionados com uma diminuição na contagem celular e na viabilidade das células, em comparação com o polietileno e o vidro^{66, 134, 135}. Além disso, os recipientes fabricados com bisfenol A (BPA) já não são utilizados como biberões devido aos efeitos adversos associados¹³⁶. Os recipientes ideais para o armazenamento de leite para o bebé internado são, por isso, de vidro ou de plástico rígido de grau alimentar fabricado sem BPA e com tampas que vedem bem. Também são aceitáveis recipientes limpos, assépticos ou estéreis, mas as políticas das instituições podem especificar um em detrimento de outros⁶⁶.

Armazenamento à temperatura ambiente

Dado que o leite humano contém bactérias comensais e patogénicas, o crescimento bacteriano é uma preocupação principal no armazenamento do leite. Contudo, o leite humano mostrou ser resistente ao crescimento bacteriano por curtos períodos e a temperaturas mais frescas. Os estudos sobre o desenvolvimento bacteriano à temperatura ambiente apresentam resultados variáveis, em parte porque a definição de temperatura ambiente pode variar entre 16–29 °C ou mais^{137–139}. Nas UCI neonatais, onde os bebés estão imunocomprometidos, os tempos de armazenamento do leite à temperatura ambiente costuma ser mais conservador do que para os bebés a termo, havendo recomendações para a refrigeração imediata do leite fresco sempre que possível e com um limite de quatro horas à temperatura ambiente⁶⁶.

Um estudo chave¹⁴⁰ sobre a degradação do leite a 15, 25 e 38 °C ao longo de 24 horas demonstrou que, apesar das alterações da proteólise e das enzimas digestivas terem sido mínimas a 15 e 25 °C após 24 horas, a lipólise ocorreu rapidamente no espaço de algumas horas de armazenamento a 38 °C, resultando num aumento entre 440 e 710% na concentração de ácidos gordos livres. Da mesma forma, a proliferação bacteriana, que se restringiu basicamente aos agentes não patogénicos, foi mínima a 15 °C e permaneceu baixa a 25 °C nas primeiras 4–8 horas, mas aumentou rapidamente após 4 horas a 38 °C¹⁴⁰. Os autores concluíram que o leite a 15 °C permanecia seguro durante 24 horas, e a 25 °C durante 4 horas¹⁴⁰. Desde então, métodos mais rigorosos utilizados para analisar a atividade das proteínas no leite a 25 °C revelaram outras reduções na β -caseína ao longo de 24 horas^{141, 142}, bem como reduções na lipase no espaço de 2 horas de armazenamento¹⁴¹. No contexto da UCI neonatal, o armazenamento ideal à temperatura ambiente recomendado é de <4 horas⁶⁶ (Quadro 4). A alimentação contínua pode, por isso, ser administrada com segurança durante um período de quatro horas.

Refrigeração

A refrigeração a cerca de 4 °C conserva a integridade do leite humano durante mais tempo do que quando este é deixado à temperatura ambiente ¹⁴³. O estudo mais abrangente que avaliou o armazenamento a 4 °C sugere que o prazo máximo de armazenamento do leite fresco em condições de refrigeração é de 96 horas (4 dias) ¹³⁸ (Quadro 4). Às 96 horas, o leite fresco refrigerado não apresentou alterações significativas na osmolalidade, nas contagens de colónias de bactérias gram-negativas e totais, nos macronutrientes e fatores imunitários, incluindo gordura, slgA e lactoferrina. Contudo, não foram medidos os efeitos após 96 horas. Para além disso, a refrigeração demonstrou inibir a proliferação de bactérias gram-positivas ¹⁴⁴. Os aumentos nas concentrações de ácidos gordos livres e os subsequentes aumentos da acidez como resultado da lipólise também foram observados de modo consistente nos estudos sobre refrigeração ^{138, 145}. Os produtos da lipólise não são considerados de risco, uma vez que estão associados à atividade antimicrobiana contra as bactérias, os vírus e os protozoários ^{137, 138, 145-147}. A perda nas contagens de glóbulos brancos, incluindo macrófagos e linfócitos, bem como das proteínas totais, foi observada às 48 horas ¹³⁸. Com base nestes estudos, o armazenamento ideal a 4 °C foi sugerido como sendo <4 dias, especialmente no caso de bebés internados na UCI neonatal para leite acabado de extrair, não fortificado e não anteriormente congelado ⁶⁶. Porém, as práticas variam provavelmente entre instituições e países. Por exemplo, algumas unidades de neonatologia na Bélgica e Luxemburgo refrigeram o leite fresco até sete dias ⁸³.

Congelamento

O congelamento a -20 °C até 3 meses foi recomendado como sendo a solução ideal na UCI neonatal ⁶⁶. Aos 3 meses, as vitaminas A, E e B, as proteínas totais, a gordura, as enzimas, a lactose, o zinco, as imunoglobulinas, a lisozima e a lactoferrina são mantidas, embora possa ocorrer a perda de vitamina C após 1 mês ⁶⁶. A proliferação bacteriana não é uma questão significativa até às 6 semanas ^{148, 149}. Contudo, a capacidade antibacteriana é geralmente menor do que no leite fresco ^{150, 151}, devido à perda de células vivas como os fagócitos. Até 12 meses a <-20 °C, o ultracongelamento é considerado aceitável na UCI neonatal ⁶⁶. O ultracongelamento a -80 °C pode ser mais apropriado para manter a capacidade bactericida do leite humano, especialmente na UCI neonatal ⁶⁶. Podem ocorrer alterações do sabor e do cheiro a -80 °C, dado que a lipase continua a decompor a gordura em ácidos gordos ¹²⁸. Adicionalmente, os estudos mostraram que a carga viral no leite, por exemplo de CMV, é significativamente reduzida após o congelamento, não sendo contudo destruída ^{68, 83}.

O recongelamento do leite descongelado no frigorífico demonstrou manter uma carga bacteriana segura ¹⁵²; no entanto, foi sugerido que o leite totalmente descongelado à temperatura ambiente não é seguro, e não deve ser recongelado ⁶⁶. Existem poucas evidências sobre os prazos de armazenamento adequados após o descongelamento à temperatura ambiente, bem como sobre o efeito que as várias transferências entre recipientes e temperaturas têm sobre a qualidade do leite. Contudo, mesmo o leite congelado há vários meses é mais benéfico do que o leite de substituição. Por outro lado, a biodisponibilidade e a concentração de alguns componentes protetores diminuem após o congelamento, reiterando a preferência do leite fresco sobre leite congelado ⁶⁶. O leite refrigerado é considerado fresco, por isso deve ser utilizado antes do leite que foi congelado ⁶⁶.

Quadro 4 – Orientações de armazenamento do leite humano para bebês internados na UCI neonatal. Adaptado de HMBANA ⁴²

Leite humano	Prazo de armazenamento ideal
Leite acabado de extrair Temperatura ambiente: Frigorífico: Congelador:	≤ 4 horas ¹⁵⁰ ≤ 4 dias ¹³⁸ ≤ 3 meses. Aceitável ≤ 12 meses ¹⁵³⁻¹⁵⁶
Previamente congelado Temperatura ambiente: Frigorífico: Congelador:	Descongelar à temperatura ambiente, utilizar no prazo de ≤ 4 horas ¹⁵⁰ Descongelar no frigorífico e utilizar no prazo de ≤ 24 horas Não recongelar
Acabado de extrair, fortificado Temperatura ambiente: Frigorífico: Congelador:	Não armazenar à temperatura ambiente ≤ 24 horas ¹⁵⁷⁻¹⁶¹ Não congelar
Previamente congelado, fortificado ou pasteurizado Temperatura ambiente: Frigorífico: Congelador:	Não armazenar à temperatura ambiente ≤ 24 horas Não recongelar
Aquecido à temperatura corporal Temperatura ambiente: Frigorífico: Congelador:	Para completar a alimentação atual Eliminar Eliminar

Manuseamento do leite humano na UCI Neonatal

Preparar o leite para a alimentação requer uma série de processos que incluem o descongelamento, a fortificação e o aquecimento. Cada processo pode afetar a composição do leite e constitui risco de contaminação.

Descongelamento

O descongelamento e o aquecimento do leite humano são dois processos separados, frequentemente combinados num só passo na prática clínica e em casa. Historicamente, o descongelamento do leite era efetuado deixando-o à temperatura ambiente, colocando-o no frigorífico ou colocando um frasco de leite num recipiente com água quente. O descongelamento está completo quando o leite congelado fica líquido, ainda está frio e tem alguns cristais de gelo. A presença dos cristais de gelo é uma indicação visível de que o leite não descongelou para lá de determinado ponto ⁶⁶. O leite descongelado deve, então, ser refrigerado até imediatamente antes da sua utilização, e não mantido à temperatura ambiente durante mais do que algumas horas, para prevenir a proliferação bacteriana ⁶⁶. Determinar o tempo exato necessário para o descongelamento pode ser uma tarefa trabalhosa, pois exige uma monitorização constante. O uso de banhos de água, em aquecedores de leite ou taças de água quente, também introduz riscos de contaminação através da água da torneira e banhos comuns, contaminação proveniente do recipiente ou das mãos do cuidador ⁶⁶.



Figura 6 – Exemplo do manuseamento de leite humano usando uma técnica asséptica

Embora os estudos que investigam o método ideal de descongelamento do leite sejam limitados, sabe-se que o aquecimento do leite durante a pasteurização resulta em perdas significativas dos componentes imunológicos e anti-inflamatórios do leite, incluindo a IgA, a lactoferrina e a lisozima, bem como das bactérias probióticas e dos glóbulos brancos. Estas perdas são reduzidas quando a pasteurização é efetuada a temperaturas mais baixas⁶⁶. As orientações dos bancos de leite humano⁶⁶ sugerem que as temperaturas não devem exceder 37 °C no descongelamento do leite num recipiente com água. Não é recomendado utilizar o micro-ondas nem água quente ou a ferver, pois estes métodos destroem as propriedades anti-infecciosas do leite^{89, 90}. Existe um risco de contaminação em todos os métodos à base de água, pois esta pode infiltrar-se por baixo ou no interior da tampa do frasco e misturar-se com o leite¹²¹. Por isso, têm sido sugeridas recomendações para prevenir o contacto entre a água e a tampa do frasco^{66, 121}.

Fortificação

Apesar de o leite humano ser fortemente recomendado para a alimentação entérica e para toda a alimentação oral na UCI neonatal, quer seja fresco ou congelado, este pode necessitar de fortificação para ir ao encontro das elevadas necessidades de nutrientes para o crescimento do bebé prematuro. Os micro e macronutrientes, que são normalmente depositados durante o último trimestre *in utero*³⁹, diminuem de forma substancial em caso de parto pré-termo, devendo ser rapidamente substituídos. Por conseguinte, a fortificação é recomendada para todos os bebés com um peso à nascença inferior a 1500g, mas também pode ser recomendada para outros bebés¹⁶².

Se o LPM não estiver disponível ou for insuficiente, utiliza-se frequentemente leite de dadoras para suplementar a alimentação entérica^{15, 37}. O leite de dadoras tem geralmente um teor proteico inferior, em comparação com o LPM, pelo que requer um maior grau de fortificação^{15, 37}. Quando os bebés prematuros atingem volumes de alimentação de aproximadamente 100 ml/kg/dia, muitos hospitais fortificam o leite humano para aumentar as proteínas, as calorias, o cálcio, o fósforo e outros nutrientes. Porém, esta não é uma prática consistente em termos universais^{15, 37}. Nos EUA encontra-se disponível um fortificante à base de leite humano para os hospitais que pretendem evitar os fortificantes à base de leite de vaca. Os estudos realizados até agora sugerem que uma dieta 100% à base de leite humano reduz o risco de ECN médica e cirúrgica^{22, 163}. Se não houver leite humano disponível, é dado aos bebés leite de substituição para prematuros; porém, a biodisponibilidade dos nutrientes é inferior à do leite humano^{22, 164}. Uma dieta exclusiva de leite humano, incluindo leite de dadoras com fortificante para leite humano, demonstrou reduzir o risco de ECN quando comparada com o leite de substituição para prematuros²².

Apesar dos seus benefícios, a fortificação foi associada a algumas alterações no valor funcional do leite humano. A fortificação com fortificantes à base de leite de vaca demonstrou alterar e interferir com as ações antibacterianas do leite humano^{160, 161}. Alguns fortificantes podem alterar a composição do leite, pelo que é necessário um especial cuidado no que respeita à contaminação e aos riscos de armazenamento. Uma vez que a contaminação e a osmolalidade podem aumentar mais rapidamente no leite fortificado^{165, 166}, é necessário respeitar as orientações e as instruções do fabricante¹⁶⁷. Foi sugerido que a adição de fortificantes com recurso a técnicas assépticas à temperatura ambiente ou refrigerada não aumenta os níveis de osmolalidade (Figura 6)¹⁶⁷. Também têm sido recomendadas durações menores de armazenamento no caso do leite fortificado, as quais variam dependendo de o leite ser fresco ou congelado, previamente descongelado ou do tempo passado à temperatura ambiente¹⁶⁸. Estas incluem as recomendações de que o leite fortificado não deve ser deixado à temperatura ambiente; deve ser usado na alimentação ou refrigerado imediatamente, e conservado no frigorífico até no máximo 24 horas, após o que deve ser eliminado⁶⁶ (Quadro 4).

Aquecimento

A temperatura do leite é importante não só para manter a integridade do leite, como também no apoio à capacidade do bebé de tolerar a alimentação por gavagem. Especula-se que a temperatura do leite pode influenciar a temperatura corporal do bebé. Demonstrou-se que a temperatura do bebé diminui quando são administrados fluidos intravenosos à temperatura ambiente; por isso, tem sido recomendado que os fluidos intravenosos, tais como o sangue e o soro fisiológico, sejam aquecidos à temperatura corporal antes da perfusão^{169, 170}. Em muitas UCI neonatais, o aquecimento dos alimentos é considerado um passo importante do percurso do leite. Uma série de estudos que avaliou o efeito do aquecimento do leite sobre a estabilidade e os resíduos gástricos dos bebés prematuros apresentou resultados variáveis. As temperaturas retal e do estômago demonstraram ser mais baixas após as alimentações por gavagem à temperatura ambiente em comparação com as alimentações à temperatura corporal¹⁶⁹⁻¹⁷¹; contudo, não foram observadas diferenças nos ritmos metabólicos. Embora um estudo tenha revelado que a temperatura axilar dos bebés prematuros aumentou até 0,44 °C durante as alimentações aquecidas, os autores não encontraram alterações nos ritmos cardíaco e respiratório, nem na saturação de oxigénio às temperaturas mais elevadas¹⁷². Os bebés prematuros que foram alimentados por gavagem com leite a temperaturas baixas, à temperatura ambiente e à temperatura corporal, apresentaram menos resíduos gástricos e melhores tolerâncias à alimentação quando receberam leite à temperatura corporal (37 °C), em comparação com as temperaturas baixas (10 °C); contudo, o tipo de alimento não foi controlado¹⁷³. Outros estudos de avaliação de bebés prematuros não revelaram quaisquer diferenças na temperatura corporal, no esvaziamento gástrico e no ritmo cardíaco entre as temperaturas baixas, a temperatura ambiente e a temperatura corporal durante as alimentações por gavagem^{174, 175}. Apesar de os bebés de termo poderem receber leite a temperaturas frescas, aquecidas ou à temperatura ambiente¹²⁸, as evidências são menos claras no caso dos bebés prematuros.

Tal como no descongelamento, o leite pode ser aquecido colocando o frasco num recipiente com água quente ou segurando-o debaixo de água quente corrente, tendo o cuidado de manter a tampa do frasco seca para evitar a contaminação⁶⁶. Contudo, regular e atingir temperaturas ideais com os métodos à base de água é difícil. Para obter uma temperatura ideal é necessário considerar vários fatores, incluindo o volume de leite e a temperatura do leite no início do processo de aquecimento, o tamanho do recipiente de leite e a temperatura da água após o aquecimento e no momento da alimentação. No momento da alimentação, observaram-se grandes variações da temperatura (21,8 °C a 36,2 °C) e dos tempos de aquecimento (133 e 2061 segundos), sugerindo que a duração de aquecimento adequada e a determinação de quando o leite se encontra à temperatura de alimentação desejada muitas vezes não são alcançadas¹⁷². Outro estudo mediu a perceção das enfermeiras da temperatura de alimentação, em comparação com a temperatura medida no momento da alimentação. Tal como em estudos anteriores, observou-se uma grande variação da temperatura do leite à alimentação em 419 sessões de alimentação com leite, variando entre os 22 °C e os 46,4 °C, com uma temperatura média de ~31 °C no momento da alimentação¹⁷⁶. Concluiu-se que o leite foi fornecido ao bebé a temperaturas inconsistentes, e que a estimativa que as enfermeiras fizeram da temperatura foi inexata em comparação com a temperatura medida.

O risco de usar água contaminada em métodos à base de água é um potencial desafio na UCI neonatal. Historicamente, a água da torneira no hospital tem sido identificada como uma fonte de infecção nosocomial de bactérias, bem como de outros contaminantes. Em particular, foram identificados *Staphylococcus* e *Klebsiella pneumoniae* na água da torneira do hospital usada para aquecer o leite dos bebês¹⁷⁷. Determinou-se que estas bactérias são diretamente responsáveis por um surto de septicemia na UCI neonatal do hospital. Mais recentemente, em 2013, Molina-Cabrillana e associados¹⁷⁸ referiram um surto de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* provocado por água da torneira contaminada em aquecedores de biberões.

Como alternativa, nos EUA foi sugerida a utilização de dispositivos de aquecimento a seco para aquecer fluidos que entram em contacto com os pacientes¹⁷⁹. Nas suas Orientações de 2003 para o Controlo das Infecções em Instituições de Cuidados de Saúde¹⁸⁰, o CDC (Centro de Controlo de Doenças dos EUA) sugere que as instituições eliminem as fontes de água contaminada sempre que possível. Estas diretrizes declaram que os ambientes húmidos e as soluções à base de água podem servir como reservatórios de microrganismos no contexto hospitalar. Mais recentemente, na sequência de um surto de *Pseudomonas* relacionado com a água da torneira e da morte de três bebês numa UCI neonatal na Irlanda do Norte, a RQIA (Autoridade para a Regulamentação e Melhoramento da Qualidade) emitiu recomendações de não aquecer nem descongelar leite colocando o recipiente dentro de água quente da torneira¹⁸¹. Algumas UCIs neonatais utilizam atualmente aquecedores secos, sem água, em vez dos métodos à base de água, para prevenir a potencial contaminação do leite. Contudo, existe investigação limitada sobre os efeitos no leite após o descongelamento e aquecimento com qualquer uma destas técnicas.

Um estudo mediu as alterações na composição do leite utilizando um dispositivo de aquecimento e descongelamento sem água em comparação com métodos à base de água¹⁸². Não foram demonstradas diferenças em termos de integridade do leite entre os métodos de descongelamento e aquecimento sem água e os métodos à base de água. Observaram-se alterações semelhantes no pH do leite, contagens de colónias bacterianas e concentrações de ácidos gordos livres durante o descongelamento e aquecimento do leite, quer com os métodos à base de água quer nos isentos de água. Porém, quando o leite foi mantido à temperatura ambiente durante quatro horas depois de ser descongelado e aquecido no dispositivo sem água, observou-se o maior aumento nas contagens de colónias bacterianas e ácidos gordos livres. Apesar do teor bacteriano ser superior após quatro horas de aquecimento, não foi diferente do observado no leite fresco antes de começar a ser processado. Infelizmente, o estudo não mediu o efeito de aquecer o leite durante quatro horas utilizando o método à base de água; contudo, é provável que a manutenção da temperatura com o método à base de água seja difícil e irrealista no contexto da UCI neonatal. No entanto, é necessário um estudo adicional sobre o efeito do aquecimento do leite por períodos prolongados.

Conclusão

São necessários métodos baseados em evidências que maximizem a qualidade do leite humano e minimizem o risco de contaminação na UCI neonatal. É necessário considerar todo o percurso do leite na UCI neonatal para o fazer. Isso começa com práticas de extração seguras e higiénicas, que assegurem que as mãos das mães, todos os extratores e os kits de colheita se encontram limpos antes da extração. É fundamental estabelecer condições de refrigeração e congelamento que assegurem a perda mínima de nutrientes, fatores de crescimento e muitos outros componentes protetores do leite, bem como assegurar que o leite possa ser rastreado. Estes são fatores cruciais para reduzir as infeções e as trocas.

Os procedimentos de descongelamento e aquecimento do leite não devem expor o leite a temperaturas elevadas nem a água potencialmente contaminada. Além disso, o leite fortificado tem de ser manuseado de forma diferente que o leite não fortificado, a fim de minimizar a proliferação bacteriana ao mesmo tempo que se conservam os componentes do leite humano.

Os critérios para os limites superiores das unidades formadoras de colónias bacterianas ao utilizar o LPM não são universais, o que torna controverso o recurso a testes microbiológicos e subsequente pasteurização. É urgente realizar mais investigação para compreender o efeito de diferentes microrganismos e de diferentes níveis de contaminação nos bebés prematuros, para assegurar que os bebés conseguem receber leite humano na sua dosagem e qualidade máximas.

Referências

- 1 WHO & UNICEF. Global strategy for infant and young child feeding (World Health Organization, Geneva, 2003).
- 2 American Academy of Pediatrics - Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 129, e827-e841 (2012).
- 3 UNICEF Facts for life (United Nations Children's Fund, New York, 2010).
- 4 Callen, J. & Pinelli, J. A review of the literature examining the benefits and challenges, incidence and duration, and barriers to breastfeeding in preterm infants. *Adv Neonatal Care* 5, 72-88 (2005).
- 5 Winberg, J. Mother and newborn baby: Mutual regulation of physiology and behavior - a selective review. *Dev Psychobiol* 47, 217-229 (2005).
- 6 Meier, P.P., Engstrom, J.L., Patel, J.L., Jegier, B.J., & Bruns, N.E. Improving the use of human milk during and after the NICU stay. *Clin Perinatol* 37, 217-245 (2010).
- 7 Patel, A.L. et al. Impact of early human milk on sepsis and health-care costs in very low birth weight infants. *J Perinatol* 33, 514-519 (2013).
- 8 Arslanoglu, S., Ziegler, E.E., Moro, G.E., & WAPM working group on nutrition. Donor human milk in preterm infant feeding: evidence and recommendations. *J Perinat Med* 38, 347-351 (2010).
- 9 Bisquera, J.A., Cooper, T.R., & Berseth, C.L. Impact of necrotizing enterocolitis on length of stay and hospital charges in very low birth weight infants. *Pediatrics* 109, 423-428 (2002).
- 10 Furman, L., Taylor, G., Minich, N., & Hack, M. The effect of maternal milk on neonatal morbidity of very low-birth-weight infants. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157, 66-71 (2003).
- 11 Hylander, M.A., Strobino, D.M., & Dhanireddy, R. Human milk feedings and infection among very low birth weight infants. *Pediatrics* 102, E38 (1998).
- 12 Hylander, M.A., Strobino, D.M., Pezzullo, J.C., & Dhanireddy, R. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J Perinatol* 21, 356-362 (2001).
- 13 Quigley, M.A., Henderson, G., Anthony, M.Y., & McGuire, W. Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 1-41 (2007).
- 14 Schanler, R., Shulman, R.J., & Lau, C. Feeding strategies for premature infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics* 103, 1150-1157 (1999).
- 15 Schanler, R.J., Lau, C., Hurst, N.M., & Smith, E.O. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics* 116, 400-406 (2005).
- 16 Vohr, B.R. et al. Beneficial effects of breast milk in the neonatal intensive care unit on the developmental outcome of extremely low birth weight infants at 18 months of age. *Pediatrics* 118, e115-e123 (2006).
- 17 Vohr, B.R. et al. Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. *Pediatrics* 120, e953-e959 (2007).
- 18 Meier, P.P. Breastfeeding in the special care nursery. Prematures and infants with medical problems. *Pediatr Clin North Am* 48, 425-442 (2001).
- 19 Sisk, P.M., Lovelady, C.A., Gruber, K.J., Dillard, R.G., & O'Shea, T.M. Human milk consumption and full enteral feeding among infants who weigh <1250 grams. *Pediatrics* 121, e1528-e1533 (2008).
- 20 Corpeleijn, W.E. et al. Intake of own mother's milk during the first days of life is associated with decreased morbidity and mortality in very low birth weight infants during the first 60 days of life. *Neonatology* 102, 276-281 (2012).
- 21 Meinzen-Derr, J. et al. Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death. *J Perinatol* 29, 57-62 (2009).
- 22 Sullivan, S. et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J Pediatr* 156, 562-567 (2010).
- 23 Taylor, S.N., Basile, L.A., Ebeling, M., & Wagner, C.L. Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: Mother's milk versus formula. *Breastfeed Med* 4, 11-15 (2009).
- 24 Newburg, D.S. & Walker, W.A. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr Res* 61, 2-8 (2007).
- 25 Hanson, L.A. The role of breastfeeding in the defense of the infant in *Textbook of human lactation* (eds. Hale, T.W. & Hartmann, P.E.) 159-192 (Hale Publishing LLP, Amarillo TX, 2007).
- 26 Hassiotou, F. & Geddes, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26, 29-48 (2013).
- 27 Hassiotou, F. et al. Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells* 30, 2164-2174 (2012).
- 28 Bode, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22, 1147-1162 (2012).
- 29 Garrido, D., Kim, J.H., German, J.B., Raybould, H.E., & Mills, D.A. Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. infantis reveal a preference for host glycans. *PLoS One* 6, e17315 (2011).
- 30 Sela, D.A. et al. An infant-associated bacterial commensal utilizes breast milk sialyloligosaccharides. *J Biol Chem* 286, 11909-11918 (2011).
- 31 Wu, S., Grimm, R., German, J.B., & Lebrilla, C.B. Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides. *J Proteome Res* 10, 856-868 (2011).
- 32 Etzold, S. & Bode, L. Glycan-dependent viral infection in infants and the role of human milk oligosaccharides. *Curr Opin Virol* 7, 101-107 (2014).
- 33 Caicedo, R.A., Schanler, R.J., Li, N., & Neu, J. The developing intestinal ecosystem: Implications for the neonate. *Pediatr Res* 58, 625-628 (2005).
- 34 Claud, E.C. Probiotics and neonatal necrotizing enterocolitis. *Anaerobe* 17, 180-185 (2011).
- 35 Claud, E.C. & Walker, W.A. Hypothesis: Inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB J* 15, 1398-1403 (2001).
- 36 Schanler, R.J. Evaluation of the evidence to support current recommendations to meet the needs of premature infants: The role of human milk. *Am J Clin Nutr* 85, 625S-628S (2007).
- 37 Schanler, R.J. The use of human milk for premature infants. *Pediatr Clin North Am* 48, 207-219 (2001).
- 38 Gartner, L.M. et al. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 115, 496-506 (2005).
- 39 Kuschel, C.A. & Harding, J.E. Multicomponent fortified human milk for promoting growth in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD000343, 1-45 (2004).

- 40 Hanson,L.A. Immunobiology of human milk: How breastfeeding protects babies (Pharmasoft Publishing, Amarillo Texas,2004).
- 41 Arnold,R.R., Brewer,M., & Gauthier,J.J. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun* 28, 893-898 (1980).
- 42 Lönnerdal, B. & Lien,E.L. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. *Nutr Rev* 61, 295-305 (2003).
- 43 Svensson,K., Lange,S., Lonroth,I., Widstrom,A.M., & Hanson,L.A. Induction of anti-secretory factor in human milk may prevent mastitis. *Acta Paediatr* 93, 1228-1231 (2004).
- 44 Zaman,S., Mannan,J., Lange,S., Lonroth,I., & Hanson,L.A. B 221, a medical food containing antiseecretory factor reduces child diarrhoea: a placebo controlled trial. *Acta Paediatr* 96, 1655-1659 (2007).
- 45 Field,C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 135, 1-4 (2005).
- 46 King,C. & Jones,E. The Benefits of Human Milk for the Preterm Baby in Feeding and Nutrition in the Preterm Infant (eds. Jones,E. & King,C.) 1-13 (Elsevier Churchill Livingstone, Oxford, 2005).
- 47 Hernell,O., Ward,H., Blackberg,L., & Pereira,M.E. Killing of *Giardia lamblia* by human milk lipases: An effect mediated by lipolysis of milk lipids. *J Infect Dis* 153, 715-720 (1986).
- 48 Armogida,S.A., Yannaras,N.M., Melton,A.L., & Srivastava,M.D. Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy Asthma Proc* 25, 297-304 (2004).
- 49 Murakami,M., Dorschner,R.A., Stern,L.J., Lin,K.H., & Gallo,R.L. Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatr Res* 57, 10-15 (2005).
- 50 Kleinman,R.E. & Walker,W.A. The enteromammary immune system: an important new concept in breast milk host defense. *Dig Dis Sci* 24, 876-882 (1979).
- 51 Newburg,D.S. et al. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 351, 1160-1164 (1998).
- 52 Johnson,T.J., Patel,A.L., Bigger,H.R., Engstrom,J.L., & Meier,P.P. Economic benefits and costs of human milk feedings: A strategy to reduce the risk of prematurity-related morbidities in very-low-birth-weight infants. *Adv Nutr* 5, 207-212 (2014).
- 53 Tudehope,D.I. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *J Pediatr* 162, S17-S25 (2013).
- 54 Boo,N.Y., Nordiah,A.J., Alfizah,H., Nor-Rohaini,A.H., & Lim,V.K. Contamination of breast milk obtained by manual expression and breast pumps in mothers of very low birthweight infants. *J Hosp Infect* 49, 274-281 (2001).
- 55 Novak,F.R., Da Silva,A.V., Hagler,A.N., & Figueiredo,A.M. Contamination of expressed human breast milk with an epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Med Microbiol* 49, 1109-1117 (2000).
- 56 Carroll,L., Osman,M., Davies,D.P., & McNeish,A.S. Bacteriology of raw breast milk. *Lancet* 2, 1186 (1979).
- 57 Eidelman,A.I. & Szilagyi,G. Patterns of bacterial colonization of human milk. *Obstet Gynecol* 53, 550-552 (1979).
- 58 Thompson,N., Pickler,R.H., Munro,C., & Shotwell,J. Contamination in expressed breast milk following breast cleansing. *J Hum Lact* 13, 127-130 (1997).
- 59 Cabrera-Rubio,R. et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 96, 544-551 (2012).
- 60 Jeurink,P.V. et al. Human milk: A source of more life than we imagine. *Benef Microbes* 4, 17-30 (2013).
- 61 Perez,P.F. et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119, e724-e732 (2007).
- 62 Carroll,L., Osman,M., Davies,D.P., & McNeish,A.S. Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units. *Lancet* 2, 732-733 (1979).
- 63 Shetty,A., Barnes,R., Adappa,R., & Doherty,C. Quality control of expressed breast milk. *J Hosp Infect* 62, 253-254 (2006).
- 64 Godambe,S., Shah,P.S., & Shah,V. Breast milk as a source of late onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 24, 381-382 (2005).
- 65 Engür,D. et al. A milk pump as a source for spreading *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. *Breastfeed Med* 9, 551-554 (2014).
- 66 Human Milk Banking Association of North America 2011 Best practice for expressing, storing and handling human milk in hospitals, homes, and child care settings (HMBANA, Fort Worth, 2011).
- 67 el-Mohandes,A.E., Keiser,J.F., Johnson,L.A., Refat,M., & Jackson,B.J. Aerobes isolated in fecal microflora of infants in the intensive care nursery: Relationship to human milk use and systemic sepsis. *Am J Infect Control* 21, 231-234 (1993).
- 68 Schanler,R.J. et al. Breastmilk cultures and infection in extremely premature infants. *J Perinatol* 31, 335-338 (2011).
- 69 el-Mohandes,A.E., Schatz,V., Keiser,J.F., & Jackson,B.J. Bacterial contaminants of collected and frozen human milk used in an intensive care nursery. *Am J Infect Control* 21, 226-230 (1993).
- 70 Becker,G.E., McCormick,F.M., & Renfrew,M.J. Methods of milk expression for lactating women (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 1-46 (2008).
- 71 Pittard,W.B., Geddes,K.M., Brown,S., Mintz,S., & Hulsey,T.C. Bacterial contamination of human milk: container type and method of expression. *Am J Perinatol* 8, 25-27 (1991).
- 72 Olver,W.J., Bond,D.W., Boswell,T.C., & Watkin,S.L. Neonatal group B streptococcal disease associated with infected breast milk. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 83, F48-F49 (2000).
- 73 Byrne,P.A., Miller,C., & Justus,K. Neonatal group B streptococcal infection related to breast milk. *Breastfeed Med* 1, 263-270 (2006).
- 74 Botsford,K.B. et al. Gram-negative bacilli in human milk feedings: Quantitation and clinical consequences for premature infants. *J Pediatr* 109, 707-710 (1986).
- 75 Cooke,R.P., Devlin,J., & Robinson,M.J. Breast milk and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 10, 312 (1987).
- 76 Widger,J., O'Connell,N.H., & Stack,T. Breast milk causing neonatal sepsis and death. *Clin Microbiol Infect* 16, 1796-1798 (2010).
- 77 Goldman,A.S. Immunologic system in human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 5, 343-345 (1986).

- 78 Ng,D.K., Lee,S.Y., Leung,L.C., Wong,S.F., & Ho,J.C. Bacteriological screening of expressed breast milk revealed a high rate of bacterial contamination in Chinese women. *J Hosp Infect* 58, 146-150 (2004).
- 79 Boer,H.R., Anido,G., & Macdonald,N. Bacterial colonization of human milk. *South Med J* 74, 716-718 (1981).
- 80 Berardi,A. et al. Group B streptococcus late-onset disease: 2003-2010. *Pediatrics* 131, e361-e368 (2013).
- 81 Davanzo,R. et al. To feed or not to feed? Case presentation and best practice guidance for human milk feeding and group B streptococcus in developed countries. *J Hum Lact* 29, 452-457 (2013).
- 82 Jawa,G., Hussain,Z., & da,S.O. Recurrent late-onset group B Streptococcus sepsis in a preterm infant acquired by expressed breastmilk transmission: a case report. *Breastfeed Med* 8, 134-136 (2013).
- 83 Cossey,V., Johansson,A.B., de,H., V, & Vanhole,C. The use of human milk in the neonatal intensive care unit: Practices in Belgium and Luxembourg. *Breastfeed Med* 7, 302-306 (2012).
- 84 Omarsdottir,S., Casper,C., Akerman,A., Polberger,S., & Vanpee,M. Breastmilk handling routines for preterm infants in Sweden: A national cross-sectional study. *Breastfeed Med* 3, 165-170 (2008).
- 85 National Institute for Health and Care Excellence. Donor milk banks: The operation of donor milk bank services. 2010. <http://www.nice.org.uk/guidance/CG93/chapter/1-Guidance/> (2014).
- 86 Balmer S.E. & Williams A.F. Guidelines for the establishment and operation of human milk banks in the UK. *Arch Dis Child* 73, 481-482 (1995).
- 87 Czank,C., Prime,D.K., Hartmann,B., Simmer,K., & Hartmann,P.E. Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice. *Pediatr Res* 66, 374-379 (2009).
- 88 Czank,C., Simmer,K., & Hartmann,P.E. Simultaneous pasteurization and homogenization of human milk by combining heat and ultrasound: effect on milk quality. *J Dairy Res* 77, 183-189 (2010).
- 89 Quan,R. et al. Effects of microwave radiation on anti-infective factors in human milk. *Pediatrics* 89, 667-669 (1992).
- 90 Sigman,M., Burke,K.I., Swarner,O.W., & Shavlik,G.W. Effects of microwaving human milk: Changes in IgA content and bacterial count. *J Am Diet Assoc* 89, 690-692 (1989).
- 91 Christen,L., Lai,C.T., Hartmann,B., Hartmann,P.E., & Geddes,D.T. The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk. *PLoS One* 8, e85867 (2013).
- 92 Capretti,M.G. et al. Very low birth weight infants born to Cytomegalovirus-seropositive mothers fed with their mother's milk: A prospective study. *J Pediatr* 154, 842-848 (2009).
- 93 Sharland,M., Khare,M., & Bedford-Russell,A. Prevention of postnatal Cytomegalovirus infection in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 86, F140 (2002).
- 94 Meier,J. et al. Human Cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *J Clin Microbiol* 43, 1318-1324 (2005).
- 95 Sabbaj,S. et al. Breast milk-derived antigen-specific CD8+ T cells: An extralymphoid effector memory cell population in humans. *J Immunol* 174, 2951-2956 (2005).
- 96 Pignatelli,S., Dal,M.P., Rossini,G., & Landini,M.P. Genetic polymorphisms among human Cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol* 14, 383-410 (2004).
- 97 Hale,T.W. & Rowe,H.E. Medications and mothers' milk (Hale Publishing, Plano TX, 2014).
- 98 Read,J.S. Prevention of mother-to-child transmission of HIV through breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 27, 649-650 (2008).
- 99 Biggar,R.J. et al. Human leukocyte antigen concordance and the transmission risk via breast-feeding of human T cell lymphotropic virus type I. *J infect Dis* 193, 277-282 (2006).
- 100 Shi,Z. et al. Breastfeeding of newborns by mothers carrying hepatitis B virus: a meta-analysis and systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 165, 837-846 (2011).
- 101 Jim,W.T. et al. Transmission of Cytomegalovirus from mothers to preterm infants by breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 23, 848-851 (2004).
- 102 Miron,D. et al. Incidence and clinical manifestations of breast milk-acquired Cytomegalovirus infection in low birth weight infants. *J Perinatol* 25, 299-303 (2005).
- 103 Read,J.S., Cannon,M.J., Stanberry,L.R., & Schuval,S. Prevention of mother-to-child transmission of viral infections. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 38, 274-297 (2008).
- 104 Human Milk Banking Association of North America 2011 Guidelines for establishment and operation of a donor human milk bank (HMBANA, Fort Worth, 2011).
- 105 Grøvslien,A.H. & Grønn,M. Donor milk banking and breastfeeding in Norway. *J Hum Lact* 25, 206-210 (2009).
- 106 Arnold,L.D. The cost-effectiveness of using banked donor milk in the neonatal intensive care unit: prevention of necrotizing enterocolitis. *J Hum Lact* 18, 172-177 (2002).
- 107 Tan,L., Nielsen,N.H., Young,D.C., & Trizna,Z. Use of antimicrobial agents in consumer products. *Arch Dermatol* 138, 1082-1086 (2002).
- 108 Aiello,A.E., Larson,E.L., & Levy,S.B. Consumer antibacterial soaps: Effective or just risky? *Clin Infect Dis* 45 Suppl 2, S137-S147 (2007).
- 109 Levy,S.B. Antibacterial household products: Cause for concern. *Emerg Infect Dis* 7, 512-515 (2001).
- 110 Larson,E.L., Eke,P.I., Wilder,M.P., & Laughon,B.E. Quantity of soap as a variable in handwashing. *Infect Control* 8, 371-375 (1987).
- 111 Costa,K.M. A comparison of colony counts of breast milk using two methods of breast cleansing. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 18, 231-236 (1989).
- 112 Kac,G. et al. Microbiological evaluation of two hand hygiene procedures achieved by healthcare workers during routine patient care: A randomized study. *J Hosp Infect* 60, 32-39 (2005).
- 113 Pittet,D., Allegranzi,B., & Boyce,J. The World Health Organization guidelines on hand hygiene in health care and their consensus recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30, 611-622 (2009).
- 114 Harrison,W.A., Griffith,C.J., Ayers,T., & Michaels,B. Bacterial transfer and cross-contamination potential associated with paper-towel dispensing. *Am J Infect Control* 31, 387-391 (2003).

- 115 Harrison,W.A., Griffith,C.J., Michaels,B., & Ayers,T. Technique to determine contamination exposure routes and the economic efficiency of folded paper-towel dispensing. *Am J Infect Control* 31, 104-108 (2003).
- 116 Gustafson,D.R. et al. Effects of 4 hand-drying methods for removing bacteria from washed hands: A randomized trial. *Mayo Clin Proc* 75, 705-708 (2000).
- 117 Huang,C., Ma,W., & Stack,S. The hygienic efficacy of different hand-drying methods: A review of the evidence. *Mayo Clin Proc* 87, 791-798 (2012).
- 118 Salisbury,D.M., Hutfilz,P., Treen,L.M., Bollin,G.E., & Gautam,S. The effect of rings on microbial load of health care workers' hands. *Am J Infect Control* 25, 24-27 (1997).
- 119 Trick,W.E. et al. Impact of ring wearing on hand contamination and comparison of hand hygiene agents in a hospital. *Clin Infect Dis* 36, 1383-1390 (2003).
- 120 Hoffman,P.N., Cooke,E.M., McCarville,M.R., & Emmerson,A.M. Micro-organisms isolated from skin under wedding rings worn by hospital staff. *Br Med J (Clin Res Ed)* 290, 206-207 (1985).
- 121 Brown,S.L., Bright,R.A., Dwyer,D.E., & Foxman,B. Breast pump adverse events: Reports to the food and drug administration. *J Hum Lact* 21, 169-174 (2005).
- 122 Jones,B. et al. An outbreak of *Serratia marcescens* in two neonatal intensive care units. *J Hosp Infect* 46, 314-319 (2000).
- 123 D'Amico,C.J., DiNardo,C.A., & Krystofiak,S. Preventing contamination of breast pump kit attachments in the NICU. *J Perinat Neonatal Nurs* 17, 150-157 (2003).
- 124 Gilks,J., Price,E., Hateley,P., Gould,D., & Weaver,G. Pros, cons and potential risks of on-site decontamination methods used on neonatal units for articles indirectly associated with infant feeding, including breast pump collection kits and neonatal dummies. *J Infect Prev* 13, 16-23 (2012).
- 125 Atkinson,A. Decontamination of breast milk collection kits - a change in practice. *Midwives Information Resource Services. Midwifery Digest* 11, 381-383 (2001).
- 126 Cossey,V., Jeurissen,A., Thelissen,M.J., Vanhole,C., & Schuermans,A. Expressed breast milk on a neonatal unit: A hazard analysis and critical control points approach. *Am J Infect Control* 39, 832-838 (2011).
- 127 Meier,P.P., Engstrom,J.L., Mingoelli,S.S., Miracle,D.J., & Kiesling,S. The Rush Mothers' Milk Club: Breastfeeding interventions for mothers with very-low-birth-weight infants. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 33, 164-174 (2004).
- 128 Eglash,A. ABM clinical protocol #8: Human milk storage information for home use for full-term infants (original protocol March 2004; revision #1 March 2010). *Breastfeed Med* 5, 127-130 (2010).
- 129 Stellwagen,L.M., Vaucher,Y.E., Chan,C.S., Montminy,T.D., & Kim,J.H. Pooling expressed breastmilk to provide a consistent feeding composition for premature infants. *Breastfeed Med* 8, 205-209 (2013).
- 130 Zeilhofer,U.B., Frey,B., Zandee,J., & Bernet,V. The role of critical incident monitoring in detection and prevention of human breast milk confusions. *Eur J Pediatr* 168, 1277-1279 (2009).
- 131 Dougherty,D. & Nash,A. Bar coding from breast to baby: A comprehensive breast milk management system for the NICU. *Neonatal Netw* 28, 321-328 (2009).
- 132 Drenckpohl,D., Bowers,L., & Cooper,H. Use of the six sigma methodology to reduce incidence of breast milk administration errors in the NICU. *Neonatal Netw* 26, 161-166 (2007).
- 133 Goldblum,R. et al. Human milk Banking: I. Effects of container upon immunologic factors in mature milk. *Nutr Res* 1, 449-459 (1981).
- 134 Williamson,M.T. & Murti,P.K. Effects of storage, time, temperature, and composition of containers on biologic components of human milk. *J Hum Lact* 12, 31-35 (1996).
- 135 Hopkinson,J., Garza,C., & Asquith,M.T. Human milk storage in glass containers. *J Hum Lact* 6, 104-105 (1990).
- 136 vom Saal,F.S. & Hughes,C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 113, 926-933 (2005).
- 137 Igumbor,E.O., Mukura,R.D., Makandiramba,B., & Chihota,V. Storage of breast milk: Effect of temperature and storage duration on microbial growth. *Cent Afr J Med* 46, 247-251 (2000).
- 138 Slutzah,M., Codipilly,C.N., Potak,D., Clark,R.M., & Schanler,R.J. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 156, 26-28 (2010).
- 139 Nwankwo,M.U., Offor,E., Okolo,A.A., & Omene,J.A. Bacterial growth in expressed breast-milk. *Ann Trop Paediatr* 8, 92-95 (1988).
- 140 Hamosh,M., Ellis,L., Pollock,D., Henderson,T., & Hamosh,P. Breastfeeding and the working mother: Effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics* 97, 492-498 (1996).
- 141 Molinari,C., Casadio,Y.S., Arthur,P.G., & Hartmann,P.E. The effect of storage at 25° C on proteins in human milk. *Internat Dairy J* 21, 286-293 (2011).
- 142 Ferranti,P. et al. Casein proteolysis in human milk: Tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides. *J Dairy Res* 71, 74-87 (2004).
- 143 Lawrence,R. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatr Suppl* 88, 14-18 (1999).
- 144 Sosa,R. & Barness,L. Bacterial growth in refrigerated human milk. *Am J Dis Child* 141, 111-112 (1987).
- 145 Ogundele,M.O. Effects of storage on the physicochemical and antibacterial properties of human milk. *Brit J Biomed Sci* 59, 205 (2002).
- 146 Martinez-Costa,C. et al. Effects of refrigeration on the bactericidal activity of human milk: A preliminary study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 45, 275-277 (2007).
- 147 Silvestre,D., Lopez,M.C., March,L., Plaza,A., & Martinez-Costa,C. Bactericidal activity of human milk: Stability during storage. *Br J Biomed Sci* 63, 59-62 (2006).
- 148 Marin,M.L. et al. Cold storage of human milk: Effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49, 343-348 (2009).
- 149 Takci,S. et al. Effects of freezing on the bactericidal activity of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55, 146-149 (2012).
- 150 Pardou,A., Serruys,E., Mascart-Lemone,F., Dramaix,M., & Vis,H.L. Human milk banking: influence of storage processes and of bacterial contamination on some milk constituents. *Biol Neonate* 65, 302-309 (1994).
- 151 Hernandez,J., Lemons,P., Lemons,J., & Todd,J. Effect of storage processes on the bacterial growth-inhibiting activity of human breast milk. *Pediatrics* 63, 597-601 (1979).

- 152 Rechtman,D.J., Lee,M.L., & Berg,H. Effect of environmental conditions on unpasteurized donor human milk. *Breastfeed Med* 1, 24-26 (2006).
- 153 Friend,B.A., Shahani,K.M., Long,C.A., & Vaughn,L.A. The effect of processing 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* 17, 61-64 (1983).
- 154 Evans,T.J., Ryley,H.C., Neale,L.M., Dodge,J.A., & Lewarne,V.M. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. *Arch Dis Child* 53, 239-241 (1978).
- 155 Buss,I.H., McGill,F., Darlow,B.A., & Winterbourn,C.C. Vitamin C is reduced in human milk after storage. *Acta Paediatr* 90, 813-815 (2001).
- 156 Bank,M.R., Kirksey,A., West,K., & Giacoia,G. Effect of storage time and temperature on folacin and vitamin C levels in term and preterm human milk. *Am J Clin Nutr* 41, 235-242 (1985).
- 157 Barash,J.R., Hsia,J.K., & Arnon,S.S. Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas. *J Pediatr* 156, 402-408 (2010).
- 158 WHO. Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula guidelines (WHO Press, Geneva, 2007).
- 159 Chan,G.M. Effects of powdered human milk fortifiers on the antibacterial actions of human milk. *J Perinatol* 23, 620-623 (2003).
- 160 Chan,G.M., Lee,M.L., & Rechtman,D.J. Effects of a human milk-derived human milk fortifier on the antibacterial actions of human milk. *Breastfeed Med* 2, 205-208 (2007).
- 161 Santiago,M.S., Codipilly,C.N., Potak,D.C., & Schanler,R.J. Effect of human milk fortifiers on bacterial growth in human milk. *J Perinatol* 25, 647-649 (2005).
- 162 American Academy of Pediatrics - Committee on Nutrition. Nutritional needs of low-birth-weight infants. *Pediatrics* 75, 976-986 (1985).
- 163 Cristofalo,E.A. et al. Randomized trial of exclusive human milk versus preterm formula diets in extremely premature infants. *J Pediatr* 163, 1592-1595 (2013).
- 164 Lapillonne,A., O'Connor,D.L., Wang,D., & Rigo,J. Nutritional recommendations for the late-preterm infant and the preterm infant after hospital discharge. *J Pediatr* 162, S90-100 (2013).
- 165 Jocson,M.A., Mason,E.O., & Schanler,R.J. The effects of nutrient fortification and varying storage conditions on host defense properties of human milk. *Pediatrics* 100, 240-243 (1997).
- 166 Janjindamai,W. & Chotsampancharoen,T. Effect of fortification on the osmolality of human milk. *J Med Assoc Thai* 89, 1400-1403 (2006).
- 167 Fenton,T.R. & Belik,J. Routine handling of milk fed to preterm infants can significantly increase osmolality. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35, 298-302 (2002).
- 168 Diehl-Jones,W., Askin,D.F., & Friel,J.K. Microlipid-induced oxidative stress in human breastmilk: In vitro effects on intestinal epithelial cells. *Breastfeed Med* 2, 209-218 (2007).
- 169 Nilsson,K. Maintenance and monitoring of body temperature in infants and children. *Paediatr Anaesth* 1, 13-20 (1991).
- 170 Knobel,R. & Holditch-Davis,D. Thermoregulation and heat loss prevention after birth and during neonatal intensive-care unit stabilisation of extremely low-birthweight infants. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 36, 280-287 (2007).
- 171 Eckburg,J.J., Bell,E.F., Rios,G.R., & Wilmoth,P.K. Effects of formula temperature on postprandial thermogenesis and body temperature of premature infants. *J Pediatr* 111, 588-592 (1987).
- 172 Dumm,M., Hamms,M., Sutton,J., & Ryan-Wenger,N. NICU breast milk warming practices and the physiological effects of breast milk feeding temperatures on preterm infants. *Adv Neonatal Care* 13, 279-287 (2013).
- 173 Gonzales,I., Durvea,E.J., Vasquez,E., & Geraghty,N. Effect of enteral feeding temperature on feeding tolerance in preterm infants. *Neonatal Netw* 14, 39-43 (1995).
- 174 Costalos,C., Ross,I., Campbell,A.G., & Sofi,M. Is it necessary to warm infants' feeds? *Arch Dis Child* 54, 899-901 (1979).
- 175 Anderson,C.A. & Berseth,C.L. Neither motor responses nor gastric emptying vary in response to formula temperature in preterm infants. *Biol Neonate* 70, 265-270 (1996).
- 176 Lawlor-Klean,P., Lefaiver,C.A., & Wiesbrock,J. Nurses' perception of milk temperature at delivery compared to actual practice in the neonatal intensive care unit. *Adv Neonatal Care* 13, E1-E10 (2013).
- 177 Büyükyavuz,B.I., Adiloglu,A.K., Onal,S., Cubukcu,S.E., & Cetin,H. Finding the sources of septicemia at a neonatal intensive care unit: Newborns and infants can be contaminated while being fed. *Jap J Infect Dis* 59, 213-215 (2006).
- 178 Molina-Cabrillana,J. et al. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a neonatal care unit associated with feeding bottles heaters. *Am J Infect Control* 41, e7-e9 (2013).
- 179 Squier,C., Yu,V.L., & Stout,J.E. Waterborne nosocomial infections. *Curr Infect Dis Rep* 2, 490-496 (2000).
- 180 Sehulster,L. & Chinn,R.Y. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep* 52, 1-42 (2003).
- 181 The Regulation and Quality Improvement Authority. Independent review of incidents of *Pseudomonas aeruginosa* infection in neonatal units in Northern Ireland - Final report (2012).
- 182 Handa,D. et al. Do thawing and warming affect the integrity of human milk?. *J Perinatol* 34, 863-866 (2014).

www.medela.com



Medela AG
Lättichstrasse 4b
6341 Baar, Switzerland
www.medela.com

International Sales

Medela AG
Lättichstrasse 4b
6341 Baar
Switzerland
Phone +41 41 562 51 51
www.medela.com

Spain & Portugal

Productos Medicinales Medela, S.L.
C/ Manuel Fernández Márquez, 49
08918 Badalona (Barcelona)

Spain

Phone: +34 93 320 59 69
Fax: +34 93 320 55 31
info@medela.es
www.medela.es

Portugal

Tel: 808 203 238
info@medela.pt
www.medela.pt