



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

CRIBADO DE SUSTANCIAS DE ABUSO EN LECHE MATERNA DONADA

TESIS DOCTORAL - UAB/2015

Arelis Ayaxcihuatl Gómez Baltazar

Directores de tesis:

Óscar García-Algar

Oriol Vall Combelles

Grup de Recerca Infància i Entorn (GRIE),
Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM);

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia, i Medicina Preventiva, Universitat
Autònoma de Barcelona



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Pediatría,
Obstetricia, Ginecología y Medicina Preventiva**

Doctorado en Pediatría

TESIS DOCTORAL

**CRIBADO DE SUSTANCIAS DE ABUSO EN
LECHE MATERNA DONADA**

Memoria presentada por Arelis Ayaxcihuatl Gómez Baltazar para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona. Este trabajo se ha realizado en el Grup de Recerca Infància i Entorn (GRIE), bajo la dirección del Dr. Óscar García Algar y del Prof. Oriol Vall Combelles

DOCTORANDA

Arelis Ayaxcihuatl Gómez Baltazar

DIRECTORES

Dr. Óscar García Algar

Prof. Oriol Vall Combelles

Bellaterra, 1 diciembre 2015

PREFACIO Y AGRADECIMIENTOS

Toda realización de tesis tiene su historia y la historia de ésta inicia cuando conocí al Pr. Oriol Vall y al Dr. Óscar García Algar. Al llegar a Barcelona me recibieron como parte de su equipo y entonces una de las mejores e inolvidables partes de mi vida inició. Es por eso que en primer lugar agradezco al Dr. Oriol Vall y Óscar García Algar su apoyo incondicional a través de los años, sin importar el día, la hora o las circunstancias. Gracias por todos sus conocimientos transmitidos, por alentarme siempre a seguir, pero sobretodo por su amistad.

A todo el equipo de la URIE (ahora GRIE) por compartir aquellos días que para mi son tan memorables. A Xavier Joya por su ayuda durante mi estancia en el PRBB y por enviarme los artículos que necesitaba cuando yo no tenía acceso; Adriana Bastons que junto con Óscar me ayudaron con la corrección de esta tesis.

A la Dra. Keka Pallás, Diana Escuder y a todo el equipo del banco de leche del Hospital 12 de Octubre, por permitirnos colaborar con ustedes y darnos la confianza de trabajar con su oro blanco... La leche materna.

A cada una de las madres que de manera altruista han donado gotitas de vida para otros niños, y por aceptar participar en este estudio deseando que siga avanzando el conocimiento para conservar la salud los niños.

A todas aquellas personas que estuvieron cerca de mi durante estos años, siendo fuente de inspiración y crecimiento personal; en especial a Carme Puig, Carmen Combelles y Ulises Gómez.

A mis padres y mi hermana por depositar toda su confianza en mi, aunque lejos estemos. Siempre animándome, apoyándome y haciéndome sentir que las cosas siempre son posibles de conseguir.

A Roselyne y Alain, por ayudarme a cuidar de mis hijos para que yo pudiese sentarme a escribir esta tesis.

Gracias a mi compañero de vida Laurent por estar conmigo en todo momento, alentando mis proyectos y siempre cuidando de mi.

A mis pequeñitos Emiliano y Andrea quienes son mi principal fuente de inspiración para nunca rendirme. Como unos grandes tuvieron paciencia mientras no estuve disponible para ellos. Gracias Emiliano por tus bromas, tus sonrisas y tu dibujo para que pusiera en mi trabajo de tesis. Andrea que tan chiquitina sabe expresar ternura, alegría y amor.

Gracias a todos por hacer posible que este día llegara.



Para Laurent, Emiliano y Andréa

RESUMEN

Antecedentes

La alimentación del recién nacido (RN) sano, prematuro y enfermo con leche materna (LM), mejora su cociente de desarrollo, transmite factores inmunoprotectores y previene complicaciones como enterocolitis necrotizante y sepsis. En los RN que no disponen de leche de su propia madre, la leche materna donada (LMD) es la mejor opción. Por esta razón, la apertura de Bancos de Leche Humana (BLH) continúa en expansión. Con el fin de preservar las propiedades nutricionales de la leche y reducir la presencia de patógenos, estos BLH funcionan con protocolos para el procesamiento de la LM. Hasta el momento no existe consenso en las guías de actuación de los diferentes BLH y tampoco existen protocolos donde se incluya el cribado de drogas en LMD. La mayoría de las sustancias que inhala o ingiere la madre pasan parcialmente a la leche. La LMD no está considerada dentro de la Ley de Trasplantes de Órganos y Tejidos; no se considera un medicamento, ni un producto sanitario. Sin embargo, es importante que sea segura y se encuentre en las mejores condiciones para ser proporcionada a los RN, sobretodo si son prematuros.

Los objetivos del presente trabajo son: (1) evaluar la seguridad toxicológica de la LMD en función de distintos procedimientos de selección de donantes y de procesamiento de la leche; (2) analizar la concentración de tóxicos encontrados en la leche materna donada y su posible repercusión en el neonato; y (3) justificar la realización de un cribado de drogas en la selección de donantes y durante el procesamiento de la leche.

Metodología

En una primera fase (febrero a julio de 2009), se incluyeron en el estudio 63 mujeres lactantes donantes del BLH del Hospital 12 de Octubre en Madrid. Se analizaron 400 muestras de leche pasteurizada además de 34 muestras antes y después del proceso de pasteurización. En un segundo período (agosto de 2010 a febrero de 2012), se incluyeron 36 mujeres que participaron en el cribado de sustancias de abuso en LM y pelo. En el mismo periodo se

analizaron 54 muestras de orina recogida durante el proceso de selección de donantes. Se compararon los resultados obtenidos de la determinación de sustancias de abuso a partir de 3 matrices biológicas diferentes con los datos recogidos en el cuestionario de hábitos de vida.

Como control se analizó la leche de 3 mujeres consumidoras de cannabis, cocaína (COC) y metadona (MTD) respectivamente. Para el estudio bioquímico de las muestras de leche y orina se utilizó la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) validada para la determinación simultánea de 18 sustancias en una sola muestra. Las determinaciones en pelo se realizaron mediante cromatografía de gases.

Resultados

El 45,3% de las muestras (n = 400) contenían una concentración media de cafeína (CAF) de 496 ± 778 ng/ml (0-7.564 ng/ml). En el análisis de la leche y el pelo de las 36 mujeres se encontró: CAF ($272,76$ ng/ml \pm $560,50$ ng/ml) en el 50% de las muestras de leche; y en el pelo se detectó CAF (1.769 ± 1.582 ng/mg) en 77,7% de las muestras; nicotina (NIC) (1.805 ± 2.956 ng/mg) y su metabolito cotinina (COT) ($0,148 \pm 0,336$ ng/mg) en el 33,3% (12/36). En el análisis de orina se determinó: CAF ($343,70$ ng/ml) en el 57,4% (31/54) de las muestras; COT ($0,52$ ng/ml) y 3-OH-COT ($2,01$ ng/ml) en el 35,12%. No se identificaron sustancias de abuso ilegales en las 3 matrices biológicas. El proceso de pasteurización no tuvo efecto en la concentración de CAF medida en las muestras de leche.

Respecto a los casos controles; en la leche de la madre cocainómana se cuantificó COC (5 ng/ml) y CAF (539 ng/ml); la leche de la madre fumadora de cannabis contenía tetrahidrocannabinol (THC) (86 ng/ml), su metabolito hidroxih THC (THC-OH) (5 ng/ml) y COT (51 ng/ml). La leche de la madre en tratamiento con metadona (MTD) contenía MTD (97 ng/ml), su metabolito EDDP (8 ng/ml) y morfina (MOR) (7 ng/ml).

Discusión

Hasta el momento no existen guías en BLH donde se incluya algún método objetivo para el cribado de sustancias de abuso. Se toma como válida la

información declarada por las madres durante el proceso de selección de donantes mediante un cuestionario de hábitos de vida. Las donantes del BLH están sensibilizadas para evitar el consumo de sustancias de abuso, por lo que los resultados no pueden extrapolarse a la población general.

Conclusiones

Los cuestionarios empleados durante la selección de donantes y el proceso de pasteurización no constituyen una medida de seguridad toxicológica absoluta. No obstante, los niveles de CAF encontrados en la LMD no son lo suficientemente altos para ocasionar sintomatología en el RN. Actualmente se cuenta con la tecnología necesaria para el cribado de tóxicos en BLH. Incluir el estudio de orina y pelo durante la selección de donantes y un cribado en la leche acumulada de cada madre previo al proceso de pasteurización y alicuotado puede garantizar que la LM dispensada sea de calidad y libre de tóxicos.

Palabras clave

Leche materna donada; Bancos de leche humana; Sustancias de abuso; Recién nacido

ABSTRACT

Introduction

Breast milk feeding improve developmental quotient, transfers immunoprotective factors and prevent complications such as necrotizing enterocolitis and sepsis. Newborns whose their own mother's milk is not available, donated human milk (DHM) is the best choice. For this reason, the opening human milk banks (HMB) continues to expand. In order to preserve the nutritional properties of milk and reduce the presence of pathogens, these HMB work with protocols for processing the DHM. Actually there is no consensus in HMB guidelines; there are no protocols where drug screening in DHM is included. Most of substances consumed or inhaled by mothers partially pass into the breast milk. Breast milk is not included in the Organ Transplant Law and Tissue; DHM is not considered as a drug or a medical device. However, it is important having DHM safe and in optimal conditions to be provided to NB, especially if they are premature. The objectives of this work are: (1) Evaluate toxicological safety of DHM according to different donors selection processes and breast milk processing; (2) analyze drugs concentration found in DHM and its possible clinical effect in neonates; and (3) justify a drug screening during the donor selection and milk processing.

Methodology

In a first stage (February to July 2009), 63 lactating women donors from HMB Hospital 12 de Octubre in Madrid, were included in the study. 400 pasteurized milk samples and 34 samples before and after the pasteurization were analyzed. In a second period (August 2010 to February 2012), 36 women who participated in drugs of abuse screening in hair and milk were included. In the same period, 54 urine samples were collected during donor selection process and were analyzed. We compared results obtained from substance abuse determination in 3 different biological matrices with data collected in lifestyle questionnaires. Milk from 3 women cannabis, cocaine and methadone respectively consumers were analyzed as control. Biochemical analysis of milk and urine samples was performed by liquid chromatography tandem mass (LC-MS/MS), a validated

method for quantifying simultaneously 18 substances in a single sample. Hair determinations were performed by gas chromatography.

Results

Caffeine (CAF) was found in 45,3% of donor milk samples (n = 400), with a mean concentration of 496 ± 778 ng/mL (range, 0-7564). Milk and hair analysis from 36 women indicated: CAF ($272,76$ ng/ml \pm $560,50$ ng/ml) in 50% of human milk; CAF (1.769 ± 1.582 ng/mg) in 77% of hair samples and nicotine (NIC) (1.805 ± 2.956 ng/ml) and its metabolite cotinine (COT) ($0,148 \pm 0.336$ ng/mg) were found in 33,33% of the total hair samples. Urinalysis revealed CAF ($343,70$ ng/ml) in 57,4% of samples; COT ($0,52$ ng/ml) and 3-OH-COT ($2,01$ ng/ml) in 35,12% of samples. No illegal drugs were identified in any of 3 biological matrices. Pasteurization had no effect on caffeine concentration measured in milk samples.

Regarding cases controls; in milk from cocaine addict mother, COC (5 ng/ml) and CAF (539 ng/ml) were quantified; milk from smoking cannabis woman contained tetrahydrocannabinol (THC) (86 ng/ml), its metabolite Hydroxy-THC (THC-OH) (5 ng/ml) and COT (51 ng/ml). Milk from mother on methadone (MTD) maintenance contained MTD (97 ng/ml) its metabolite EDDP (8 ng/ml) and morphine (MOR) (7 ng/ml).

Discussion

Actually there are no guidelines in HMB which a target DHM target method of screening substances of abuse is included. Information reported in lifestyle questionnaire is considered as valid. HMB donors are sensitized to prevent substance abuse consumption; by this reason results can not be extrapolated to the rest of the population.

Conclusion

Lifestyle questionnaire used during donor selection and pasteurization process does not constitute a measure of toxicological safety. However CAF levels found in DHM are not high enough to produce /cause symptoms in the NB. Nowadays necessary technology exists for toxic screening in HMB. Including urine and hair analysis for donor selection and screening drugs in milk pool before

pasteurization and aliquoted process may guarantee dispensing breast milk without drugs.

Key words

Donated human milk; Human milk banks; Substance abuse; Newborn

ABREVIATURAS

AP	Anfetaminas
AAP	Academia Americana de Pediatría
AEBLH	Asociación Española de Bancos de Leche Humana
API	Ionización de presión atmosférica
BEG	Benzoilecgonina
BLH	Bancos de Leche Humana
BZE	Benzodiacepinas
CAF	Cafeína
CE	Cocaetileno
COC	Cocaína
COD	Codeína
COT	Cotinina
Δ -9-THC	Delta-9-tetrahidrocannabinol
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
EDDP	2-Etilideno-1,5-Dimetil-3,3-Difenilpirrolidina
EME	Ecgoninametilester
ECD	Detección de Captura de Electrones
ESI	Ionización por Electro Spray
FID	Detector de Llama por Ionización
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento
LC	Cromatografía Líquida
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LM	Leche Materna
LMD	Leche Materna Donada
MA	Metanfetamina
MDMA	3,4-metilenedioximetanfetamina
MTD	Metadona

MOR	Morfina
M/P	Relación leche/plasma
MS	Espectrómetro de Masas
NENC	N-etilnorcotinina
NIC	Nicotina
NPD	Detector Nitrógeno Fósforo
NPL	Nalorfina
OMS	Organización Mundial de la Salud
RIA	Radioinmunoensayo
RN	Recién Nacido
THC	Δ 9-tetrahidrocannabinol
THC-OH	Hidroxi-tetrahidrocannabinol
THC-OG	11-hidroxi- Δ 9-tetrahidrocannabinol
THC-COOH	11-nor-carboxi- Δ 9-tetrahidrocannabinol
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
UV	Ultravioleta
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
6-MAM	6-acetilmorfina

SUMARIO

Prefacio y Agradecimientos	V
Resumen	X
Summary.....	XIII
Abreviaturas	XVI
Sumario	XVIII
1 Marco de referencia	20
1.1 Práctica de la lactancia materna.....	21
1.2 Propiedades de la leche materna y beneficios en el RN.....	23
1.3 Bancos de leche, historia y funcionamiento.....	24
1.4 Guías para el procesamiento de leche donada.....	28
1.5 Consumo de sustancias de abuso en la población general.....	33
1.6 Transferencia de drogas a la leche materna y efectos en el recién nacido	36
1.7 Matrices biológicas alternativas	52
1.7.1 Determinación de drogas en leche materna.....	54
1.7.2 Determinación de drogas en pelo.....	55
2 Planteamiento del problema	59
3 Justificación	61
4 Viabilidad del estudio	63
5 Objetivos	65
6 Hipótesis	67
7 Materiales y métodos	69
7.1 Diseño	70
7.2 Variables	70
7.3 Muestras	72
7.4 Metodología analítica	74
7.5 Tamaño de la muestra	75
7.6 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	75
7.7 Descripción de procedimientos.....	75

7.8 Validación de datos	78
7.9 Análisis estadístico	79
7.10 Consideraciones éticas.....	80
8 Resultados.....	81
9 Discusión	89
9.1 Cribado de sustancias de abuso.....	90
9.2 Aplicabilidad y utilidad de los resultados.....	96
9.3 Recomendaciones para el cribado de sustancias de abuso en bancos de leche materna donada.....	97
10 Conclusiones	100
11 Bibliografía	102
12 Anexos	112

1. Marco de referencia

1.1 Práctica de la lactancia materna

En las últimas décadas se han producido avances considerables que han aportado conocimiento científico sobre los beneficios de la alimentación con LM. Esta práctica beneficia al niño, la madre y la comunidad. En 1989, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) hicieron público un comunicado dirigido a los gobiernos: *“Protección, promoción y apoyo de la lactancia natural. La función de los servicios de maternidad”* [1]. En el mismo año, las Naciones Unidas adoptaron la Convención sobre los Derechos de la Infancia, la cual expresa (artículo 24, apartado e) la necesidad de asegurar que todos los sectores de la sociedad, en particular los padres, conozcan las ventajas de la lactancia materna y reciban apoyo para la aplicación de esos conocimientos [2]. Desde entonces se han implementado guías y recomendaciones para los pediatras y otros profesionales de la salud con el fin de promover y asistir el inicio y mantenimiento de la lactancia materna.

Según la encuesta de lactancia materna del Departamento de Salud de la Generalitat de Cataluña, la práctica de la lactancia materna en Cataluña ha ido aumentando respecto los primeros datos recogidos en 1989. En 1989, un 72% de los RN fueron amamantados al nacer; la cifra aumento hasta el 81.8% en 2010 con un 68.8% de los RN con lactancia exclusiva [3]. La lactancia materna a los 6 meses ha pasado de un 6,3% en 1989 a un 46.6% en 2010 (Figura 1).

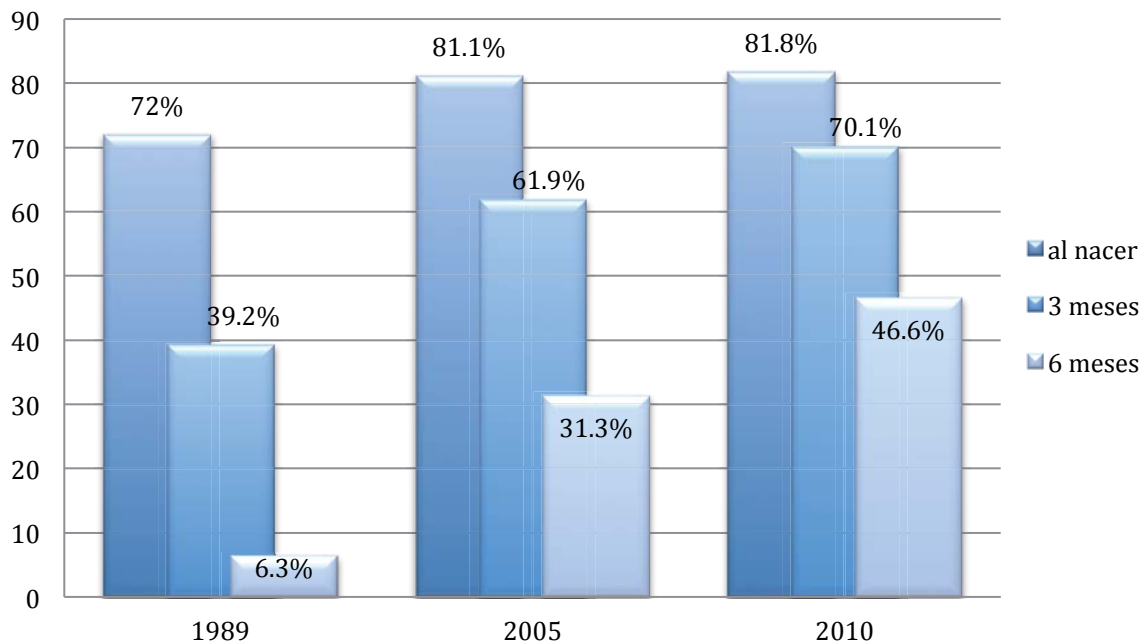


Figura 1. Práctica de lactancia materna en Cataluña.

Se han publicado múltiples estudios que hablan sobre las ventajas inmunológicas, nutricionales, psicológicas, sociales y económicas de la alimentación con LM[4-9]. Por esta razón, la Academia Americana de Pediatría (AAP) publicó en 1997 las recomendaciones de alimentación al seno materno y el uso de LM[9]. La LM posee unas propiedades específicas que la hacen más idónea que todas las fórmulas artificiales. En las madres, la lactancia favorece la disminución del sangrado postparto, la involución uterina gracias al aumento de las concentraciones de oxitocina y ayuda a una temprana recuperación del peso previo al embarazo. A medio y largo plazo, disminuye el riesgo de cáncer de mama y ovario y disminuye del riesgo de osteoporosis y fracturas de cadera en el periodo posmenopáusico[10-12].

1.2 Propiedades de la leche materna y beneficios en el recién nacido

Actualmente son bien conocidas las ventajas de la alimentación con LM comparada con las fórmulas. Otorga ventajas a neonatos sanos, prematuros y enfermos porque, además del vínculo que se crea entre madre e hijo, se transmiten factores inmunoprotectores y de crecimiento ayudando a prevenir complicaciones como la enterocolitis necrosante y sepsis, además de mejorar el cociente de desarrollo[8, 13-19]. Estos beneficios favorecen la disminución de la morbilidad, mortalidad y acortan la estancia en las unidades neonatales. Por tal motivo, la alimentación con LM es recomendada por la OMS y otras sociedades científicas, incrementando su uso en las unidades de cuidados intensivos neonatales.

Sin embargo, no siempre existe suficiente leche disponible de la propia madre para la alimentación de los niños muy prematuros. En estos casos la leche humana donada es la mejor alternativa[9, 13, 20, 21]. Se ha comparado la evolución de neonatos alimentados con LMD o con fórmula suplementaria y se ha concluido que la alimentación con leche donada también otorga los beneficios de la LM[8, 16, 21-23]. Alimentar a los prematuros con LMD permite el inicio temprano de la alimentación al no tener que esperar a que la madre tenga leche propia, los RN presentan una mejor tolerancia al incremento gradual de la alimentación y disminuye el riesgo de enterocolitis necrosante cuando se compara con las fórmulas artificiales. Todo esto se traduce en ofrecer al neonato una alimentación completa (acorde a su peso) a las 36 horas de vida, permitiendo acortar su estancia hospitalaria. También se ha descrito que la tasa de lactancia materna al alta del niño es mayor cuando se dispone de LHD[13, 24]. A largo plazo el uso de LMD disminuye los factores de riesgo cardiovascular la edad adulta, entre ellos una adecuada tensión arterial y los adecuados niveles de lipoproteínas séricas[25]. El periodo neonatal es un periodo ventana crítico para la maduración del sistema inmunológico. La LM

tiene un rol importante en el desarrollo del sistema inmune a través de factores inmunoactivos. Éstos, además de ser oligosacáridos y ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados, son bien conocidos como componentes inmunomoduladores que tienen un rol importante en la prevención de alergias[26-28].

La LM, además de alimento, es un producto biológico y tanto en su procesamiento como en su conservación, precisa de un manejo experto que garantice su seguridad y calidad certificada. En general con la LM, ya sea propia o donada se trabaja desde la perspectiva de la seguridad para que no sea vector de ninguna infección o tóxico que pueda causar al RN algún daño agudo o que afecte a su desarrollo. Integrar el conocimiento de la tecnología de la alimentación durante el procesamiento de la leche debería garantizar su calidad. La puesta en marcha de nuevos bancos de leche permite el procesamiento de la LM para ofrecerla al mayor número de RN atendidos en unidades neonatales.

1.3 Bancos de leche, historia y funcionamiento

La práctica de la lactancia entre los mamíferos es intrínseca a la especie y la alimentación con leche diferente a la de la propia madre está documentada desde 2250 a.C. en el Código de Hammurabi. Durante el transcurso de la historia se encuentran textos que describen a mujeres de diferentes épocas y estatus sociales cediendo el amamantamiento de sus hijos a las nodrizas. Esta práctica milenaria llegó a ocupar hasta una cuarta parte de los anuncios de trabajo donde se implementaban normas de selección de nodrizas. Su popularidad disminuyó de forma importante con el incremento de la mortalidad infantil y su relación con la presencia de enfermedades infecciosas como la sífilis, desapareciendo con la aparición del VIH. El uso de fórmulas artificiales se disparó coincidiendo con la incorporación de la mujer en el mundo laboral y la falta de información acerca de las propiedades de la LM.

Actualmente la mayoría de las unidades de cuidados intensivos neonatales favorecen la lactancia materna almacenando la leche de las madres para alimentar a sus hijos durante su ausencia. Para ofrecer los beneficios científicamente probados de la LM a RN prematuros de mujeres que no pueden dar su leche o cuya producción es insuficiente, se implementan medidas de seguridad y metodologías para la obtención de LMD segura. Se han creado centros especializados donde la leche donada se selecciona meticulosamente, se procesa y almacena en condiciones óptimas. Finalmente, con previos y estrictos controles de calidad, se distribuye según indicación médica[29-32].

Existen 3 modelos diferentes de bancos de leche: 1) Banco de leche comunitario que selecciona donantes, recoge, almacena y procesa LM para destinarla a unidades neonatales externas que la requieran; 2) Banco de leche institucional que funciona para cubrir la demanda de su propia unidad neonatal y 3) Banco de leche institucional con proyección externa. Estos bancos distribuyen leche no solo a su unidad neonatal, sino a la de otros centros hospitalarios.

Los bancos de leche funcionan a nivel mundial desde 1909 con la apertura del primero en Viena. Posteriormente se crean otras redes de BLH que continúan en expansión (Figura 2) [33]:

- European Milk Bank Association
- United Kingdom Association for Milk Banking
- Rede Nacional de bancos de leite humano do Brasil
- Human Milk Banking Association of North America
- Red Iberoamericana de Bancos de Leche Humana
- Asociación Española de Bancos de Leche Humana

Todos estos bancos tienen un objetivo común: suministrar el alimento más fisiológico y beneficioso a los neonatos prematuros y aquellos críticamente enfermos que no tienen acceso a la leche de su propia madre.



Figura 2. Expansión de bancos de leche en Europa 2015

Bancos de leche en España

Actualmente existen 8 bancos de leche activos en España. El primero en Mallorca, el cual se encuentra en funcionamiento desde el año 2001. En 2007 se abrió el de Madrid y posteriormente Valencia, Barcelona, Granada, Aragón y Castilla y León. Estos bancos forman parte de la Asociación Española de Bancos de Leche Humana (AEBLH), una entidad no lucrativa que tiene como finalidad fomentar todas las actividades relacionadas con la obtención, conservación, manipulación y distribución de leche humana para su posterior administración a RN. Asimismo, promueve actividades que favorecen la

lactancia materna. En 2014 la AEBLH reportó la participación de 1315 donantes quienes donaron un total de 4966,8 litros de leche que benefició a 1436 niños de 22 unidades hospitalarias (Figura 3)[34].

	IB	MAD	VAL	ARA	CAT	GRA	EXT	TOTAL
No. Donantes	50	226	161	149	579	116	34	1315
Vol. Donada	189.18	1162.70	825.90	514.00	1640.50	466.48	168.00	4966.80
Vol. Pasteurizada	175.50	1120.95	805.70	437.00	1134.40	394.58	56.00	4124.40
Vol. Distribuída	171.25	1051.56	522.21	319	1090.50	305.33	52	3511.90
No. Receptores	75	456	217	128	455	105		1436
Hospitales receptores	3	1	1	2	10	3	2	22

Figura 3. Datos de actividad Asociación Española de Bancos de Leche Humana 2014

Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre

El 17 de diciembre de 2007 se puso en marcha el BLH del Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre en Madrid. En el primer año de funcionamiento se aceptaron como donantes a 83 mujeres que donaron 489 litros de leche. Se dispensó LMH a 200 niños que estuvieron ingresados en el Servicio de Neonatología de esa unidad hospitalaria. Cuando se adquirió experiencia en el procesamiento de la leche y las necesidades de los recién nacidos ingresados en el 12 de Octubre estuvieron cubiertas, se decidió ampliar el Banco de Leche para poder incrementar el volumen de leche procesada y enviarla a otros centros hospitalarios. En mayo del 2014 se inauguró el nuevo banco de leche que pasó a llamarse Banco Regional de Leche Materna

Aladina-MGU. Hoy en día, más de 1.500 niños de los hospitales 12 de Octubre, La Paz, Puerta de Hierro y Severo Ochoa de Leganés, reciben LMD.

Perfil de mujeres donantes al BLH del Hospital 12 de Octubre

Las mujeres que deciden donar leche a este banco lo hacen de manera altruista. El rango de edad comprende entre los 18 y 42 años (media 33 años), en su mayoría españolas (79%). En el momento de la donación la gran mayoría se encuentra de baja maternal o trabajando a media jornada, lo que permite la participación con el banco de leche. La razón principal que motiva a estas mujeres para la donación de leche es el deseo de ayudar a los RN que la necesitan, ya que un 44.6% de ellas tuvo su hijo ingresado en la unidad neonatal. Otras mujeres deciden donar por tener una producción láctea abundante. Las madres donantes inician las donaciones al cuarto mes del nacimiento de su bebé aproximadamente, momento en que la lactancia está correctamente establecida y las necesidades de su hijo están cubiertas. El periodo promedio de donación es de 6,5 meses. Es interesante destacar que el 65% de las mujeres donantes tienen estudios universitarios. De hecho, está bien descrito que las mujeres con estudios universitarios amamantan con más frecuencia a sus hijos. Es posible que las mujeres con este perfil tengan un mayor acceso al conocimiento sobre los beneficios que otorga la LM y por lo tanto, sean más sensibles a las necesidades de un BLH [35].

1.4 Guías para el procesamiento de leche donada

La leche materna donada no está considerada dentro de la Ley de Trasplantes de Órganos y Tejidos (Real Decreto 1301/2006), tampoco se considera un medicamento ni un producto sanitario. No hay legislación internacional al respecto. Esta es una de las razones por la que no existe consenso internacional en el funcionamiento de los BLH.

Los procesos que siguen los bancos de leche comprenden: 1) selección de donantes, 2) extracción de la leche, 3) congelación y almacenamiento pre-pasteurización, 4) selección previa a la pasteurización (acidez de Dornic, crematocrito, 5) pasteurización, 6) congelación, 7) descongelación y 8) distribución. Los procesos se describen a continuación. Se señalan también las diferencias en el funcionamiento de los distintos bancos de leche.

1. Selección de donantes:

En general los requisitos para ser donante de leche incluyen: demostrar la identidad, donar la leche de forma voluntaria y altruista y estar amamantando satisfactoriamente a tu bebé. La donación se puede iniciar en cualquier momento de la lactancia, pero se recomienda esperar entre 3 y 8 semanas después del parto para que la lactancia esté correctamente establecida. En Brasil, España y otros bancos no hay límite superior en los meses que una mujer puede estar donando porque los controles posteriores permiten clasificar la leche en función de sus diferentes cualidades. En los bancos de leche pertenecientes a la Asociación Norteamericana no se admiten como donantes las madres que lleven más de un año lactando, puesto que con el paso del tiempo se va modificando la composición de la leche y se considera que ya no es apta para los prematuros. Es importante tener un estilo de vida saludable, no ser consumidora de alcohol, tabaco, marihuana, cocaína y otras sustancias psicótropas, así como medicamentos o productos de herboristería contraindicados durante la lactancia. En caso de ser vegetariana estricta (vegana) deberá comprometerse a tomar los suplementos vitamínicos necesarios. Otros requisitos son: disponer de un congelador que alcance -18°C , firmar el consentimiento informado y respetar las instrucciones para la extracción, conservación y transporte de la leche.

Respecto a la transmisión de infecciones existe un triple control: 1) cuestionario de hábitos de vida que excluye las mujeres con hábitos de riesgo, 2) serología

(VHB, VHC, VIH y sífilis) para excluir a las mujeres que pueden transmitir cualquiera de estas infecciones, 3) pasteurización de toda la leche. En relación a las sustancias tóxicas legales o ilegales que puedan estar presentes en la leche donada, el único dato que se recoge es el obtenido en el cuestionario de hábitos de vida.

Extracción de leche

Al ser aceptadas como donantes, se explica y otorga por escrito las normas de extracción y conservación de la leche, haciendo énfasis en la importancia del adecuado control de la cadena de frío. Se suministran sacaleches (si no poseen uno propio), recipientes de cristal estériles, etiquetas para identificar los botes y una nevera portátil para el transporte de la leche. Existen bancos de leche que cuentan con el servicio de recogida de muestras a domicilio. Las normas de higiene que deben seguir las madres antes de la extracción de leche van desde sólo lavado de manos[30, 36, 37] hasta uso de mascarilla y gorro[29]. En cuanto al mejor método de extracción también hay diferencias entre las distintas guías: algunas aceptan todos los métodos, otras prefieren la extracción manual [29]. Las recomendaciones referentes a la limpieza de los sacaleches van desde limpieza con agua y jabón[30] hasta la esterilización después de cada uso [29, 36].

Congelación y almacenamiento pre-pasteurización.

La mayor parte de los bancos de leche, con el fin de conservar la calidad de la leche, establecen un tiempo máximo de congelación (-20°C) pre-pasteurización de 3 meses desde la fecha de extracción. Otros bancos recomiendan un máximo de 15 días [29].

Selección antes de la pasteurización.

La leche que se va a pasteurizar se descongela al baño María bajo vigilancia estricta. La descongelación se suspende en el momento que queda un bloque central de hielo que sea aproximadamente del 50% del total de la leche. Una vez descongelada, lo primero que se hace es olerla buscando alteraciones en las características organolépticas como reflejo de alteraciones en la composición debido al almacenamiento. Las guías inglesas [38], americanas [29], y del PREM Bank de Australia[31] realizan un cultivo microbiológico pre-pasteurización (aceptando el crecimiento de las bacterias saprófitas habituales de la piel en nº menor de 100.000 unidades formadoras de colonias por ml). En cambio, la Red de Bancos de leche de Brasil [39] realiza determinación de la acidez titulable (método Dornic). La leche con una acidez Dornic mayor de 8,0 se desecha por la correlación que existe entre niveles elevados de acidez y crecimiento bacteriano. Además, esta acidez informa de la calidad de la leche, ya que si es baja quiere decir que no ha habido proceso de degradación y por tanto hay mayor biodisponibilidad del calcio y fósforo. Otro procedimiento previo al proceso de pasteurización es la determinación de crematocrito (porcentaje de crema-grasa de la leche), para conocer el contenido calórico de la leche y de esta manera, seleccionar la leche en relación con el contenido calórico e indicarla en situaciones clínicas puntuales donde se requiere leche con un aporte energético preciso.

Pasteurización

Hay unanimidad en todas las guías revisadas[29, 31, 36, 39] sobre el uso de la pasteurización a una temperatura de 62,5°C durante 30 min, con excepción de Noruega, donde la administran cruda. La mayoría no mezclan leches de distintas donantes, excepto las guías americanas. El enfriamiento posterior debe ser lo más rápido posible para evitar la pérdida de propiedades. Durante todo el procedimiento se monitoriza la temperatura de la leche en un recipiente

testigo y se registra. Tras la pasteurización, todos realizan un control microbiológico. No hay reportes sobre los cambios cualitativos o cuantitativos que pueden sufrir los xenobióticos, incluyendo las drogas de abuso y sus metabolitos, al ser sometidos a un proceso de pasteurización.

Congelación tras pasteurización

La leche ya pasteurizada se conserva congelada a -20°C hasta el momento de su dispensación. No existe unanimidad en el tiempo límite para conservar la leche. La guía de Brasil [39] indica períodos de hasta 6 meses para su utilización, guardada a una temperatura de -18 °C; la PREM Bank de Australia [31] establece un máximo de 3 meses y la guía inglesa entre 3 y 6 meses [30].

Descongelación de la leche donada

La mayoría de las guías desaconsejan el uso del microondas para la descongelación [29-31] debido al riesgo de sobrecalentamiento y con ello de pérdida de calidad y sobrecrecimiento bacteriano. La Red de bancos de Brasil [39] permite su uso, combinándolo con la utilización de una tabla de conversión de tiempos perfectamente definidos para asegurar que no se produzca el sobrecalentamiento. Las guías británicas [30] recomiendan la descongelación en la nevera y durante un tiempo máximo de 24 horas. Si la descongelación es a temperatura ambiente no debe exceder las 4 horas.

Administración de la leche humana tras descongelación

Los niños prematuros suelen requerir una sonda orogástrica para la administración de leche, de forma intermitente o continua mediante bombas de alimentación. Habitualmente se cambia la jeringa cada 4 horas, tiempo máximo que puede permanecer la LM a temperatura ambiente [29,39]. Ninguna guía hace referencia a la posible pérdida de calidad de la leche administrada por

sonda. Una revisión Cochrane del 2011 concluye que a partir de la limitada información disponible hasta la fecha, no se pueden determinar los beneficios y los riesgos clínicos de la alimentación continua o intermitente por sonda nasogástrica[40].

Receptores de leche materna donada

Los receptores habituales de leche donada son los niños prematuros menores de 32 semanas de gestación o menores de 1.500 g, cuyas madres no pueden proporcionar suficiente leche. Otros receptores son niños con enfermedad quirúrgica abdominal, cardiopatías con bajo gasto cardiaco y otras enfermedades con riesgo de enterocolitis necrosante. La administración se hace siempre bajo prescripción médica. Al tener la leche clasificada en función de la acidez y el crematocrito, se puede buscar la que mejor convenga para cada receptor en función de sus necesidades.

En definitiva, existe una falta de consenso y de pruebas en muchos de los procedimientos que conforman la donación de leche, desde la selección de donantes a la administración. Existe una falta de estudios al respecto teniendo en cuenta que la leche donada se proporciona a RN críticamente enfermos y por tanto sus procedimientos deberían estar estandarizados no solo para garantizar la seguridad, sino también para confirmar que se mantiene su calidad nutricional e inmunológica. Ninguna de las guías habla sobre el tamizaje de consumo de drogas de madres donantes de leche, aspecto importante para la certificación de calidad de esta leche.

1.5 Consumo de sustancias de abuso en la población general

El consumo de sustancias de abuso continúa siendo un problema de salud pública. El tabaco y el alcohol siguen siendo las sustancias psicoactivas

mayormente consumidas. Más del 25% de la población mundial es fumadora. En la Encuesta Nacional de Salud del 2011, se concluyó que, entre los españoles mayores de 15 años, había un 24% de consumo diario y un 3,1% ocasional; un 19,6% se identificó como ex fumador. Desde 1993 el porcentaje de población que consume tabaco a diario muestra un continuo descenso. La puesta en vigor de la Ley del Tabaco en 2010 amplió la prohibición de fumar en espacios públicos cerrados y colectivos, disminuyendo considerablemente la exposición al humo del tabaco de la población no fumadora[41]. El consumo de alcohol permanece constante, 52,7%, de los cuales un 6,2% son grandes consumidores de alcohol [42]. En España la prevalencia del consumo de alcohol (30 días previos a la entrevista) es del 74% para los hombres y 52,2% para las mujeres (Figura 4).

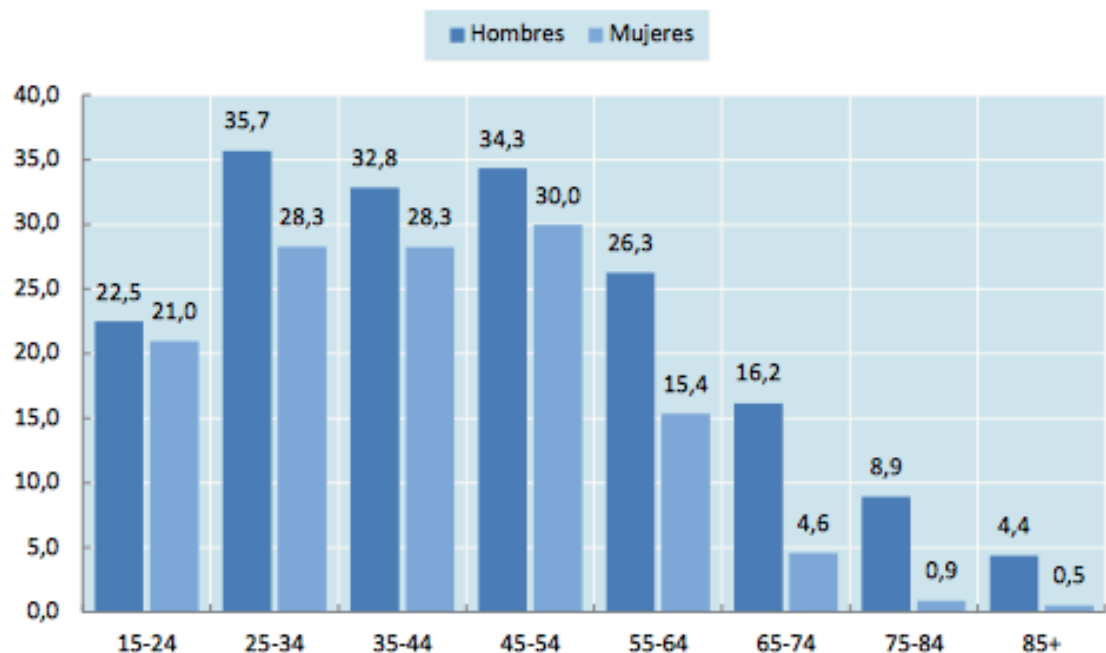


Figura 4. Consumo diario de alcohol por sexo y grupo de edad, en la población española de 15 años y más (Encuesta Nacional en Salud 2011/2012).

Según la Encuesta Nacional de Salud y Uso de Drogas de los Estados Unidos del 2014, 27 millones de personas mayores de 12 años refirieron un consumo de drogas ilícitas los 30 días previos a la encuesta. Esta cifra representa el porcentaje más alto (10,2%) registrado desde el año 2002. El cannabis es la droga ilícita más consumida. En Estados Unidos un 8,4% de los mayores de 12 años lo consumen[42], mientras que en España la Encuesta sobre el uso de Drogas reportó un consumo del 7,6% en personas entre 15 y 64 años[41]. (Figura 5)

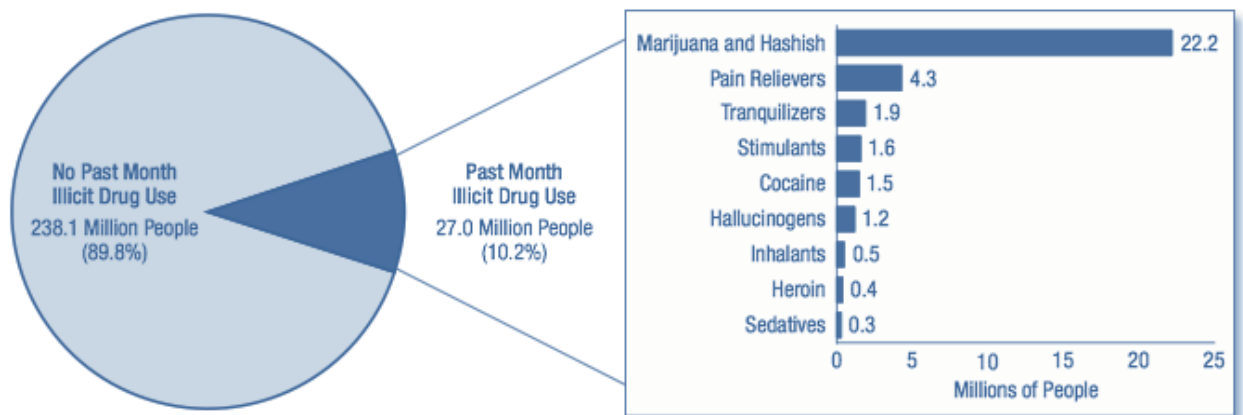


Figura 5. Consumo de drogas ilícitas según la Encuesta Nacional de Salud y Uso de Drogas de los Estados Unidos 2014.

Las prevalencias de consumo en mujeres han aumentado considerablemente en los últimos tiempos. El 10,8% de las mujeres embarazadas entre 15 y 44 años consumen alcohol, el 26,7% tabaco y el 5,4% otras drogas ilícitas[42]. Los estudios de consumo de sustancias de abuso no reportan prevalencia de consumo en mujeres lactantes.

1.6 Transferencia de drogas a la leche materna y efectos en el recién nacido

La mayoría de sustancias de abuso lícitas e ilícitas que ingiere una mujer lactante pasan en cierto porcentaje a la LM y pueden modificar su producción, volumen y composición. La transferencia de drogas a la LM ocurre, en la mayoría de las ocasiones, por difusión pasiva; sin embargo algunas otras pueden pasar a la leche mediante transporte activo[43]. Dependerá entonces de las características físico-químicas de la droga: su afinidad por la unión a proteínas plasmáticas, ionización, grado de lipofilicidad y su peso molecular. En general, la baja afinidad por las proteínas, el bajo peso molecular, la alta lipofilicidad, el pH bajo y el alto contenido de lípidos facilitan su excreción[44].

Existe mucha confusión entre la comunidad científica respecto los efectos a corto y largo plazo que pueden ocasionar las drogas en los RN alimentados con LM. Esta es la razón por la cual las medicaciones tienden a ser restringidas y limitadas durante el periodo de lactancia; también se aconseja a las mujeres lactantes que reduzcan el consumo de bebidas con CAF y eviten el consumo de tabaco y drogas de abuso.

Existen muchos casos clínicos reportados que hablan sobre RN alimentados con leche materna que presentan síntomas de intoxicación secundaria al consumo materno de ciertas sustancias, tales como irritabilidad, vómito, sedación respiratoria y shock[45-48]. Sin embargo, hay pocos estudios en mujeres lactantes y sus hijos que evalúen el riesgo real del consumo de sustancias por parte de la madre. El objetivo de medir los xenobióticos y/o sus metabolitos en LM es conocer la cantidad de droga excretada a través de la leche para poder calcular la dosis ingerida por el niño.

La concentración de la droga en la leche depende directamente de la dosis ingerida, la duración del consumo, la cantidad total de excreción de leche por día, la salud materna y su genotipo. La mayoría de los xenobióticos pasan de la circulación sanguínea a la leche en una relación plasma/leche distinta según sus características químicas. Algunas sustancias como la cocaína o las anfetaminas se concentran de forma muy importante en la leche porque son bases débiles y la leche es ligeramente más ácida que el plasma.

El RN es un organismo en desarrollo, las transformaciones fisiológicas siguen su curso a medida que el niño crece. En el neonato los sistemas metabólicos y de eliminación son inmaduros; la mayor parte de las reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, conjugación, acetilación y metilación se encuentran disminuidas. Otros sistemas de metabolización de drogas como las enzimas hepáticas P450 y CYP3A7, pasan del 40% al 100% de la función del adulto al mes de vida[49]. Por esta razón los neonatos tienen una menor capacidad para metabolizar drogas. Éstas se acumulan, aumentan su vida media y pueden alcanzar niveles potencialmente tóxicos. La excreción renal de drogas depende de la filtración glomerular y la secreción tubular. La tasa de filtración glomerular del RN a término, es tan solo el 25% de la del adulto; no es hasta los 3-5 meses de edad cuando se incrementa. La función tubular madura más lentamente que la tasa de filtración glomerular[50].

El padecimiento de ciertas patologías (colestasis, resección intestinal, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, hipo o hipertiroidismo) así como la administración de otros fármacos pueden modificar la absorción, metabolismo y eliminación de ciertas sustancias.

En los primeros meses de vida, el RN es muy vulnerable a los xenobióticos porque su sistema nervioso central está todavía en fase de desarrollo. Por ejemplo, la migración de las neuronas de los hemisferios cerebrales, que empieza aproximadamente a la sexta semana de gestación, continúa hasta los

5 meses después del nacimiento[51]. Existe una creciente preocupación por la exposición de drogas psicoactivas durante el embarazo y el postparto, ya que se ha demostrado que la mayoría pueden afectar el correcto desarrollo del cerebro y de otros órganos del RN.

La relevancia de realizar determinaciones de xenobióticos en leche materna es conocer su concentración y poder predecir, de esta manera, el riesgo al que se enfrenta un bebé alimentado con leche contaminada.

La exposición de drogas en los neonatos por medio de la leche depende de la relación (M/P), la cantidad de leche ingerida y la capacidad de aclaramiento.

La cantidad de leche ingerida por un RN es de aproximadamente 150 ml/kilo/día. Conociendo las concentraciones de una determinada droga en la LM, podemos calcular la cantidad consumida por el neonato al día.

Dosis = concentración de sustancia en LM x Volumen ingerido (kg/día)

En caso de no conocerse las concentraciones de droga en la LM, la dosis podría ser calculada a partir de la concentración plasmática materna de la droga, la relación M/P y el total de leche ingerida por día.

Dosis RN= [] droga en plasma materno X M/P X Vol. Leche ingerida

A pesar de toda la información publicada acerca de los riesgos relacionados con el uso de drogas, las tasas de consumo de sustancias de abuso en mujeres en edad fértil y lactantes siguen siendo altas. A continuación se cita una lista de drogas de uso común y sus efectos en el RN.

Nicotina

La NIC tiene una absorción rápida y es metabolizada a COT, trans-3-hydroxy-COT y COT-N-oxido. La NIC y sus metabolitos pueden pasar a la leche a través de las células epiteliales de la glándula mamaria. Es una base débil ($pK_a^1=8.0$) y se concentra en la leche ligeramente ácida (pH 6.8) a través de la captura de iones. La vida media ($t_{1/2}$) de la NIC en plasma es ligeramente más alta (aproximadamente 2 horas); la concentración de COT permanece constante durante un intervalo de 4 horas sin fumar. La concentración de NIC en la leche es de 1.5 a 3 veces más alta que la concentración plasmática simultánea de la madre[52], sin embargo, solo el 10% de la dosis de NIC materna es excretada a través de la LM [53].

En la década de los noventa se realizaron estudios de cohorte en mujeres lactantes fumadoras, se midió simultáneamente la NIC y su principal metabolito (COT) en leche materna y en la orina de los lactantes con el objetivo de estimar la cantidad de metabolitos de la NIC que se incorporan a la leche[54]. Estos estudios concluyeron que la fuente principal de exposición a la NIC en RN es la LM, seguido del consumo pasivo por la exposición al humo del tabaco. Existe una relación directamente proporcional entre las concentraciones de CAF en LM y el número de cigarrillos fumados por día además de una correlación lineal entre las concentraciones de COT y NIC en plasma y LM [52].

Las metodologías descritas para la determinación de NIC incluyen: cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo (GC-NPD), cromatografía líquida de alto rendimiento con detección ultravioleta (HPLC-UV), cromatografía líquida con detección UV y detector de arreglo de diodos (LC-UV/DAD) y cromatografía líquida-ionización por electrospray acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC/ESI/MS/MS)[43]. La aplicación de estas técnicas ha permitido estimar el consumo medio de NIC a través de la LM

(7 µg/kg/día) [55] y otras características útiles para el análisis químico de la NIC y sus metabolitos.

Efectos adversos

Los hijos de madres fumadoras presentan más cólicos, están más predispuestos a infecciones respiratorias y su tasa respiración/saturación de oxígeno posterior a la alimentación se ve disminuida[56]. Existen estudios acerca del síndrome de abstinencia en RN de madres con historia de tabaquismo intenso[57]. Vagnarelli utilizó la técnica LC/ESI/MS/MS en el diagnóstico del síndrome de abstinencia por NIC en un RN que presentaba crisis de temblores y rigidez; la madre tenía historia de tabaquismo intenso. La determinación de NIC reveló concentraciones altas de NIC en cabello de la mamá y del niño. Al mes de vida el lactante continuaba con un patrón intermitente de los síntomas que se relacionó con niveles fluctuantes de NIC en diferentes sesiones de lactancia generando un síndrome de abstinencia postnatal a la NIC.

Recomendaciones

En la Declaración del Comité de Drogas de la AAP (1994) se concluyó que la NIC está contraindicada en la lactancia debido a que causa disminución en la producción de leche y disminuye, consecuentemente, la ganancia de peso del lactante. Un estudio realizado a madres lactantes y sus hijos concluyó que lactar y fumar es menos perjudicial que alimentar con biberón y fumar[58]. Las estrategias para minimizar el daño son: 1) suspender el consumo de tabaco, si es posible; 2) prolongar el espacio de tiempo entre el consumo de un cigarrillo y la lactancia para minimizar la exposición; 3) someterse a un tratamiento con parches de NIC; 4) emplear medidas para disminuir la exposición del RN al humo del tabaco como fumar fuera de casa y evitar lugares donde el consumo de tabaco sea elevado.

Cafeína (CAF)

Es conocido que las mujeres embarazadas y lactantes consumen grandes cantidades de CAF en bebidas como café, té y refrescos de cola; también en medicamentos (prescritos o no). La CAF se transfiere rápidamente a la leche materna, llegando a los niveles pico 1 o 2 horas tras su consumo [59]. Las concentraciones plasmáticas pueden variar en función de la absorción y eliminación de cada individuo. Las concentraciones que pasan del plasma a la LM son aproximadamente del 1% y podrían tener poca repercusión clínica. Sin embargo, se produce también la transferencia total de xantinas que pueden tener repercusiones clínicas; representan el 18% de la dosis materna de CAF [60].

La dosis promedio de CAF en lactantes después de un consumo alto de CAF (6-8 tazas = 750 mg/día) por parte de la madre es de 0,6 -0,8 mg/kg/día[61]. Es importante remarcar que la CAF se utiliza como estimulante respiratorio en el tratamiento de la apnea del prematuro a una dosis de 5 mg/kg/día. Su eliminación es menor en el RN por su inmadurez en la vía hepática N-demetilación, haciendo que los prematuros hijos de mujeres que consumen grandes cantidades de CAF puedan acumular dosis con potenciales efectos tóxicos.

Las metodologías que se han empleado para determinar los niveles CAF en LM son: GC-NPD, HPLC-UV, LC-UV/DAD, y el único método disponible capaz de dar resultados confirmatorios y legales es la MS por su alta sensibilidad; requiere además solo 1 ml de muestra para un análisis de corto tiempo[43].

Efectos Adversos

Los síntomas en lactantes expuestos a altas dosis de CAF incluyen: irritabilidad, vómito y alteraciones en el patrón del sueño[46].

Todos los estudios realizados para la determinación de CAF en LM coinciden en que la concentración media observada se encuentra entre 47-4.000 ng/mL, lo que representa una dosis para el lactante de entre 7 y 600 μ l/kg/día. No existen muchos estudios en la literatura que relacionen los niveles de CAF con efectos adversos en el neonato. Solamente el caso de un RN, hijo de una consumidora de mate durante el embarazo y la lactancia, presentó síndrome de abstinencia neonatal severo durante 3 semanas después del nacimiento, caracterizado por irritabilidad intermitente. Se cuantificó CAF 666 ng/ml por medio de LC/MS/MS [62].

Recomendaciones

La AAP considera que el consumo de CAF puede ser compatible con la lactancia [63], su uso ocasional parece tener poco efecto en los bebés alimentados con leche materna. Se aconseja restringir el consumo a menos de 300 mg/día (aproximadamente 3 tazas de café) durante la lactancia debido a la vida media prolongada de la CAF en el RN.

Alcohol

A pesar de que se conocen ampliamente los efectos del consumo de alcohol durante el embarazo, un estudio realizado en el Hospital del Mar en Barcelona[64], encontró que el 45.7% de las mujeres que acudieron al hospital por trabajo de parto habían consumido grandes cantidades de alcohol durante el embarazo. El riesgo de consumir alcohol durante la lactancia no está bien definido, sin embargo pueden presentarse efectos adversos como alteraciones en el desarrollo motor [65], cambios en el patrón del sueño, disminución en el consumo de leche [66], falta de ganancia ponderal, hipoglucemia inducida por alcohol y sedación cuando los niveles plasmáticos maternos alcanzan los 300

mg/dl[67]. Un consumo agudo excesivo puede provocar coma y convulsiones en el lactante.

Pese a que aumenta discretamente los niveles de prolactina, el consumo agudo de alcohol inhibe la secreción de oxitocina de la madre y por tanto el reflejo de eyección de la leche, reduciendo su producción entre un 10 y un 25%. El alcohol pasa fácilmente a la leche materna en concentraciones similares a las plasmáticas ($M/P \cong 1$) [68], lo que significa que el lactante está expuesto sólo a una fracción del consumo de la madre[69]. Sin embargo, durante la primera semana de vida, los RN metabolizan el alcohol de forma más lenta que los adultos [6]. La eliminación del alcohol sigue una cinética de orden cero, por lo que beber agua, el reposo y bombear la leche, no acelera su eliminación. Diferente a lo que pasa con el alcohol de la orina que queda almacenado en la vejiga, el alcohol no permanece en la LM, sino que es constantemente movilizado hacia el torrente sanguíneo [65].

Para estimar el tiempo requerido para la eliminación del alcohol de la leche posterior al consumo materno, se diseñó un nomograma basado en las propiedades farmacocinéticas del alcohol, la dosis consumida y el peso materno[65].

Maternal weight		Drinks											
kg	lb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
40.8	90	2:50	5:40	8:30	11:20	14:10	17:00	19:51	22:41				
43.1	95	2:46	5:32	8:19	11:05	13:52	16:38	19:25	22:11				
45.4	100	2:42	5:25	8:08	10:51	13:34	16:17	19:00	21:43				
47.6	105	2:39	5:19	7:58	10:38	13:18	15:57	18:37	21:16	23:56			
49.9	110	2:36	5:12	7:49	10:25	13:01	15:38	18:14	20:50	23:27			
52.2	115	2:33	5:06	7:39	10:12	12:46	15:19	17:52	20:25	22:59			
54.4	120	2:30	5:00	7:30	10:00	12:31	15:01	17:31	20:01	22:32			
56.7	125	2:27	4:54	7:22	9:49	12:16	14:44	17:11	19:38	22:06			
59.0	130	2:24	4:49	7:13	9:38	12:03	14:27	16:52	19:16	21:41			
61.2	135	2:21	4:43	7:05	9:27	11:49	14:11	16:33	18:55	21:17	23:39		
63.5	140	2:19	4:38	6:58	9:17	11:37	13:56	16:15	18:35	20:54	23:14		
65.8	145	2:16	4:33	6:50	9:07	11:24	13:41	15:58	18:15	20:32	22:49		
68.0	150	2:14	4:29	6:43	8:58	11:12	13:27	15:41	17:56	20:10	22:25		
70.3	155	2:12	4:24	6:36	8:48	11:01	13:13	15:25	17:37	19:49	22:02		
72.6	160	2:10	4:20	6:30	8:40	10:50	13:00	15:10	17:20	19:30	21:40	23:50	
74.8	165	2:07	4:15	6:23	8:31	10:39	12:47	14:54	17:02	19:10	21:18	23:26	
77.1	170	2:05	4:11	6:17	8:23	10:28	12:34	14:40	16:46	18:51	20:57	23:03	
79.3	175	2:03	4:07	6:11	8:14	10:18	12:22	14:26	16:29	18:33	20:37	22:40	
81.6	180	2:01	4:03	6:05	8:07	10:08	12:10	14:12	16:14	18:15	20:17	22:19	
83.9	185	1:59	3:59	5:59	7:59	9:59	11:59	13:59	15:59	17:58	19:58	21:58	23:58
86.2	190	1:58	3:56	5:54	7:52	9:50	11:48	13:46	15:44	17:42	19:40	21:38	23:36
88.5	195	1:56	3:52	5:48	7:44	9:41	11:37	13:33	15:29	17:26	19:22	21:18	23:14
90.7	200	1:54	3:49	5:43	7:38	9:32	11:27	13:21	15:16	17:10	19:05	20:59	22:54
93.0	205	1:52	3:45	5:38	7:31	9:24	11:17	13:09	15:02	16:55	18:48	20:41	22:34
95.3	210	1:51	3:42	5:33	7:24	9:16	11:07	12:58	14:49	16:41	18:32	20:23	22:14

Time is calculated from the beginning of drinking. Assumptions made: alcohol metabolism is constant at 15 mg/dl; height of the women is 162.56 cm (5 feet, 4 inches). 1 drink = 340 g (12 oz) of 5% beer or 141.75 g (5 oz) of 11% wine or 42.53 g (1.5 oz) of 40% liquor.

Example 1: for a 40.8-kg (90-lb) woman who consumed 3 drinks in 1 h, it would take 8 h 30 min for there to be no alcohol in her breast milk, but for a 95.3-kg (210-lb) woman drinking the same amount, it would take 5 h 33 min.

Example 2: for a 63.5-kg (140-lb) woman drinking 4 beers starting at 8.00 p.m., there would be a zero level of alcohol in her breast milk 9 h 17 min later (i.e. at 5.17 a.m.).

Figura 6. Alcohol y lactancia. Tiempo estimado entre el consumo de alcohol y su ausencia en LM

Recomendaciones

La AAP considera que beber alcohol podría ser compatible con la lactancia si se establecen niveles de alcohol en leche materna que no representen riesgos para el lactante. Como ninguna cantidad de alcohol es segura para los lactantes, se recomienda entonces que las madres lactantes retrasen las tomas de leche hasta asegurarse que ya no hay alcohol en la leche. Las estrategias para minimizar el riesgo son: alimentar al bebé antes de beber alcohol y esperar 2 o 3 horas después del consumo para poder alimentarlo nuevamente. Las

grandes consumidoras de alcohol o consumidoras crónicas deben abstenerse de lactar a sus hijos.

Cannabis

El consumo de cannabis es muy frecuente, su uso recreacional se ha extendido en la población femenina en edad reproductiva; además es también usado como tratamiento de depresión, ansiedad y dolor. Normalmente, el cannabis se ingiere o se fuma, pero también puede ser consumido por lactantes a través de la leche materna. El compuesto principal de la marihuana es el 9-delta-tetrahidrocannabinol (Δ -9-THC o THC). Es altamente liposoluble y se distribuye rápidamente en el cerebro y tejido adiposo; se une fácilmente a las proteínas plasmáticas. EL THC se excreta a la leche materna donde puede acumularse; se metaboliza en el hígado y debido a la circulación entero-hepática, su liposolubilidad tiene una vida media de 20 a 36 horas y puede extenderse hasta 4 días en consumidores crónicos [70]. El cannabis sufre una biotransformación a través de la hidroxilación; los productos derivados son los responsables de la psicoactividad del cannabis. Los lactantes, mediante la LM, consumen aproximadamente el 0.8% de la dosis materna (dosis/kg). Los efectos a corto plazo que presentan los RN después de la exposición a THC son: sedación, letargia, debilidad y baja ingesta de leche[47]. Aunque no se conozcan los efectos a largo plazo, podría teóricamente haber una afectación en el desarrollo cerebral. Algunos estudios sugieren que la exposición del RN durante el primer mes de vida puede repercutir en el desarrollo psicomotor del niño al año de edad [71].

El análisis de cannabis en LM puede realizarse mediante LC/MS.

Recomendaciones

La APP considera que el cannabis está contraindicado durante la lactancia. En caso de que la madre consuma esporádicamente debe esperar varias horas para poder alimentar a su bebé y evitar exponerlo al humo de la marihuana.

Cocaína (COC)

El consumo de COC en Estados Unidos y Europa se ha incrementado considerablemente. Sus formas de administración son en general: inyectada, inhalada y fumada. La COC se distribuye fácil y rápidamente a la leche materna [59]. La vida media en humanos es cerca de 1 hora, por lo que su distribución a la LM es rápida. La COC se metaboliza en aproximadamente 12 metabolitos farmacológicamente inactivos, los más importantes son benzoilecgonina (BEG) y ecgoninametil-ester (EME). La COC y sus metabolitos pueden encontrarse en la orina de los lactantes a las 24-36 horas tras su exposición. La colinesterasa sérica de los RN es menor que en los adultos para metabolizar COC y como resultado puede acumularse. (Los niveles de colinesterasa sérica son más bajos en el RN respecto al adulto, con lo que la capacidad de metabolizar la COC es menor, dando como resultado, su acumulación).

En el primer caso reportado de intoxicación neonatal por COC, se relacionó la intoxicación con la transferencia de COC a través de la LM., El cuadro clínico se caracterizaba por: irritabilidad extrema, temblores, pupilas dilatadas, taquicardia, hipertensión [48]. La cocaína puede cuantificarse en la leche materna pero también, con sus metabolitos, en la orina del RN mediante GC-MS [72].

Recomendaciones

La AAP recomienda que el consumo de COC sea completamente abandonado durante la lactancia materna.

Anfetaminas (AP)

Las anfetaminas son bases débiles con un peso molecular relativamente bajo, características que les permiten pasar fácilmente a través de membranas celulares, tejidos o sustratos biológicos con un pH más bajo que la sangre, como es la leche[43]. Es importante diferenciar los derivados MA (*speed*) con sus formas sintéticas MDMA (éxtasis). Su eliminación se lleva a cabo a través de la vía hepática y renal; su vida media es de 6 a 12 horas.

Los RN alimentados con leche materna con anfetaminas pueden presentar alteraciones en la conducta, irritabilidad, alteraciones en el patrón del sueño, agitación, llanto [56], e incluso muerte súbita del lactante [73].

Las técnicas empleadas para la determinación de anfetaminas en leche materna son la GC-FID y HPLC-UV.

Recomendaciones

La AAP contraindica la lactancia si la madre consume anfetaminas.

Opioides

1. Heroína

Derivado de la morfina, su uso se incrementó a partir de los años 90. La vía de administración más común es la intravenosa seguida por la inhalación. Es un compuesto liposoluble con una vida media de 15 a 30 minutos, rápidamente hidrolizada por el 6-MAM en el hígado, cerebro, corazón y riñón; posteriormente es convertida a morfina [43]. La Morfina es metabolizada en el hígado y excretada por los riñones en forma de glucurónido o en su forma libre. La vida media de la MOR es de 2-3 horas. A dosis terapéuticas los opioides como la

MOR, meperidina, MTD y codeína son excretadas en mínimas cantidades y pueden ser compatibles con la lactancia materna [74]. La heroína se excreta en la LM en cantidades suficientes para ocasionar adicción en el lactante[59]. Los síntomas clínicos característicos de la intoxicación en el neonato son temblores, inquietud, vomito, rechazo al alimento [75]. Sin embargo existe la publicación de 1 caso en un lactante de 2 meses de edad con letargia, hipertonia y opistótonos tras la alimentación con LM de una madre consumidora de heroína[76].

No existen metodologías descritas para la detección de heroína en LM.

Recomendaciones

La AAP considera contraindicado el uso de heroína durante la lactancia.

2. Metadona (MTD)

Utilizada en programas para el tratamiento de dependencia a narcóticos. Comparada con otros narcóticos, la MET tiene una tasa menor de efectos eufóricos y su vida media larga (1-18horas) permite la disminución progresiva de la dosis. Tiene alta afinidad a las proteínas plasmáticas y su concentración plasmática pico se alcanza entre 2 -4 horas tras la administración de la dosis. Es un compuesto lipofílico que se excreta a través de la LM [43]. La principal ruta de eliminación es a través del metabolismo hepático por el citocromo P450 y las isoenzimas CYP3A4 y CYP2B6. Los hijos de madres tratadas con metadona durante el embarazo pueden experimentar síndrome de abstinencia si la lactancia materna se suspende abruptamente[77]. Por tal motivo se aconseja destetar gradualmente del seno materno. Existen evidencias que indican que la dosis de MET que pasa a la LM es insuficiente para causar efectos adversos en el RN [78].

Las metodologías empleadas para la determinación de MET son: GC-GC-MS, GC-MS, HPLC-UV, LC-APCI-MS/MS

Recomendaciones

Desde el 2001, la AAP considera la MET compatible con la lactancia materna a cualquier dosis materna[9]. Esto alienta a algunas madres consumidoras de heroína a iniciar un tratamiento de mantenimiento con MET.

3. Buprenorfina

Utilizada como tratamiento de reemplazo en adictos a la heroína. Comparada con la MTD, provee mejor estabilidad para la madre y causa menos síntomas del síndrome de abstinencia del RN [79]. En estudios realizados por Lindemalm et al, se encontró que la dosis a la cual se exponía el RN era el 1% de la dosis materna [80]. No hay indicación para discontinuar la lactancia en mujeres en tratamiento con buprenorfina.

La determinación es posible a través de extracción en fase sólida (SPE) y HPLC-MS con ionización de presión atmosférica (API).

4. Codeína (COD)

Es un analgésico comúnmente utilizado para aliviar el dolor postparto. La codeína se considera una pro-droga ya que sus propiedades analgésicas dependen de su biotransformación a MOR mediante la acción del citocromo CYP2D6. El uso de codeína puede causar efectos adversos en el SNC del RN como debilidad, apneas y cianosis. Hay estudios que midieron las concentraciones libres de COD y MOR mediante radioinmunoensayo (RIA) concluyendo que el uso moderado de codeína durante la lactancia es seguro[81]. Existe una relación dosis respuesta entre el uso materno de codeína y los síntomas del SNC del bebé.

Hasta el momento la AAP concluye que el uso de codeína es compatible con la lactancia.

5. Morfina (MOR) y tramadol

La morfina y el tramadol son dos opioides usados en el manejo de dolor post-cesárea. Se han realizado determinaciones de tramadol en LM para evaluar su tasa de transferencia. Los niveles observados ($112\mu\text{kg}$) se encuentran por debajo de la dosis utilizada ($1000\mu\text{kg}$) en pacientes pediátricos post-operados. Por lo tanto se concluye que el uso de tramadol en periodos cortos, es compatible con la lactancia materna [43]. Los estudios que han evaluado la transferencia de MOR y su metabolito activo M6G a la LM han determinado que el consumo de MOR por el RN a través de la LM no es significativa.

Benzodiazepinas (BZEs)

La benzodiazepinas son drogas frecuentemente prescritas en mujeres durante el embarazo y después del parto [82]. El 30% del uso de benzodiazepinas es se hace sin prescripción. Según la farmacocinética, se dividen en tres categorías: de larga, intermedia y corta acción. Tras su consumo, estas drogas aparecen en la LM con una relación M/P de 0.5:1. Las concentraciones de las benzodiazepinas de vida larga se pueden medir en plasma y otros tejidos como el cerebro. Durante los primeros meses de vida la metabolización de estas sustancias es baja debido a la inmadurez renal y hepática. El efecto principal de estas drogas es la alteración de la función de neurotransmisores que participan en el desarrollo del SNC. No se han relacionado efectos adversos en neonatos expuestos a benzodiazepinas de corta acción.

Las BZEs de larga acción, como el diazepam y sus metabolitos pueden acumularse en los RN y causar letargia, sedación, pérdida de peso; estos efectos ceden rápidamente cuando se suspende la lactancia materna [83]. La

descontinuación abrupta de la lactancia en hijos de madres consumidoras pueden ocasionar síndrome de abstinencia.

Las metodologías empleadas para la determinación de BZEs incluyen HPLC-UV, GC-MS-NCI, LC-ECD.

La AAP clasificó a las BZEs en el grupo de drogas cuyos efectos en niños alimentados con LM no son claros. Se recomienda evitar dosis repetidas altas o esquemas compuestos durante la lactancia.

Antidepresivos

Cada año en los Estados Unidos, más de 250 mil mujeres tratadas con antidepresivos desean practicar la lactancia materna [84]. Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina son frecuentemente la primera opción para el tratamiento de la depresión. La principal preocupación sobre la exposición de los lactantes a estas sustancias a través de la LM, es saber si sus niveles de serotonina pueden alterarse y perturbar su neurodesarrollo. Los diversos estudios que se han realizado midiendo las concentraciones de antidepresivos (tricíclicos, sertralina, paroxetina, doxepina) en leche y en plasma materno y neonatal, señalan que su paso a la LM corresponde aproximadamente al 1%, sin causar efectos adversos en el neonato[43]. Uno de los antidepresivos más estudiados en la leche materna es la fluoxetina. Su absorción es rápida y completa (100%) y se convierte rápidamente a su metabolito activo, la norfluoxetina. La fluoxetina tiene una $t_{1/2}$ de 48 a 72 horas, y la $t_{1/2}$ de la norfluoxetina es de 360 horas. Las dos pueden encontrarse en LM mediante LC-ECD. No hay evidencia sobre efectos adversos evaluados a los 12 meses de seguimiento; existe únicamente la publicación de un caso de un RN con cólico severo, vómito, llanto e irritabilidad, síntomas que se relacionaron con la ingesta de la LM; los síntomas desaparecieron tras la discontinuación de la lactancia [85].

1.8 Matrices biológicas alternativas

Hasta los años 80, para analizar la presencia de drogas en el cuerpo humano se utilizaba básicamente el plasma o la orina. La limitación principal de estas matrices es que sólo nos informan del consumo de sustancias en las últimas horas o días [86]. En las dos últimas décadas ha ganado importancia el uso de otros fluidos y matrices para medir las concentraciones de tóxicos en el cuerpo. Son las llamadas matrices alternativas o no convencionales y comprenden: pelo, leche materna, fluido oral o sudor. En los RN puede obtenerse meconio, pelo y orina neonatal. Incluso puede determinarse la presencia de sustancias de abuso en placenta y líquido amniótico [87].

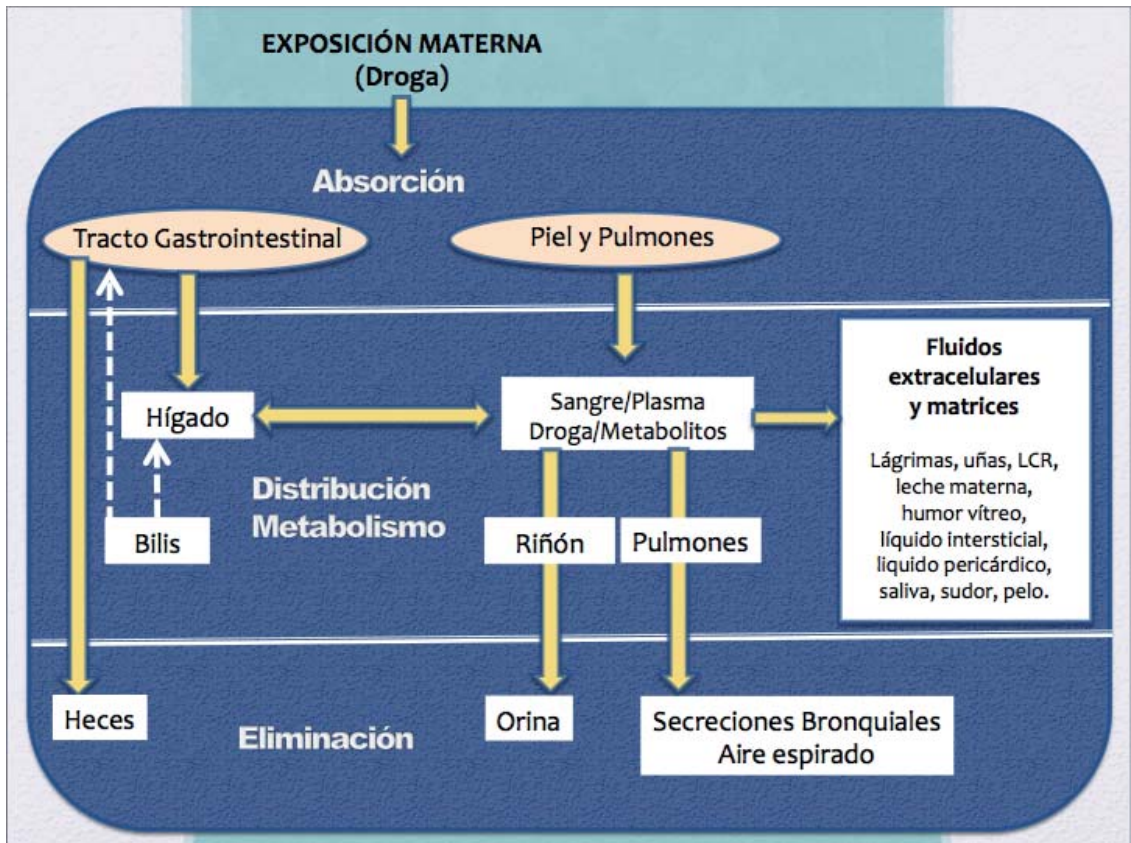


Figura 4 Esquema de distribución de drogas en el cuerpo humano

Cada una de estas matrices tiene unas características diferentes (concentración de las sustancias y sus metabolitos, ventanas de detección, cantidad de muestra disponible, etc.) lo que hace que tengan diferentes utilidades.

Para detectar la posible presencia de sustancias de abuso en donantes y en LM, los bancos de leche deben integrar en sus guías de actuación las metodologías necesarias para la detección de biomarcadores de drogas. Estos marcadores deberían estar presentes, en una matriz biológica mínimamente invasiva y de fácil recolección: orina, pelo y leche materna.

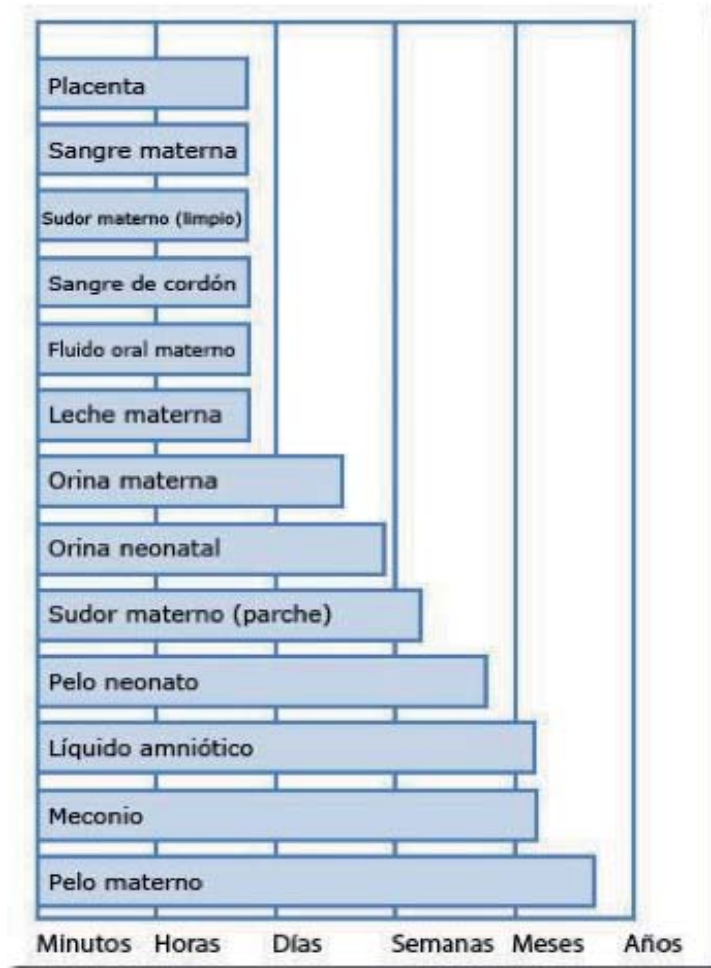


Figura 8. Ventana de detección para diferentes matrices biológicas

Leche materna como matriz alternativa

La leche humana es una matriz alternativa que ha sido empleada para documentar exposición aguda a drogas en neonatos. Esta matriz biológica tiene como ventaja su nula invasividad, sin embargo, aporta solo información en una ventana reducida de tiempo, desde algunas horas hasta 1 día después de la exposición a una sola dosis de sustancias como NIC, COT, CAF, COC, MOR y heroína. Otras drogas como el cannabis y las anfetaminas pueden detectarse días o meses tras su consumo [43].

La obtención de drogas en LM representa un reto analítico debido a su alta cantidad de proteínas y grasas. La principal razón para investigar la presencia de xenobióticos en la leche humana es la de calcular la excreción de determinados tóxicos en este fluido y consecuentemente, conocer la dosis aproximada ingerida por el RN para ofrecerle un tratamiento oportuno y aconsejar a la madre sobre la importancia de no consumir sustancias de abuso durante la lactancia.

Se han publicado diversos métodos para la determinación de sustancias de abuso en LM [43]. La mayor parte de las pruebas analizan un número limitado de sustancias de la misma clase puesto que no se contaba con la LC-MS-MS para su determinación.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem es una metodología validada, empleada para cuantificar en LM y otras matrices biológicas, drogas lícitas (CAF, NIC y COT) e ilícitas (COC, opiáceos, cannabinoides y AP) de manera simultánea. Tiene un proceso de extracción simple y la determinación es rápida, lo que la hace ideal para ser empleada en bancos de leche donde se procesan un gran número de muestras.

Pelo

El pelo está constituido aproximadamente por un 65-95% de proteínas, 1-9% de lípidos, pequeñas cantidades de oligoelementos, polisacáridos y agua. El folículo piloso está recubierto por un rico sistema vascular envolvente que proporciona el material necesario para el crecimiento del cabello [88].

La ventana de detección de sustancias de abuso en cabello depende de su longitud. El cabello más largo permite ampliar la ventana de detección de meses o hasta años. El cabello crece aproximadamente entre 0,6 y 1,4 cm por mes, dependiendo del tipo de pelo y el lugar anatómico en que se encuentre

[89, 90].

El resto del vello corporal puede también utilizarse como matriz para la detección de drogas y se ha sugerido como alternativa cuando la recogida del pelo de cuero cabelludo no es posible. Sin embargo, la diferente tasa de crecimiento y la circulación sanguínea del lugar donde se encuentre, puede hacer que varíen las concentraciones respecto a las de cabello [90, 91].

Las sustancias de abuso se pueden incorporar al pelo por 3 vías: 1) desde el torrente sanguíneo en el proceso de crecimiento del pelo; 2) desde el sudor y posterior recubrimiento por el sebo, y 3) por la exposición pasiva a las sustancias de abuso, como por ejemplo, contacto con el humo o contaminación del sudor [92]. La captación de drogas por el pelo depende de la cantidad de melanina que contenga el cabello; la acidez y lipofilia de la molécula. Se piensa que las sustancias de abuso se unen a la melanina, lo que explicaría que las mayores concentraciones se alcancen en el pelo más oscuro [93].

El pelo debe cortarse lo más cerca posible del cuero cabelludo con tijeras, en la zona posterior de la cabeza donde el pelo crece más rápido y de forma más uniforme, y donde existe el mayor número de folículos pilosos activos. Posteriormente, el pelo se fija en un soporte de papel y se indica la zona proximal (más cercana al cuero cabelludo) para poder llevar a cabo un análisis segmentario. Después, la muestra se puede almacenar a temperatura ambiente y protegida de la luz directa (Figura 9).

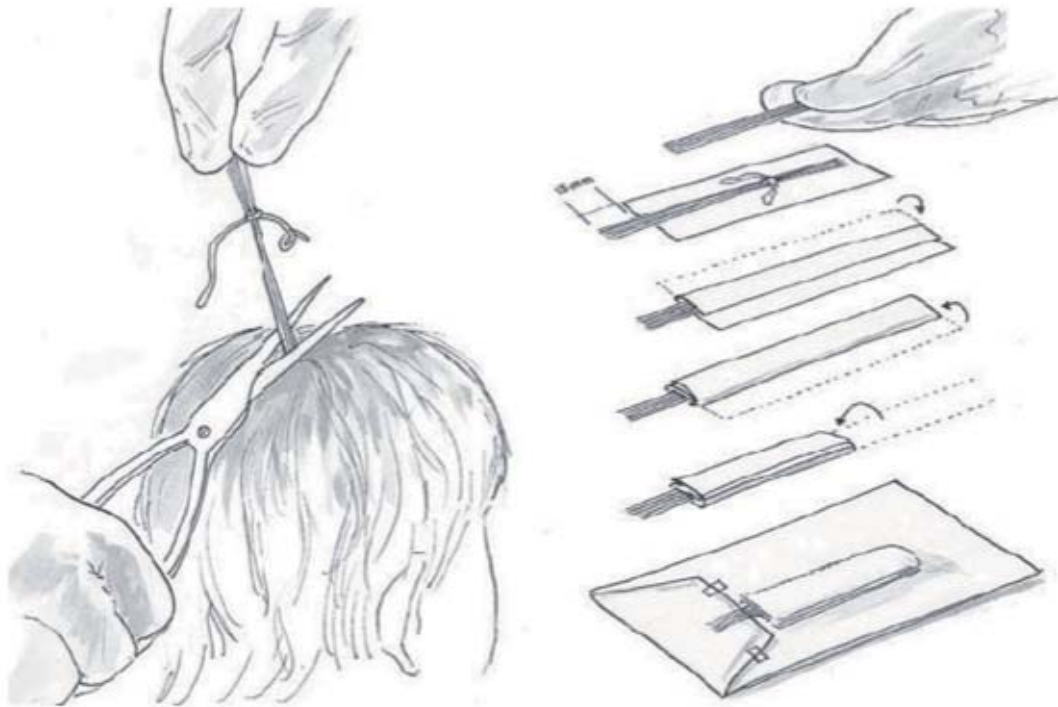


Figura 5. Técnica para recogida y almacenamiento de pelo

Las sustancias de abuso pueden permanecer de forma indefinida en el pelo [94], pudiendo ser detectadas al cabo de años después de la recogida [88]. Existen factores que pueden afectar al análisis toxicológico como jabones, tratamientos cosméticos, polvo, luz solar o lluvia[95, 96].

Para minimizar el riesgo de la contaminación ambiental del pelo se recomienda que previo a los procedimientos de análisis toxicológico se incluya un proceso de lavado. Existen varios procedimientos de descontaminación de la muestra descritos en la literatura que abarcan desde el uso de disolventes orgánicos, tampones acuosos, agua y jabones hasta combinaciones de éstos [97, 98].

La mayor ventaja práctica que nos ofrece el análisis toxicológico en pelo respecto el análisis efectuado en orina o en sangre es la mayor ventana de tiempo de detección. La evaluación de la exposición crónica a sustancias de abuso se realiza mediante el análisis segmentario del pelo. El pelo crece a un

ritmo aproximado de 1 cm por mes, con lo cual es posible asociar patrones de distribución de sustancias en el pasado teniendo en cuenta la tasa de crecimiento del pelo.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) es la técnica confirmatoria más ampliamente utilizada para analizar sustancias de abuso en cabello. Antes del análisis cromatográfico, los analitos deben ser extraídos del interior de la matriz y concentrados en un disolvente compatible con los instrumentos de análisis. No existe un método universal para extraer los analitos de la matriz del cabello, y depende de la naturaleza química y la estabilidad del compuesto a analizar. Por lo tanto, opiáceos y COC son los compuestos que mejor se extraen utilizando una hidrólisis ácida leve, a fin de evitar la conversión de la heroína o la 6-MAM a MOR o de la COC a BE [99]. Por otro lado, los compuestos anfetamínicos o cannabinoides pueden ser extraídos utilizando fuertes condiciones alcalinas[100].

Estas técnicas analíticas aplicadas al análisis del pelo tienen la ventaja de presentar una elevada sensibilidad y selectividad, alcanzando precisiones del 89% y límites de detección en el rango de los ng/mg a los pg/mg.

2. Planteamiento del problema

Ante la necesidad de ofrecer a los RN prematuros y a los RN enfermos los beneficios científicamente probados que otorga la LM, la obertura de bancos de leche sigue en aumento. Es fundamental que estos bancos de leche funcionen con guías y protocolos que garanticen la distribución de leche segura y de calidad. Hasta el momento, no existen recomendaciones que indiquen la realización de un cribado objetivo para la detección de sustancias de abuso en LMD. Actualmente se cuenta con las herramientas de biotecnología necesarias para el estudio de LMD tanto a nivel microbiológico como toxicológico, repercutiendo directamente en la salud y pronóstico de los RN.

3. Justificación

A partir de la realización de una revisión sistemática de las diferentes guías de los BLH, se ha observado la inexistencia de un cribado de sustancias de abuso durante el proceso de selección de donantes de LM. La información obtenida sobre el consumo de sustancias potencialmente tóxicas proviene únicamente de los cuestionarios de hábitos de vida. Las respuestas de las madres pueden estar influenciadas por diversos factores: la falta de confianza hacia el personal sanitario, el temor a las consecuencias de admitir el consumo de drogas de abuso y la subestimación de la autopercepción de consumo. Un estudio descriptivo de la presencia de xenobióticos en un banco de leche permite conocer si la seguridad toxicológica está bien cubierta por el cuestionario aplicado durante la selección de donantes. Este estudio no pretende conocer la prevalencia del consumo de estas sustancias a nivel poblacional ya que se trata de una muestra muy específica de mujeres. Nos interesa evaluar el nivel de exposición a tóxicos al que están sometidos los RN a través de su única fuente de alimentación, la leche humana pasteurizada. Los resultados de este estudio permitirían sustentar la necesidad de realizar un cribado toxicológico en las mujeres donantes y su leche. La difusión de estos resultados a otros bancos de leche, podría realizarse fácilmente por medio de redes como la Asociación Española de Bancos de Leche Humana, que a su vez está en relación con las asociaciones europea, norteamericana y brasileña. Por otro lado, el conocimiento de este estudio puede ayudar a concienciar al personal sanitario del papel negativo (los efectos adversos) de los tóxicos y promover el abandono de su consumo en mujeres embarazadas y lactantes.

No existen estudios toxicológicos realizados en bancos de leche. Preocupa, por tanto, que esta leche destinada a RN muy prematuros o críticamente enfermos contenga tóxicos que puedan causar efectos perjudiciales como los ya descritos anteriormente.

4. Viabilidad del estudio

Este trabajo de investigación se realiza en colaboración con el Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre en Madrid, inaugurado en el año 2007. Durante el primer año de funcionamiento se recolectaron 489 litros de LMD proveniente de 83 mujeres. La cantidad de donantes se han ido incrementado anualmente; en 2014 el banco de leche distribuyó 1.551 litros de leche a RN de 4 unidades neonatales. Las muestras se obtienen de este banco de leche, después de la firma del consentimiento informado por parte de las mujeres participantes, que acceden a dar una pequeña cantidad de leche y cabello para trabajos de investigación.

El equipo del Grup de Recerca Infància i Entorn (GRIE) del IMIM posee amplia experiencia en la detección de tóxicos en matrices alternativas como la leche y cabello.

5. Objetivos

Objetivo principal

Evaluar la seguridad toxicológica de la LMD en función de distintos procedimientos de selección de donantes y de procesamiento de la leche.

Objetivos secundarios

- Analizar la concentración de tóxicos encontrados en la leche materna donada y su posible repercusión en el neonato.
- Justificar la realización de un cribado de drogas en la selección de las donantes de leche y durante el procesamiento de la leche.
- Elaborar recomendaciones para el cribado de sustancias de abuso en BLH.

6. Hipótesis

Los procedimientos utilizados a día de hoy en los BLH para garantizar la seguridad y calidad de la leche no contemplan el cribado de tóxicos de forma objetiva. El consumo de drogas en la población, incluyendo mujeres en edad fértil, sigue siendo un problema de salud pública. La información recabada sobre patrones del consumo a través de la aplicación del cuestionario de hábitos de vida puede estar sujeta a un grado de subjetividad importante de las madres, por lo que es posible encontrar diferencias entre los resultados de este cuestionario y la determinación objetiva a través de metodologías validadas como la LC-MS-MS. Las concentraciones medidas a través de estas técnicas permiten evaluar el grado real de exposición en los RN que reciben LMD. Los datos obtenidos de este estudio permiten justificar la realización de un cribado de sustancias de abuso en bancos de leche.

7. Materiales y métodos

7.1 Diseño

Se trata de un estudio descriptivo, abierto y transversal, a partir de muestras de leche, cabello y orina procedentes de donantes del banco de leche del Hospital 12 de Octubre en Madrid.

7.2 Variables

a) Variables independientes

- **Edad**

Naturaleza de la variable: cuantitativa

Escala de medición: razón

Unidad de Medición: años cumplidos

Análisis estadístico descriptivo: Promedio \pm DE

- **Nacionalidad**

Naturaleza de la variable: cualitativa

Escala de medición: nominal

Definición operacional: 1) España, 2) Europa, 3) Norteamérica, 4) Centro y Sudamérica, 5) Otros

Análisis estadístico descriptivo: Frecuencia y porcentaje

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

- **Escolaridad:**

Naturaleza de la variable: cualitativa

Escala de medición: nominal

Definición operacional: 1) básica, 2) bachillerato, 3) superior

Análisis estadístico descriptivo: Frecuencia y porcentaje

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

- **Parto prematuro/término:**

Naturaleza de la variable: cualitativa

Escala de medición: nominal

Definición operacional: 1) prematuro, 2) término (> 37 semanas)

Análisis estadístico descriptivo: Frecuencia y porcentaje

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

- **Consumo de CAF:**

Naturaleza de la variable: cualitativa

Escala de medición: nominal

Definición operacional: 1) si, 2) no

Análisis estadístico descriptivo: Frecuencia y porcentaje

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

- **Número de bebidas con CAF consumidas:**

Naturaleza de la variable: cuantitativa

Escala de medición: razón

Unidad de Medición: número de bebidas con CAF consumidas por día

Análisis estadístico descriptivo: Promedio \pm DE

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

- **Medicación con CAF:**

Naturaleza de la variable: cualitativa

Escala de medición: nominal

Definición operacional: 1) si, 2) no

Análisis estadístico descriptivo: Frecuencia y porcentaje

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

- **Numero de muestras donadas:**

Naturaleza de la variable: cuantitativa

Escala de medición: razón

Unidad de Medición: número de muestras donadas

Análisis estadístico descriptivo: Promedio \pm DE

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

- **Estado de maduración de la leche al momento de la donación:**

Naturaleza de la variable: cualitativa

Escala de medición: nominal

Definición operacional: 1) calostro, 2) intermedia 3) madura

Análisis estadístico descriptivo: Frecuencia y porcentaje

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

b) Variables dependientes

- **Pasteurización:**

Naturaleza de la variable: cualitativa

Escala de medición: nominal

Definición operacional: 1) si, 2) no

Análisis estadístico descriptivo: Frecuencia y porcentaje

Análisis estadístico analítico: Coeficiente de Correlación de Pearson

7.3 Muestras (Figura 10)

Se analizan 543 muestras de leche materna:

- 470 pasteurizadas
- 73 crudas

Se recogen y analizan:

- 36 muestras de cabello
- 54 muestras de orina.

El estudio se divide en dos etapas:

1. En el primer periodo comprendido entre enero y junio 2010, 63 de 64 mujeres aceptan participar en el estudio, se recogieron 400 muestras de leche pasteurizada junto a 34 muestras más que se analizan antes y después del proceso de pasteurización.

2. En un segundo tiempo, entre agosto 2010 y febrero 2012, se explica el objetivo del estudio a 57 mujeres de las cuales 36 aceptan participar y firman el consentimiento informado para el cribado de sustancias de abuso en LM y cabello (anexo 2).

Se analizan 54 muestras de orina, que se recogen durante el proceso de selección de donantes.

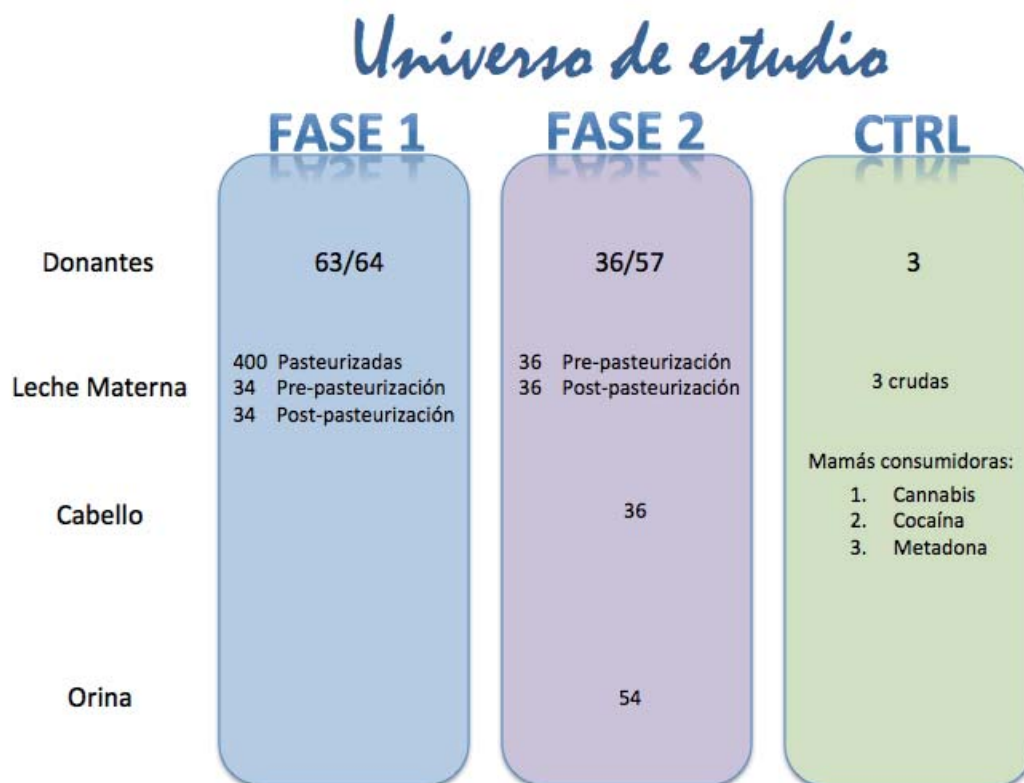


Figura 6 Matrices biológicas y donantes incluidas en el estudio.

Como control, se analiza la leche de 3 mujeres consumidoras de cannabis, COC y MET respectivamente.

7.4 Metodología analítica

Para la detección y cuantificación de sustancias de abuso y sus metabolitos en LM y orina se emplea la técnica de LC-MS/MS. Las muestras de cabello se estudian mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Analitos

Morfina (MOR), codeína (COD), 6-acetilmorfina (6-MAM), 2-etileno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), metadona (MTD), cocaína (COC), benzoilecgonina (BZE), cocaetileno (CE), nalorfina (NLP), 11-nor-carboxi- Δ 9-tetrahidrocannabinol (THC-COOH), 11-hidroxi- Δ 9-tetrahidrocannabinol (THC-OH), Δ 9-tetrahidrocannabinol (THC), naftaleno-1-yl- (1-pentilindol-3-yl), metanona (JWH-018), anfetamina (AP), metamfetamina (MA), 3,4-metilenedioxi-metanfetamina (MDMA), 3,4-metilenedioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenedioxilpropilanfetamina (MDPA) son suministrados por la LGC Standards Promochem (Milan, Italia). Nicotina (NIC), cotinina (COT), cafeína (CAF) y N-etilnorcotinina (NENC) son suministrados por Sigma-Aldrich (Milan, Italia). NLP, JWHC18, MDPA y NENC son utilizados como estándares internos relacionados estructuralmente para diferentes clases de drogas.

Los estándares deuterados (MOR-d3, COC-d3, BZE-d3, THC-COOH-d3, AP-d5, MDMA-d5 y COT-d3) fueron suministrados por LGC Standards Promochem (Milan, Italia).

7.5 Tamaño de la muestra

Se trata de un estudio piloto ya que no se conoce la prevalencia de consumo entre las mujeres donantes de leche materna. Se analizan las 543 muestras de leche, 36 de cabello y 54 de orina.

7.6 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión.

1. Ser donante del Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre de Madrid.
2. Firmar la hoja de consentimiento informado.

Criterios de exclusión.

Negativa de las mujeres donadoras para participar en el estudio (no firma de la hoja de consentimiento informado).

Criterios de eliminación:

Mala conservación o transporte inadecuado de las muestras.

7.7 Descripción de procedimientos

Recogida de las muestras

El banco de leche selecciona las donantes, aplica el cuestionario de hábitos de vida (ver anexos) y recoge una muestra de orina.

Una vez aceptada como donante, se realiza la extracción de leche de acuerdo a las guías de actuación.

Se invita a las madres a participar en el estudio con una donación de 5ml de leche. A algunas madres, además de la muestra de leche, se les propone donar cabello.

La autorización de participación al estudio se realiza mediante la firma de un consentimiento informado (ver anexo 2). Las muestras de cabello se cortan según la metodología descrita.

Las muestras de orina y leche obtenidas (crudas y pasteurizadas) se mantienen en congelación a -20°C hasta su envío al IMIM (Barcelona) mediante contenedores refrigerados y nieve carbónica para la determinación de tóxicos mediante análisis cromatográfico.

Determinación de tóxicos en leche y orina

El análisis toxicológico se realiza mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, utilizando un sistema de HPLC (Waters, Etten-Leur, The Netherlands) acoplado a micromass quattro microo API triple quadrupole mass spectrometer (Waters). La separación cromatográfica se realiza mediante columna Eclipse XDB-C8 (100 3,00 mm, 3,5 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La fase móvil consta de un gradiente formado por una solución (A) 50 mM de formato de amonio, pH 5,0 y una solución (B) compuesta por acetonitrilo. Programado de la siguiente manera: inicialmente 95% de la solución A mantenida durante 3 minutos, posteriormente se mantiene al 70% en 5 minutos, se mantiene al 70% por 3 minutos y, finalmente se incrementa a un 95% durante 9 minutos. El flujo se fija a 0,5 ml/min. Los solventes cromatográficos se desgrasan con helio previamente a su

uso. La temperatura de la columna se mantiene a 30°C. Los espectros de MS y MS/MS de los compuestos en estudio se adquieren de la siguiente manera.

Las muestras se disuelven en metanol a una concentración de 10 mg/l, se infunden al HPLC mediante un sistema de bomba-jeringa; eso provee un flujo de 10 ml/min para sintonizar el espectrómetro de masas y optimizar los parámetros de adquisición. Se utilizan las siguientes condiciones optimizadas: energía de colisión en un rango entre 15 y 20 eV, con un voltaje capilar a 3,0 kV, voltaje en cono a 25 V, fuente de temperatura a 1.208 °C, temperatura de desolvatación a 4.008 °C. El flujo de gas de cono y de solvatación se establece a 50 y 400 L/h respectivamente.

Los límites de detección para cada analito son los siguientes: CAF 3 ng/ml; NIC 2 ng/mL; COT 2 ng/ml; MOR 1,5 ng/ml; 6 acetil-MOR 1ng/ml; codeína 1 ng/mL, Anfetamina 2 ng/ml; 3,4-metilenedioxi-metanfetamina 2,5 ng/ml; metaanfetamina 1 ng/ml; 1 ng/mL benzoilecgonine y COC 1 ng/ml; cocaetileno 2 ng/ml; 1 nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol 1 ng/ml; 11-Hydroxy- Δ-tetrahydrocannabinol y delta-9-terahidrocarbocannabinol 1,5 ng/ml; MET 2 ng/ml, 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-defenilpirrolidina (MET) 2,5 ng/ml.

Determinación de tóxicos en pelo

Para disminuir el riesgo de detectar sustancias por exposición pasiva, las muestras de pelo se someten a descontaminación mediante lavado con diclorometano por 15 minutos en baño ultrasónico. Posteriormente se corta en trozos pequeños para digerirse en condiciones ácidas o alcalinas dependiendo las determinaciones a realizar. Se emplea cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los límites de cuantificación en pelo son: para acetilmorfina, MOR y codeína 0,2 ng/ml; COC, benzoilecgonina y cocaetileno 0,5 ng/ml; Anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenedioxyafetamina y 3,4-metilenedioxi-metanfetamina 0,2 ng/ml; 9-tetrahydrocannabinol 0,1 ng/ml y 0,002

ng/mg para 11-nor-carboxi-9-tetrahidrocannabinol cuando se empleaban 40 mg de pelo.

7.8 Validación de los datos

Primera etapa (enero a junio 2010)

Se realizan 3 grupos de estudio.

1. Muestras pasteurizadas (n = 400), en búsqueda de tóxicos en la leche que está preparada para administrarse a RN.
2. Muestras pre y post-pasteurización (n = 34), para analizar los posibles efectos de la pasteurización en caso de encontrarse tóxicos.
3. Muestras de madres que refirieren consumo de drogas de abuso (cocaína y cannabis (n = 2) y una muestra de una mujer en tratamiento de mantenimiento con metadona. Estas últimas tres muestras se incluyen con el fin de validar la metodología desarrollada.

Para la validación de la técnica, se realizan determinaciones utilizando leche materna libre de tóxicos en la cual se agregan los analitos a estudiar. Posteriormente se realiza el análisis de las 3 muestras procedentes de mujeres consumidoras (cannabis, cocaína y metadona).

Finalmente se realiza la determinación de drogas en las 543 muestras procedentes del banco de leche del Hospital 12 de Octubre.

Segunda etapa (agosto 2010 a febrero 2012)

Se analizan 3 matrices biológicas:

1. Leche cruda (n = 36) y pasteurizada (n= 36), en búsqueda sustancias de abuso y su posible alteración ante la pasteurización.
2. Muestras de cabello (n = 36), en búsqueda de sustancias de abuso que puedan revelar un consumo crónico en las candidatas donantes de leche y permita evaluar una posible correlación con las determinaciones en LM.

3. 54 muestras de orina, recabadas durante el proceso de selección de donantes para hacer un análisis descriptivo de los hallazgos. Otorga información de consumo en un periodo ventana corto (horas máximo, 1 día).

7.9 Análisis estadístico

La base de datos y el análisis estadístico se realiza con Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.15 (Stat-point Technologies Inc, Warrenton, Virginia).

- Se realiza un análisis estadístico descriptivo de las participantes presentadas en porcentajes.
- Las variables continuas con distribución normal se presentan con media y desviación estándar.
- Para verificar la normalidad de distribución de los datos bioquímicos se emplea la prueba de Kolmogorov-Smirnov.
- Se expresan las concentraciones medias y su intervalo de confianza (IC 95%) de drogas ilícitas, biomarcadores de tabaco y CAF en las 3 matrices biológicas.
- El número promedio de muestras de leche por donador se expresa como media y IQR por no tener una distribución normal.
- Para las medidas de correlación se emplea la correlación de Spearman.
- El acuerdo (la relación) entre el consumo referido y los resultados obtenidos por LC-MS/MS se determina mediante coeficientes kappa.
- Los valores de sensibilidad y especificidad se expresan con un intervalo de confianza de 95% para drogas ilegales, NIC y CAF.
- Los niveles de CAF se categorizan en 4: bajos (0 ng/ml), medios (1-165 ng/ml), altos(166-625 ng/ml) y muy altos (> 625 ng/ml).
- Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0,05$

7.10 Consideraciones éticas

- Se solicita consentimiento escrito de las madres para utilizar en este estudio una pequeña cantidad de la leche donada.
- Para garantizar la confidencialidad, se garantizan los principios de la Declaración de Helsinki y de la Ley de Protección de Datos y todas las muestras se manejan de forma anónima, se registran con códigos numéricos y no se guarda ningún tipo de registro que pueda identificar de que madres proceden las muestras de leche incluidas en el estudio.
- El protocolo para la recogida de muestras y su análisis fue aprobado por el comité ético del Hospital 12 de Octubre y el comité ético del Hospital del Mar.

8. Resultados

Primera etapa

Se incluyen 63 de las 64 mujeres que aceptan participar en el estudio. La edad promedio es de $35,7 \pm 4,75$ años con un rango de edad entre 23 y 53 años. La mayor parte de las donantes (50/63) han tenido embarazos a término (>37 semanas) y el 62% (39/63) son primíparas.

Un 85,7% (54/63) de las madres son de nacionalidad española, un 12,7% (8/63) provienen de Centro y Sud-América y 1/63 de otro estado miembro de la Unión Europea.

El promedio de donaciones al banco de leche fue de $13,4 \pm 4$ (IQR, 2-6). La distribución del estado de maduración de la leche fue el siguiente: 52 mujeres donaron leche materna madura; 4 madura e intermedia; 2 calostro e intermedia; 4 calostro; y una mujer donó leche en las 3 fases, calostro, intermedia y madura (Figura 11).

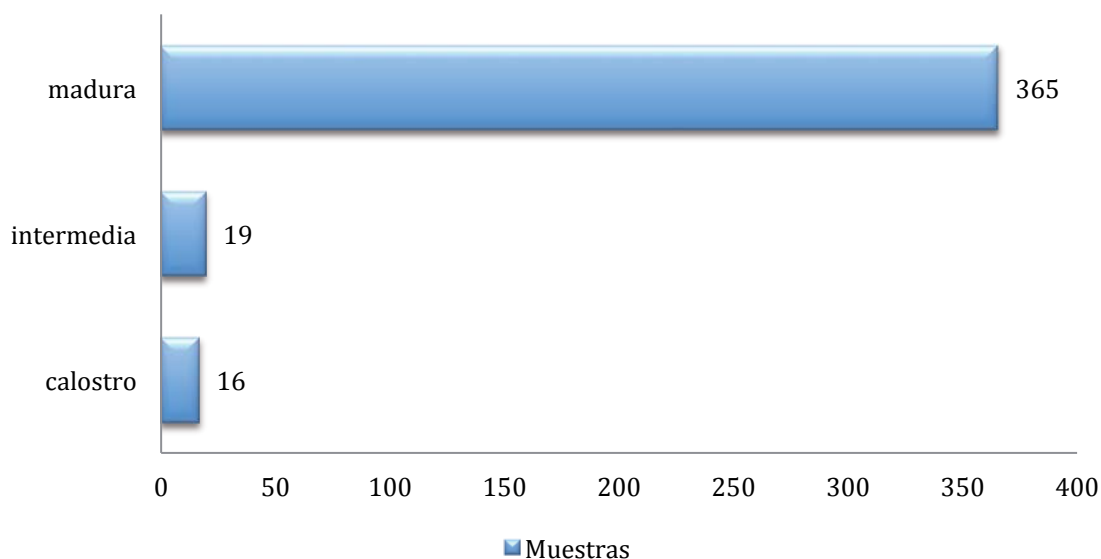


Figura 7. Estado de maduración de las muestras de leche materna donada

No se detecta la presencia de drogas ilegales en la leche analizada, esto concuerda con las respuestas del cuestionario aplicado durante el proceso de selección de donantes. La tasa de falsos-negativos para el consumo de drogas ilícitas mediante la aplicación de cuestionario es del 0%, con un 100% de especificidad.

Nicotina

En una muestra de leche madura se detecta NIC (46,1 ng/mL) y su metabolito COT (138,6 ng/mL). Esta muestra pertenece a una madre que ha donado otras 102 muestras de leche para el estudio que han sido negativas para drogas legales e ilegales. Ninguna de las donantes manifiesta ser fumadora activa en el cuestionario, ya que se considera un criterio de exclusión para la donación.

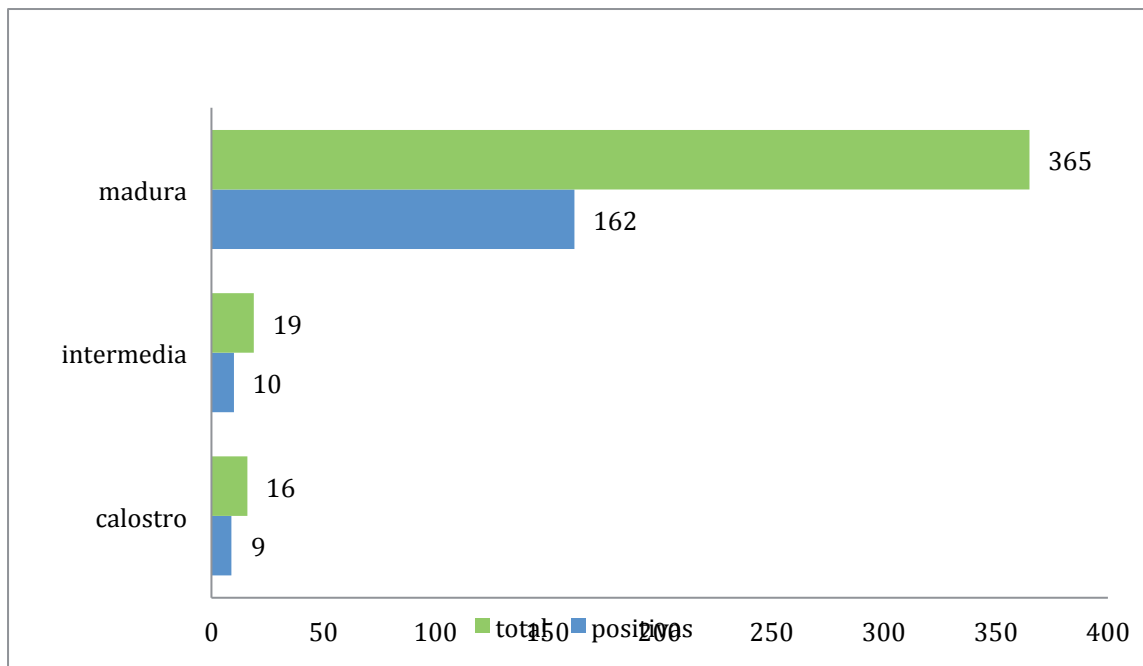


Figura 8. Estado de maduración de la leche de las muestras positivas a CAF

Cafeína

Se ha cuantificado CAF en el 45,3% de las muestras (181/400) con una concentración media de 496 ± 778 ng/mL (IC 95%, 382-609; rango, 0-7564).

La positividad observada, de acuerdo al estado de maduración de la leche, fue la siguiente: 56,2% calostro, 52,6% intermedia y 44,4% madura (Figura 12).

Se ha encontrado CAF en un 11,7% (4/34) de las muestras analizadas pre y post-pasteurización. No se observan diferencias en la concentración de CAF antes y después del proceso de pasteurización.

Un 40% de las donantes (25/63) refieren haber consumido bebidas con cafeína (café, té o sodas). El promedio de consumo reportado es de $1,46 \pm 0,52$. No se describen casos de toma de medicamentos que contengan CAF.

De las 22 madres que han dado leche durante al menos 22 meses, solamente en un caso se observa una relación entre los niveles de CAF cuantificados ($P=0,03$) y el momento de extracción de la leche. Los niveles de CAF en LM han ido aumentando a medida que ha aumentado el tiempo de la donación.

La relación entre el consumo de CAF referido en el cuestionario y el analizado en la leche mediante LC-MS/MS se muestra en la siguiente tabla.

Consumo de bebidas con cafeína referido	Prueba para donadores de leche (gold standard)		
	Positivo	Negativo *	Total
Si	21	4	25
No	24	14	38
Total	45	18	63

*Por debajo del límite de detección del método (3ng/mL)

Figura 9. Consumo de bebidas con CAF referido y presencia de CAF en la leche materna

La probabilidad de acuerdo esperada entre el consumo referido de bebidas con CAF y la presencia de CAF en leche materna fue de 0,45 y el valor de kappa fue de 0,22. La sensibilidad y especificidad del cuestionario para detectar consumidoras de CAF en donantes es de 46,7% (IC 95% 31,9-62) y 77,8% (IC 95%, 51,9-92,6) respectivamente.

Cuando analizas la sensibilidad y la especificidad en base al estado madurativo de la leche analizada, los resultados son los siguientes: sensibilidad del 20% (IC 95% 1,1-70,1) y especificidad del 50% (IC 95% 2,7-97,3) para el calostro; sensibilidad del 40% (IC 95% 7,3- 83) y especificidad del 0% en la leche intermedia y sensibilidad del 48,7% (IC 95% 32,7-65) y especificidad 66,7% (IC 95% 41,2-85,6) en la leche madura.

El estudio de las muestras controles de madres que refieren ser consumidoras de alguna sustancia de abuso se describen a continuación:

- a) *Madre fumadora de cannabis*: Se mide THC en una concentración de 86 ng/ml, THC-OH (metabolito de THC) 5 ng/ml y COT (metabolito de NIC) de 51 ng/ml.

- b) *Madre consumidora de Cocaína*: Se detectaron niveles de COC a 5 ng/ml y una concentración de CAF a 539 ng/ml. No se detectaron metabolitos de la COC.
- c) *Madre en tratamiento de mantenimiento con metadona*: Se mide MTD en una concentración de 97 ng/ml, su metabolito EDDP a 8 ng/ml y MOR 7 ng/ml (Figura 14).

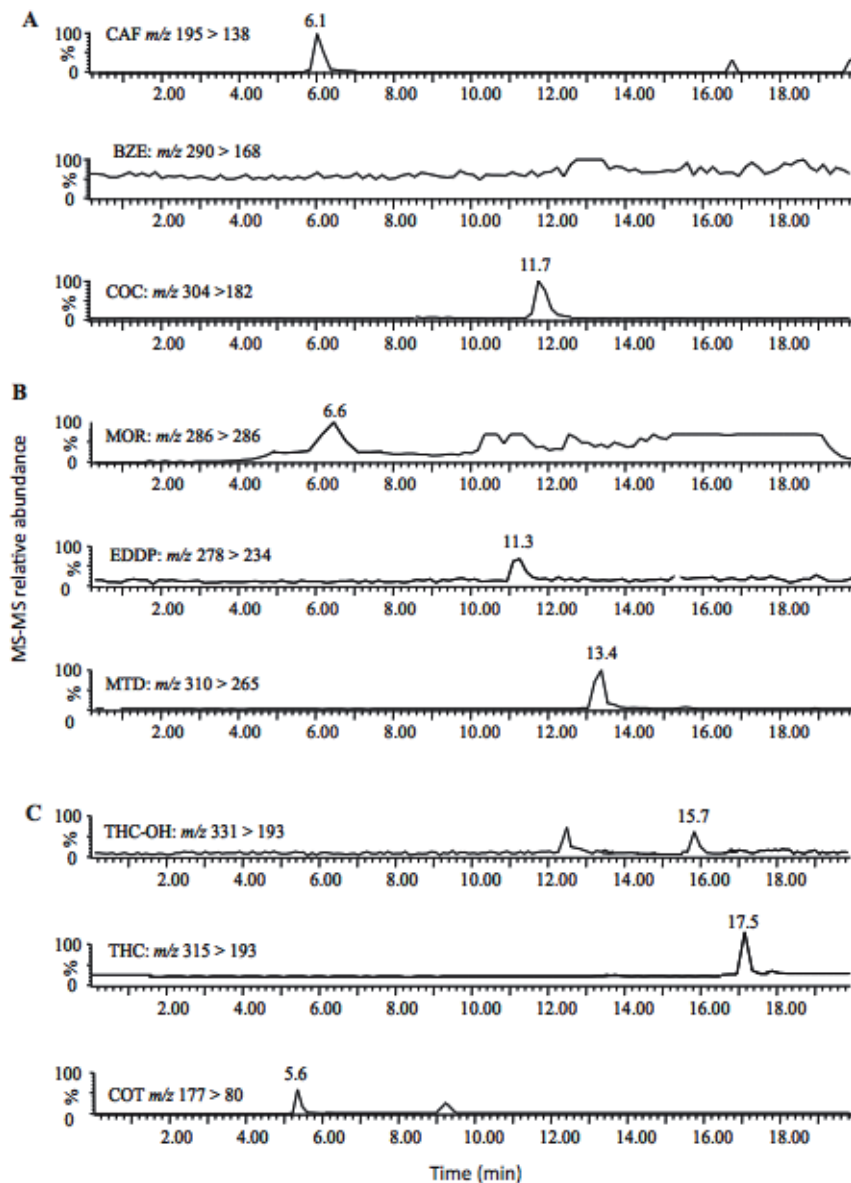


Figura 10. Cromatogramas de las muestras de leche de madres adictas. A) cocaína, CAF; B) MOR,EDDP y MTD; C) THC, TCH-OH, COT.

Segunda etapa

Se explica el objetivo del estudio a 57 donantes de las cuales 36 aceptan participar en el estudio. La edad promedio es de 34 ± 3 años (rango 24-41 años). El 83,3% (30/36) tienen un embarazo a término (>37 semanas). En la información recogida por cuestionario, las donantes refieren no consumir tabaco de manera crónica o esporádica y niegan también el consumo de drogas ilegales durante el embarazo y la lactancia (el consumo de estas sustancias las excluye como donantes). Ninguna mujer refiere beber más de 2 bebidas o productos con cafeína al día ni la toma de medicamentos que contengan cafeína. No se encuentran drogas de abuso o sus metabolitos en leche materna ni cabello. Se objetiva NIC y su metabolito COT en el 33,33% (12/36) de las muestras de cabello analizadas, con una concentración media de NIC de $1,805\pm 2,956$ ng/mg (95% IC 1-1.805; rango 0,805-2,805). La concentración media de COT es de $0,148\pm 0,336$ ng/mg (95% IC, 0,113-0,148; rango 0,034-0,262).

El 83,3% (10/12) de las muestras de cabello positivas, tienen concentraciones de COT compatibles con valores característicos de personas no fumadoras (0,2 a 0,4 ng/mg). En una muestra se determina COT 0,47 ng/mg, cantidad que corresponde a los valores encontrados en los fumadores pasivos (0,5 a 0,7 ng/mg). Solo una muestra de cabello tenía una concentración de 1,9 ng/mg, concentración similar a las encontradas en los fumadores activos (2,3 a 3,1 ng/mg). No se encuentra NIC ni COT en las muestras de leche.

Se cuantifica CAF en el 77,77% (28/36) de las muestras de cabello, con una concentración media de $1,769\pm 1,582$ ng/mg (95% CI, 1,233 – 2,304; rango 0-6,8). Por otro lado el 50% (18/36) de las muestras de leche materna contienen una concentración media de CAF de $272,76\pm 560,50$ ng/ml (95% CI, 83,121–462,41; rango 0-2.236,92). La correlación de CAF entre las muestras de cabello y de leche es de $r = 0,288$, $p = 0,0881$.

Determinación de sustancias de abuso en orina

En el análisis de las 54 muestras de orina se observa la presencia de CAF en el 57,4% (31/54) de las muestras, con una concentración media de 343,70 ng/ml (rango 0-2.600); COT en el 35,2% (19/54) de las muestras, con una concentración media de 0,52 ng/ml (rango 0-3,90). En el mismo número de muestras se detecta 3-OH-COT con una concentración media de 2,01 ng/ml (rango 0-17,6). No se encuentra NIC en orina.

9. Discusión

Existe una amplia evidencia en la literatura que indica que la LM es la mejor opción para alimentar a todos los RN porque transmite factores inmunoprotectores y de crecimiento a corto y largo plazo [13, 25, 27]. Se ha visto que los RN prematuros y enfermos que no tienen leche de su propia madre, la LMD es la mejor opción [13]. La LM además de un alimento, es un producto biológico y tanto en su procesamiento como en su conservación, al igual que ocurre con la donación de sangre, precisa de un manejo experto que garantice su seguridad y calidad certificada. En general con la leche donada, se trabaja desde la perspectiva de la seguridad. Es fundamental que la leche no sea vector de ninguna infección ni contenga tóxicos que puedan causar daños agudos al RN que repercutan en su desarrollo.

9.1 Cribado de sustancias de abuso

El resultado principal de este estudio es la inexistencia de drogas ilegales (COC, MOR, cannabis, anfetaminas, codeína, MTD) en las 3 matrices biológicas (leche, cabello y orina) provenientes de mujeres donantes a un banco de leche. Estos resultados corresponden a lo declarado mediante la aplicación del cuestionario de estilo de vida. Las mujeres donantes posiblemente están más sensibilizadas sobre la importancia de evitar el consumo de sustancias de abuso durante la lactancia ya que reciben formación por parte del personal sanitario del banco de leche. Existen trabajos realizados con leche materna comprada a través de internet, donde se ha detectado la presencia de NIC 58%, COT 4% y CAF 97%, ésta última en altas concentraciones [101]. El comercio de la leche sin un previo control de seguridad y calidad puede representar un riesgo para los RN que reciben esta leche.

Una limitación de los cuestionarios de estilo de vida es que las respuestas de las madres están influenciadas por diversos factores como la falta de confianza hacia el personal sanitario, el temor a las consecuencias de admitir el consumo de drogas de abuso, etc. Se han reportado importantes diferencias encontradas

entre los porcentajes de consumo de drogas obtenidos por cuestionario y las mediciones obtenidas por análisis cromatográfico de matrices biológicas alternativas como el meconio de los RN, placenta o líquido amniótico [86, 87, 102].

Las tres muestras de leche analizadas en el estudio tomadas como controles revelaron la presencia de otras sustancias de abuso además de las referidas. La madre consumidora de COC tenía además concentraciones de CAF; la madre fumadora de cannabis contenía también COT y la leche de la madre en tratamiento con MET contenía además MOR; éste último no había sido referido y sirve como indicador de recaída en el consumo de opiáceos. El análisis de sustancias de abuso en cabello permite detectar donantes con antecedente de consumo de drogas.

Sustancias de abuso en leche materna

1. Cafeína

Exceptuando 1 muestra de LMD en que se determinó NIC y COT, la única sustancia detectada en LMD es CAF. Estos resultados son similares a los medidos en otros estudios [60, 103]. Está descrito que los hijos de madres consumidoras de CAF a dosis altas pueden presentar síntomas como irritabilidad, vómito y alteraciones del patrón del sueño [46, 62].

La concentración más alta de CAF encontrada es de 7.564 ng/ml. Si calculamos la dosis ingerida por un RN que consume 150 ml/kg/día de esta leche, su consumo correspondería a 1,13 mg/kg/día. Aunque las concentraciones de CAF medidas en este estudio no representan por si solas un riesgo de intoxicación al RN, esta leche es destinada en su mayoría a RN prematuros que reciben una dosis inicial del CAF a 20 mg/kg y posteriormente 5 mg/kg/día como dosis de mantenimiento para el tratamiento de la apnea del prematuro. Recibir dosis suplementarias a través del consumo inadvertido en la LM puede ocasionar una

acumulación que represente un riesgo de intoxicación. Las propiedades farmacocinéticas de la CAF hacen que tenga una vida media entre 5 a 6 horas [104] con una concentración pico a las 2 horas del consumo [59]. Por lo tanto, los niveles de CAF encontrados en LMD dependen del tiempo que hay entre el consumo y la extracción de la leche; esto puede explicar la negatividad a CAF en muestras de leche de madres donantes que dijeron haber consumido CAF. Es importante que en la información otorgada a las donantes, se precise la importancia de limitar el consumo de bebidas o alimentos con CAF y espaciarlos de la extracción de la leche.

La mayor parte de las muestras de cabello son positivas a CAF (77,77%), sin embargo 3 muestras de cabello negativas para CAF tienen muestras de leche positivas; esto puede deberse a diversos factores: 1) los tratamientos cosméticos pueden alterar la presencia de tóxicos en cabello, 2) cortar el cabello condiciona que no se puedan medir la dosis acumuladas de drogas en cabello y 3) para realizar un análisis óptimo de cabello se requiere obtener una muestra entre 20 y 50 gramos [94].

Las muestras de orina recogidas durante el proceso de selección de donantes son un 57,4% positivas para CAF con una concentración media de 343,70 ng/ml; determinación nos permite ver el consumo de CAF de las últimas horas por ofrecer información en un periodo de ventana corto. La metodología empleada para la determinación en orina es la LC-MS-MS.

El análisis de la leche mediante LC-MS-MS permite detectar los casos falsos negativos del cuestionario de hábitos de vida por tratarse de una metodología objetiva y validada.

2. Nicotina

La NIC es rápidamente metabolizada a COT, trans-3-hydroxyCOT y COT-N-oxido y son capaces de pasar a través del epitelio de la glándula mamaria,

alcanzado concentraciones en la LM de 1,5 a 3 veces más altas que las concentraciones plasmáticas maternas simultáneas [53]. Por esta razón pueden estar presentes en LMD.

En este estudio se ha determinado NIC en solo una muestra con una concentración de NIC 46,1 ng/ml y su metabolito COT 138,6 ng/ml en una mujer que ha donado otras 120 muestras de leche negativas. Los valores observados son menores a los encontrados en leche de madres fumadoras 200 ng/ml [105]. El consumo medio de NIC a través de la leche materna en hijos de madres fumadoras corresponde a 7 µg/kg/día. Las determinaciones en cabello revelan la presencia de NIC y COT en un 33% y 88,3% de las muestras respectivamente. Las concentraciones son similares a las medidas en individuos no fumadores y no expuestos (0,2 a 0,4 ng/mg). En 1 muestra se ha determinado COT (0,47 ng/ml) y se ha clasificado en el rango de fumador pasivo y solo 1 muestra de cabello es positiva a COT en rangos de fumador activo (2,3 a 3,1 ng/mg). Por otro lado las muestras de orina estudiadas muestran una positividad del 35,2% para COT y 3-OH-COT; no se encuentra NIC. La explicación se fundamenta en la rápida transformación que sufre la NIC al entrar al organismo.

El tabaquismo es un criterio de exclusión para ser donante de leche, la positividad en estas muestras pueden explicarse por el consumo pasivo de NIC a través de la exposición al humo del tabaco. El tabaquismo pasivo en niños puede incrementar el riesgo de padecer infecciones respiratorias, asma e incluso se ha relacionado con muerte súbita del lactante. Debido a que esta leche es destinada a prematuros de muy bajo peso, es importante que la leche donada que reciben esté libre de NIC u otros tóxicos.

Cribado de sustancias de abuso en leche materna donada

A pesar de la alta prevalencia de consumo de sustancias de abuso demostrada en la población general, ofrecer a los RN leche donada que pueda contener sustancias de abuso podría representar un riesgo importante para su salud a corto y largo plazo. En los bancos de leche se siguen protocolos estrictos para garantizar la calidad nutricional y microbiológica de la leche, sin embargo no se realiza ningún cribado toxicológico durante la selección de donantes o durante el procesamiento de la LD. Los niveles de CAF encontrados en la LMD no se modificaron con el proceso de pasteurización, situación que podría repetirse con otras drogas. Puede considerarse que la pasteurización no constituye una medida de seguridad toxicológica durante el procesamiento de LM.

La positividad a CAF en muestras de pelo y orina demuestra que los xenobióticos pueden ser detectados durante la selección de donantes. La presencia de NIC y sus metabolitos COT y 3-OH-COT en las muestras de cabello y en el 35,2% de las muestras de orina, constituye evidencia suficiente para afirmar que las mujeres lactantes y sus hijos continúan expuestos al humo del tabaco. Los resultados son similares a lo reportado en estudios previos donde se realizaron determinaciones de NIC y sus metabolitos en diferentes matrices biológicas (sangre de cordón, placenta, LM, dientes) que revelan exposición de madres e hijos en el periodo pre y postnatal a la NIC [106, 107].

Cribado en orina y cabello

La recogida de orina y cabello en donantes en banco de leche representa una matriz biológica no invasiva que aporta información sobre antecedentes de consumo en dos ventanas de tiempo diferentes. La detección de drogas en orina permite una correcta individualización de la exposición activa o pasiva de las donantes durante los días inmediatamente anteriores a la obtención de esta matriz [86]. El cribado en cabello permite determinar la exposición crónica al

tabaco, fármacos y sustancias de abuso, lo que hace que esta matriz biológica sea adecuada para detectar la exposición crónica activa o pasiva [108].

Aunque en estos resultados hay pocos casos positivos, con cifras que representan bajo riesgo de intoxicación para los lactantes, hasta la fecha no existen en la literatura datos sobre detección de drogas en los bancos de leche.

Si se integra el conocimiento de la tecnología de la alimentación, todos estos procedimientos deberían garantizar también la calidad de la leche humana en términos de preservación de sus componentes.

Limitaciones

Una de las principales limitantes de este estudio es que sólo el 63% de las donantes han aceptado participar en el estudio para el cribado de drogas mediante el análisis de leche y cabello, por lo que los resultados presentados no se pueden extrapolar a la población general. Los motivos para no participar en el estudio no se especifican.

Aunque existen metodologías validadas para cuantificar tóxicos en LM, no todas las unidades de cuidados intensivos neonatales cuentan con un banco de leche que otorgue seguridad nutricional, infectológica y toxicológica. Por esta razón se almacena la leche de madres para sus propios bebés. En unidades como estas, es importante aplicar cuestionarios de hábitos de vida de manera sistemática, consciente y detallada, además de otorgar información necesaria para sensibilizar a prestadores de servicios de salud y madres sobre los riesgos de consumir drogas durante la lactancia.

9.2 Aplicabilidad y utilidad de los resultados

Los resultados de este estudio permiten conocer la prevalencia de drogas de abuso y otras sustancias en LMD, su concentración y sus posibles efectos nocivos en el RN.

Hasta ahora no había un estudio objetivo que evaluara si la seguridad a nivel toxicológico está bien cubierta en los bancos de leche humana. Actualmente se utiliza el cuestionario de hábitos de vida aplicado durante el proceso de selección de donantes y la pasteurización de la leche para la eliminación de sustancias de abuso y sus metabolitos que pudieran estar presentes en la LM.

Los resultados de este estudio plantean excepcionalmente la implementación del cribado de sustancias de abuso en las guías de actuación de los bancos de leche, para mejorar la calidad de la LMD destinada a RN prematuros o críticamente enfermos.

La divulgación de estos resultados podría ayudar a concienciar al personal sanitario y a las madres sobre la importancia de evitar el consumo de tóxicos durante la lactancia.

Este estudio es un punto de partida para futuras investigaciones que puedan determinar la influencia de otras sustancias presentes en la LM consumidas por las madres de manera inadvertida. Estas sustancias incluyen: contaminantes ambientales, pesticidas, organoclorados, dioxinas, bisfenoles, metales pesados, entre otros. Conocer su prevalencia en leche donada, analizar predictores de exposición para crear recomendaciones dietéticas para las madres que lactan.

9.3 Recomendaciones para el cribado de sustancias de abuso en bancos de leche materna donada

En los bancos de leche materna donada donde hay que conseguir estándares de seguridad y calidad, es necesario aplicar herramientas de biotecnología para la detección de drogas durante la selección de donantes y en el procesamiento de la LM donada. Actualmente la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas permite la detección y cuantificación simultánea de 18 diferentes drogas y sus metabolitos, representando una herramienta que puede ser aplicada en los bancos de leche para ofrecer leche no sólo segura, sino también de calidad.

Las recomendaciones actuales de los bancos de leche respecto a la seguridad toxicológica se fundamentan en el cuestionario de hábitos de vida, eliminando madres consumidoras o con sospecha de consumo.

El siguiente diagrama de flujo muestra la inclusión del cribado de sustancias de abuso durante la selección de donantes y el procesamiento de leche. Posteriormente se describe detalladamente las recomendaciones para el cribado objetivo de sustancias de abuso en bancos de leche (Figura 15).

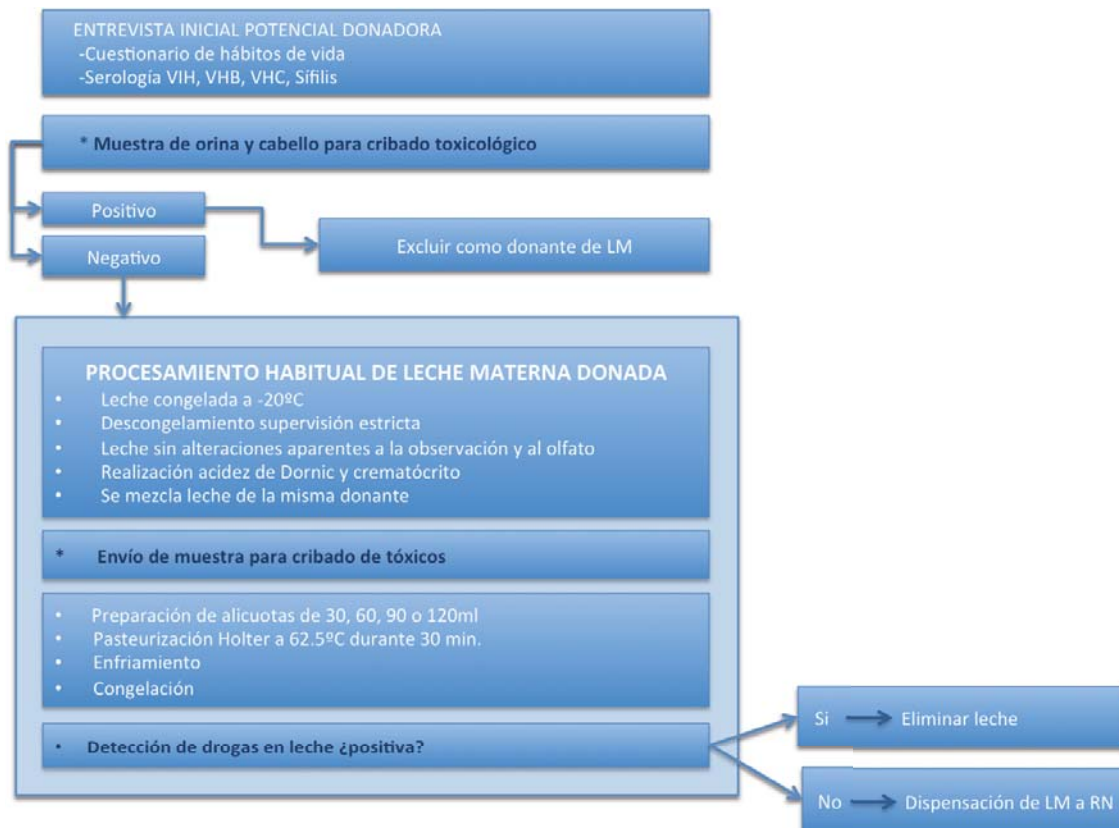


Figura 11. Diagrama de flujo para el cribado de sustancias de abuso en bancos de leche

Descripción del procedimiento

Durante el proceso de selección de donantes

1. Inicialmente se aceptan como posibles donantes las mujeres lactantes que cumplan con los criterios habituales del banco de leche (previamente mencionados en este documento).
2. Aplicación de cuestionario de hábitos de vida. Las mujeres que deseen participar como donantes al banco de leche materna deben someterse en su primera visita, a una entrevista con el personal sanitario del banco de leche donde se recabe el historial clínico (edad gestacional, paridad, medicamentos, suplementos vitamínicos) y características sobre su estilo de vida: números de tazas de café, té, otras bebidas con cafeína; exposición a

tabaquismo activo o pasivo; y consumo drogas de abuso actual o previo. Los criterios de exclusión como donantes deben comprender: tabaquismo activo, uso de drogas ilícitas, consumo de 2 o más productos con cafeína por día. Es recomendable *incluir un diagrama donde se señale de manera precisa el consumo de productos que contienen CAF* (Ver Anexo). Es importante también conocer el momento del día en que la donante extrae su leche y el intervalo de tiempo que hay entre el consumo de alimentos con CAF y la extracción de leche.

3. Toma habitual de serología para cribado infeccioso.
4. *Recoger muestra de orina y pelo de la donante para detectar el posible consumo de sustancias de abuso de manera aguda o crónica.*

La positividad para drogas ilegales en cualquiera de las dos matrices biológicas las excluye como donantes de leche.

Durante el procesamiento de la leche materna donada

Una vez recogida la leche extraída por las madres seleccionadas, se procede a continuar con los procesos normales del banco de leche que incluyen además el cribado de tóxicos:

1. Descongelación a baño María hasta obtener el bloque de leche al 50%
2. Selección de leche de acuerdo a sus características macroscópicas y olor
3. Determinación de la acidez titulable (método Dornic)
4. Determinación de crematocrito
5. Se reúne la leche de una sola donante (pool)
6. *Enviar 2 muestras de 3 ml de LM obtenidos del pool para la realización del cribado. La leche libre de sustancias de abuso puede pasteurizarse, si alguna muestra es positiva, debe eliminarse.*
7. Pasteurización de la leche a 62,5 °C durante 30 minutos
8. Congelación tras pasteurización para su almacenamiento hasta el momento de la dispensación.

10. Conclusiones

Los datos presentados en este trabajo y la revisión de bibliografía referente a la determinación de sustancias de abuso en leche materna permiten formular las siguientes conclusiones:

- Los RN prematuros y enfermos alimentados con leche materna donada pueden estar expuestos a sustancias de abuso consumidas por las madres donantes
- Las sustancias de abuso encontradas en las muestras recogidas en este banco de leche son CAF, NIC y su metabolito COT.
- No existe una infradeclaración clara del consumo de sustancias de abuso en el cuestionario de hábitos de vida aplicado durante la selección de donantes.
- La pasteurización es un proceso al cual se somete la leche materna para garantizar la destrucción de agentes infecciosos. Sin embargo en nuestro estudio, no alteró la presencia de tóxicos
- Los niveles de cafeína encontrados, por si solos no son lo suficientemente altos para ocasionar sintomatología en el RN, pero se deber realizar consejo preventivo ya que no se había referido el consumo y las dosis pueden ser acumulables y/o intervenir con la farmacocinética de medicamentos establecidos en el tratamiento del RN.
- Se dispone de métodos analíticos validados para el cribado de sustancias de abuso en bancos de leche que permiten el análisis simultáneo de 18 drogas y sus metabolitos.
- La determinación objetiva de sustancias de abuso en leche materna donada permitiría ofrecer a RN prematuros y enfermos leche segura y de calidad.
- Es aconsejable implementar un protocolo de cribado de estas sustancias en leche materna donada que podría incluir: (1) cribado en orina y guardar muestra de pelo de las donantes; y (2) estudio de la leche previamente a su alicuotación en caso de resultados positivos en el cribado realizado.

11. Bibliografía

1. *Estrategia mundial para la alimentación del lactante y el niño pequeño*, O.M.d.I. Salud, Editor. 2003.
2. UNICEF, *Por una niñez bien nutrida Comunicación para la acción*. 2004.
3. *Encuesta Lactancia Materna Catalunya*, D.d. Salud, Editor. 2010.
4. Barclay, A.R., et al., *Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease*. J Pediatr, 2009. **155**(3): p. 421-6.
5. Nutrition, E.C.o., et al., *Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **49**(1): p. 112-25.
6. Raisler, J., C. Alexander, and P. O'Campo, *Breast-feeding and infant illness: a dose-response relationship?* Am J Public Health, 1999. **89**(1): p. 25-30.
7. Riordan, J.M., *The cost of not breastfeeding: a commentary*. J Hum Lact, 1997. **13**(2): p. 93-7.
8. Lucas, A. and T.J. Cole, *Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis*. Lancet, 1990. **336**(8730): p. 1519-23.
9. Pediatrics., A.A.o., *Breastfeeding and the use of human milk*. 2005.
10. Jarlenski, M.P., et al., *Effects of breastfeeding on postpartum weight loss among U.S. women*. Prev Med, 2014. **69**: p. 146-50.
11. Feng, L.P., H.L. Chen, and M.Y. Shen, *Breastfeeding and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis*. J Midwifery Womens Health, 2014. **59**(4): p. 428-37.
12. Nagata, C., et al., *Breastfeeding and breast cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population*. Jpn J Clin Oncol, 2012. **42**(2): p. 124-30.
13. Arslanoglu, S., et al., *Donor human milk in preterm infant feeding: evidence and recommendations*. J Perinat Med, 2010. **38**(4): p. 347-51.
14. Dewey, K.G., M.J. Heinig, and L.A. Nommsen-Rivers, *Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants*. J Pediatr, 1995. **126**(5 Pt 1): p. 696-702.

15. Henderson, G., M.Y. Anthony, and W. McGuire, *Formula milk versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. CD002972.
16. Quigley, M.A., et al., *Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. CD002971.
17. Schultz, K., G. Soltesz, and J. Mestyan, *The metabolic consequences of human milk and formula feeding in premature infants*. Acta Paediatr Scand, 1980. **69**(5): p. 647-52.
18. Sisk, P.M., et al., *Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants*. J Perinatol, 2007. **27**(7): p. 428-33.
19. 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, 2007. **120**(4): p. e953-9.
20. Hernandez Aguilar, M.T., J. Aguayo Maldonado, and P. Comite de Lactancia Materna de la Asociacion Espanola de, [*Breastfeeding. How to promote and support breastfeeding in pediatric practice. Recommendations of the Breastfeeding Committee of the Spanish Association of Pediatrics*]. An Pediatr (Barc), 2005. **63**(4): p. 340-56.
21. Boyd, C.A., M.A. Quigley, and P. Brocklehurst, *Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: systematic review and meta-analysis*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2007. **92**(3): p. F169-75.
22. Wight, N.E., *Donor human milk for preterm infants*. J Perinatol, 2001. **21**(4): p. 249-54.
23. Lucas, A., et al., *A randomised multicentre study of human milk versus formula and later development in preterm infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1994. **70**(2): p. F141-6.
24. Simmer, K. and B. Hartmann, *The knowns and unknowns of human milk banking*. Early Hum Dev, 2009. **85**(11): p. 701-4.

25. Singhal, A., et al., *Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomised study*. Lancet, 2004. **363**(9421): p. 1571-8.
26. Bode, L., *Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond*. Nutr Rev, 2009. **67 Suppl 2**: p. S183-91.
27. Gottrand, F., *Long-chain polyunsaturated fatty acids influence the immune system of infants*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1807S-1812S.
28. Verhasselt, V., et al., *Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma*. Nat Med, 2008. **14**(2): p. 170-5.
29. *Guidelines for the Establishment and Operation of a Donor Human Milk Bank*. Human Milk Banking Association of North America.
30. Harry, B.J., *GUIDELINES FOR THE ESTABLISHMENT AND OPERATION OF HUMAN MILK BANKS IN THE UK*. Arch Dis Child Educ Pract, 2004.
31. Hartmann, B.T., et al., *Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU*. Early Hum Dev, 2007. **83**(10): p. 667-73.
32. Italian Association of Human Milk Banks Associazione Italiana Banche del Latte Umano, D., et al., *Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2010. **23 Suppl 2**: p. 1-20.
33. (EMBA), E.M.B.A. Noviembre 2015]; Available from: <http://www.europeanmilkbanking.com/index.html>.
34. Humana, A.E.d.B.d.L. [cited 2015; Available from: <http://www.aeblh.org/>.
35. Sierra Colomina, G., et al., *[Profile of human milk bank donors and relationship with the length of the donation]*. An Pediatr (Barc), 2014. **80**(4): p. 236-41.
36. Jones, F. and A. Human Milk Banking Association of North, *History of North American donor milk banking: one hundred years of progress*. J Hum Lact, 2003. **19**(3): p. 313-8.

37. Sanitária, A.N.d.V. *Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos*. 2008; Available from: <http://www.redeblh.fiocruz.br>.
38. in *Donor Breast Milk Banks: The Operation of Donor Milk Bank Services*. 2010: London.
39. *Banco de leite Humano: Funcionamiento, Prevenção e Controle de Riscos/ Agencia Nacional de Vigilância Sanitária*. . 2015.
40. Premji, S.S. and L. Chessell, *Continuous nasogastric milk feeding versus intermittent bolus milk feeding for premature infants less than 1500 grams*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(11): p. CD001819.
41. Ministerio de Sanidad, S.S.e.I., *Informe Anual del Sistema Nacional Salud 2012*. 2014.
42. Administration, S.A.a.M.H.S., *Encuesta Nacional Sobre el Uso de Drogas y Salud Estados Unidos*. 2014.
43. Friguls, B., et al., *A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**(3): p. 1157-79.
44. Oo, C.Y., et al., *Active transport of cimetidine into human milk*. Clin Pharmacol Ther, 1995. **58**(5): p. 548-55.
45. Pellegrini, M., et al., *Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. **21**(16): p. 2693-703.
46. McGowan, J.D., R.E. Altman, and W.P. Kanto, Jr., *Neonatal withdrawal symptoms after chronic maternal ingestion of caffeine*. South Med J, 1988. **81**(9): p. 1092-4.
47. Liston, J., *Breastfeeding and the use of recreational drugs--alcohol, caffeine, nicotine and marijuana*. Breastfeed Rev, 1998. **6**(2): p. 27-30.
48. Chasnoff, I.J., D.E. Lewis, and L. Squires, *Cocaine intoxication in a breast-fed infant*. Pediatrics, 1987. **80**(6): p. 836-8.

49. Lacroix, D., et al., *Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth.* Eur J Biochem, 1997. **247**(2): p. 625-34.
50. Leake, R.D. and C.W. Trygstad, *Glomerular filtration rate during the period of adaptation to extrauterine life.* Pediatr Res, 1977. **11**(9 Pt 1): p. 959-62.
51. Chi, J.G., E.C. Dooling, and F.H. Gilles, *Gyral development of the human brain.* Ann Neurol, 1977. **1**(1): p. 86-93.
52. Luck, W. and H. Nau, *Nicotine and cotinine concentrations in the milk of smoking mothers: influence of cigarette consumption and diurnal variation.* Eur J Pediatr, 1987. **146**(1): p. 21-6.
53. Atkinson, H.C., E.J. Begg, and B.A. Darlow, *Drugs in human milk. Clinical pharmacokinetic considerations.* Clin Pharmacokinet, 1988. **14**(4): p. 217-40.
54. Becker, A.B., et al., *Breast-feeding and environmental tobacco smoke exposure.* Arch Pediatr Adolesc Med, 1999. **153**(7): p. 689-91.
55. Dahlstrom, A., C. Ebersjo, and B. Lundell, *Nicotine exposure in breastfed infants.* Acta Paediatr, 2004. **93**(6): p. 810-6.
56. Anderson PO, K.J., Troutman WG, *Handbook of clinical drug data.* 10th ed. 2002, New York.
57. Vagnarelli, F., et al., *TDM grand rounds: neonatal nicotine withdrawal syndrome in an infant prenatally and postnatally exposed to heavy cigarette smoke.* Ther Drug Monit, 2006. **28**(5): p. 585-8.
58. Woodward, A., et al., *Acute respiratory illness in Adelaide children: breast feeding modifies the effect of passive smoking.* J Epidemiol Community Health, 1990. **44**(3): p. 224-30.
59. Briggs, G.G., *Drugs in pregnancy and lactation: a referece guide to fetal and neonatal risk.* 7th ed. 2005, Philadelphia and London.
60. Oo, C.Y., et al., *Pharmacokinetics of caffeine and its demethylated metabolites in lactation: predictions of milk to serum concentration ratios.* Pharm Res, 1995. **12**(2): p. 313-6.

61. Ryu, J.E., *Caffeine in human milk and in serum of breast-fed infants*. Dev Pharmacol Ther, 1985. **8**(6): p. 329-37.
62. Martin, I., et al., *Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal drinking of mate*. Ther Drug Monit, 2007. **29**(1): p. 127-9.
63. American Academy of Pediatrics Committee on, D., *Transfer of drugs and other chemicals into human milk*. Pediatrics, 2001. **108**(3): p. 776-89.
64. Garcia-Algar, O., et al., *Alarming prevalence of fetal alcohol exposure in a Mediterranean city*. Ther Drug Monit, 2008. **30**(2): p. 249-54.
65. Ho, E., et al., *Alcohol and breast feeding: calculation of time to zero level in milk*. Biol Neonate, 2001. **80**(3): p. 219-22.
66. Mennella, J.A. and C.J. Gerrish, *Effects of exposure to alcohol in mother's milk on infant sleep*. Pediatrics, 1998. **101**(5): p. E2.
67. Lamminpaa, A., *Alcohol intoxication in childhood and adolescence*. Alcohol Alcohol, 1995. **30**(1): p. 5-12.
68. da-Silva, V.A., et al., *Ethanol pharmacokinetics in lactating women*. Braz J Med Biol Res, 1993. **26**(10): p. 1097-103.
69. LawtonME, *Alcohol in brest milk*. J Obstet Gynaecol, 1985. **25**(1): p. 71-72.
70. BennettPN, *Drugs and Human Lactation*. 1996.
71. Astley, S.J. and R.E. Little, *Maternal marijuana use during lactation and infant development at one year*. Neurotoxicol Teratol, 1990. **12**(2): p. 161-8.
72. Dickson, P.H., et al., *The routine analysis of breast milk for drugs of abuse in a clinical toxicology laboratory*. J Forensic Sci, 1994. **39**(1): p. 207-14.
73. Ariagno, R., et al., *Methamphetamine ingestion by a breast-feeding mother and her infant's death: People v Henderson*. JAMA, 1995. **274**(3): p. 215.
74. Wojnar-Horton, R.E., et al., *Methadone distribution and excretion into breast milk of clients in a methadone maintenance programme*. Br J Clin Pharmacol, 1997. **44**(6): p. 543-7.

75. Cobrinik, R.W., R.T. Hood, Jr., and E. Chusid, *The effect of maternal narcotic addiction on the newborn infant; review of literature and report of 22 cases*. Pediatrics, 1959. **24**(2): p. 288-304.
76. vande Velde, S., et al., *Heroin withdrawal leads to metabolic alkalosis in an infant with cystic fibrosis*. Eur J Pediatr, 2007. **166**(1): p. 75-6.
77. Malpas, T.J. and B.A. Darlow, *Neonatal abstinence syndrome following abrupt cessation of breastfeeding*. N Z Med J, 1999. **112**(1080): p. 12-3.
78. McCarthy, J.J. and B.L. Posey, *Methadone levels in human milk*. J Hum Lact, 2000. **16**(2): p. 115-20.
79. Vert, P., et al., [*Infants of drug-addicted mothers: pitfalls of replacement therapy*]. Bull Acad Natl Med, 2008. **192**(5): p. 961-9; discussion 969.
80. Lindemalm, S., et al., *Transfer of buprenorphine into breast milk and calculation of infant drug dose*. J Hum Lact, 2009. **25**(2): p. 199-205.
81. Madadi, P., et al., *Establishing causality of CNS depression in breastfed infants following maternal codeine use*. Paediatr Drugs, 2008. **10**(6): p. 399-404.
82. Kelly, L.E., et al., *Neonatal benzodiazepines exposure during breastfeeding*. J Pediatr, 2012. **161**(3): p. 448-51.
83. Hale, T.W., *Medications and mother's milk: a manual of lactational pharmacology*. 11 ed. 2004.
84. Epperson, N., et al., *Maternal sertraline treatment and serotonin transport in breast-feeding mother-infant pairs*. Am J Psychiatry, 2001. **158**(10): p. 1631-7.
85. Lester, B.M., et al., *Possible association between fluoxetine hydrochloride and colic in an infant*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 1993. **32**(6): p. 1253-5.
86. Pichini, S., et al., *Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices*. Clin Pharmacokinet, 1996. **30**(3): p. 211-28.
87. Ortigosa, S., et al., *Feto-placental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse*. Reprod Toxicol, 2012. **34**(1): p. 73-9.

88. Pragst, F. and M.A. Balikova, *State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse*. Clin Chim Acta, 2006. **370**(1-2): p. 17-49.
89. Balabanova, S. and H.U. Wolf, *Methadone concentrations in human hair of the head, axillary and pubic hair*. Z Rechtsmed, 1989. **102**(5): p. 293-6.
90. Han, E., et al., *Correlation of methamphetamine results and concentrations between head, axillary, and pubic hair*. Forensic Sci Int, 2005. **147**(1): p. 21-4.
91. Offidani, C., S. Strano Rossi, and M. Chiarotti, *Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts*. Forensic Sci Int, 1993. **63**(1-3): p. 105-8.
92. Blank, D.L. and D.A. Kidwell, *External contamination of hair by cocaine: an issue in forensic interpretation*. Forensic Sci Int, 1993. **63**(1-3): p. 145-56; discussion 157-60.
93. Mieczkowski, T. and M. Kruger, *Interpreting the color effect of melanin on cocaine and benzoylecgonine assays for hair analysis: brown and black samples compared*. J Forensic Leg Med, 2007. **14**(1): p. 7-15.
94. Kintz, P., et al., *Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS*. Forensic Sci Int, 2005. **150**(2-3): p. 213-20.
95. Martins, L.F., et al., *Influence of bleaching on the enantiomeric disposition of amphetamine-type stimulants in hair*. Forensic Sci Int, 2008. **176**(1): p. 38-41.
96. Potsch, L. and G. Skopp, *Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment*. Forensic Sci Int, 1996. **81**(2-3): p. 95-102.
97. Eser, H.P., et al., *Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis [GC/MS] on hair snippets versus hair powder using various extraction methods*. Forensic Sci Int, 1997. **84**(1-3): p. 271-9.
98. Tsanaclis, L. and J.F. Wicks, *Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair*. Forensic Sci Int, 2008. **176**(1): p. 19-22.

99. Girod, C. and C. Staub, *Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS*. Forensic Sci Int, 2000. **107**(1-3): p. 261-71.
100. Villamor, J.L., et al., *A new GC-MS method for the determination of five amphetamines in human hair*. J Anal Toxicol, 2005. **29**(2): p. 135-9.
101. Keim, S.A., et al., *Drugs of Abuse in Human Milk Purchased via the Internet*. Breastfeed Med, 2015. **10**: p. 416-8.
102. Garcia-Algar, O., et al., *[Prenatal exposure to drugs of abuse using meconium analysis in a low socioeconomic population in Barcelona]*. An Pediatr (Barc), 2009. **70**(2): p. 151-8.
103. Bailey, D.N., et al., *A study of salicylate and caffeine excretion in the breast milk of two nursing mothers*. J Anal Toxicol, 1982. **6**(2): p. 64-8.
104. Stavchansky, S., et al., *Pharmacokinetics of caffeine in breast milk and plasma after single oral administration of caffeine to lactating mothers*. Biopharm Drug Dispos, 1988. **9**(3): p. 285-99.
105. Ilett, K.F., et al., *Transfer of dexamphetamine into breast milk during treatment for attention deficit hyperactivity disorder*. Br J Clin Pharmacol, 2007. **63**(3): p. 371-5.
106. Joya, X., et al., *Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation*. Forensic Sci Int, 2010. **196**(1-3): p. 38-42.
107. Llaquet, H., et al., *Biological matrices for the evaluation of exposure to environmental tobacco smoke during prenatal life and childhood*. Anal Bioanal Chem, 2010. **396**(1): p. 379-99.
108. Pichini, S., et al., *Assessment of chronic exposure to cigarette smoke and its change during pregnancy by segmental analysis of maternal hair nicotine*. J Expo Anal Environ Epidemiol, 2003. **13**(2): p. 144-51.

11. Anexos

Anexo 1. Glosario de términos

- **Banco de leche:** Establecimiento con el propósito de seleccionar, coleccionar, revisar, procesar, almacenar y distribuir la leche humana donada destinada para indicaciones médicas específicas.
- **Leche materna donada:** Leche dada voluntaria y libremente a bancos de leche materna.
- **Leche cruda:** leche materna la cual no ha sido sometida a tratamiento alguno.
- **Leche materna pasteurizada:** leche la cual ha sido sometida al proceso de pasteurización 62.5°C durante 30 minutos.

Anexo 2. Consentimiento Informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUJERES DONANTES DE LECHE

Agradecemos muy sinceramente su interés por ser donante de leche. La donación es un acto voluntario y altruista que beneficia enormemente a los niños hospitalizados que la reciben y no tiene ningún riesgo para usted ni para su hijo.

Su leche es la ideal para su hijo, pero necesitamos asegurarnos de que también lo sea para niños enfermos. Por ello le rogamos que conteste de forma veraz a la encuesta sobre su salud y estilo de vida y que nos permita realizarle un análisis de sangre para descartar que padezca alguna de estas infecciones: hepatitis B y C, infección por virus de la inmunodeficiencia humana adquirida y sífilis. Si en el análisis detectáramos cualquier alteración le informaremos de forma confidencial para que pueda completar el estudio y tratarse si fuera preciso.

Si después de ser aceptada como donante se modifica alguna de las circunstancias por las que se le ha preguntado, por favor, infórmenos lo antes posible.

Le proporcionaremos de forma verbal y escrita información sobre la extracción, conservación y transporte de su leche y sobre cualquier otro aspecto que usted solicite. El personal del Banco de Leche está a su disposición para resolver las dudas que quiera plantearnos.

Tras la donación su leche será pasteurizada y congelada, para ser posteriormente administrada bajo indicación médica, de forma anónima y gratuita, a niños hospitalizados.

Pequeñas cantidades de su leche podrán ser utilizadas para estudios de investigación avalados por el Servicio de Neonatología, lo que permitirá avanzar en el conocimiento científico de la leche humana y sus aplicaciones terapéuticas.

Usted puede dejar de donar leche en el momento que desee. No existe ninguna obligación ni compromiso por su parte.

Los datos facilitados por usted serán recogidos, de forma confidencial, en un Fichero Automatizado cuyo responsable es el Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre. Usted podrá ejercer sus derechos de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre la Protección de Datos de carácter Personal y su uso informático, mediante solicitud escrita y firmada al responsable del Fichero.



Nombre y apellidos de la donante (en letra mayúscula, por favor):

con DNI _____ declaro que:

1. He leído el documento de consentimiento informado. He podido plantear mis dudas a los profesionales del Banco de Leche y he comprendido toda la información sobre la donación altruista de leche. Si
2. Acepto que los datos sobre mi salud y estilo de vida y los resultados de las pruebas que me han realizado queden almacenados y custodiados en el Banco de Leche, siempre que sean tratados de forma estrictamente confidencial. Si
3. Consiento que me realicen las pruebas que sean necesarias para ser donante de leche Si
4. Acepto que mi leche donada sea administrada a niños hospitalizados por indicación médica Si
5. Acepto que pequeñas cantidades de mi leche se utilicen de forma anónima para estudios de investigación supervisados por el Servicio de Neonatología. Si No

Madrid a _____ de _____ de 20____

Nombre y firma de la donante

Nombre y firma del profesional

Anexo 3. Escala de Finnegan para valoración de síntomas del síndrome de abstinencia neonatal

Cuadro I. Puntuación de Finnegan.	
Alteraciones del sistema nervioso central	
Llanto excesivamente agudo	2
Llanto agudo continuo	3
Duerme < 1 hora después de la toma	3
Duerme < 2 horas después de la toma	2
Duerme < 3 horas después de la toma	1
Temblores leves a la estimulación	1
Temblores moderados a la estimulación	2
Temblores leves espontáneos	3
Temblores moderados espontáneos	4
Hipertonía muscular	2
Escoriación (especificar el lugar)	1
Sacudidas mioclónicas	3
Convulsiones generalizadas	5
Alteraciones metabólicas, vasomotoras y respiratorias	
Fiebre de < 38.4 °C	1
Fiebre de > 38.4 °C	2
Bostezos (3-4 veces/intervalo)	1
Falta de ventilación nasal	1
Estornudos (> 3-4 veces/intervalo)	1
Aleteo nasal	2
Frecuencia respiratoria < 60/minuto	1
Frecuencia respiratoria > 60/minuto con tiraje	2
Alteraciones metabólicas, vasomotoras, respiratorias	
Succión excesiva	1
Mala alimentación	2
Regurgitación	2
Vómitos en proyectil	3
Heces blandas	2
Heces líquidas	3

Anexo 4. Cuestionario de hábitos de vida



Hospital Universitario
12 de Octubre
Comunidad de Madrid

ENCUESTA DE SALUD Y ESTILO DE VIDA PARA MUJERES DONANTES

DATOS DE LA DONANTE

FECHA ____ / ____ / ____

Nombre: _____

Dirección: _____

CP: _____ Localidad: _____

Teléfonos de contacto: 1) _____ 2) _____

Correo electrónico: _____

Fecha de Nacimiento: ____ / ____ / ____

País de nacimiento: _____

Profesión: _____

¿Cómo se enteró de la existencia del Banco de Leche?

Me informó la matrona Por una persona conocida En la planta de la Maternidad
En mi centro de salud Por la página Web de la CAM Por la página Web de la AEP / AEPap
por la página Web del Hospital Por los medios de comunicación Otros

¿Ha sido usted donante de leche previamente? Si No

DATOS DEL HIJO LACTANTE

Nombre y apellido: _____

¿Dónde nació? _____ Fecha de nacimiento: ____ / ____ / ____

Duración del embarazo en semanas: _____ Peso: _____ Kg

¿Tuvo algún problema durante el embarazo? Si No

Especificar: _____

¿Le tuvieron que transfundir sangre al feto durante el embarazo? Si No



DATOS DE HIJOS ANTERIORES

¿Tiene usted hijos previos? Si No

¿Amamantó a sus otros hijos? Si No

¿Durante cuanto tiempo?

1er hijo: tiempo con LM: _____

2º hijo: tiempo con LM: _____

3er hijo: tiempo con LM: _____

4º hijo: tiempo con LM: _____

HISTORIA MÉDICA MATERNA

Señale si ha padecido alguna de las siguientes infecciones:

- Hepatitis, ictericia o problemas hepáticos Si No - Sífilis Si No

- Tuberculosis o contacto con TBC activa Si No - HTLV Si No

- Otras, especificar: _____ *VCH*

¿Padece o ha padecido alguna otra enfermedad?: Si No (especificar)

- crónica: _____

- aguda en el último año: _____

¿Toma actualmente alguna medicación? (incluyendo hierbas y vitaminas) Si No

Nombre	Ocasional /habitual	Dosis

¿Le han vacunado de algo en las últimas 4 semanas? Si No

Especificar: _____

¿Recibió hormona de crecimiento antes de 1985? Si No

¿Le han transplantado algún tejido u órgano? Si No

Especificar: _____

¿Le han hecho una endoscopia en los últimos 3 meses? Si No

¿Le han transfundido sangre en los últimos 3 meses? Si No

¿Ha recibido inmunoglobulina anti-hepatitis B en los últimos 6 meses? Si No



¿Se ha realizado tatuajes, *piercing* o acupuntura en los 3 últimos meses? Sí No

¿Ha tenido contacto accidental con sangre de otras personas o con agujas contaminadas con sangre en los últimos 3 meses? Sí No

ESTILO DE VIDA MATERNA

¿Ingiere diariamente bebidas que contengan cafeína? Sí No

Nº de cafés/día: _____ Nº de té/día: _____

Cantidad de refrescos con cafeína/día: _____

¿Es fumadora habitual? Sí No

¿Está tomando bebidas alcohólicas durante la lactancia? Sí No

¿Consumo o ha consumido drogas? Sí No

Especificar: _____

¿Es usted vegetariana estricta? Sí No

¿Tiene pareja estable? Sí No

¿Ha tenido relaciones sexuales con una persona transfundida en los últimos 3 meses, consumidora de drogas, con hepatitis, con VIH o con sífilis? Sí No

DECLARACIÓN

Declaro que he leído y comprendido los motivos que excluyen la donación de leche humana, que he tenido la oportunidad de preguntar todo lo que no he entendido, que han sido resueltas todas mis dudas y que he respondido de forma veraz a este cuestionario. En caso de que alguna de las circunstancias por las que se me ha preguntado se modificara mientras sea donante de leche, me comprometo a comunicarlo al Banco de Leche.

Firma de la madre

DNI nº: _____

Firma del profesional

Nombre

Madrid a _____ de _____ de 20

Anexo 5. Diagrama para documentar consumo de cafeína durante la aplicación del cuestionario de hábitos de vida.

Indique la cantidad de consumo por día de los siguientes productos



Anexo 6. Equivalencia de alimentos con cafeína en tazas de café.

Alimento	Contenido de cafeína	Equivalencia
1 taza de café filtrado (60 ml)	24 mg	
1 taza de café expreso (25 ml)	48 mg	 
1 taza de te de 260 ml	26 mg	
1 lata de cola de 330 ml	26 mg	
1 lata de cola <i>light</i> de 330 ml	42 mg	 
1 lata de bebida energética con cafeína (320 mg/L) de 330 ml	105 mg	   
1 taza de chocolate a la taza de 200 ml	18 mg	
1 pastilla de chocolate negra (20 g)	7 mg	1/3 
<i>Snack</i> de chocolate negro de 45 g	12 mg	1/2 

 = 1 taza de café filtrado

ARTÍCULO 1

Análisis simultáneo de drogas lícitas usadas frecuentemente y drogas psicoactivas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Emilia Marchei, Diana Escuder, Carmen Rosa Pallás, Óscar García-Algar, Arelis Gómez, Bibiana Friguls, Manuela Pellegrinia, Simona Pichini,*

J Pharm Biomed Anal. 2011 May 15;55(2):309-16.

doi: 10.1016/j.jpba.2011.01.028. Epub 2011 Jan 28



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Simultaneous analysis of frequently used licit and illicit psychoactive drugs in breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry

Emilia Marchei^a, Diana Escuder^b, Carmen Rosa Pallas^b, Oscar Garcia-Algar^c, Arelis Gómez^c, Bibiana Friguls^c, Manuela Pellegrini^a, Simona Pichini^{a,*}

^a Department of Therapeutic Research and Medicines Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

^b Neonatal Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^c URIE, Hospital del Mar, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2010

Received in revised form 18 January 2011

Accepted 21 January 2011

Available online 28 January 2011

Keywords:

Breast milk

Drugs of abuse

Tobacco

Caffeine

Liquid chromatography

Tandem mass spectrometry

ABSTRACT

A liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) method for the quantification of frequently used licit (caffeine, nicotine and cotinine) and illicit drugs (opiates, cocaine, cannabinoids and amphetamines) in breast milk was developed and fully validated. Chromatography was performed on a reverse-phase column using a gradient of 2 mM ammonium acetate, pH 6.6, and methyl alcohol as mobile phase at a flow rate of 0.35 mL/min. Separated analytes were quantified by electrospray ionization tandem mass spectrometry in positive ion mode using multiple reaction monitoring.

Milk samples were kept at -20°C until analysis and the compounds under investigation were extracted from the matrix by Bond Elut Certify cartridges. The concentration range covered was LOQ to 1000 ng/mL for all the investigated drugs. Intra- and inter-assay imprecision was less than 20%, analytical recovery ranged between 51.6% and 86.5%, matrix effect between 71.1% and 116.6% and process efficiency between 46.8% and 84.0%. Analytes were stable after three freeze–thaw cycles, after 6 months at -20°C and after the pasteurization process (differences to the initial concentration always lower than 10%), matrix effect ranged from 77.6% to 116.6%, recovery from 51.6% to 86.5%, and process efficiency from 46.8% to 79.0%.

This LC–MS–MS assay was applied to screen samples from the largest Spanish milk bank and samples coming from drug addicted mothers. The developed method provided adequate sensitivity and performance characteristics to prove the presence of only caffeine in a small percentage of samples from milk donating nursing mothers and the presence or absence of most commonly used illicit drugs in breast milk from addicted lactating mothers.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Breastfeeding is an essential physiological process with health and social benefits [1,2]. Human milk provides nutrition, digestive enzymes, immunological factors of many types, growth factors, hormones, and other bioactive factors [2] and it is widely accepted that breastfed infants have a lower risk of developing necrotizing enterocolitis, enteritis, otitis media, sudden infant death syndrome, lower respiratory tract infections, respiratory syncytial virus infection, insulin-dependent diabetes mellitus, and allergies [3–5]. To protect nursing infants from undesired effects of maternal consumption of any licit or illicit drug, but also to allow effective pharmacologic treatment of breastfeeding mothers, information on drugs (and or metabolites) excretion in human milk is essential [1,6,7]. This is of major importance when breastfeeding newborns

with milk coming from milk banks. Indeed, although mother's own milk is clearly the best choice, human milk banking has a long tradition in many countries and has a well recognized role in the care of preterm and sick infants [2].

When drugs are administered to a lactating mother, a certain percentage of the drugs may be excreted into the breast milk [7]. The amount of drug excreted from plasma into breast milk depends on the characteristics of the drug, such as plasma protein binding, ionization, degree of lipophilicity and molecular weight. In general, low plasma protein binding, low molecular weight, high lipophilicity, low pH and high lipid content contribute to the excretion phenomenon [1]. The excretion of drugs in breast milk occurs mostly via passive diffusion, but carrier-mediated transport also occurs for certain drugs [7]. As a result of the infant's small size and the difference in metabolism between infants and their mothers, occasionally this transfer of medication can prove to be harmful to the infant [8–10]. For this reason, drug therapies tend to be limited or strictly controlled during breastfeeding. Furthermore, nursing mothers are recommended to stop or at least

* Corresponding author. Tel.: +39 06 49906545; fax: +39 06 49902016.
E-mail addresses: simona.pichini@iss.it, pichini@iss.it (S. Pichini).

to reduce tobacco smoking and coffee drinking and to absolutely avoid consumption of drugs of abuse [1]. Despite these warnings, some lactating mothers keep on maintaining their toxic habits so that the presence of significant amounts of most frequently consumed licit and illicit psychoactive drugs in breast milk cannot be excluded. Consequently, both in the case of nursing mothers suspected of drug abuse and more importantly in the case of human milk banks, screening for such substances before breastfeeding protect the newborn from undesired ingestion of potentially harmful compounds.

Breast milk is an unconventional matrix that has been used to assess neonatal acute exposure to drugs, and its main advantage is its easy and non-invasive collection. However, the extraction of drugs from breast milk is an analytical challenge because of its high protein and fat content and changing composition during the postpartum period [1].

Several methods were published for the determination of nicotine [11–16], caffeine [16–19], cannabis [20], cocaine [21,22], amphetamines [23–25], and methadone [26–29] in human milk. Often, only a limited number of substances from the same drug class are included in the assay and in early studies there was no mass spectrometry used to detect the analytes. There is no published evidence of analysis of heroin in human breast milk, while two articles reported the determination of codeine and morphine levels by radioimmunoassay [30] and the determination of morphine and its metabolite by liquid chromatography–ultraviolet spectrophotometry assay [31].

We developed a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) method to measure licit (tobacco and caffeine) and illicit (opiates, methadone, cocaine, amphetamines and cannabinoids) drugs in human breast milk and applied the validated methodology to screen samples from the largest Spanish milk bank. To our knowledge this is the first LC–MS/MS method to simultaneously quantify 18 drugs and metabolites in breast milk.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

Morphine (MOR), codeine (COD), 6-acetylmorphine (6-MAM), 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), methadone (MTD), cocaine (COC), benzoylcegonine (BZE), cocaethylene (CE), nalorphine (NLP), 11-nor-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH), 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl) methanone (JWH-018), amphetamine (AP), methamphetamine (MA), 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxypropylamphetamine (MDPA) were supplied by LGC Standards Promochem (Milan, Italy). Nicotine (NIC), cotinine (COT) and caffeine (CAF) and N-ethylnorcotinine (NENC) were supplied by Sigma–Aldrich (Milan, Italy). NLP, JWH-C18, MDPA and NENC were used as structurally related internal standards for different drug classes. Deuterated internal standards (MOR-d3, COC-d3, BZE-d3, THC-COOH-d3, AP-d5, MDMA-d5 and COT-d3) were supplied by LGC Standards Promochem (Milan, Italy).

Bond Elut Certify solid-phase extraction (SPE) columns were from Varian (Palo Alto, CA). Ultrapure water and all other reagents of HPLC grade were obtained from Carlo Erba (Milan, Italy).

2.2. Preparation of standard solutions

Stock standard solutions (1 mg/mL) and working solutions (10, 1 and 0.1 μ g/mL) of all the analytes were prepared in methyl alcohol

and stored at 20 °C until analysis. The internal standards (both structurally related and deuterated ones) working solutions were prepared at a concentration of 10 μ g/mL. Calibration standards for all the analytes between LOQ and 1000 ng/mL milk were prepared daily for each analytical batch by adding suitable amounts of methanolic working solutions to 0.5 mL pre-checked drug-free human milk. Quality controls (QC) samples at 850 ng/mL (high control for all analytes under investigation), 400 ng/mL (medium control for all analytes under investigation), and 6 ng/mL (low control for MOR, 6-MAM, COD, MA, BZE, COC, THC, THC-OH, THC-COOH) or 12 ng/mL (low control for COT, CAF, NIC, MDA, AM, MDMA, CE, MTD, EDDP) were prepared in drug-free milk and stored at –20 °C. The QC samples were included in each analytical batch to check linearity, accuracy and precision, and the stability of samples under different storage conditions.

2.3. Sample extraction

To 500 μ L breast milk sample (blank, calibrators, QC and real samples) in a glass tube, 500 μ L of methyl alcohol were added. The tubes were vortex mixed for 0.5 min and centrifuged at 4000 rpm for 5 min at room temperature. The supernatant was transferred into 15-mL screw-capped glass tubes, diluted with 4 mL of 100 mM ammonium acetate pH 5.5 and applied on a Bond Elut Certify solid-phase extraction (SPE) column, which had been preconditioned with 2 mL methyl alcohol, 2 mL water and 1 mL 100 mM ammonium acetate pH 5.5. The column was further washed with 1 mL 0.1N HCl and dried under vacuum for 5 min. Cannabinoids were eluted with 2 mL methanol, a second elution step with 2 mL dichloromethane:isopropyl alcohol (80:20) with 2% ammonium hydroxide was used for the other analytes. The organic layer was evaporated under nitrogen stream at 30 °C and redissolved in 100 μ L of water:methyl alcohol (20:80, v/v).

2.4. Liquid chromatography tandem mass spectrometry

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) analyses were performed using an Alliance HPLC system (Waters, Etten-Leur, The Netherlands) interfaced to a Micromass Quattro micro API triple quadrupole mass spectrometer (Waters) equipped with an electrospray (ESI) ion source. Chromatographic separation was achieved at 38 °C with a Zorbax extend C18 column (50 mm \times 2.1 mm i.d., 3.5 μ m particle size) (Agilent). The gradient was a mixture of solvent A: (2 mM ammonium acetate at pH 6.6) and solvent B: (methyl alcohol) with the following linear program: 0.0 min, 10% B; 0.1–16.0 min: from 10% to 93% B; 16.1–20 min return to initial conditions. The flow rate was kept constant at 0.35 mL/min during the analysis and the sample volume injected was 25 μ L.

The tandem mass spectrometer was operated in positive ionization mode with the following parameters: capillary voltage, 3 kV; lens voltage 0.3 V; source temperature, 130 °C; desolvation temperature, 500 °C; cone gas flow rate, 30 L/h; desolvation gas flow rate, 800 L/h. Dry nitrogen ($\geq 99.5\%$) was used as desolvation and nebulization gas and argon ($>99.999\%$, Praxair, Spain) was used as collision gas. Acquisition was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode and the protonated molecular ion of each compound was chosen as precursor ion. MS and MS/MS spectra of the compounds under investigation were acquired as follows. The compounds dissolved in methyl alcohol at a concentration of 10 μ g/mL, were infused through an integrated syringe pump into the ESI probe at a rate of 10 μ L/min to tune the mass spectrometer and optimize the acquisition parameters. Cone energy voltages, MRM transitions, and collision energy voltages were established for each analyte and the values are listed in Table 1.

Table 1
LC–MS–MS parameters for the MRM acquisition mode (quantification and confirmation).

Analytes	Retention time (min)	MRM transitions					
		Quantification			Confirmation		
		m/z	CV (V) ^a	CE (eV) ^b	m/z	CV (V) ^a	CE (eV) ^b
COT	5.6	177 → 80	25	18	177 → 146	25	18
CAF	6.1	195 → 138	30	20	165 → 110	30	20
NIC	8.5	163 → 132	25	20	163 → 80	25	25
MOR	6.6	286 → 152 ^c	45	5	286 → 165	45	40
6-MAM	9.1	328 → 152 ^c	35	5	328 → 165	35	35
COD	9.5	300 → 152 ^c	47	5	300 → 165	47	43
MDA	6.9	180 → 105	20	11	180 → 163	20	15
AP	7.1	136 → 91	20	15	136 → 119	20	9
MDMA	7.7	194 → 163	20	15	194 → 105	20	23
MA	8.1	150 → 91	20	18	150 → 119	20	10
BZE	7.2	290 → 168	30	25	290 → 105	30	29
COC	11.7	304 → 182	30	25	304 → 82	30	34
CE	12.4	318 → 196	25	20	318 → 168	25	20
EDDP	11.3	278 → 234	50	25	278 → 249	50	35
MTD	13.4	310 → 265	20	15	310 → 105	20	25
THC-COOH	14.8	345 → 327	30	16	345 → 193	30	28
THC-OH	15.7	331 → 193	30	22	331 → 201	30	22
THC	17.5	315 → 193	30	22	315 → 123	30	30
NENC	6.9	191 → 120	25	20			
MDPA	9.3	222 → 163	20	20			
NLR	11.5	312 → 312	40	10			
JWH-C18	16.2	342 → 155	35	25			
COT-d3	5.6	180 → 80	25	18			
MOR-d3	6.6	289 → 289	45	5			
AP-d5	7.1	141 → 96	20	15			
MDMA-d5	7.7	199 → 165	20	15			
COC-d3	11.7	307 → 185	30	25			
BZE-d3	7.2	293 → 171	30	25			
THC-COOH-d3	14.8	348 → 330	30	16			

^c In case of MOR, COD and 6-MAM, the protonated molecular ion was used for quantification.

^a CV: cone voltage.

^b CE: collision energy.

2.5. Method validation

Validation parameters included linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), imprecision, inaccuracy, selectivity, carryover, matrix effect, recovery, process efficiency and stability studies. Linearity was determined by least-squares regression with $1/x^2$ weighting. Acceptable linearity was achieved when the coefficient of determination was at least 0.99 and the calibrators were quantified within $\pm 20\%$ at the LOQ and $\pm 15\%$ at other concentrations.

The LOD and LOQ were evaluated with decreasing analyte concentrations in drug-fortified breast milk. The LOD was defined as the lowest concentration with acceptable chromatography, the presence of all transitions with signal-to-noise ratios of at least 3, and a retention time within ± 0.2 min of the average retention time of the calibrator. LOQ was the lowest concentration that met LOD criteria and a signal-to-noise ratio of at least 10.

Imprecision and inaccuracy were determined at three concentrations by analyzing five replicates on three different days ($n = 20$). Imprecision and inaccuracy, expressed as the coefficient of variation (%) of the measured values and error (%) respectively, were expected to be less than 20%.

Interferences from endogenous matrix components were evaluated by analyzing breast milk samples from ten healthy non drug-consuming volunteers fortified only with internal standards solutions. Endogenous interferences were considered insignificant if no peaks at LOQ value were detected at the retention times of the analytes in these ten breast milk samples. Potential interferences from other drugs of abuse, e.g. common benzodiazepines, and antidepressants were also evaluated by spiking 0.5 mL of pre-checked drug-free human milk pool with 500 ng of each of the

forementioned substances (final concentration: 1000 ng/mL as the highest point of calibration curve) and carried through the entire procedure.

The potential for carryover was investigated by injecting extracted drug-free human milk, with added internal standards, immediately after analysis of the highest concentration point of the calibration curve and measuring the area of possible peaks at the retention times of the analytes under investigation. In case of CAF, carryover was also assessed after injecting three replicates two additional concentration points at 2000 and 5000 ng CAF per mL drug-free human milk, since this analyte was found in breast milk in concentration up to 4000 ng/mL [1,16]. These over-the-curve samples were also tested for calibration curve fitting, recovery, and imprecision once they were diluted 5-fold.

Matrix effects, recovery and process efficiency were determined using the experimental design proposed by Matuszewski et al. [32]. Set 1 were five replicates of QC material prepared in the mobile phase. Set 2 and 3 were five replicates of blank breast milk fortified with QC solutions after and before extraction, respectively. Matrix effects were determined by dividing mean peak areas of set 2 by set 1 multiplied by 100. A value of 100% indicates that the responses in the mobile phase and in the plasma extracts were the same and no matrix effect was observed. A value of $> 100\%$ indicates an ionization enhancement and a value of $< 100\%$ indicates an ionization suppression. Recovery was determined by comparing the mean peak areas of analytes under investigation obtained in set 3 to those in set 2 multiplied by 100. Process efficiency expressed as the ratio of the mean peak area of an analyte spiked before extraction (set 3) to the mean peak area of the same analyte standards (set 1) multiplied by 100 [32].

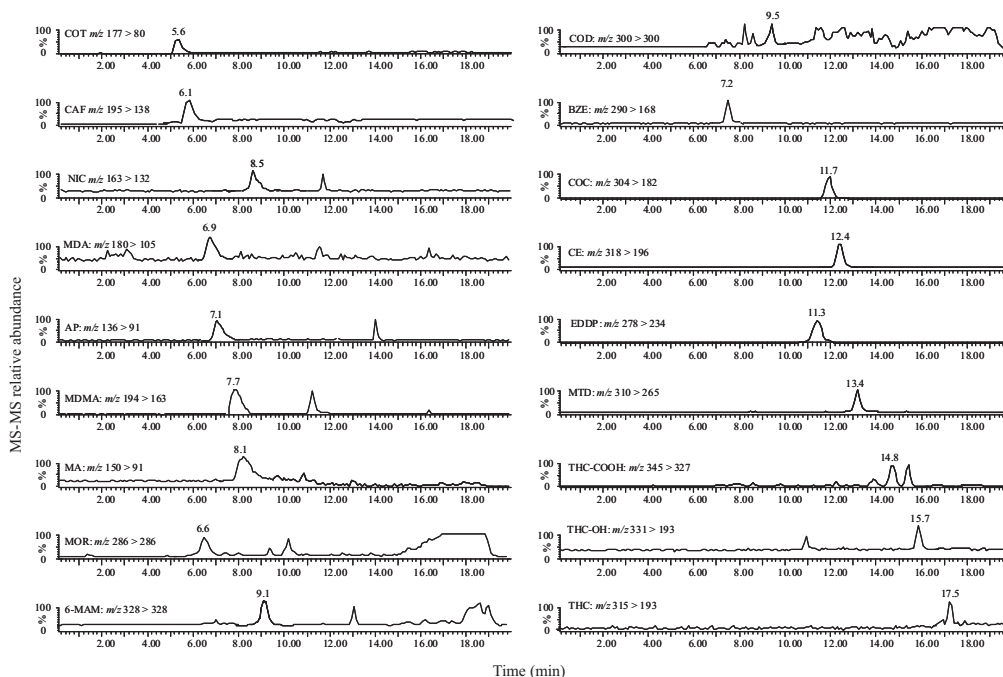


Fig. 1. LC-MS chromatogram of a breast milk sample spiked at the low quality control concentration, 6 ng/mL for morphine (MOR), 6-acetylmorphine (6-MAM), codeine (COD), methamphetamine (MA), benzoylecgonine (BZE), cocaine (COC), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH), 11-nor-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) and 12 ng/mL for cotinine (COT), caffeine (CAF), nicotine (NIC), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), amphetamine (AP), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), cocaethylene (CE), methadone (MTD), 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP).

The effect of three freeze–thaw cycles (storage at -20°C) on the compounds stability in human milk was evaluated by repeated analysis ($n=3$) of QC samples. In addition, mid-term stability test was performed for real samples stored at -20°C . Three replicates of four samples were analyzed once a month during a 6 months period. The stability was expressed as a percentage of the initial concentration (first analyzed batch) of the analytes both in QC and real samples. Finally, the effect of pasteurization on the stability of analytes under investigation in breast milk was evaluated by repeated analysis ($n=3$) of QC samples. Milk was pasteurized following the method in use at the Spanish milk bank at the “Hospital Universitario 12 de Octubre” – Madrid Spain, by heating it at 62.5°C for 30 min and then cooling it below 5°C within 15 min. The pasteurization effect was expressed as a percentage of the initial concentration (first analyzed batch) of both analytes in QC samples.

All the validation parameters were calculated using two types of internal standards: the ones structurally related to the analytes under investigation and deuterated internal standards.

2.6. Breast milk samples

Breast milk samples came from the largest Spanish milk bank located at the “Hospital Universitario 12 de Octubre”, Madrid, Spain. Samples were collected from January 2010 to June 2010. Once collected, milk from each mother was pasteurized as above reported, aliquoted and stored at -20°C . At the time of donation, lactating mothers completed a structured questionnaire regarding smoking habits, consumption of caffeinated drinks and eventual consumption of psychoactive drugs. Mothers signed an informed consent to

drug testing of donated milk and local ethics committee approved the protocol for milk donation and drug testing. Milk was accepted only from mothers declaring no toxic habit and no use of any drug or drug of abuse. However, no drug testing in any biological matrix was performed to confirm self-declarations. In order to check the eventual effects of pasteurization performed at the milk bank, 34 samples were sent in duplicate: before and after the pasteurization process.

Furthermore, to verify the reliability of developed method, breast milk samples from two addicted mothers declaring cocaine and cannabis consumption respectively and from one mother in methadone maintenance treatment were collected at Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

3. Results

3.1. Chromatography and validation results

Representative chromatograms obtained following the extraction of drug-free milk spiked with all the analytes under investigation and real milk samples from addicted lactating mothers are shown in Figs. 1 and 2.

Linear calibration curves were obtained for the compounds of interest with correlation coefficients (r^2) of at least 0.99 in all cases and LODs and LOQs values were adequate for the purpose of the present study (Table 2). The intra and inter-assay imprecision (measured as coefficient of variation, CV) and accuracy (measured as % error) values were always lower than 20% (Table 3). Once diluted, over-the-curve CAF samples fitted the calibration curve, and when tested for imprecision and inaccuracy gave values always better

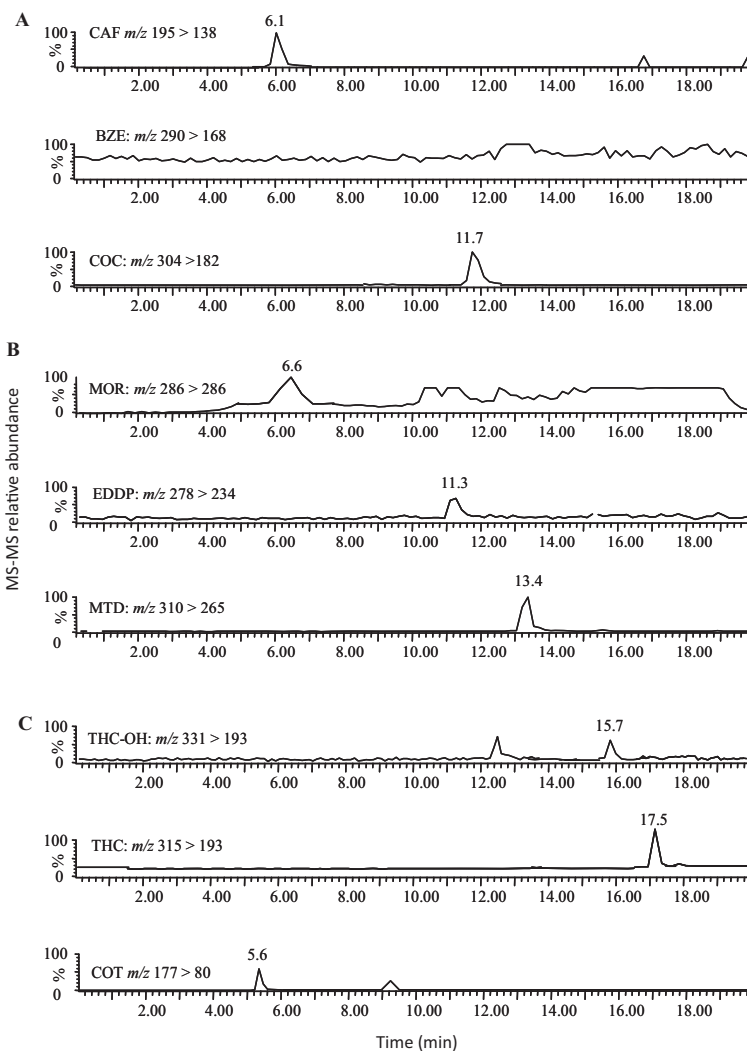


Fig. 2. LC-MS-MS chromatograms of breast milk samples from addicted nursing mothers containing: (A) cocaine (COC 5 ng/mL) and caffeine (CAF 539 ng/mL); (B) morphine (MOR 7 ng/mL), 2-ethylene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP 8 ng/mL) and methadone (MTD 97 ng/mL); (C) Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC 86 ng/mL), 11-hydroxy- Δ -9-tetrahydrocannabinol (TCH-OH 5 ng/mL) and cotinine (COT 51 ng/mL).

than 20%. For this reason, breast milk samples with CAF concentration over the highest point of the calibration curve were diluted 1:5 and reanalyzed.

No additional peaks due to endogenous substances which could have interfered with the detection of the compounds of interest were observed in drug-free samples. No psychoactive drugs other than the compounds under investigation interfered with the assay. Blank samples injected after the highest point of the calibration curve or after 2000 and 5000 ng/mL CAF did not present any traces of carryover.

The mean absolute matrix effect ranged from 77.6% to 116.6%, recovery from 71.1% to 86.5%, and process efficiency from 46.8% to 84.0% (Table 4).

No relevant degradation was observed after any of the three freeze-thaw cycles, with differences in the initial concentration less than 10% for all the compounds under investigation. Similar results (differences to the initial concentration always lower than 10%) were obtained for real breast milk specimens with respect to the case of mid-term stability test, confirming the validity of stored samples for analysis. Similarly, no significant degradation was observed after pasteurization.

The above-reported validation parameters were obtained using internal standards structurally related to the analytes under investigation (NLP for opiates and COC, JWH-C18 for cannabinoids, MDPA for amphetamines and NENC for NIC, COT and CAF). Similar results were obtained when calculating the validation parameters

Table 2
Calibration results, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ).

Analyte	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	Correlation coefficient (r^2) \pm SD	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
COT	0.028 \pm 0.002	-0.226 \pm 0.131	0.992 \pm 0.001	2.0	7.0
CAF	0.002 \pm 0.001	0.176 \pm 0.036	0.992 \pm 0.002	3.0	10.0
NIC	0.0008 \pm 0.0002	0.036 \pm 0.020	0.992 \pm 0.002	3.0	10.0
MOR	0.0007 \pm 0.0002	0.004 \pm 0.006	0.995 \pm 0.002	1.5	5.0
6-MAM	0.006 \pm 0.001	-0.002 \pm 0.013	0.994 \pm 0.001	1.0	5.0
COD	0.005 \pm 0.002	-0.005 \pm 0.019	0.996 \pm 0.004	1.0	5.0
MDA	0.0005 \pm 0.0001	0.006 \pm 0.006	0.993 \pm 0.002	2.0	7.0
AP	0.0023 \pm 0.0003	0.019 \pm 0.007	0.994 \pm 0.003	2.0	7.0
MDMA	0.003 \pm 0.001	-0.022 \pm 0.063	0.996 \pm 0.005	2.5	8.0
MA	0.011 \pm 0.002	0.100 \pm 0.079	0.992 \pm 0.001	1.0	5.0
BZE	0.0006 \pm 0.0002	-0.005 \pm 0.002	0.991 \pm 0.001	1.0	5.0
COC	0.002 \pm 0.001	0.036 \pm 0.014	0.994 \pm 0.003	1.0	5.0
CE	0.005 \pm 0.001	0.103 \pm 0.053	0.991 \pm 0.001	2.0	7.0
MTD	0.010 \pm 0.004	0.144 \pm 0.075	0.991 \pm 0.001	2.0	7.0
EDDP	0.004 \pm 0.001	0.034 \pm 0.061	0.994 \pm 0.004	2.5	8.0
THC-COOH	0.002 \pm 0.001	-0.026 \pm 0.029	0.994 \pm 0.004	1.0	5.0
THC-OH	0.0003 \pm 0.0001	-0.005 \pm 0.004	0.994 \pm 0.003	1.5	5.0
THC	0.0001 \pm 0.00002	0.002 \pm 0.003	0.994 \pm 0.004	1.5	5.0

using deuterated compounds (MOR-d3, COC-d3, BZE-d3, THC-COOH-d3, AP-d5, MDMA-d5 and COT-d3) as internal standards. For the analysis of real samples (more than 400 samples have already been analyzed and other 400 still to be analyzed), NLP, JWH-C18, MDPA and NENC were used because of the lower cost of the substances, higher stability and availability.

3.2. Analysis of breast milk samples

The method was first applied to breast milk specimens from the Spanish milk bank ($n=400$). None of the analytes under investigation were found in the analyzed samples apart from caffeine, found in 17.5% ($n=70$) of the breast milk specimens with a concentration ranging from 295 to 2191 ng/mL. These results are in accordance with previous studies [16–19], where CAF in breast milk from CAF-consuming mother was between 47 and 4000 ng/mL. CAF is considered compatible with breastfeeding [7] because occasional use appears to have little effects on infant but it would seem advisable to restrict caffeine consumption to less than 300 mg/day

(approximately three cups of coffee) while breastfeeding [1]. With respect to the 34 milk samples collected and analyzed before and after pasteurization process, no difference in concentration of CAF, the only analyte found in few of these samples, was highlighted and none of the other psychoactive drugs were determined before or after the process.

Breast milk samples from two addicted mothers declaring cocaine and cannabis consumption respectively and from one mother in methadone maintenance treatment were collected at Hospital del Mar, Barcelona, Spain. COC was the only analyte found (concentration: 5 ng/mL) in the breast milk sample from the cocaine addicted mother, with BZE and other metabolites absent in this biological matrix and CAF present in high concentration (539 ng/mL). With respect to the cannabis smoker, THC (86 ng/mL) and THC-OH (5 ng/mL) were detected in her breast milk sample together with COT (51 ng/mL), the nicotine metabolite. Finally in breast milk from the heroin-addicted mother in methadone treatment, not only methadone (97 ng/mL) with its metabolite EDDP (8 ng/mL) were found but also a low concentration of MOR (7 ng/mL).

Table 3
Intra-day ($n=5$) and inter-day ($n=15$) precision and accuracy.

Analyte	Intra-day precision (RSD)			Intra-day accuracy (Error%)			Inter-day precision (CV%)			Inter-day accuracy (Error%)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
COT	7.6	15.4	14.4	15.1	12.0	14.1	14.5	12.2	10.7	14.8	9.5	8.5
CAF	14.8	4.7	5.7	15.7	3.1	4.5	10.2	9.2	6.8	11.7	10.8	6.6
NIC	5.3	10.4	15.2	4.6	8.2	10.6	6.9	6.8	10.9	5.9	4.5	10.4
MOR	6.5	15.4	1.5	14.7	10.8	1.3	13.1	10.3	3.5	10.8	7.4	2.9
6-MAM	4.1	14.6	7.8	6.5	10.5	14.8	10.2	12.8	9.7	8.0	9.4	8.6
COD	10.6	5.3	2.4	12.4	5.07	2.7	9.6	11.8	8.5	9.4	10.7	6.4
MDA	7.4	8.9	1.7	6.6	9.8	1.6	9.4	10.5	9.5	7.2	13.5	5.9
AP	9.5	6.8	3.4	6.5	4.4	7.6	9.8	9.3	7.3	7.4	6.5	6.4
MDMA	11.8	12.0	12.3	11.9	8.8	8.6	11.5	10.3	10.6	10.2	10.3	6.2
MA	10.0	11.1	5.1	8.2	10.1	4.3	12.4	11.1	4.9	11.8	10.9	4.3
BZE	6.2	5.6	2.5	9.9	8.0	2.3	8.7	10.6	4.3	10.0	7.6	2.9
COC	1.5	6.5	1.6	10.1	7.4	1.7	10.2	10.4	5.2	8.7	7.8	3.4
CE	3.0	10.3	6.5	15.7	11.6	6.8	10.6	10.5	9.9	10.8	10.9	8.9
MTD	3.5	10.0	7.4	2.2	6.9	13.5	10.1	9.1	7.4	6.7	7.3	8.2
EDDP	5.3	9.1	11.3	4.5	11.8	7.3	9.4	10.8	7.4	8.6	10.9	5.9
THC-COOH	2.9	9.2	9.0	14.9	11.5	8.9	10.6	7.8	8.2	11.5	8.4	5.3
THC-OH	1.1	4.6	0.6	10.8	6.2	2.6	10.4	8.6	2.6	9.5	7.6	1.9
THC	9.2	5.1	13.6	7.1	4.3	10.2	9.9	5.0	9.2	7.6	5.1	6.9

Table 4

Matrix effect, recovery and process efficiency data for analytes under investigation in five different lots of human breast milk.

Analyte	Matrix effect (%)			Recovery (%)			Process efficiency (%)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
COT	98.1	94.4	95.1	72.9	72.0	77.4	71.5	68.0	73.6
CAF	104.4	105.4	104.9	61.4	56.2	59.6	64.1	59.2	62.5
NIC	90.0	96.0	91.9	52.0	55.8	54.6	46.8	53.6	50.2
MOR	95.1	96.1	100.2	66.9	70.7	63.5	63.7	67.9	63.6
6-MAM	90.5	90.8	90.6	82.9	83.6	84.0	75.0	75.9	76.1
COD	95.0	94.9	91.1	77.9	83.2	83.2	74.0	79.0	75.8
MDA	88.0	82.8	85.7	68.3	70.4	64.1	60.1	58.3	54.9
AP	103.2	102.6	105.0	56.7	54.0	51.6	58.5	55.4	54.2
MDMA	94.7	97.1	98.0	72.6	71.5	69.0	68.8	69.4	67.6
MA	94.5	92.5	95.8	67.9	70.8	65.3	64.2	65.5	62.6
BZE	94.0	92.2	87.4	62.0	61.9	66.4	58.3	57.1	58.0
COC	93.8	93.2	95.2	81.9	83.0	75.3	76.8	77.4	72.1
CE	85.1	88.0	87.6	86.5	82.4	82.4	73.6	72.5	72.2
MTD	77.6	71.1	75.6	73.9	85.4	72.8	57.4	60.7	55.0
EDDP	114.8	116.6	113.0	65.5	64.2	64.1	75.2	74.8	72.4
THC-COOH	92.1	94.1	92.8	56.0	53.2	55.6	51.6	50.1	51.6
THC-OH	104.8	105.1	102.6	57.8	59.9	59.3	60.6	63.0	60.8
THC	88.0	91.8	91.0	59.9	59.8	63.5	52.7	54.9	57.8

4. Discussion

There is ample evidence in the literature that breast feeding is beneficial in meeting the nutritional and immunological needs of all babies, whether born at full-term or prematurely. Ideally, the milk should come from the baby's mother, but sometimes this is impossible. Mothers of preterm babies and other babies in intensive care are often unable, too sick or simply they do not have sufficient production in the first day after delivery to provide enough milk for their baby's needs. In these cases the milk from the human milk bank can be a viable alternative. In fact, with respect to the infections transmission, there are three different filters to check the milk from the bank: first a structured interview to the donating mothers on life style, second a complete blood analysis and third the milk pasteurization, which removes potentially harmful viruses and bacteria.

However, due to the large prevalence of drug use in the population of child bearing age, it is feasible that the milk donated by mothers could potentially contain drugs which may be harmful to the infants. Screening the donated milk for the presence of drugs of abuse prior to being given to the newborns is extremely important. The method we describe has the advantage that it quantifies simultaneously a large number of potentially harmful licit and illicit drugs.

With respect to the milk sample collected from the cocaine addicted mother, considering that COC is readily soluble in non polar solvents, its distribution into lipid-rich breast milk is predictable. More polar COC metabolites, such as BZE, may be more soluble in blood, and this could be the cause of disproportionate partitioning of COC relative to its metabolite, in breast milk [22]. Furthermore, it is likely that the concentration of COC and BZE in breast milk is a function of the temporal relationship between COC use and collection of specimen. Breastfeeding while consuming COC is absolutely not safe in the light of evidence that COC concentrations in breast milk reaches high levels if the lactating mothers regularly use COC. Milk samples collected from a mother declaring cannabis smoking showed the presence of THC and THC-OH together with NIC and COT confirming that cannabis was consumed with tobacco and that THC-COOH, the acid THC metabolite was not present in this sample. Finally, the presence of low concentrations of morphine was identified together with methadone and its metabolite in the milk sample from the mother on methadone

maintenance program demonstrating a possible relapse in opiates consumption.

5. Conclusion

For the first time a fully validated LC-MS/MS method simultaneously quantifies the most frequently used licit and illicit psychoactive drugs in human breast milk. The method involved a fast and simple sample extraction procedure, presented a high throughput, adequate linearity, accuracy and precision to be used for rapid screening of milk samples continuously arriving at a milk bank.

Breastfeeding mothers are often reluctant to admit to using drugs or they may not even be aware that they are using a drug so measurement of drug concentrations (licit or illicit drugs) in breast milk provides useful information for appropriate maternal counselling, immediate infant treatment and subsequent medical follow-up.

Acknowledgments

The study was supported by grant N.4305005818 – Red SAMID, (Instituto Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain).

The authors thank Dr. Rita Di Giovannandrea and Dr. Donatella Mattioli for their technical support.

References

- [1] B. Friguls, X. Joya, O. García-Algar, C.R. Pallás, O. Vall, S. Pichini, A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1157–1179.
- [2] N.E. Wight, Donor human milk for preterm infants, *J. Perinatol.* 21 (2001) 249–254.
- [3] J. Raisler, C. Alexander, P. O'Campo, Breast-feeding and infant illness: a dose-response relationship? *Am. J. Public Health* 89 (1999) 25–30.
- [4] J.M. Riordan, The cost of not breastfeeding: a commentary, *J. Hum. Lact.* 13 (1997) 93–97.
- [5] K.G. Dewey, M.J. Heinig, L.A. Nommsen-Rivers, Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants, *J. Pediatr.* 126 (1995) 696–702.
- [6] H.C. Atkinson, E.J. Begg, B.A. Darlow, Drugs in human milk. Clinical pharmacokinetic considerations, *Clin. Pharmacokinet.* 14 (1988) 217–240.
- [7] American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, Transfer of drugs and other chemicals into human milk, *Pediatrics* 108 (2001) 776–789.
- [8] C.R. Howard, R.A. Lawrence, Drugs and breastfeeding, *Clin. Perinatol.* 26 (1999) 447–478.

- [9] K. Yoshida, B. Smith, M. Craggs, R. Kumar, Neuroleptic drugs in breast-milk: a study of pharmacokinetics and of possible adverse effects in breast-fed infants, *Psychol. Med.* 28 (1998) 81–91.
- [10] A. Lewellyn, Z.N. Stowe, Psychotropic medications in lactation, *J. Clin. Psychiatry* 59 (1998) 41–52.
- [11] W. Luck, H. Nau, Nicotine and cotinine concentrations in serum and milk of nursing smokers, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 18 (1984) 9–15.
- [12] M. Page-Sharp, T.W. Hale, L.P. Hackett, J.H. Kristensen, K.F. Ilett, Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection, *J. Chromatogr. B* 796 (2003) 173–180.
- [13] K.F. Ilett, T.W. Hale, M. Page-Sharp, J.H. Kristensen, R. Kohan, L.P. Hackett, Use of nicotine patches in breast-feeding mothers: transfer of nicotine and cotinine into human milk, *Clin. Pharmacol. Ther.* 74 (2003) 516–524.
- [14] A. Dahlstrom, C. Ebersjo, B. Lundell, Nicotine exposure in breastfed infants, *Acta Paediatr.* 93 (2004) 810–816.
- [15] P. Aresta, F. Palmisano, C.G. Zambonin, Simultaneous determination of caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine and nicotine in human milk by liquid chromatography with diode array UV detection, *Food Chem.* 93 (2005) 177–181.
- [16] M. Pellegrini, E. Marchei, S. Rossi, F. Vagnarelli, A. Durgbanshi, O. Garcia-Algar, O. Vall, S. Pichini, Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2693–2703.
- [17] S. Stavchansky, A. Combs, R. Sagraves, M. Delgado, A. Joshi, Pharmacokinetics of caffeine in breast milk and plasma after single oral administration of caffeine to lactating mothers, *Biopharm. Drug Dispos.* 9 (1988) 285–299.
- [18] J. Blanchard, C.W. Weber, L.E. Shearer, HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk, *J. Chromatogr. Sci.* 28 (1990) 640–642.
- [19] C.Y. Oo, D.E. Burgio, R.C. Kuhn, N. Desai, P.J. McNamara, Pharmacokinetics of caffeine and its demethylated metabolites in lactation: predictions of milk to serum concentration ratios, *Pharm. Res.* 12 (1995) 313–316.
- [20] M. Perez-Reyes, M.E. Wall, Presence of delta9-tetrahydrocannabinol in human milk, *N. Engl. J. Med.* 307 (1982) 819–820.
- [21] P.H. Dickson, A. Lind, P. Studts, H.C. Nipper, M. Makoid, D. Therikildsen, The routine analysis of breast milk for drugs of abuse in a clinical toxicology laboratory, *J. Forensic Sci.* 39 (1994) 207–214.
- [22] R.E. Winecker, B.A. Goldberger, I.R. Tebbett, M. Behnke, F.D. Eyley, J.L. Karlix, K. Wobie, M. Conlon, D. Phillips, R.L. Bertholf, Detection of cocaine and its metabolites in breast milk, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 1221–1223.
- [23] E. Steiner, T. Villen, M. Hallberg, A. Rane, Amphetamine secretion in breast milk, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 27 (1984) 123–124.
- [24] K.F. Ilett, L.P. Hackett, J.H. Kristensen, R. Kohan, Transfer of dexamphetamine into breast milk during treatment for attention deficit hyperactivity disorder, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 63 (2007) 371–375.
- [25] A. Bartu, L.J. Dusc, K.F. Ilett, Transfer of methylamphetamine and amphetamine into breast milk following recreational use of methylamphetamine, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 67 (2009) 455–459.
- [26] B. Geraghty, E.A. Graham, B. Logan, E.L. Weiss, Methadone levels in breast milk, *J. Hum. Lact.* 13 (1997) 227–230.
- [27] J.J. McCarthy, B.L. Posey, Methadone levels in human milk, *J. Hum. Lact.* 16 (2000) 115–120.
- [28] R.E. Choo, L.M. Jansson, K. Scheidweiler, M.A. Huestis, A validated liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometric method for the quantification of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), and 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EMDP) in human breast milk, *J. Anal. Toxicol.* 3 (2007) 265–269.
- [29] P.D. Nikolaou, I.I. Papoutsis, C.P. Maravelias, C.A. Spiliopoulou, C.M. Pistos, A.C. Calokerinos, J. Atta-Politou, Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of methadone and its major metabolites (EDDP and EMDP) in human breast milk, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 478–484.
- [30] R.G. Meny, E.G. Naumburg, L.S. Alger, J.L. Brill-Miller, S. Brown, Codeine and the breastfed neonate, *J. Hum. Lact.* 9 (1993) 237–240.
- [31] N.E. Baka, F. Bayoumeu, M.J. Boutroy, M.C. Laxenaire, Colostrum morphine concentrations during post cesarean intravenous patient-controlled analgesia, *Anesth. Analg.* 94 (2002) 184–187.
- [32] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.

ARTÍCULO 2

Validación de un cuestionario de cribado para determinar la presencia de drogas ilegales, nicotina y cafeína

Diana Escuder-Vieco, BS, Óscar García-Algar, PhD, Simona Pichini, PhD, Roberta Pacifici, PhD, Nadia Raquel García-Lara, MD, and Carmen Rosa Pallás-Alonso, PhD

J Pediatr. 2014 Apr;164(4):811-4.

doi: 10.1016/j.jpeds.2013.11.043. Epub 2013 Dec 31

Validation of a Screening Questionnaire for a Human Milk Bank to Determine the Presence of Illegal Drugs, Nicotine, and Caffeine

Diana Escuder-Vieco, BSc^{1,2}, Óscar García-Algar, PhD^{2,3}, Simona Pichini, PhD⁴, Roberta Pacifici, PhD⁴,
Nadia Raquel García-Lara, MD^{1,2}, and Carmen Rosa Pallás-Alonso, PhD^{1,2}

Objectives To validate the health and lifestyle questionnaire answered by donors to a human milk bank with respect to the presence of illegal drugs, nicotine, and caffeine levels in donor milk.

Study design A total of 400 human milk samples from 63 donors were analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the presence of 14 illegal drugs, nicotine, and caffeine. Demographics and clinical and lifestyle data (illegal drugs, tobacco, and caffeinated beverage use) were collected from the required screening questionnaire of a human milk bank. The relationship between the 2 evaluation techniques was determined.

Results Illegal drugs were not found in donor milk. Nicotine (46.1 ng/mL) and cotinine (138.6 ng/mL) were quantified in one milk sample from a donor who did not report tobacco use in the questionnaire (1.6% false negative). Caffeine was detected in 45.3% (181/400) of the total milk samples, with a mean concentration of 496 ± 778 ng/mL. The sensitivity and specificity of the questionnaire to detect caffeine in donor milk was 46% and 77%, respectively.

Conclusions The lifestyle questionnaire is reliable for the assessment of illicit drug use by donors to a human milk bank, but there are certain limitations regarding the identification of second-hand smoke exposure and the disclosure of consumption of caffeinated beverages. Data such as smoking habits of partners, type and volume of beverage or food containing caffeine, method of preparation, and time of day of consumption should be collected by the questionnaire. (*J Pediatr* 2014; ■: ■ - ■).

Mother's own milk is the ideal choice for feeding infants during at least the first 6 months of life because of the health benefits it confers. When mother's milk is not available or is insufficient, milk from a human donor is recommended.¹ The selection of healthy and reliable donors is one of the most important aspects of human milk banks. Internationally, these centers have monitored the risk of transmission of infectious agents through donor milk by developing screening questionnaires, blood tests and, as an additional security measure, pasteurization of donor milk (62.5°C for 30 minutes) to kill viruses and potential pathogenic bacteria.^{2,3}

There is less emphasis placed on determining the presence or absence of legal or illegal drugs in this biologic fluid. The only information available is provided by the donors themselves in the self-report required by the screening questionnaire that must be completed before the women are accepted as donors.

Psychoactive drugs and caffeine taken by the mother during breastfeeding are known to be secreted into breast milk.⁴ The American Academy of Pediatrics recommends against breastfeeding in mothers with positive illegal drug screening and suggests avoiding the consumption of tobacco and alcohol.¹ By contrast, some experts believe that a maternal limit of 300 mg daily of caffeine might be a safe level of intake.⁵ Risk assessment based on the subject's self-report by a questionnaire is widely used. However, there is no validation of the questionnaire. The objective of the present study was to validate the health and lifestyle questionnaire answered by donors with respect to the presence of illegal drugs, nicotine, and caffeine in the donor milk.

Methods

This study was approved by the local Ethics Committee, with informed consent from all participants. The study was conducted at Human Milk Bank, Neonatology Unit, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, between February and July 2009.

Each donor who wished to participate in the study was provided with several glass containers for expressing human milk along with labels for her name and the expression date of the milk. A different container was used for each new expression. All containers were kept frozen in the donor's home and transported to the milk bank without the transporter breaking the cold chain. Subsequently,

LC-MS/MS Liquid chromatography tandem mass spectrometry

From the ¹Department of Neonatology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; ²SAMID Network (Spanish Collaborative Maternal and Child Health Research Network); ³URIE, Hospital del Mar, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain; and ⁴Instituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Funded by Spanish Health Research (FIS 09/00040). The authors declare no conflicts of interest.

Portions of this study were presented as a poster at the International Society For Research in Human Milk and Lactation Conference, "Breastfeeding and the Use of Human Milk: Science and Practice," Trieste, Italy, September 27, 2012.

0022-3476/\$ - see front matter. Copyright © 2014 Mosby Inc. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.11.043>

to perform an adequate pasteurization, different containers of milk from the same donor were mixed into a pool (maximum 1 L). From each of these pools, an aliquot of 1.5 mL of human milk was stored frozen at -20°C until it was analyzed for illegal drugs, nicotine, and caffeine. The aliquots were collected in the chronological order in which they arrived at the milk bank. Consequently, each sample used in the study spans an average time period of 1 month from the beginning of the donation period. In total, 400 human milk samples were collected for analysis of illegal drugs, nicotine, and caffeine from 400 different pools.

Health Questionnaire

A health and lifestyle questionnaire was completed by each donor participant on the first visit to the milk bank before any of her expressed milk was accepted. The following data were collected from the enrolled donors: demographic data (maternal age and birthplace), clinical data (gestational age, parity, medications or vitamin supplements) and lifestyle data (number of coffee, tea, and soft drinks per day; active smoker; illegal drug user).

Expression dates gathered from the labels of each milk container and data from the questionnaire permit classification of samples according to type: colostrum (milk from less than 7 days after delivery), intermediate milk (7-21 days after delivery), and mature milk (more than 21 days after delivery). The study included 63 donors who fulfilled the requirements of the Human Milk Bank. The exclusion criteria for rejecting a mother as donor included the use of illicit drugs, being an active smoker, and daily consumption of more than 2 caffeinated beverages per day (coffee, tea, or soft drinks).

Biochemical Analyses

A validated, reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) test⁶ was used to determine the concentration of illegal drugs, nicotine, and caffeine. The analysis was performed with an Alliance High Performance Liquid Chromatography system (Waters, Etten-Leur, The Netherlands) interfaced to a Micromass Quattro micro API triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, Massachusetts) equipped with an electrospray ion source.

Analytes were extracted from the human milk buffered at pH 5.5 with solid-phase extraction for substance recovery ranging from 71.1% to 86.5%. The intra- and interassay imprecision (measured as coefficient of variation) and inaccuracies (measured as % error) were always lower than 20%. The analytes and limits of detection in breast milk were as follows: 3 ng/mL for caffeine; 3 ng/mL for nicotine; 2 ng/mL for cotinine; 1.5 ng/mL for morphine; 1 ng/mL for 6-acetylmorphine and codeine; 2 ng/mL for amphetamine; 2.5 ng/mL for 3,4-methylenedioxy-methamphetamine; 1 ng/mL for methamphetamine; 1 ng/mL for benzoylecgonine and cocaine; 2 ng/mL for cocaethylene; 1 ng/mL for 1-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol; 1.5 ng/mL for 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and delta-9-tetrahydrocannabinol; 2 ng/

mL for methadone; and 2.5 ng/mL for 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine. Alcohol was not analyzed.

Human milk testing has a detection window with a typical range from a few hours to 1 day after a single intake of substances such as nicotine, cotinine, caffeine, cocaine, heroin, and morphine. Others, such as cannabis or amphetamines, can be detected up to a few days or months later.⁴

Statistical Analyses

Biochemical data were tested for normality of distribution by a Kolmogorov-Smirnov test. Caffeine concentration was expressed as the mean and 95% CI of the mean. The average number of samples per donor was expressed as the median and IQR because they were not normally distributed.

Agreement or disagreement between self-report use and LC-MS/MS results was determined by kappa coefficients.^{7,8} Sensitivity and specificity values are reported with 95% CIs for illegal drugs, nicotine, and caffeine. The effect of collection date on caffeine concentration was determined by the Fisher test. Donors who delivered human milk samples for at least 2 months were included in this analysis. Caffeine levels were categorized into 4 classes: low (0 ng/mL), medium (1-165 ng/mL), high (166-625 ng/mL), and very high levels (>625 ng/mL). Differences were considered significant at $P < .05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc, Warrenton, Virginia) was used to perform these analyses.

Results

The Human Milk Bank accepted milk from 64 donor mothers. Of these 64, 63 accepted to participate in the study with a mean age of 35.7 ± 4.75 years (range, 23-53). Among these donor mothers, 50 had a term delivery (after 37 weeks of gestation), and 39 were primigravida. A total of 85.7% (54/63) of the mothers were from Spain, 12.7% (8/63) were from Central and South America, and 1.6% (1/63) was from another European country. Of these donors, 52 gave samples of mature milk, 4 gave both intermediate and mature milk, 2 donors gave colostrum and intermediate milk, 4 donors gave only colostrums, and 1 donor gave colostrum, intermediate and mature milk.

The average number of samples per donor was 4 ± 13.4 (IQR, 2-6). In total, 400 milk specimens were used in the study: 16 colostrum, 19 intermediate milk, and 365 mature milk.

No illegal drugs were found, consistent with the answers given by the donors on the questionnaire because none reported taking these substances. Thus, the false-negative rates of the questionnaire for illicit drugs were 0% and the specificity of the questionnaire to detect illegal drugs was 100%.

Nicotine and its metabolite cotinine were found in one mature human milk sample. Nicotine levels were 46.1 ng/mL, and cotinine levels were 138.6 ng/mL. This positive sample belonged to a donor who had provided another 102 samples for the study which tested negative for legal and illegal drugs. No donor said she was an active smoker on the questionnaire (exclusion criteria).

Finally, caffeine was found in 45.3% (181/400) of the total donor milk samples, with a mean concentration of 496 ± 778 ng/mL (95% CI, 382-609; range, 0-7564). These positive samples were 56.2% (9/16) colostrum; 52.6% (10/19) intermediate milk, and 44.4% (162/365) mature milk.

The relation between self-reported caffeinated beverage use on the questionnaire and the analysis of caffeine in donor milk by LC-MS/MS is shown in the **Table**. The probability of expected agreement between self-reports of caffeinated beverage use and detection of caffeine in donor milk was 0.45 and the kappa value was 0.22. The sensitivity and specificity of the questionnaire to detect caffeine in donor milk was 46.7% (95% CI 31.9-62) and 77.8% (95% CI 51.9-92.6) respectively. On the basis of the type of milk analyzed, for colostrum the sensitivity was 20% (95% CI 1.1-70.1) and the specificity was 50% (95% CI 2.7-97.3); for intermediate milk, the sensitivity was 40% (95% CI 7.3-83) and the specificity was 0% and, finally, in the case of mature milk, the sensitivity was 48.7% (95% CI 32.7-65) and the specificity 66.7% (95% CI 41.2-85.6). The consumption of caffeinated beverages (coffee, tea, or soft drinks) from mothers who reported having drunk these beverages (25/63) was 1.46 ± 0.52 drinks/day. No donor reported having taken any prescription or over-the-counter medication containing caffeine.

A total of 22 donors delivered human milk samples for at least 2 months. In only one of these donors was there a relationship between collection time and caffeine levels in milk ($P = .030$), the caffeine levels being greater as donation time increased. A total of 60% (19/32) of all the samples expressed before completing the questionnaire contained caffeine vs the 44% (162/368) expressed later on ($P = .09$).

Discussion

Our main result was the good agreement between self-report and milk analysis for illegal drug use. A single milk sample with nicotine and cotinine was from a mother who stated she was a nonsmoker (1.6% false-negative result on the questionnaire). The sensitivity and specificity of the questionnaire to detect caffeine in donor milk was 46% and 77%, respectively. The sensitivity and specificity of the questionnaire to detect caffeine in mature milk was greater than for colostrum and intermediate milk. The absence of illegal drugs in milk donors is likely attributable to the fact that the population is highly sensitive to the benefits of breastfeeding.

Table. Self-reported caffeinated beverage use and presence of caffeine in donor milk

Reported use of caffeinated beverages	Donor milk test (gold standard)		Total
	Positive	Negative*	
Yes	21	4	25
No	24	14	38
Total	45	18	63

*Below the detection limit of the method (3 ng/mL).

The concentration of caffeine is similar to that found in previous studies in which caffeine in breast milk from caffeine-consuming mothers was between 32 and 4000 ng/mL,⁹⁻¹⁵ except for one with a level of 7564.26 ng/mL. These caffeine levels, as for nicotine, may vary depending on the time between drinking the last caffeinated beverage and the time of the milk expression (data not collected in our questionnaire). The mean elimination half-life of caffeine in breast milk usually occurs about 5-6 hours after having the drink.¹⁵⁻¹⁷ It is possible that 16% (4/25) of the participants who reported having drunk caffeinated beverages and who tested negative in their donor milk samples, had coffee, tea, or soft drinks at times distant from the collection of the milk.

By contrast, 63.2% (24/38) donors who reported nonuse of caffeinated beverages during donation had caffeine in their milk.

This finding could be attributable first to the provision of false information by the donors (improbable because caffeine is not considered a drug of abuse) or second because of a faulty design in our questionnaire regarding the gathering of information on possible sources of caffeine. The questionnaire asked for the number of coffees, teas, soft drinks, and medications consumed per day. However, there are certain foods and beverages containing caffeine that were not considered, such as energy drinks, chocolate found in candy, desserts, and beverages like chocolate milk, along with food that uses chocolate or coffee as an ingredient, such as yogurt, ice cream, and baked goods. To improve data collection on caffeine consumption, a more complete record of the type of drink or food should be specified. Second, the approximate volume or grams of each drink or food consumed should be recorded. Third, the usual time of day (morning, afternoon, evening, or night) when the donor consumes these products should be reported and finally, the donor should report the usual time of day when she expresses her milk for the milk bank.

On the basis of the concentrations found in the milk, including the highest, the potential exposure of an infant to caffeine ingested through breast milk is not of concern. The recommended loading dose for caffeine citrate for apnea of prematurity is 20 mg/kg, followed by a 5-10 mg/kg/d maintenance dosage.¹⁸ Moreover, unlike theophylline, caffeine is associated with lower rates of toxicity.¹⁹

Since its opening, the Human Milk Bank of the Hospital 12 de Octubre, has rejected only 13 of its 568 donors. The main reasons for the exclusion have been: receiving blood transfusions, positive serology for hepatitis B or C, a metabolic disease (3-methylcrotonylglycinuria), a strictly vegan diet, and being an active smoker. No mothers have been rejected as donors because of an addiction to illicit drugs.

This study has certain limitations. First, the short half-life of some drugs in breast milk means that we could not guarantee that a donor had not consumed certain toxic substances before the time of milk expression for the bank. Second, the donor knew that the study would check for illicit or harmful elements in her milk and was aware that the testing would not be anonymous, although confidential.

In conclusion, the results of the present study suggest that the self-report questionnaire of a human milk bank is reliable for ruling out possible use of illicit drugs and tobacco by the donors. However, there is a poor agreement between caffeine in the milk and the self-reported consumption of caffeinated beverages. It is possible that these results would improve if a differently designed questionnaire included information about the type and volume of beverage or food containing caffeine, method of preparation, and time of day of consumption. ■

The generosity of the human milk donors made this research possible. We also thank Dr Emilia Marchei and Donatella Mattioli (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy) for technical assistance, Spanish Collaborative Maternal and Child Health Research Network Spanish Collaborative Research Network, and Ann Marie Strigari for her editing assistance.

Submitted for publication Feb 16, 2013; last revision received Oct 29, 2013; accepted Nov 19, 2013.

Reprint requests: Diana Escuder-Vieco, BSc, Department of Neonatology, Hospital 12 de Octubre, Edificio Materno-Infantil, Avda de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain. E-mail: diana.e.vieco@gmail.com

References

1. American Academy of Pediatrics. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012;129:827-41.
2. de Segura AG, Escuder D, Montilla A, Bustos G, Pallás C, Fernández L, et al. Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk alter Holder pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:197-203.
3. Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, Dietz K, Besenthal I, Goelz R, et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res* 2004;56:529-35.
4. Fríguls B, Joya X, García-Algar O, Pallás CR, Vall O, Pichini S. A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:1157-79.
5. Santos IS, Matijasevich A, Domingues MR. Maternal caffeine consumption and infant nighttime waking: prospective cohort study. *Pediatrics* 2012;129:860-8.
6. Marchei E, Escuder D, Pallas CR, García-Algar O, Gómez A, Fríguls B, et al. Simultaneous analysis of frequently used licit and illicit psychoactive drugs in breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2011;55:309-16.
7. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
8. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Farm Med* 2005;37:360-3.
9. Pellegrini M, Marchei E, Rossi S, Vagnarelli F, Durgbanshi A, García-Algar O, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:2693-703.
10. Blanchard J, Weber CW, Shearer LE. HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk. *J Chromatogr Sci* 1990;28:640-2.
11. Tyrala EE, Dodson WE. Caffeine secretion into breast milk. *Arch Dis Child* 1979;54:787-800.
12. Ryu JE. Effect of maternal caffeine consumption on heart rate and sleep time of breast-fed infants. *Dev Pharmacol Ther* 1985;8:355-63.
13. Ryu JE. Caffeine in human milk and in serum of breast-fed infants. *Dev Pharmacol Ther* 1985;8:329-37.
14. Bailey DN, Weibert RT, Naylor AJ, Shaw RF. A study of salicylate and caffeine excretion in the breast milk of two nursing mothers. *J Anal Toxicol* 1982;6:64-8.
15. Oo CY, Burgio DE, Kuhn RC, Desai N, McNamara PJ. Pharmacokinetics of caffeine and its demethylated metabolites in lactation: predictions of milk to serum concentration ratios. *Pharm Res* 1995;12:313-6.
16. Berlin CM Jr, Denson HM, Daniel CH, Ward RM. Disposition of dietary caffeine in milk, saliva, and plasma of lactating women. *Pediatrics* 1984;73:59-63.
17. Stavchansky S, Combs A, Sagraves R, Delgado M, Joshi A. Pharmacokinetics of caffeine in breast milk and plasma after single oral administration of caffeine to lactating mothers. *Biopharm Drug Dispos* 1988;9:285-99.
18. Charles BG. Caffeine citrate treatment for extremely premature infants with apnea: population pharmacokinetics, absolute bioavailability, and implications for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2008;30:709-16.
19. Henderson-Smart DJ, Steer PA. Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;1-19.