



Efecto inhibitorio del calostro humano sobre *Vibrio cholerae* 01

Soledad Sandoval Zaragoza,* Gustavo Adolfo Berrospe Gómez,** Jorge Becerril Plata,*** Rafael García González,**** Víctor Vargas Hernández,***** Gustavo Acosta Altamirano*****

RESUMEN

El calostro y la leche materna le confieren protección al lactante, ya que se ha comprobado que cuenta con elementos que proporcionan inmunidad contra enfermedades provocadas por bacterias, parásitos y virus. Se investigaron todos los cuadros diarreicos compatibles con infección por *Vibrio cholerae* en el periodo 1991-1995 en menores de cinco años que acudieron al Hospital General Regional No. 72 del IMSS. Sólo se presentaron dos casos en menores de un año, mismos que no habían recibido lactancia materna. Con este antecedente se realizó, por separado e individualmente, un estudio *in vitro* en 32 muestras de calostro obtenidas por expresión manual y mantenidas en refrigeración por un máximo de 48 horas. En cada tubo se colocó una suspensión constante de bacterias de *Vibrio cholerae* 01 (10 µL) en 990 µL de calostro. La suspensión de las bacterias y el calostro se dejaron en contacto 0, 15, 30 y 60 minutos; conforme mayor es el tiempo de contacto entre las bacterias y el calostro, ocurre una disminución importante en el número de colonias la cual es estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Palabras clave: Leche materna, calostro, *Vibrio cholerae* 01, protección.

ABSTRACT

The colostrum and the breast feeding confer protection to the unweaned baby. It is well known that both of them contain substances which provide immunity against illness that are produced by bacterium, parasites and virus. We did research on all children under five years who were diagnosed with diarrhoea probably produced by *Vibrio cholerae*, at the Regional General Hospital No. 72, of the Instituto Mexicano del Seguro Social, from 1991 to 1995. We found just two children under one year, with such illness, who hadn't had motherly lactation. Because of that, 32 samples of colostrum, which were obtained and conserved in refrigeration by no more than 48 hours were analyzed. A suspension of *Vibrio cholerae* 01 (10 µL) in 990 µL of colostrum, was placed in each one of the test tubes. The suspension of bacterium and the colostrum were contacted in several times: 0, 15, 30 and 60 minutes. We observed that the more time, the less colonies of bacterium were developed. This is a result statistically significative ($p < 0.001$).

Key words: Breast feeding, colostrum, *Vibrio cholerae* 01, protection.

* Epidemiología del Hospital General Regional 72, IMSS.

** Sanidad Naval, Secretaría de Marina.

*** Epidemiólogo de la Jurisdicción Epidemiológica Tlalnepantla, Secretaría de Salud.

**** Lab. de Bacteriología. Instituto Nacional de Pediatría, SSA.

***** D. en C. e Inmunólogo del Hospital Juárez de México.



INTRODUCCIÓN

El calostro humano es una secreción amarillenta por la gran cantidad de carotenos que contiene, así como proteínas, minerales, grasas, vitaminas (hidrosolubles y liposolubles) y carbohidratos, principalmente lactosa. Su pH es de 6.8 y su densidad varía de 1.03 a 1.06. Cabe mencionar que la concentración de los componentes en el calostro es mayor que la que contiene la leche. Todo esto puede variar de acuerdo con la alimentación de la madre y lactancia previa.

La ingestión de calostro y leche materna da una protección a la superficie de la mucosa intestinal y posiblemente a las vías respiratorias de los recién nacidos, ya que se ha demostrado que en aquellos niños que reciben lactancia materna comparada con los que no la reciben, disminuye su morbilidad por infecciones respiratorias y gastrointestinales.¹

De los elementos celulares identificados en el calostro humano, los macrófagos conforman el mayor porcentaje, seguido de los leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y células epiteliales.²

Se sabe que a medida que progresla la lactancia y se inicia el flujo de la leche materna, el número de células tiende a disminuir de forma constante. Se ha observado que a los dos o tres días de lactancia hay aproximadamente 10^4 a 10^5 linfocitos por mL de calostro.³

Los linfocitos del calostro pueden tener una reactividad importante *in vitro* contra una amplia variedad de antígenos como candidina, estreptocinasa, tuberculina, citomegalovirus y los virus de parotiditis y rubéola. Los linfocitos también se caracterizan por una hiporespuesta a mitógenos no específicos y antígenos de histocompatibilidad de células alogénicas. Se sugiere que los linfocitos de calostro y leche representan una población heterogénea de linfocitos que podrían derivarse del tejido linfoide asociado a intestino (TLAI) o del tejido linfoide asociado a bronquios (TLAB), de formas semejantes a los precursores de IgA en la glándula mamaria durante el periodo de lactancia.⁴

Con relación a los macrófagos, han sido poco estudiados aunque se han demostrado algunas de sus propiedades como son: su capacidad amebicida y su contenido intracelular de IgA.

En otros estudios se indica que los macrófagos del calostro humano son los responsables de la síntesis de algunos productos de resistencia del huésped y factores propios de la leche; estos incluyen la lactoferrina, componentes del complemento y de manera importante se

comportan como vehículo de almacenamiento y transporte de IgA.⁵

También es sabido que los hospitales cuya política es el alojamiento conjunto, tienen una menor morbilidad neonatal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio epidemiológico de casos sospechosos de cólera

Se estudiaron todos los casos sospechosos de cólera en el periodo 1991-1995 de acuerdo con los grupos etáreos de menores de un año hasta cinco años de edad; todos ellos correspondieron a la zona de influencia de la Jurisdicción Sanitaria de Tlalnepantla y municipios circunvecinos, incluyéndose el Hospital de Urgencias de la Villa y Hospital Infantil de México en el D.F., con el antecedente de tener como lugar de residencia el Estado de México. Se logró conjuntar todos los pacientes con síndrome diarreico sospechosos de cólera desde el punto de vista del Sector Salud, ya que se tomaron todos los casos reportados y captados por el IMSS, ISSSTE y SSA, en el 1º y 2º nivel de atención.

En todos los niños internados en alguna Institución del Sector Salud en el área de urgencias, hospitalización, y pacientes ambulatorios que presentaron evacuaciones diarreicas, se procedió a la identificación del *Vibrio cholerae* 01 en muestras de heces fecales, con hisopo rectal, mediante pruebas rápidas: Cólera-Smart, el cual es un inmunoensayo colorimétrico, y cultivo de heces fecales en medio de transporte de Cary-Blair; dichos estudios permitieron la identificación del agente etiológico.

Finalmente, en todos los casos se realizó estudio epidemiológico de la institución correspondiente, con seguimiento por parte del HGR No. 72 y la Jurisdicción Sanitaria de Tlalnepantla, en busca del antecedente de alimentación al seno materno o lactancia artificial.

Medios de cultivo y soluciones para el crecimiento de *Vibrio cholerae* 01

a) Medio de cultivo TCBS. Extracto de levadura 5 g, peptona proteasa-3 de difco, citrato sódico 10 g, tiosulfato sódico 10 g, bilis de buey 8 g, sacarosa 20 g, cloruro sódico 10 g, citrato férrico 1 g, azul de bromotinol 0.04 g, azul de timol 0.04g, agar 15 g.

Poner a punto de ebullición y vaciar en las cajas de Petri.



b) Infusión cerebro corazón. Infusión de cerebro de ternera 200 g, infusión de corazón de vacuno 250 g, ácido p-aminobenzoico 0.04 g. Se mezclan formando un líquido y se esterilizan en autoclave.

Efecto inhibitorio *in vitro* de calostro humano sobre *Vibrio cholerae*

Obtención de las 32 muestras de calostro

Las muestras se obtuvieron en un periodo de 24 a 72 horas posparto, de mujeres primíparas y multíparas con un rango de edad entre 16 y 38 años, internadas en el Hospital General Regional No. 72 del IMSS, para incubación *in vitro* con *Vibrio cholerae*.

Se utilizaron bacterias de *Vibrio cholerae* del serogrupo 01, procedentes del Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE). Las cepas se mantuvieron en cultivo entre 37 y 38 °C en tubos de vidrio.

Desarrollo del experimento

Se mezclaron suspensiones de *Vibrio cholerae* en medio BHI, colocándose posteriormente en la incubadora a 37 °C. Se ajustaron hasta 30 unidades Klett, dejándose reposar a medio ambiente.

Se utilizó un tubo para cada experimento y se colocaron 990 µL de calostro más 10 µL de suspensión bacteriana y de ésta se tomaron alicuotas a diferentes intervalos: 0, 15, 30 y 60 minutos.

- Tiempo 0. Una vez que se pone en contacto el calostro con la suspensión bacteriana se mezcla y se toma de ésta 10 µL, los cuales se colocan en medio de cultivo TCBS, y es distribuida en forma uniforme con una asa estéril.
- Tiempo 15'. Se incuba la mezcla de calostro y suspensión bacteriana por 15 minutos a temperatura ambiente, y se toman 10 µL realizándose el mismo procedimiento del inciso anterior.
- Tiempo 30'. Se deja la misma mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos y se procede a seguir los mismos pasos del inciso a).
- Tiempo 60'. La mezcla es mantenida a temperatura ambiente por 60 minutos y se siguen los mismos pasos del inciso a).

En cajas de Petri individuales, con medio de cultivo TCBS, se colocaron 10 µL de las suspensiones bacterianas incubadas con el calostro a una temperatura de 37 °C por 24 horas, con el fin de favorecer el crecimiento

de colonias y se realizó el conteo de números de colonias por placa.

Al final de cada periodo (intervalo), se realizó una comparación entre el número de colonias encontradas en el tiempo 0, 15, 30 y 60 minutos, para evaluar la disminución del número de colonias de *Vibrio cholerae* posterior a su contacto con el calostro.

RESULTADOS

De acuerdo con el reporte epidemiológico de pacientes menores de cinco años con el síndrome diarreico sospechoso de cólera durante el periodo de 1991-1995, sólo hubo casos confirmados en la población de 1-2 años y ninguno de éstos fueron alimentados por seno materno.

La protección por leche materna se limita al primer año de vida, ya que es improbable que continúe ulteriormente la lactancia materna.

Por otro lado, de un total de 32 muestras de calostro y leche materna que se analizaron, se logró observar en 22 una disminución gradual de colonias bacterianas de *Vibrio cholerae* conforme era mayor el tiempo de contacto de éste con el calostro.

Las 22 muestras que presentaron una disminución gradual del número de bacterias se consideraron como efecto positivo, y en las que hubo aumento o que presentaron disminución al minuto 60, en comparación con el tiempo 0, se consideraron como efecto negativo.

Al promediar los resultados de las 32 muestras de calostro incubadas con suspensión de *Vibrio cholerae* se obtuvieron 209.4 colonias en el tiempo 0; 156.2 colonias a los 15; 121.2 colonias a los 30; y 91.7 colonias a los 60 minutos.

Por otra parte, al comparar el tiempo 0 con el tiempo 15, 30 y 60 minutos en lo referente al promedio aplicando una prueba t, obtuvimos los siguientes resultados: tiempo 0 comparado con el tiempo 15 obtuvimos $t = 1.15$ con una $P < 0.10$, el cual no es un resultado estadísticamente significativo, debido a que el tiempo durante el cual estuvo en contacto el *Vibrio cholerae* con el calostro fue muy corto, y aunque haya presentado una disminución del número de colonias de la bacteria, ésta no fue muy marcada en comparación con la del tiempo 0. Con el tiempo 30 obtuvimos un $t = 3.20$, $P < 0.005$, el cual es un resultado estadísticamente significativo, y aquí sí se observó una marcada diferencia en la disminución de colonias con respecto a la observada en el tiempo 0. Por último, al comparar el tiempo 0 con

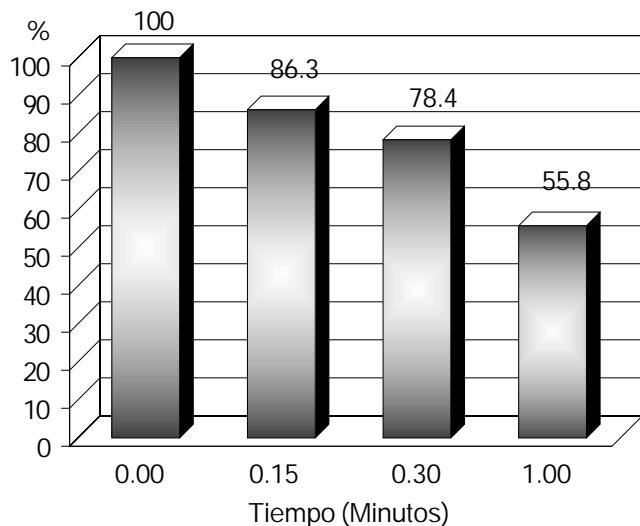


Figura 1. Porcentajes de colonias de *V. cholerae* al incubarse con calostro humano a diferentes tiempos.

el tiempo 60, obtuvimos una $t = 4.10$ y una $p < 0.001$, resultado estadísticamente significativo.

Los promedios obtenidos para cada tiempo de incubación los expresamos en porcentajes; de esta manera podemos observar de una forma más sencilla los cambios en el número de colonias del *Vibrio cholerae*. El tiempo 0 lo consideramos como basal por lo que la concentración del número de colonias se toma como el 100%. En el tiempo 15, el número de colonias estuvo en 86.3%, presentando una disminución del 13.07% con relación al 100% del tiempo 0. En el tiempo 30 encontramos el número de colonias con 73.4%, presentando una disminución del 23.7% con relación al 100% del tiempo 0; y por último, en el tiempo 60 se encontró el número de colonias en 55.8%, con una disminución del 54.2% con relación al 100% del tiempo 0 (Fig. 1).

Por último, del total de las muestras analizadas encontramos que 66.75% tuvieron un efecto inhibitorio significativo.

DISCUSIÓN

La protección de la leche materna tiene una duración limitada (directamente proporcional a la duración de la lactancia materna).⁶⁻⁸ En virtud de que el número de casos sospechosos en menores de un año fue muy pequeño, sólo se encontraron dos casos positivos, o sea, nueve casos negativos en un total de 11 casos sospechosos estudiados, de acuerdo con el control y

seguimiento epidemiológico realizado a la población menor de cinco años.

Los resultados obtenidos durante el transcurso de nuestra investigación fueron realmente satisfactorios. Las muestras analizadas de leche materna demostraron que existen elementos que inhiben o afectan la viabilidad del *Vibrio cholerae*. El 66.75% de nuestras muestras que resultaron positivas y que fueron comparadas, conforme transcurría el tiempo de contacto de la bacteria con el calostro, presentaron una disminución progresiva, llegando hasta 54% de disminución del número de colonias.

Con todo esto y el análisis de los resultados epidemiológicos obtenidos podemos concluir que el calostro y la leche materna contienen elementos que afectan la viabilidad de la bacteria y que de cierta forma pueden proteger a los niños que reciben alimentación del seno materno contra este tipo de enfermedad.

Por otra parte, es importante continuar promoviendo la lactancia materna y fomentando la estrategia del hospital amigo del niño y de la madre, ampliéndola al primer nivel de atención a la salud.⁹

REFERENCIAS

1. Acosta G, Cote, Isibasi A, Kumate J. Anticuerpos anti *Entamoeba histolytica* de clase IgA en el calostro de mujeres mexicanas. Inmunología 1985; 4: 24-7.
2. Acosta G, Ortiz J, Neteras EC, Barragán L, Torres S, Santos JL. Identificación y comparación de subpoblaciones de linfocitos en muestras de calostro en sangre periférica en un grupo de mujeres con productos a término. Inmunología 1994; 13: 118-21.
3. Acosta G, Rocha LM, Reyes MR, Santos JL. Antiamoebic properties of human calostrum. Adv Exp Md Biol 1987; 216B: 1347-52.
4. Anderson B, Porras O, Anson LA. Non antibody fractions of breast milk inhibit epithelial attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Lancet 1985; 1643-7.
5. Clemen J, Clerici N, Espinoza M, Leyva Cobian F. Defective chemotactic response of human alveolar and calostral macrophages. Immunology letters 1986; 5: 343.
6. Husghes A, Brock JH, Parrot DM. Effect of human calostrom and infant formula on phagocyte activity of macrophages I, residents and stimulated mouse peritoneal macrophages. Clin Exp Immunol 1985; 61: 169
7. Muñoz C, Endres S, Van Der Meer J, Schlesinger L, Arevalo M, Dinarello C. Interleukin-1 beta in human calostrum. Res Immunol 1990; 141(6): 505-13.



8. Robertson DM, Forrest PC, Frangoulis E. Early induction of secretory immunity in infancy specific antibody in neonatal breast milk. *Arch Dis Child* 1986; 61(5): 489.
9. Rocha RLM, Cruz RA, García MMMR. Inmunología del calostro y leche humana. En: Acosta G, y Cruz M. (eds): Inmunología de las mucosas. México, D.F.: DEMSA 1992. p. 135-48.

Solicitud de sobretiros:
Dra. Soledad Sandoval Zaragoza
Hospital General Regional No. 72
IMSS. Tlalnepantla, Estado de México

Recibido para publicación: 6 de diciembre de 2000.
Aceptado para publicación: 3 de junio de 2001.