

## **Determinación de Inmunoglobulina A en leche humana antes y después de pasteurizar**

Ortíz K<sup>1</sup>; Moreira R<sup>2</sup>; Soto M<sup>3</sup> y Arroyo G<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

<sup>2</sup>Laboratorio Clínico, Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala

<sup>3</sup>Departamento de Pediatría, Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala  
gerarroyo@gmail.com

### **Resumen**

La IgA es la inmunoglobulina predominante en las secreciones humanas la cual actúa como barrera humoral primaria brindando protección en los epitelios mucosos contra infecciones por microorganismos. El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar el efecto del proceso de pasteurización en la concentración de IgA, llevado a cabo como parte del procesamiento de las muestras de leche humana en el Banco de Leche Materna del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, Antigua Guatemala. Para ello se recolectaron por conveniencia 37 muestras de leche madura de madres atendidas en el Banco de Leche Materna del Hospital. Una alícuota de 3 mL fue obtenida antes del proceso de pasteurización por cada muestra y una alícuota de 3 mL después del proceso de pasteurización. El análisis de la IgA se realizó mediante un método de turbidimetría. La concentración media de IgA antes del proceso de pasteurización fue de 18.86 mg/dL y la concentración media de IgA después del proceso de pasteurización fue de 9.94 mg/dL. La disminución de la concentración de IgA fue significativa después del proceso de pasteurización ( $p < 0.0001$ ), con un porcentaje de reducción en la concentración de IgA de 48.28 %. Se observó una correlación negativa entre la acidez Dornic y la concentración de IgA. A pesar de la reducción de IgA relacionada al proceso de pasteurización de la leche humana está aún contiene un promedio de 51.72 % de la concentración de esta importante proteína inmunológica la cual brinda protección a los infantes que la consumen.

Palabras clave: inmunoglobulina A; leche humana; pasteurización; banco de leche.

## **Determination of immunoglobulin A in human milk before and after pasteurization**

### **Abstract**

Secretory IgA is the most frequent immunoglobulin found in human secretions which acts as a humoral barrier in mucosal epithelium giving protection against infections produced by microorganisms. The objective of this study was to determinate how the concentration of IgA is affected by the process of pasteurization. We collected 37 samples of mature milk from moms who attended the Human Milk Bank at the National Hospital Pedro Bethancourt, in Antigua Guatemala. One aliquot of 3 mL was collected before pasteurization and another aliquot of 3 mL was collected after pasteurization from each sample. The analysis of IgA was made by immunoturbidimetry. The average concentration of IgA before pasteurization was 18.86 mg/dL and the average concentration of IgA after pasteurization was 9.94 mg/dL. The diminution of the IgA concentration was significant after pasteurization ( $p < 0.0001$ ). We observed a negative correlation between the concentration of IgA and Dornic acidity. There was a 48.28 % reduction of IgA original concentration but despite the reduction of IgA associated to the process of pasteurization of the human milk, samples still contain an average of 51.72% of the original concentration of this important immunologic protein which give protection to the infants that are fed with this milk.

Key words: immunoglobulin A; human milk; pasteurization; milk bank.

## Introducción

La leche humana es recomendada por la Academia Americana de Pediatría y por la Organización Mundial de la Salud como la forma óptima de nutrición para los recién nacidos, incluyendo los de bajo peso al nacer (APP, 2005; WHO, 2011). Debido al riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas a través de la lactancia materna, surge la necesidad de pasteurizar la leche humana en los bancos de leche. Este proceso es llevado a cabo en los bancos de leche humana, los cuales son servicios hospitalarios especializados de carácter multidisciplinario.

Varios estudios han demostrado que el proceso de pasteurización reduce el valor nutricional e inmunológico de la leche humana (Akinbi, *et al.*, 2010; Viazis, *et al.*, 2007; Permanyer, *et al.*, 2010; Braga & Palhares, 2007). Sin embargo el grado de afectación de las sustancias contenidas en la leche humana no ha sido consistentemente establecido en los trabajos reportados, lo cual es indicativo que el grado de afectación varía de acuerdo a las condiciones en que se trabaja en cada banco.

Para poder comprender en qué grado se ven afectadas las sustancias que aportan el valor inmunológico a la leche humana se plantea en el presente trabajo evaluar el efecto del proceso de pasteurización sobre la concentración de inmunoglobulina A (IgA) de leche humana recolectada en el Banco de Leche Materna del Hospital Nacional Pedro Bethancourt, así como analizar posibles factores que pueden

influir en los niveles de esta inmunoglobulina.

## Materiales y Métodos

### Muestras

Se seleccionó un total de 37 frascos de leche humana madura recolectada en el Banco de Leche Materna, que contenían un mínimo de 5 onzas. Las muestras fueron clasificadas dependiendo de su acidez Dornic, seleccionándose 10 muestras con acidez Dornic 2, 3 y 4. Solamente se seleccionaron 7 muestras de acidez Dornic mayor o igual a 5. Las muestras fueron analizadas antes del proceso de pasteurización y después del proceso de pasteurización. Se tomó un total de 2 alícuotas de 3 mL de cada frasco, la primer alícuota se tomó antes al proceso de pasteurización y la segunda después del proceso de pasteurización. Las alícuotas fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

### Pasteurización

Se siguió el protocolo de pasteurización descrito por Kolbe, (2008) el cual es conocido en otros países con las siglas LTLT (del inglés *Low temperature long time*). Las muestras de leche fueron llevadas a 62.5 °C en un tiempo mínimo de 15 minutos y luego se mantuvo la temperatura por 30 minutos. Las muestras fueron luego enfriadas a 0-5°C en un tiempo de 15 minutos.

## Determinación de IgA

Las muestras fueron descongeladas a 37°C por 10 minutos e inmediatamente centrifugadas a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos. Con una pipeta automática se tomó el suero y se descartó la fracción lipídica y celular. Se analizó la IgA total mediante turbidimetría utilizando anticuerpos de cabra anti-IgA (BioSystems S. A.). La lectura de los resultados se realizó a 320 nm en un analizador de química A25 marca BioSystems del laboratorio de reumatología del Hospital Roosevelt y la concentración de IgA determinada comparando la densidad óptica de las muestras con una curva estándar.

## Análisis estadístico

Se empleó una *t* de Student para diferencias pareadas a una cola con un  $\alpha = 0.05$ , para determinar una disminución significativa en la concentración de IgA de la leche humana después del proceso

de pasteurización. Para el análisis de la concentración de IgA con respecto al título de acidez Dornic se empleó una correlación de Pearson antes y después del proceso de pasteurización.

## Resultados

Se analizó un total de 37 muestras de leche humana obtenidas del Banco de Leche Materna del Hospital Nacional Pedro Bethancourt. Al analizar las concentraciones de IgA se obtuvo una media de 18.86 mg/dL antes de realizado el proceso de pasteurización, siendo la mayor concentración obtenida de 119 mg/dL y la menor de 0 mg/dL.

La media obtenida después de pasteurizar fue de 9.94 mg/dL siendo la mayor concentración obtenida de 113 mg/dL y la menor de 0 mg/dL. La disminución de la concentración de IgA fue significativa después del proceso de pasteurización ( $p < 0.0001$ ). El porcentaje de reducción en la concentración de IgA fue 48.28 % (Tabla 1).

Tabla 1. Determinación de la concentración de IgA pre y post pasteurización

	Pre	Post	<i>p</i> *
Promedio	18.86	9.94	<0.0001
Desviación estándar	28.68	23.04	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de reumatología del Hospital Roosevelt

\* valor *p* de *t* de Student para diferencias pareadas a una cola

El coeficiente de correlación de Pearson indicó que no existe una correlación entre los valores de acidez Dornic y la concentración de IgA antes del proceso de pasteurización (Coeficiente de correlación de Pearson=-0.05701). De igual manera que en las muestras de leche antes del

proceso de pasteurización, se observó que no existe una correlación entre los valores de acidez Dornic y la concentración de IgA después del proceso de pasteurización (Coeficiente de correlación de Pearson= -0.13198) (Figura 1).

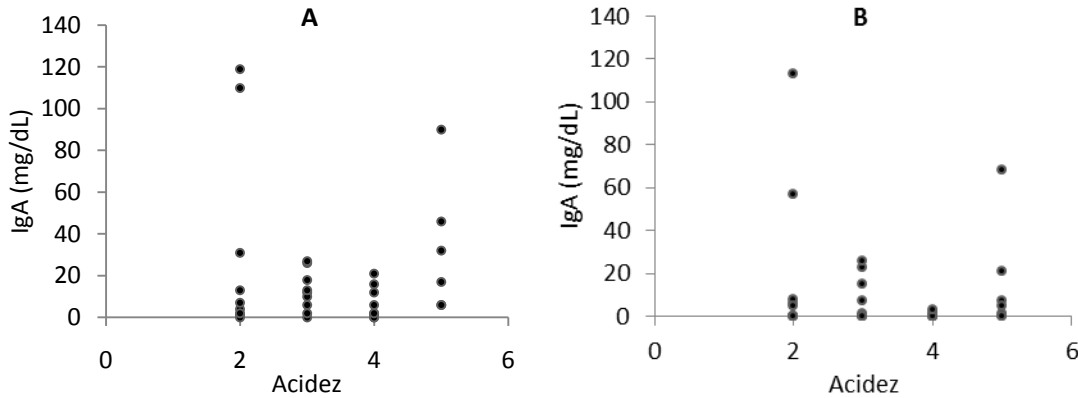


Figura 1. Gráfica de dispersión de datos entre la concentración de IgA antes del proceso de pasteurización versus acidez Dornic (A), Coeficiente de correlación de Pearson = -0.05701; y concentración de IgA después del proceso de pasteurización (B) versus acidez Dornic, Coeficiente de correlación de Pearson = -0.13198.

### Discusión

En los bancos de leche humana las muestras son procesadas llevando a cabo una serie de pasos dentro de los cuales está incluida la pasteurización de la leche. La leche es llevada a una temperatura de 62.5°C por un periodo de 30 minutos (Soto & Moreira, 2009). Es durante este periodo que se eliminan los microorganismos patógenos y se produce una reducción en el valor nutricional e inmunológico de la leche humana. La media obtenida en este estudio (18.86 mg/dL) demostró que la IgA antes del proceso de pasteurización fue considerablemente menor a la reportada por otros autores los cuales también

analizaron muestras de leches provenientes de distintas madres (Akinbi, *et al.*, 2010; Viazis, *et al.*, 2007; Permanyer, *et al.*, 2010; Braga & Palhares, 2007), excepto a la concentración reportada por Hartmann, *et al.* (2006) en la cual se reporta una media de 26.33 mg/dL. Recientemente en un estudio aún sin publicar llevado a cabo por Linares *et al.* (2013) se determinó mediante turbidimetría una concentración media de IgA de 29.8 mg/dL, la cual se asemeja a la reportada en el presente estudio. Según Humbert *et al.*, (2006) para el análisis por métodos espectrofotométricos es necesario el realizar un paso de aclaramiento de las

muestras debido a una suspensión coloidal de caseína y a los glóbulos de grasa presentes en las leches los cuales obstruyen el paso de la luz a través del suero de la leche. Debido a la ausencia en la clarificación de las muestras se puede explicar el por qué la concentración media de IgA obtenida en el presente estudio y la media obtenida por Hartmann, et al. fueron menores a las medias presentadas por el resto de autores.

Existen diversos factores que pueden influenciar los valores de IgA, dentro de estos factores es muy importante resaltar el informe presentado por Tomicic, *et al.* (2010) en el que la raza es uno de los factores condicionantes en la concentración de IgA, por lo cual comparar la media de la concentración de IgA antes del proceso de pasteurización con la reportada por otros autores carecería de importancia por tratarse de poblaciones distintas. Otro factor que también ha sido reportado como importante la concentración de IgA de la leche humana es el estado nutricional de la madre (Bartolozzo, *et al.*, 2010), habiéndose demostrado que las madres con un alto consumo de proteínas en sus dietas presentan concentraciones de IgA significativamente diferentes a las madres con un consumo normal de proteínas. Así como la dieta existen muchas otras variables que no fueron tomadas en consideración en el presente estudio, factores como la presencia de procesos infecciosos en la madre, el periodo de gestación en el que la madre tuvo al infante e inclusive el tiempo de

refrigeración que se le da a la leche, pueden llegar a afectar la concentración de la IgA en la leche humana.

Como se ha reportado por otros autores el proceso de pasteurización de la leche afecta la concentración de la IgA siendo el grado en que esta disminuye muy oscilante entre los reportes encontrados. Los porcentajes de reducción de la concentración de IgA van desde 28.95 % hasta un 63.91 % (Akinbi, *et al.*, 2010; Viazis, *et al.*, 2007; Permanyer, *et al.*, 2010; Braga & Palhares, 2007). El porcentaje de reducción obtenido en el presente estudio fue de 48.28 %, la disminución de la concentración de IgA fue significativa después del proceso de pasteurización ( $p < 0.0001$ ). En una investigación llevada a cabo por Ogundele (2000) se concluye que la destrucción de la IgA se debe principalmente al efecto de la temperatura (62.5 °C) y no al tiempo utilizado para la pasteurización (30 min.). La concentración de IgA remanente después del proceso de pasteurización (9.94 mg/dL) representa a una ventaja de la leche humana sobre las fórmulas de leche artificiales, las cuales no contienen factores inmunológicos. Esto también representa una ventaja por sobre la leche de vaca ya que esta también contiene IgA, pero al no ser esta de origen humano, así como muchas otras proteínas contenidas en esta, puede llegarse a producir una respuesta inmune no deseada en el neonato. Viazis *et al.* (2007) evaluaron no solamente la concentración de IgA sino también su actividad, concluyendo que la también se observa una reducción de la



actividad de la IgA en el proceso de pasteurización a 62.5 °C por 30 min pero que esta actividad es aún mayor que la obtenida por una pasteurización a 73 °C por 5 segundos.

En un estudio llevado a cabo por Novak y Cordeiro (2007) se demostró que el título de acidez Dornic aumenta a medida que lo hace la concentración de mesófilos en las leches analizadas; y en un estudio llevado a cabo por Lawrence (1999) el autor concluye que la concentración de IgA se ve disminuida conforme aumenta la carga bacteriana en la leche humana. Estos datos hacen pensar que a mayor acidez dornic habrá menor concentración de IgA, lo cual no concuerda con el índice de correlación de Pearson obtenido antes y después del proceso de pasteurización en el presente estudio. Se ha reportado en la literatura que el aumento del título de acidez Dornic se debe al consumo de la lactosa por la microbiota de la leche para dar como producto final ácido láctico. Este ácido láctico aumenta el nivel de hidrogeniones ( $H^+$ ) en la leche, los cuales pueden llegar a afectar la estabilidad de la IgA. Sin embargo la literatura establece que la IgA es estable en medios ácidos, ya que esta es secretada en forma de dímero, unida por la cadena J, la cual le brinda la estabilidad necesaria para ser secretada (Mestercky & Mcghee, 1987). Además de eso estudios llevados a cabo en ratones han demostrado la transferencia de factores inmunológicos de las madres a los infantes. (Arvola, *et al.*, 2000), siendo este indicativo que los factores inmunológicos en la leche son capaces de resistir el medio ácido que se presenta en

la mucosa gástrica y producido por el metabolismo bacteriano.

### Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Jesús Nuñez y a la empresa BIONUCLEAR por haber proporcionado el reactivo y colaborar en la gestión del equipo utilizado en el análisis de la IgA. A la Licda. Egly Álvarez del Laboratorio de Inmunología del Hospital Roosevelt por permitir el uso de sus equipos e insumos para la realización de la presente investigación.

### Referencias

- Akinbi, H., Meinzen-Der, J., Auer, C., Ma, Y., Pullum, D., Kusano, R., et al. (2010). Alterations in the Host Defense Properties of Human Milk Following Prolonged Storage or Pasteurization. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 51, 347-352.
- APP. (2005). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 115, 496–506.
- Arvola, M., Gustafsson, E., Svensson, L., Jansson, L., Holmdahl, R., Heyman, B., et al. (2000). Immunoglobulin-Secreting Cells of Maternal Origin Can Be Detected in B Cell-Deficient Mice. *Biology of Reproduction*, 63, 1817–1824.

- Bartolozzo, E. Q., Candido, L. M., Colombo, A. O. & Santos, G. (2010). Protein supplementation effects on human milk protein and A immunoglobulin concentrations. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69, 327-332.
- Braga, L. P. M. & Palhares, D. B. (2007). Effect of evaporation and pasterurization in the biochemical an immunological composition of human milk. *Jornal de Pediatria (Rio J.)*, 83, 59-63.
- Hartmann, S. A., Wigdahl, B., Neely, E. B., Berlin, C. M., Schengrund, C., Lin, H. & Howett M. K. (2006). Biochemical Analysis of Human Milk Treated With Sodium Dodecyl Sulfate, an Alkyl Sulfate Microbicide That Inactivates Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Human Lactation*, 22, 61- 73.
- Humbert, G., Guingamp, M. F. & Gaillard, J. L. (2006). The Clarifying Reagent, or how to make the analysis of milk and dairy products easier. *Journal of Dairy Research*, 73, 1–8.
- Kolbe, M. (2009). Implementación de buenas prácticas de manufactura y elaboración del plan de análisis de peligros y puntos críticos de control -haccp-en el banco de leche materna del Hospital Nacional Pedro de Bethancourt, San Felipe de Jesús Antigua Guatemala. Universidad Rafael Landivar. Guatemala.
- Lawrence, R. A. (1999). Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatrica*, 88, 14-18
- Linares, S., Ortiz, K., Soto, M.A., Moreira, R., & Arroyo, G. (2013) [IgA concentrations in breast milk samples during the processing phases at the Human Milk Bank, National Hospital "Pedro de Bethancourt", Antigua Guatemala]. Información no publicada
- Mestercky, J. & McGhee, J. R. (1987). Immunoglobulin A (IgA): molecular an celular interactons involved in IgA biosynthesis and immune responses. *Advances in immunology*, 40, 153.
- Novak, F. R. & Cordeiro, D. M. (2007). The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk. *Jornal de Pediatria*, 83, 87-91.



- Ogundele, M. O. (2000). Techniques for the storage of human breast milk: implications for anti-microbial functions and safety of stored milk. *European Journal of Pediatrics*, 159, 793–797.
- Permanyer, M., Castellote, C., Ramírez-Santana, C., Audí, C., Pérez-Cano, F. J., Castell, M., et al. (2010). Maintenance of breast milk immunoglobulin A after high-pressure processing. *Journal of Dairy Science*, 93, 877–883.
- Soto, M.A. y Moreira, R. (2007) Manual Técnico y Funciones del Banco de Leche Materna. Hospital Nacional Pedro de Bethancourt. Guatemala.
- Tomicic, S., Johansson, G., Voor, T., Björkstén, B. Böttcher, M. F. & Jenmalm, M. C. (2010). Breast Milk Cytokine and IgA Composition Differ in Estonian and Swedish Mothers—Relationship to Microbial Pressure and Infant Allergy. *Pediatric Research*, 68, 330-334.
- Viazis, S., Farkas, B. E., Allen, J. C. (2011). Effects of High-Pressure Processing on Immunoglobulin A and Lysozyme Activity in Human Milk. *Journal of human Lactation*, 23, 253-261
- World Health Organization. (11/01/2011). Exclusive breastfeeding for six months best for babies everywhere. Disponible en: [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2011/breastfeeding\\_20110115/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2011/breastfeeding_20110115/en/index.html)