

Presencia de factores específicos en leche materna contra cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea en humanos

ALEJANDRO CRAVIOTO*

Se estudió la presencia de factores específicos contra cepas de Escherichia coli causantes de diarrea en humanos, en calostro y leches obtenidas longitudinalmente durante el primer año de lactancia de una cohorte de mujeres de un poblado rural, como parte de una investigación sobre el papel que tiene la leche materna en la colonización intestinal y la presencia de diarrea en niños pequeños alimentados al seno materno. Se detectó la presencia de factores globulínicos y no globulínicos contra enterotoxina lábil al calentamiento y factores de colonización CFA/I, CFA/II y PCF 8775 producidos por cepas enterohemorrágicas de Escherichia coli y contra adhesinas utilizadas por cepas enteropatógenas y enteroadherentes de Escherichia coli para causar enfermedad en humanos. Aunque la producción de estos factores no fue constante a través del tiempo, aun en la misma mujer, los resultados reflejan una relación entre la respuesta en leche materna y la presencia de cierto tipo de cepas o sus productos en los hijos de estas mujeres. Los datos apoyan la posibilidad de usar la leche materna como vehículo de vacunación pasiva contra bacterias aisladas con alta frecuencia de niños pequeños con diarrea, a través de incrementar y mantener constante la presencia de factores específicos de protección en la leche con que se alimentan durante el principio de su vida.

CLAVES: Diarrea, leche materna, *Escherichia coli*, inmunidad pasiva.

SUMMARY

Presence of specific secretory immunoglobulin A (sIgA) against pathogenic factors of Escherichia coli related with diarrheal disease was studied in colostrum and breast-milk samples obtained longitudinally from a cohort of rural Mexican women. Levels of sIgA against heat-labile enterotoxin, Shiga-like toxin, colonization factors antigens I, II and E8775 and adherence to HEP-2 cells were detected in samples obtained from 54 rural women during the first year of lactation. Although production of specific sIgA against these pathogenic factors was almost universal it was not constant, even in the same woman. The results reflect a definite mother-infant relationship during this period. The data support the thesis of using breast-milk as a vaccination vehicle against diarrhea associated with specific organisms during the first year of life of infants born in developing areas of the world.

KEY WORDS: Diarrhea, mother's milk, *Escherichia coli*, passive immunity.

* Académico numerario. Instituto Nacional de Ciencias y Tecnologías-DIF.

Existen numerosos estudios que demuestran que la alimentación al seno materno protege a niños pequeños contra diarrea.¹⁻⁶ Se desconoce, sin embargo, si esta protección está dada por la ingesta de factores específicos que contiene la leche materna o por el proceso de amamantamiento como parte de un contexto socio-cultural relacionado con la crianza de los hijos.^{7,8,9}

La leche materna contiene proteínas, grasas y carbohidratos que se han relacionado con protección contra diarrea, tanto a nivel de laboratorio como en niños lactantes.^{4,10-13} Esta relación ha sido esencialmente teleológica; si un factor está presente debe tener algún grado de protección en el niño. A la fecha, sólo el estudio de Glass y colaboradores¹⁴ en relación a protección contra el lipopolisacárido o la enterotoxina producida por *Vibrio cholerae* 01 protege a niños contra la enfermedad, aun cuando se encuentren colonizados por esta bacteria.

En países en desarrollo donde no existe cólera la alimentación al pecho materno parece disminuir la frecuencia de colonización intestinal y la diarrea por cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* (EPEC).^{4,5} Sin embargo, se desconoce el mecanismo por medio del cual la leche materna protege a estos niños, así como si esta protección se extiende a colonización por cepas enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasoras (EIEV), enterohemorrágicas (EHEC) o enteroadherentes (EAEC) de *Escherichia coli*.¹⁵

Como parte de un programa de investigación que tiene como objetivo conocer cómo es el proceso de colonización intestinal y su relación con diarrea, en una cohorte de niños rurales, seguidos longitudinalmente durante los primeros años de vida, se decidió estudiar el papel específico que pudieran tener los componentes del calostro y de la leche materna con que se alimenta a estos niños, en relación con la colonización y la presencia de diarrea asociada con diferentes tipos patógenos de *Escherichia coli*.

En este primer reporte se informan los resultados de las determinaciones de factores globulínicos y no globulínicos contra mecanismos de patogenicidad utilizados por cepas EPEC, ETEC, EHEC y EAEC para causar diarrea en humanos.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en el ejido "En la Casa de los Guajes" del Estado de Morelos, situado aproximadamente a 180 kilómetros al suroeste de la ciudad de México. Las características del poblado y de la cohorte en estudio han sido descritas con anterioridad.^{16,17} Se colectaron muestras de calostro y leche materna en forma longitudinal cada quince días a partir del nacimiento del niño. Las muestras fueron tomadas por expresión manual a la misma hora del día en recipientes estériles, después de desinfectar la aréola y el pezón y de descartar las primeras dos gotas. Las muestras fueron congeladas de inmediato y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

Para obtener la fase acuosa, las muestras fueron sometidas a centrifugación a 12 000 x g a 4 °C durante 15 minutos después de ser descongeladas. El sobrenadante que se obtuvo fue dividido en dos partes alícuotas. Una de ellas fue utilizada para obtener una fracción de alto peso molecular (FAPM) por cromatografía por Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA) en los eluyentes fue obtenida por cromatografía de afinidad con un sistema comercial (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois); fue concentrada por ultrafiltración, se dializó 24 horas contra solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), pH 7.2 y fue esterilizada por filtración. La pureza de cada muestra de sIgA se probó mediante inmunotransferencia a nitrocelulosa (Schleier-Scheuell, Keene, New Hampshire), y detección con anti-sIgA de calostro humano obtenida en cabras (Kirkegaard and Perry, Inc., Gaithersburg, Maryland) según el método de Towbin y colaboradores¹⁸ después de correr los eluyentes en geles de acrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), según el método de Leammi.¹⁹ La cantidad total de sIgA en cada muestra fue determinada por inmunodifusión radial utilizando como estándar sIgA purificada de calostro humano (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri). La concentración de proteínas totales fue determinada por duplicado con el método de Lowry y colaboradores.²⁰

La segunda alícuota fue usada para obtener una fracción de bajo peso molecular (FBPM) por ultrafiltración a través de membranas Diaflo YM10 (Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts), con un punto de corte de 10 000. Pruebas de inmunodifusión tipo Ouchterlony²¹ utilizando anti-sIgA humana obtenida en cabras (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland) demostraron que no existía contaminación de sIgA en la FBPM.

La determinación de sIgA específica contra enterotoxina lábil al calentamiento (LT) y los factores de colonización CFA/I, CFA/II (CS1, CS2 y CS3) y PCF 8775 producidos por cepas ETEC fue determinada por ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA). En el caso de LT las determinaciones fueron hechas siguiendo la técnica descrita por Svennerholm y Holmgren²² utilizando gangliósido GM₁ purificado (Supelco, Belafonte, Pennsylvania) como sustrato inicial. Para las determinaciones de sIgA contra los factores de colonización se montaron sistemas de ELISA específicos utilizando como sustrato inicial fimbrias purificadas por el método de Evans y colaboradores.²³ En cada caso se ajustó la cantidad de sustrato a una concentración de 1 mg/ml de proteína total con el fin de estandarizar los ensayos. Los resultados de estas pruebas se presentan en unidades ELISA/g de sIgA, obtenidas dividiendo para cada muestra el título encontrado en los ensayos de ELISA entre la cantidad de sIgA total en gramos por litro.¹⁴

Para determinar la actividad neutralizante de las fracciones de alto y bajo peso molecular contra citotoxina tipo Shiga 1 producida por cepas EHEC²⁴ se utilizó el sistema

en células HeLa diseñado por O'Brien y colaboradores.²⁵ Para este fin, se hicieron diluciones seriadas de 1mg/ml de sIgA o 1ml de la FBPM en medio mínimo Eagle (MME) sin suero fetal de becerro (SFB), se incubaron 60 minutos a 37 °C y luego toda la noche a 4 °C con un volumen igual de toxina tipo Shiga 1 purificada²⁶ a una dilución final de 2 unidades CD₅₀ previamente determinadas por el método de O'Brien y colaboradores.²⁵ La actividad neutralizante en estas mezclas fue determinada agregando por triplicado 100 microlitros de la mezcla ya incubada a placas de 96 pozos con fondo plano (Nunc, Copenhague, Dinamarca) que contenían 1.6 x 10⁴ células HeLa por pozo. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37 °C, fijadas en metanol al 50 por ciento (v/v) y teñidas con Giemsa al 10 por ciento (p/v).

En el caso de los ensayos adhesivos las bacterias obtenidas de un cultivo de 18 horas a 37 °C en peptona al 1 por ciento fueron lavadas dos veces con PBS, pH 7.2 y reconstituidas en MME sin SFB para dar una concentración final de 10⁹ bacterias/ml, ajustada previamente por nefelometría y cuentas bacterianas. Se incubó durante 60 minutos, a 37 °C, 1 ml de esta suspensión con 1 mg/ml de sIgA en PBS, pH 7.2 o con 1 ml de las FBPM. Se inocularon placas de cultivo de tejidos de 24 pozos en las cuales habían crecido monocapas de células HEp-2 en MME con 10 por ciento (v/v) de SFB, 2 por ciento (v/v) de glutamina y 100 UI de penicilina/estreptomycin sobre cubreobjetos de vidrio. Antes de inocularlas con la suspensión, las monocapas fueron lavadas dos veces con solución balanceada de sales de Hank. Fueron incubadas durante tres horas a 37 °C, en una atmósfera de 15 por ciento de CO₂ después de lo cual se las fijó con metanol al 10 por ciento (v/v) y fueron teñidas con Giemsa al 10 por ciento (p/v). Los cubreobjetos fueron teñidos con soluciones crecientes de alcohol/xilol y montados sobre portaobjetos para su observación microscópica al día siguiente.

Las preparaciones fueron codificadas y leídas por separado por dos observadores independientes, previamente estandarizados. El efecto de inhibición del calostro y de la leche fue obtenido calculando el porcentaje de células con bacterias adheridas en las preparaciones problema, en comparación con el porcentaje encontrado en preparaciones control. Estas últimas fueron realizadas de manera simultánea con la misma metodología, substituyendo las fracciones de leche por PBS, pH 7.2.

La viabilidad de las bacterias utilizadas fue determinada sembrando por triplicado diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas en agar McConkey, después de su incubación con las fracciones de leche materna o con PBS. El número de unidades formadoras de colonias fue leído por una persona que desconocía los resultados de los ensayos adhesivos, después de incubar las placas 18 horas a 37 °C.

Resultados

De los 56 niños nacidos durante un año calendario en el poblado en estudio, 54 (96 por ciento) fueron alimentados al seno materno a partir del nacimiento. Más del 50 por ciento de estos niños continuaban siendo alimentados al pecho materno al año de edad (Fig. 1). Este hallazgo no fue diferente a la incidencia de lactancia al seno materno encontrada 20 años antes en un estudio realizado en el poblado vecino que funge como cabecera municipal.²⁷ La toma de muestras quincenales de leche permitió la detección exacta del momento en que se terminó la lactancia al pecho materno en cada una de las mujeres estudiadas.

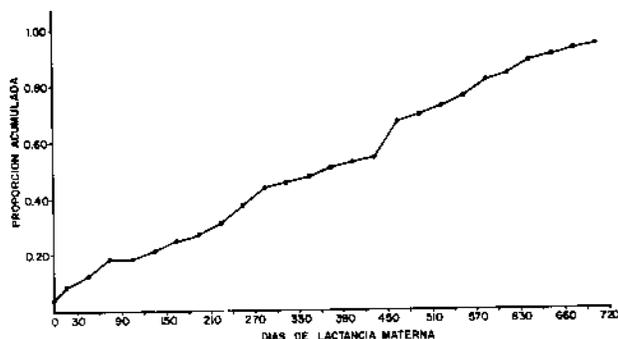


Fig. 1. Distribución porcentual de duración de alimentación al pecho materno. "En la Casa de los Guajes", 1982-1984.

La figura 2 muestra los niveles de sIgA en las muestras recolectadas. La muestra "O" equivale al calostro obtenido el primer día postparto en que se detectó secreción láctea. Se utilizó la mediana como medida de tendencia central por la gran dispersión de los datos encontrados en estos ensayos. La mediana de sIgA para cada tiempo de lactancia fue constante durante todo el primer año (Fig. 2), exceptuando las muestras de calostro que mostraron una mediana significativamente mayor ($p < 0.01$ por prueba U de Mann-Whitney). Se analizó si la ingesta de leche con niveles de sIgA por arriba de la mediana durante el primer año de vida fue suficiente para dar una menor frecuencia de diarrea durante este lapso, no encontrándose diferencia significativa ($p > 0.1$ por χ^2 de proporciones) al comparar este grupo de niños con otros de la misma cohorte que fueron alimentados con leches con niveles de sIgA por debajo de la mediana durante este mismo periodo.

La figura 3 presenta los niveles de proteínas totales en las muestras estudiadas. Una vez más los niveles de mediana encontrados durante el primer año de lactancia fueron constantes, con excepción del calostro que tuvo una mediana significativamente mayor ($p < 0.01$ por prueba

ba de U de Mann-Whitney). La cantidad de sIgA en la fase acuosa de estas leches representó de 90 a 95 por ciento del total de proteína total en las muestras, a excepción de los primeros tres meses de lactancia, incluyendo calostro, en que la sIgA representó de 75 a 90 por ciento del contenido de proteína (Fig. 4).

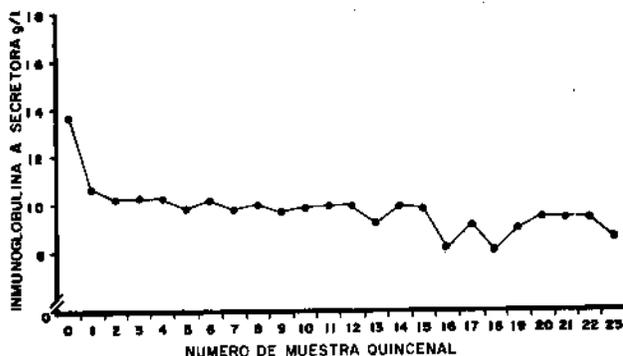


Fig. 2. Niveles de mediana de inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA) en leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982-1983.

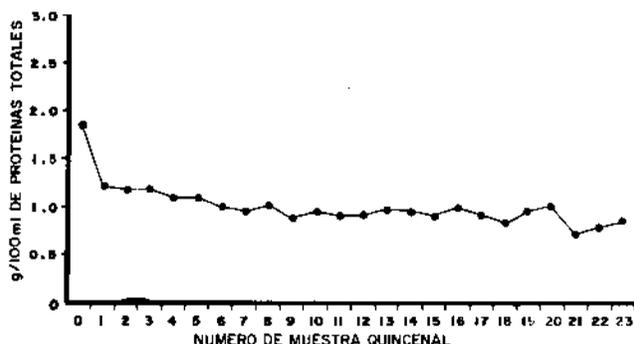


Fig. 3. Niveles de mediana de proteínas totales en la fase acuosa de calostro y leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982-1983.

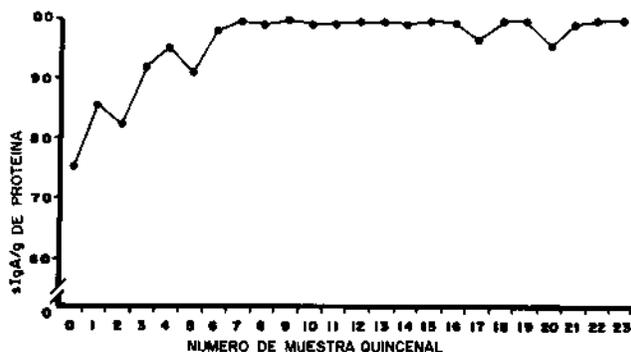


Fig. 4. Niveles de mediana de inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA) por gramo de proteína en calostro y leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982-1983.

En análisis de anticuerpos sIgA específicos contra factores de patogenicidad de cepas ETEC medidos como unidades ELISA/g de sIgA mostró una gran variabilidad en las determinaciones realizadas a cada tiempo de lactancia, así como en la misma mujer a través del primer año de vida de su hijo. En el caso de anti-LT (Fig. 5) un número importante de muestras no mostraron respuesta contra enterotoxina, manteniéndose las medianas de las determinaciones dentro de un rango similar, incluyendo el calostro, a través de todo el primer año de lactancia.

En el caso de los factores de colonización de cepas ETEC se decidió graficar únicamente las muestras que mostraron una respuesta positiva contra cada factor. La figura 6 muestra los resultados de unidades ELISA/g de sIgA contra el factor de colonización CFA/I, encontrándose que el calostro muestra una mediana significativamente mayor ($p < 0.001$ por prueba de U de Mann-Whitney) a la encontrada durante el resto de la lactancia. Para el factor de colonización CFA/II se decidió examinar por separado la respuesta de sIgA contra cada antígeno CS que forma esta adhesina. Es de hacer notar que las cepas ETEC que producen CFA/II comparten el antígeno CS3, mientras algunas producen CS1 o CS2 de acuerdo con su

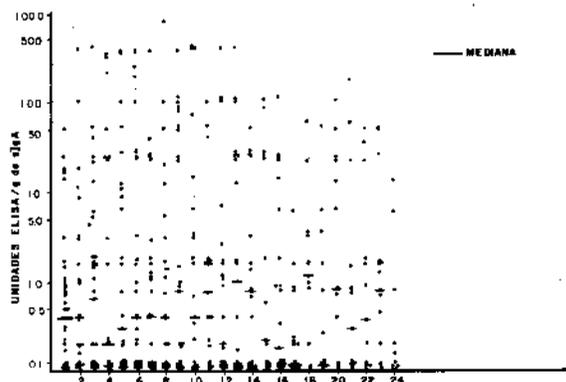


Fig. 5. Niveles de inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA) contra enterotoxina lábil al calentamiento de factor de *Escherichia coli* en calostro y leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982-1983.

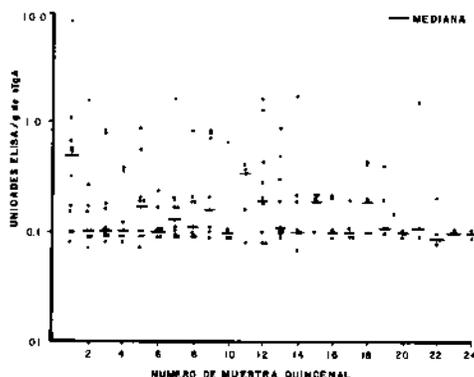


Fig. 6. Niveles de inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA) contra factor de colonización CFA/I de *Escherichia coli* en calostro y leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982-1983.

biotipo.²⁸ La figura 7 muestra las medianas de las unidades ELISA/g de sIgA contra estos tres antígenos. Como era de esperarse, las medianas de las mediciones de anti-CS3 fueron siempre superiores a las de las mediciones de anti-CS1 o de anti-CS2, encontrándose un descenso muy significativo en las medianas de las determinaciones de sIgA contra los tres antígenos a los seis meses de lactancia. En el caso del factor de colonización PCF 8775 los resultados encontrados fueron similares en su comportamiento a los hallados para el CFA/I (Fig. 8). De los tres factores de colonización analizados se encontró una mayor respuesta en leches contra el PCF 8775. Es importante mencionar que la respuesta de las leches a estos antígenos no fue constante aun en la misma madre durante el primer año de lactancia.

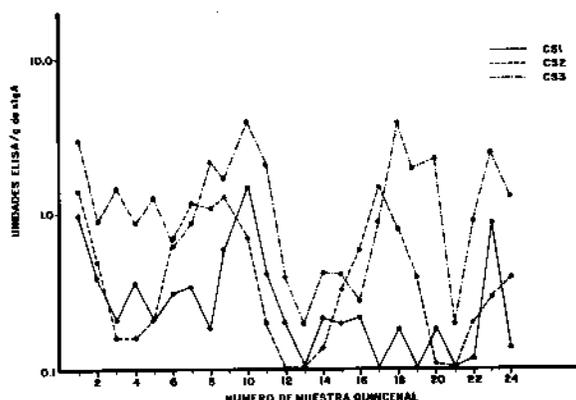


Fig. 7. Mediana de los niveles de inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA) contra antígenos CS del factor de colonización II de *Escherichia coli* en calostro y leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982-1983.

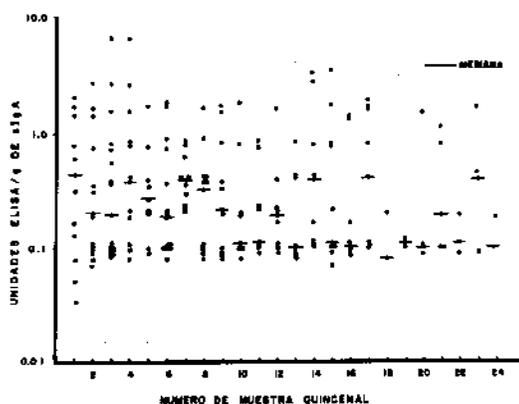


Fig. 8. Niveles de inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA) contra factor de colonización PCF 8775 en calostro y leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982.

En los siguientes ensayos se utilizó tanto la sIgA purificada como la FBPM debido a resultados contradictorios obtenidos inicialmente al estudiar factores sensibles y resistentes al calentamiento presentes en las

muestras examinadas en relación a las determinaciones del efecto de los leches contra la citotoxina SLT-1 producida por cepas EHEC y del efecto antiadhesivo a células HEp-2 de cepas EPEC.

La figura 9 muestra los resultados de la actividad neutralizante de 14 series de sIgA purificada de calostro y leche obtenidas a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días de lactancia contra dos unidades CD_{50} de citotoxina SLT-1 purificada.

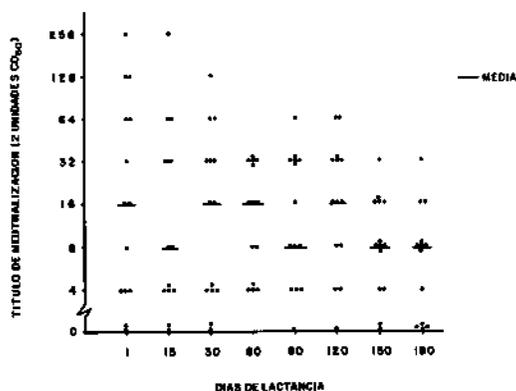


Fig. 9. Actividad neutralizante de inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA) contra citotoxina tipo Shiga (SLT) 1 de *Escherichia coli* en calostro y leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982.

La sIgA purificada de las 14 muestras de calostro mostró actividad neutralizante del efecto citotóxico sobre células HeLa de la SLT-1 con títulos entre 64 y 512. La sIgA purificada de las muestras obtenidas a los 15, 30 y 60 días de lactancia mostraron títulos de neutralización similares a los del calostro, con una mediana de 128 a los 15 días y de 64 a los 60 y 90 días de lactancia. No se encontró actividad neutralizante en la sIgA de muestras obtenidas a los 90, 150 y 180 días de lactancia.

La figura 10 muestra los títulos de neutralización de las FBPM obtenidas de las mismas 14 series de muestras mencionadas anteriormente. En este caso se detectaron títulos de neutralización entre 4 y 256 contra las mismas unidades CD_{50} de SLT-1 purificada. A diferencia de la sIgA, el efecto neutralizante de las FBPM tuvo una persistencia a lo largo de los primeros 180 días de lactancia. Es de hacerse notar que la sIgA purificada de otras seis series de calostro y leches obtenidas durante este mismo periodo de lactancia no mostraron efecto neutralizante sobre la actividad citotóxica de la SLT-1 sobre las células HeLa. Las FBPM de estas mismas seis series de calostro y leche materna, por el contrario, sí mostraron actividad neutralizante del efecto de la SLT-1 con títulos similares a los descritos con anterioridad para las otras 14 series de leches mencionadas.

Esta misma serie de 20 muestras de sIgA purificada y sus FBPM de calostro y leches obtenidas durante los primeros seis meses de lactancia se utilizó para conocer el efecto

Discusión

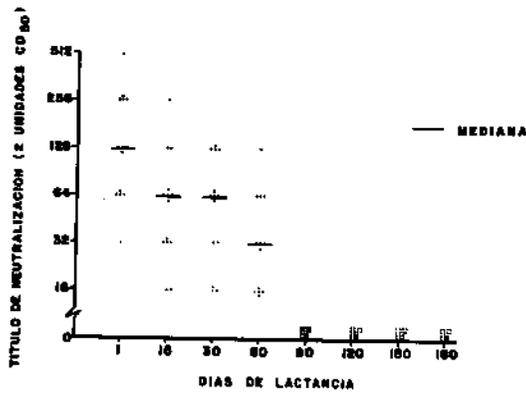


Fig. 10. Actividad neutralizante de fracciones de bajo peso molecular contra citotoxina tipo Shiga (SLT) 1 de *Escherichia coli* en calostro y leche materna. "En la Casa de los Guajes", 1982.

que pudieran tener contra la habilidad de una cepa de EPEC (E2348; O127:H6) para adherirse en forma localizada a células HEP-2. La sIgA de las 20 series de calostro y leche fue capaz de inhibir la adhesividad de la cepa E2348 durante los primeros 180 días de lactancia a niveles entre 70 y 100 por ciento del control (fig. 11). Esta inhibición fue disminuyendo a medida que continuó la lactancia.

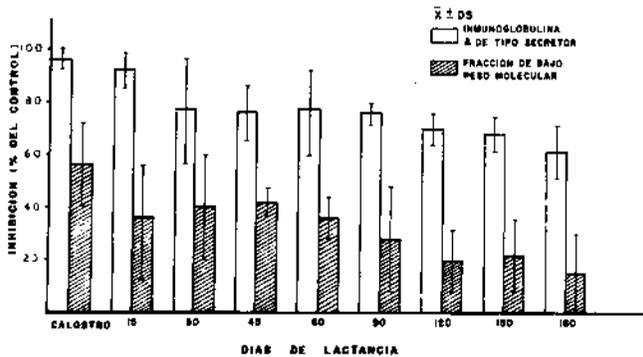


Fig. 11. Inhibición de la adhesividad de una cepa enteropatógena de *Escherichia coli* (E2348; O127:h6) a células HEP-2 por fracciones de calostro y leche humana. "En la Casa de los Guajes", 1982.

Las FBPM del calostro y la leche de estas mismas 20 mujeres fueron capaces también de inhibir la adhesividad de la cepa EPEC E2348 (Fig. 11). En este caso el porcentaje de inhibición durante los primeros 180 días de lactancia permaneció entre 20 y 50 por ciento del control. Como con la sIgA, la FBPM de los calostros mostró niveles de inhibición más altos que las FBPM de las muestras obtenidas a tiempos posteriores. El porcentaje de inhibición de las FBPM disminuyó progresivamente a medida que continuó la lactancia.

No existe duda de que la lactancia al seno materno tiene un efecto de protección contra infecciones en niños pequeños. Los datos presentados en el presente estudio apoyan la hipótesis de que esta protección es específica y está dirigida contra factores de patogenicidad utilizados por bacterias para causar enfermedad. Queda por demostrar si la ingesta de leche que contiene niveles altos de estos factores se asocia con protección específica en los niños alimentados con ella al prevenir colonización y/o infección por gérmenes relacionados con la presencia de diarrea. Este tipo de análisis se está realizando en la actualidad.

Los diferentes tipos de cepas de *Escherichia coli* son probablemente el grupo de gérmenes aislados con mayor frecuencia de pacientes con diarrea en muchas comunidades en desarrollo.^{15,29} El conocimiento de los mecanismos utilizados por cada uno de estos grupos para causar enfermedad permite en la actualidad el planteamiento de medidas más específicas para su control. La posibilidad de incrementar el contenido de estos factores de protección en la leche materna ofrece la oportunidad única de utilizar este producto como vehículo de vacunación pasiva a través de inmunizar a las madres durante el embarazo contra estos mecanismos de patogenicidad. Los estudios en humanos de Glass y colaboradores¹⁴ en relación con la prevención de cólera y los estudios en relación con la prevención de diarrea por cepas ETEC en animales recién nacidos alimentados con calostro de vacas y cerdas vacunadas con factores adhesivos K88, K99 y 987P durante el embarazo apoyan esta posibilidad.³⁰⁻³²

La búsqueda de factores de protección contra bacterias o sus productos en leche materna no es un planteamiento nuevo. Existen reportes sobre ensayos *in vitro* e *in vivo* demostrando una respuesta específica en leche humana contra enterotoxinas y factores de adhesividad de cepas *Escherichia coli* relacionadas con diarrea en humanos.³³⁻³⁶ Estos estudios no han demostrado un efecto longitudinal de la presencia de estos factores a través de la lactancia y, a excepción del estudio de Glass y colaboradores¹⁴ ya mencionado, en ninguno se ha hecho una asociación con protección a nivel intestinal. La otra diferencia entre el estudio actual y los reportados con anterioridad es la búsqueda de factores contra cuatro de los cinco grupos de *Escherichia coli* relacionados con diarrea en las mismas muestras de leche, lo que permite un análisis más amplio de los factores de protección que contienen y sus interrelaciones, como imagen de la respuesta en la madre a gérmenes que colonizan y causan enfermedad en sus hijos.

Dos puntos merecen especial mención; el primero es en relación a la presencia de factores de protección contra adhesinas de *Escherichia coli*. Existe una asociación entre la frecuencia de aislamiento de cepas productoras de estas adhesinas con los niveles de sIgA contra ellos encontrados en las leches. En los niños de este poblado se han

aislado más cepas ETEC productoras de CFA/II (CS1, CS2, CS3) y de PCF 8775 que de CFA/I (Cravioto y colaboradores, manuscrito en vías de publicación). Esta relación muestra, en forma indirecta, que la respuesta en leche no es fortuita, sino que está relacionada con factores epidemiológicos de frecuencia y etiología de agentes causales presentes en una comunidad determinada).

El otro punto importante es la inhibición de la adhesividad de cepas EPEC a células HEP-2 por fracciones de calostro y leche durante cuando menos los primeros seis meses de lactancia. Después del estudio inicial de Cravioto y colaboradores³⁷ demostrando una adherencia selectiva de cepas EPEC para causar daño severo a nivel intestinal por destrucción de las microvellosidades de las células epiteliales de esa región,³⁸ así como con la producción de diarrea en voluntarios adultos inoculados oralmente con cepas adhesivas.³⁹

Levine y colaboradores³⁹ han demostrado que a la respuesta serológica de voluntarios inoculados con la cepa EPEC E2348, la misma usada en este estudio, está dirigida contra una proteína de membrana externa de 94 kilodaltones (kDa), cuya producción está controlada genéticamente por un plásmido. Actualmente se está estudiando si la respuesta antiadhesiva específica de las leches está dirigida también contra esta proteína de 94 kDa.

Al mismo tiempo se ha extendido el estudio del efecto antiadhesivo de las fracciones de las leches examinadas contra un número mayor de cepas EPEC con habilidad para adherirse en forma localizada a células HEP-2, pero pertenecientes a serotipos diferentes al de la cepa E2348 (O127:H6), encontrándose que tanto la sIgA, como las FBPM inhiben la adhesividad de estas otras cepas EPEC en porcentajes similares a los encontrados con la cepa E2348 (Cravioto y colaboradores, *ibidem*). A diferencia de lo anterior, las leches estudiadas no presentaron inhibición de adhesividad de cepas con patrones de pegamiento de tipo difuso o agregativo al mismo tipo de células en cultivo, lo cual indica una alta especificidad del factor protector presente en la leche contra adhesividad de tipo localizado y pone en tela de juicio el verdadero papel patogénico de cepas de *Escherichia coli* adherentes a células HEP-2 con patrones difuso o agregativo.¹⁵

Finalmente, en el caso de la actividad neutralizante de la sIgA purificada y las FBPM de las leches estudiadas sobre el efecto citotóxico de SLT-1 producida por cepas EHEC, la importancia de estas bacterias como causantes de colitis hemorrágica y de síndrome urémico-hemolítico^{24,40} hacen pensar que la lactancia al seno materno durante el principio de la vida puede prevenir enfermedades asociadas con la producción de esta citotoxina aun en niños colonizados por gérmenes que la producen en grandes cantidades. La detección creciente de este tipo de cepas en nuestro medio (Cravioto y colaboradores, manuscrito aceptado para su publicación en el Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 1988) demuestra que la infección causada por ellas no se trata de un problema

restringido a países industrializados de América y Europa.

Durante los últimos veinte años el tema de la lactancia al pecho materno ha sido discutido de manera más emocional que científica. Estudios como el que se presenta probablemente aporten parte de los conocimientos necesarios para dar a la leche materna su lugar real en la prevención de diarrea en niños pequeños asociada a colonización por gérmenes específicos.

Se agradece la valiosa colaboración técnica de Rosa Eugenia Reyes, Raymundo Hernández, Felipe Uribe, Arturo Hernández, Angel Tello y Alejandra Soria en la elaboración de esta investigación.

Referencias

1. Black RE, Merson MH, Rahman ASMM, Yunus M y col. A two year study of bacterial, viral and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J Infect Dis* 1980; 142: 660.
2. Grulee CG, Sanford HN, Schwartz A. Breast and artificially fed infants. A study of the age incidence in the morbidity and mortality. *JAMA*, 1935; 104: 1926.
3. Guerrant RL, Kirchoff LV, Shields DS y col. Prospective study of diarrheal illness in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. *J Infect Dis* 1983; 148: 986.
4. Mata LJ, Urrutia JJ. Intestinal colonization of breast-fed children in a rural area of low socioeconomic level. *Ann NY Acad Sci* 1971; 176: 93.
5. Mata LJ, Urrutia JJ, Gordon JE. Diarrheal disease in a cohort of Guatemalan village children: observed from birth to age two years. *Trop Geogr Med* 1967; 19: 247.
6. Youn HB, Buckley AE, Hamza B, Mandarano C. *Milk and lactation: some social and developmental correlates among 1 000 infants*. *Pediatrics* 1982; 69: 169.
7. Feachem RG, Koblinsky MA. Interventions for the control of diarrheal diseases among young children: promotion of breastfeeding. *Bull World Health Org* 1984; 62: 271.
8. Habicht JP, DeVanzo J, Butz WP. Does breast-feeding really save lives, or are apparent benefits due to biases? *Am J Epidemiol* 1986; 123: 279.
9. Sanjurjo DM, Cravioto J, Rosales L, van Veen A. Infant feeding and weaning practices in a rural preindustrial setting. *Acta Paed Scand* 1970; (Supl 200): 1.
10. Ashkenzi S, Mirelman D. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits the adherence of certain enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to guinea pig intestinal tract. *Ped Res* 1987; 22: 130.
11. Brock JH. Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Arch Dis Child* 1980; 55: 417.
12. Carlsson B, Ahlstedt S, Hanson LA y col. *Escherichia coli* O antibody content in milk from healthy Swedish mothers and mothers from a very low socioeconomic group of a developing country. *Acta Paed Scand* 1976; 65: 417.
13. Jason JM, Nieburg P, Marks JS. Mortality and infectious disease associated with infant-feeding practices in developing countries. *Pediatrics* 1984; (Supl); 74: 702.
14. Glass RI, Svennerholm AM, Stoll BJ y col. Protection against cholera in breast fed children by antibodies in breast milk. *New Engl J Med* 1983; 308: 1382.
15. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987; 155: 377.
16. Cravioto A, Ortega R, Rodríguez P, Reyes RE, López D, Fernández G. Estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos. I. Diseño del estudio y hallazgos iniciales durante el periodo neonatal. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1985; 42: 287.
17. Cravioto A, Reyes RE, Ortega R, Fernández G, Hernández R, López

D. Diarrea asociada a la diarrea de la Organización Mundial de la Salud y de la Nestlé Technical Research Assistance Company.

18. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 76: 4350.
19. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Londres)*, 1970; 227: 680.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
21. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1949; 26B: 507.
22. Svennerholm AM, Holmgren J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. *Curr Microbiol* 1978; 1: 19.
23. Evans DG, Evans DJ, Clegg S, Pauley JA. Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immunol* 1979; 25: 738.
24. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* 1987; 51: 206.
25. O'Brien AD, LaVeck GD. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immunol* 1983; 40: 675.
26. Gentry MK, Dalrymple JM. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 361.
27. Cravioto J, Birch HC, DeLicardie E, Rosales L, Vega, L. The ecology of growth and development in a Mexican perindustrial community. I. Method and findings from birth to one month of age. *Mon Soc Ped Res Child Develop* 1969; 34: 1.
28. Cravioto A, Scotland SM, Rowe B. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect Immunol* 1982; 36: 189.
29. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infants diarrhea: Epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 1984; 6: 31.
30. Bagley CV, Call JW. Vaccination of the dam by the intramuscular or deep subcutaneous route to prevent neonatal calf enteric colibacillosis. *Am J Vet Res* 1979; 40: 1285.
31. Isaacson, R.E.; Dean, E.A.; Morgan, R.L.; Moon, H.W.: Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified K99 and 987 pili: antibody production in response to vaccination. *Infect Immunol* 1980; 29: 824.
32. Moon HW, McDonald JS. Antibody response of cows to *Escherichia coli* pilus antigen K99 after oral vaccination with live or dead bacteria. *Am J Vet Res* 1983; 44: 493.
33. Stoliar OA, Pelley RP, Kainecki-Green E, Klaus MH, Carpenter CCJ. Secretory IgA against enterotoxins in breast-milk. *Lancet* 1976; 1: 1258.
34. Martins-Filho J, Pestana de Castro AF, Serafin MB, Gomes JA. Anticorpos anti-enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* e anti-factor de colonização em colostro humano. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1980; 22: 7.
35. Mellander L, Carlsson B, Jalil F, Söderström T, Hanson LA. Secretory IgA antibody response against *Escherichia coli* antigens in infants in relation to exposure. *J Pediatr* 1985; 107: 430.
36. Cruz JR, Arévalo C. Levels of human milk-specific immunoglobulin A antibodies during lactation. *Ped Res* 1986; 5: 5148.
37. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979; 3: 95.
38. Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultures human intestinal mucosa. *Infect Immunol* 1987; 55: 69.
39. Levine MM, Nataro JP, Karch H y col. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* dependent on a plasmid encoding an enteroadhesive factor. *J Infect Dis* 1985; 152: 550.
40. Karmali MA, Petric M, Leni C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151: 775.

COMENTARIO OFICIAL

ONOFRE MUÑOZ*

Diferentes estudios han demostrado que tanto el calostro como la leche materna contienen factores solubles y celulares que intervienen como mecanismos de defensa específicos e inespecíficos contra diferentes agentes infecciosos. Los trabajos de Ogra, Wyatt, Pittard, Michael y Palmer establecieron con precisión la presencia de inmunoglobulinas, de predominio IgA, el espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias, virus y hongos, así como la presencia de células con predominio de macrófagos y las diferencias entre calostro y leche. La lista de factores solubles identificados incluye inmunoglobulinas A, M, G, D y E, sistema de complemento, lactoferrina, lactoperoxidasa, lisosima, factores quimiotácticos, factores de resistencia a estafilococo asociados a lípidos, monoglicéridos con actividad antiviral, alfa-1 antitripsina e inhibidores de proteasas; además de factores como MIF de macrófagos, factores estimulantes de IgA, interferón y sustancias inmunosupresoras de células T. Entre los componentes celulares identificados se incluyen monocitos, macrófagos, células T, linfocitos B, células plasmáticas, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales.

Sin embargo, como señala el doctor Alejandro Cravioto, la demostración de un efecto protector específico contra un microorganismo patógeno en particular en la especie humana, no ha sido fácil de probar, debido principalmente a la multiplicidad de factores y variables involucrados. Los trabajos de Glass en 1983, que establecen una relación entre ingesta de anticuerpos específicos y protección contra *Vibrio cholerae* en niños colonizados por esta bacteria, ilustran las posibilidades de protección contra microorganismos patógenos utilizando algunas de las funciones de la sIgA (exclusión de material antigénico en intestino, evitar adherencia de bacterias, parásitos y virus, neutralización de toxinas e interferencia con la estabilidad de plásmidos).

El trabajo que el doctor Alejandro Cravioto nos presenta con motivo de su ingreso a esta Corporación, corresponde a una línea de investigación sobre el proceso de colonización intestinal y su relación con diarrea en una cohorte de niños rurales, y a través de él, nos permite atisbar una serie de posibles contribuciones originales. Este trabajo se refiere en particular a la descripción de la presencia de factores específicos en calostro y leche materna contra cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea

* Académico numerario. Unidad de Investigación Clínica en Infectología y Parasitología. Subjefatura de Investigación. Instituto Mexicano del Seguro Social.

en humanos, que tiene como aportaciones originales, el que se ha demostrado la presencia de protección específica contra cuatro de los factores de patogenicidad para *Escherichia coli* (enterotoxigénicas, enteroinvasoras, enterohemorrágicas y enteroadherentes), proporcionando además información longitudinal.

Los resultados de este trabajo apoyan la especificidad de la protección que el calostro y la leche materna pueden ofrecer, y el doctor Alejandro Cravioto nos ofrece para un futuro próximo, la posibilidad de analizar la prevención de la colonización y/o infección por estos gérmenes en los niños alimentados con leche, que contiene estos factores de protección.

La demostración relativamente reciente de la existencia de memoria inmunológica local de anticuerpos de clase sIgA, lleva a considerar la posibilidad de estimular y lograr una respuesta inmune local de larga duración, que

interfiera con la colonización de microorganismos enteropatógenos y para el caso del recién nacido, lograr este efecto a través del calostro y la leche materna.

Me es particularmente grato dar la bienvenida al doctor Alejandro Cravioto a nuestra Corporación. Tengo la seguridad de que su participación enriquecerá a la Academia Nacional de Medicina y a la medicina mexicana.

Bibliografía

1. Allardyce RA, Bienestock J. The mucosal immune system in health and disease with an emphasis on parasitic infection. Bull WHO 1984; 62: 7.
2. Gershwin ME, Beach RS, Hurley S. Immunological considerations of breast milk. En: *Nutrition and immunity*. New York: Academic Press Inc. 1985: 285.
3. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J Infect Dis 1987; 155: 377.



EL LAPIZ

La historia de la escritura cambió después de muchos siglos, cuando en Seatoller Fell, cerca de Keswick Cumberland, en el norte de Inglaterra, se descubrió una sustancia llamada plumbago, que se conoce actualmente como grafito.

En 1565, en un libro de Konrad Gesner, aparece un dibujo de un trozo de grafito con un mango de madera, la primera representación del lápiz, cuyo nombre en español deriva del latín piedra y en inglés de pencil.

El que pudiera borrarse le dio al grafito gran popularidad en Europa, para ser usado en el dibujo y en la escritura. A mediados del siglo XVII existían varias familias en Inglaterra y en Alemania, las cuales se dedicaban a producir este novedoso instrumento. La elaboración de las dos piezas de madera con una hendidura central en la que se coloca la puntilla y después se pega, pasó de la manufactura a la máquina. Y para mejor aprovechamiento de la madera se empleó desde entonces la forma hexagonal.

En 1793, debido a la guerra con Inglaterra, Francia quedó sin grafito y, por consiguiente, sin lápices. Un joven ingeniero francés, Nicolas Jacques Conté, inventó la actual puntilla al mezclar polvo de grafito con agua y barro, los cuales colocaba en moldes y los sometía a cocción.

En el siglo XIX, el grafito inglés se había agotado y la búsqueda de este producto condujo al descubrimiento, en 1847, de unas minas en Siberia -cerca de la frontera con China-, por parte de la compañía alemana A. W. Faber, la cual las explotó con derechos exclusivos.

Otras compañías, para enfatizar la pureza de su producto, producían marcas como *Mikado*, y el color amarillo para enfatizar aún más este origen oriental. Hasta la actualidad, la mayoría de los lápices sigue siendo de color amarillo.

Un industrial norteamericano, Henry David Thoreau, el célebre autor de *Walden, o la vida entre bosques y lagos*, produjo distintos tipos de puntillas, variando los porcentajes de barro y grafito, para obtener mayor o menor dureza. Su éxito económico le permitió retirarse a vivir cerca del lago Walden, donde escribió su famosa obra literaria.

La creación de este objeto, que resulta cómodo en su uso y barato en su precio, ha motivado su producción por millones, que se lo emplee en los trabajos artísticos, literarios y científicos y que se lo encuentre en casi todos nuestros escritorios.

J. H. M. G.