

## FACTOR AGLUTINANTE DE ROTAVIRUS EN CALOSTRO DE MUJERES COSTARRICENSES

Francisco Hernández<sup>1, 2</sup> y Leonardo Mata<sup>1, 2, 3</sup>.

### INTRODUCCION

Estudios prospectivos en una comunidad indígena de Guatemala demostraron la baja prevalencia de enfermedades infecciosas, especialmente de los tractos gastrointestinal y respiratorio, en niños alimentados exclusivamente al seno materno (12,15). El efecto protector de la leche humana se debe fundamentalmente al sistema inmune, destacándose, por su capacidad antimicrobiana, la inmunoglobulina A secretora (IgAs) (8). Además de las otras inmunoglobulinas (7,25) se han encontrado más principios biológicos en el calostro y la leche humana (6,13), como el factor bífido, la lactoferrina, lisozima, triocianasa, factor antiestafilocócico, proteína ligante de la vitamina B 12, complemento, una molécula semejante a interferón (11) y más recientemente un factor diferente del anticuerpo, aunque capaz de neutralizar algunos virus "in vitro" (1,16). Además, la leche es rica en células inmunocompetentes, principalmente linfocitos y macrófagos (4,19,22). Con base en estudios epidemiológicos se ha postulado que el calostro y la leche humana protegen contra las infecciones por rotavirus. Se ha observado que la mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedad por este agente es entre los 6 meses y 2 años de edad (3,18), aunque se han encontrado rotavirus en neonatos (20). Entonces, la baja incidencia observada en niños menores de 6 meses podría deberse a la lactancia natural (2).

Existe evidencia indirecta en animales de laboratorio sobre el efecto protector del calostro y de la leche contra las infecciones por rotavirus de origen humano; así para lograr la infección ha sido preciso disponer de animales gnotobióticos susceptibles como terneros (17), lechones (24), ovejas (23) y monos (26), o de animales recién nacidos que no habían sido amamantados.

Los animales recién nacidos alimentados con calostro no desarrollan el cuadro clínico. Por otra parte se han descrito niveles relativamente altos de inmunoglobulinas anti-rotavirus en leche de vaca, capaces de neutralizar el rotavirus bovino hasta en un título de 640 (27).

En este trabajo se describe la existencia de un factor aglutinante de rotavirus de origen humano en calostro de mujeres costarricenses y se discute su posible naturaleza y significación en biología humana.

1. Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica.

2. Ministerio de Salud, Costa Rica.

3. Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social, Costa Rica.

## MATERIAL Y METODOS

### Calostro humano

Se recolectaron treinta y tres muestras de calostro de sendas mujeres de 16 a 33 años de edad, internadas en las Salas de Maternidad del Hospital San Juan de Dios, entre enero y marzo de 1976. Las muestras, extraídas entre 1 y 72 horas "post-partum", fueron clarificadas de células y grasa por centrifugación a 2000 xG por 90 minutos y luego almacenadas a - 70 ° C hasta el momento del examen.

### Antígeno de rotavirus humano

El antígeno consistió de una mezcla de doce extractos de heces diarreas, con una alta concentración de partículas demostradas por examen al microscopio electrónico, las que fueron clarificadas por centrifugación a 4000 rpm (2000 xG).

### Suero antirotavirus

Se utilizó como control positivo un suero anti-rotavirus, (proporcionado por el Dr. R.H. Yolken del Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, E.E.U.U.) preparado en terneros gnotobióticos inoculados con rotavirus de origen humano (28).

### Inmunoelectromicroscopía (IEM)

El factor aglutinante de rotavirus se investigó mediante la técnica de IEM descrita por Kapikian et al. (10). Se mezclaron alícuotas de 0,2 ml de calostro y de antígeno de rotavirus y se incubaron durante una hora a 37 ° C. Después de una centrifugación a 39.000 xG durante 90 minutos (Sorval PC-2B), el sedimento fue resuspendido en 0,1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), se colocó sobre rejillas de cobre de 200 "mesh" recubiertas de una membrana de "formvar" y se tiñó con ácido fosfotúngstico al 1,5 % para examen al microscopio electrónico (Hitachi HU-12A).

La titulación del efecto aglutinante se hizo mezclando diluciones (en duplicado) de calostro en PBS con antígeno de rotavirus y procesado de acuerdo a la técnica de IEM.

### Testigos

Se corrieron un testigo positivo y otro negativo, los cuales consistieron respectivamente en una mezcla de antígeno-suero anti-rotavirus y antígeno-PBS, manipuladas en igual forma que las muestras de calostro.

## RESULTADOS

El suero anti-rotavirus (control positivo) aglutinó los viriones (Figura 1) formando grumos entre los cuales se observaron elementos idénticos a inmunoglobulinas y que le dan un aspecto borroso a las partículas virales.

En las mezclas de antígeno-PBS (control negativo) los virus aparecieron generalmente aislados, aunque se presentaron unos pocos agregados pequeños, en que los viriones se observaban nítidamente delineados, con el borde externo liso, sin que se observaran los elementos semejantes a inmunoglobulinas, (Figura 2).

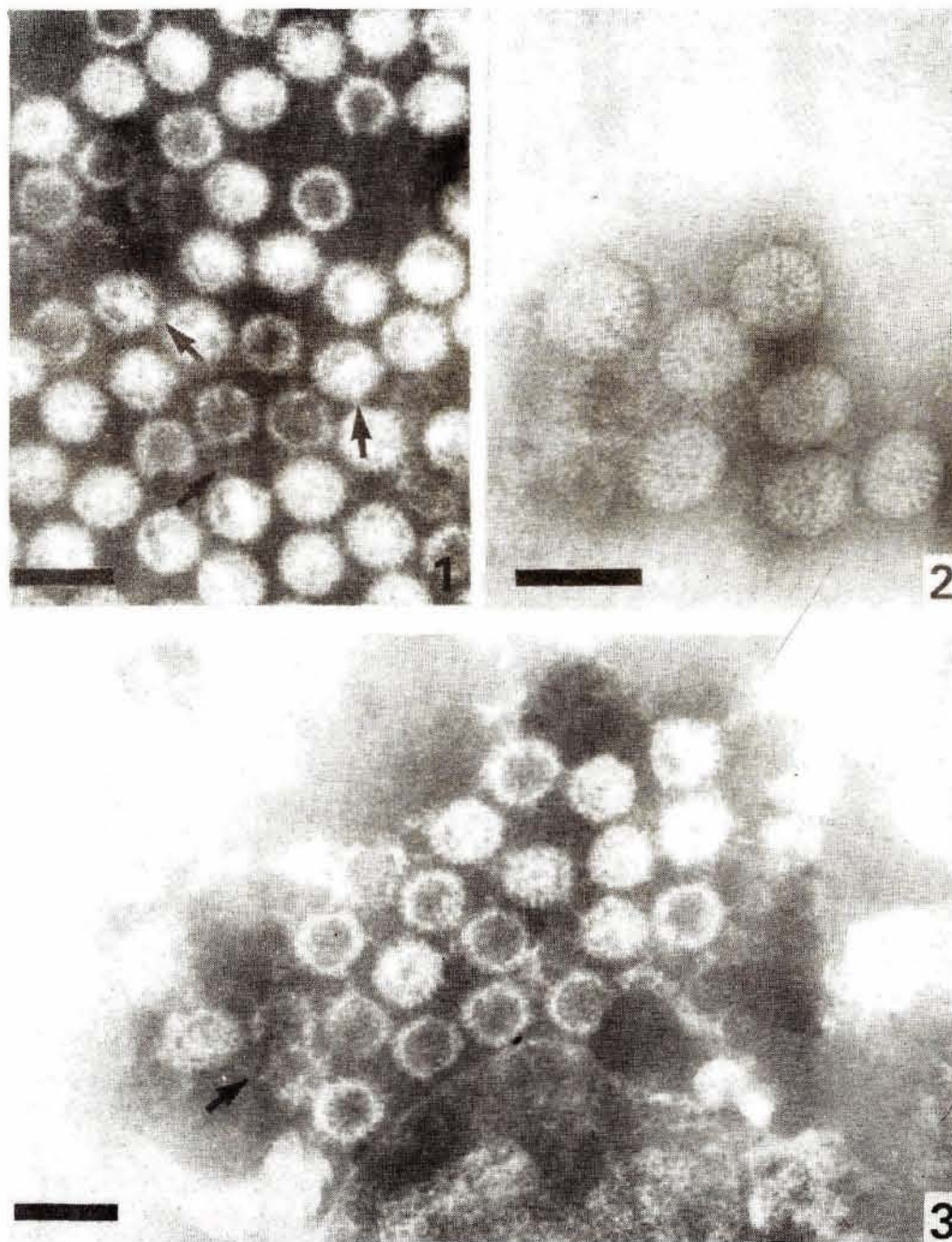
De los 33 calostros examinados, 18 (54 %) presentaron la propiedad de aglutinar rotavirus. La aglutinación consistió en agregados de viriones completos pero de borde externo rugoso, de partículas semidestruidas o fragmentos de cápsidas unidos por una trama de material semejante a inmunoglobulinas, como el observado en las preparaciones tratadas con suero anti-rotavirus (Figura 3).

En el Cuadro 1 se ilustra el título del factor aglutinante en los calostros. Once muestras mostraron la capacidad aglutinante de rotavirus a la dilución 1:2 y seis manifestaron un título de 1:4 a 1:8; sólo una muestra alcanzó un título de 1:16. No se observó efecto aglutinante en diluciones más altas.

CUADRO 1

Capacidad aglutinante de rotavirus  
en 33 calostros de mujeres costarricenses

Recíproco del título	Número de muestras (%)	% acumulado
≥ 2	11 33	33
4	3 9	42
8	3 9	51
≥ 16	1 3	54
Negativos	15 45	



FIGURAS 1 A 3

## DISCUSION

El material filamentosos observado entre las partículas, ya sea por el suero hiperinmune o por calostros, fue morfológicamente idéntico en ambos casos, como se observa en las figuras 1 y 3. El factor aglutinante de rotavirus, podría ser una inmunoglobulina y posiblemente se trate de IgAs. Esta es la inmunoglobulina más importante en secreciones y su hallazgo en el 54 % de los calostros de las madres estudiadas podría explicarse dada la amplia distribución que tienen los rotavirus en Costa Rica, como ya ha sido demostrado en investigaciones anteriores (9,14).

La observación de agregados de rotavirus semidestruidos y de fragmentos de cápsidas en las preparaciones tratadas con calostro, podría ser el resultado de aglutinación de fragmentos virales ya presentes en el antígeno, o bien representan viriones modificados o desintegrados por acción directa del calostro, pregunta que aún queda por dilucidar.

Estudios del INISA han demostrado niveles altos de anticuerpos anti-rotavirus en la fracción de IgAs, en casi todos los calostros de mujeres de Costa Rica (21,29). Tal hallazgo, aunado a la demostración de un factor aglutinante de los viriones podría ser de valor biológico en la protección del neonato. De hecho, la baja incidencia de infecciones por rotavirus en niños menores de 6 meses podría deberse a la inmunidad pasiva aportada por la leche materna. Los factores del calostro y de la leche materna podrían recubrir la mucosa del tracto gastrointestinal ofreciendo una barrera a la internación del virus. Se sabe que la IgAs es bastante resistente a la acción de los jugos intestinales (5,7). Queda por demostrar si el factor aglutinante y el anticuerpo IgAs son iguales, así como su poder neutralizante o inhibitorio contra el rotavirus.

## RESUMEN

Se demostró por inmunoelectromicroscopía la presencia de un factor aglutinante de rotavirus en el calostro de mujeres costarricenses. El 54 % de los calostros de 33 mujeres aglutinaron rotavirus de origen humano. La aglutinación se manifestó como conglomerados de partículas enteras, de viriones semidestruidos y de fragmentos de cápsidas. El hallazgo puede interpretarse como que éste u otro factor asociado al calostro causaron la destrucción de los viriones, o bien que el antígeno empleado ya contenía viriones semidestruidos que luego fueron aglutinados por el calostro.

La actividad anti-rotavirus en calostro podría ser epidemiológicamente importante en la protección del recién nacido contra la diarrea por este agente.

### SUMMARY

A rotavirus-agglutinating factor was demonstrated by immune electron microscopy in colostrum from Costa Rican women. Fifty-four per cent of 33 colostrum induced aggregates of both intact particles and fragments and empty capsids of rotavirus of human origin. The finding can be interpreted as if this or another associated colostrum factor resulted in the destruction of virions or that the antigen used in the test already contained fragments of virions and empty capsids which became agglutinated by colostrum.

The anti-rotavirus activity could be of epidemiological significance in protecting newborns against diarrhea by this agent.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen la ayuda económica de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), Costa Rica, así como la colaboración del Dr. Yoshimichi Kozuka y de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

BIBLIOGRAFIA

1. Anónimo  
Breast-feeding: the immunological argument.  
Brit. Med. J. 108: 1167, 1976.
2. DuPont, H. L., B. L. Portnoy & R. H. Conckin  
Viral agents and diarrheal illness.  
Ann. Rev. Med. 28: 167, 1977.
3. Flewett, T. H., A. S. Bryden & H. Davies  
Virus particles in gastroenteritis.  
Lancet 2. 1497, 1973
4. Goldblum, R. M., S. Ahlstedt, B. Carlsson, L. A. Hanson,  
U. Jodal, G. Lidin-Janson & A. Sohl-Akerlund  
Antibody-forming cells in human colostrum after oral immunization.  
Nature 257: 797, 1975.
5. Goldman, A. S. & C. W. Smith  
Host resistance factors in human milk.  
J. Ped. 82: 1082, 1973.
6. Gothefors, L.  
Studies of antimicrobial factors in human milk and bacterial colonization of the newborn. En: Umea University Medical dissertations.  
Umea Universitet, Sweden, p. 47, 1975.
7. Hanson, L. A. & P. Brandtzaeg  
Secretory antibody systems. En: Immunological diseases in infants and children.  
Stiehm, C. & W. B. Fulginiti (editores). Saunders Co. p. 107, 1973
8. Hanson, L. A., B. Carlsson, S. Ahlstedt, C. Svanborg & B. Kaijser  
Immune defense factors in human milk.  
Med. Probl. Paediat. 15:63, 1975.
9. Hernández, F., L. J. Mata, Cecilia Lizano & E. Mohs  
Prevalencia de rotavirus y descripción de una epidemia de diarrea por este agente en Costa Rica.  
Acta Med. Cost. 20: 297, 1977
10. Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalika & R. M. Chanock  
Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non bacterial gastroenteritis.  
J. Virol, 10: 1075, 1972.

11. Lawton, J. W. M. & K. F. Shortridge  
Protective factors in human breast milk and colostrum.  
*Lancet* 1: 253, 1977.
12. Mata, L. J. & J.J. Urrutia  
Intestinal colonization of breast-fed children in a rural area of low socioeconomic level.  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 176: 93, 1971.
13. Mata, L. J. & R. G. Wyatt  
Host resistance to infection.  
*Amer. J. Clin. Nutr.* 24: 976, 1971.
14. Mata, L. J., Cecilia Lizano, F. Hernández, E. Mohs, L. Herrero, M. E. Peñaranda, F. Gamboa y J. León  
Agentes infecciosos en la diarrea del niño hospitalizado en Costa Rica.  
*Bol. Méd. Hosp. Inf. (Méx.)* 34: 955, 1977.
15. Mata, L. J. & J. J. Urrutia  
Infections and infectious diseases in a malnourished population; a long-term prospective field study. En: *Food and Immunology*.  
Hambraeus, L., Stockholm, Sweden, p. 42, 1977.
16. Mattews, T. H. J., M. K. Lawrence, C. D. G. Mair & D. A. J. Tyrrell  
Antiviral activity in milk of possible clinical importance.  
*Lancet* 2: 1387, 1976.
17. Mebus, C. A., R. G. Wyatt, R. L. Sharpee, M. M. Sereno, A. R. Kalika, A. Z. Kapikian & M. J. Twiehaus  
Diarrhea in gnotobiotic calves caused by reovirus-like agent of human infantile gastroenteritis.  
*Infect-Immun.* 14:471, 1976.
18. Middleton, P. J., M. T. Szimonski, C. D. Abbott, R. Bortolussi & J.R. Hamilton  
Orbivirus in acute gastroenteritis in infancy.  
*Lancet* 1: 1241, 1974.
19. Murillo, G. J. & A. S. Goldman  
The cells of human colostrum. II. Synthesis of IgA and BLc.  
*Pediat. Res.* 4: 71, 1970.
20. Murphy, A. M., M. B. Albrey & P. J. Hay  
Rotavirus infection in neonates.  
*Lancet* 2: 452, 1975.



21. Simhon, A., R. H. Yolken & L. Mata  
S-IgA cholera toxin and rotavirus antibody in human colostrum.  
*Acta Paediat. Scand.* En prensa, 1978
22. Smith, C. W. & A. S. Goldman  
The cells of human colostrum. I. In vitro studies of morphology and functions.  
*Pediat. Res.* 2: 103, 1968.
23. Snodgrass, D. R. & P. W. Wells  
Rotavirus infection in lambs: studies on passive protection.  
*Arch. Virol.* 52: 201, 1976.
24. Torres-Medina, A., R. G. Wyatt, C. A. Mebus, N. R. Underhal & A. Z. Kapikian  
Diarrhea caused in gnotobiotic piglets by the reovirus-like agent of human infantile gastroenteritis  
*J. Infect. Dis.* 133: 22, 1976.
25. Wyatt, R. G., B. García, A. Cáceres & L. J. Mata  
Immunoglobulin and antibodies in colostrum and milk of Guatemalan Mayan women.  
*Arch. Latinoamer. Nutr.* 22: 629, 1972.
26. Wyatt, R. G., D. L. Sly, W. T. London, A. E. Palmer, A. R. Kalika, D. H. Van Kirk, R. M. Chanock & A. Z. Kapikian  
Induction of diarrhea in colostrum-deprived newborn rhesus monkey with the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis.  
*Arch. Virol.* 50: 17, 1976.
27. Woode, G. N., J. Jones & J. Bridger  
Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhoea virus.  
*Vet. Rec.* 97: 148, 1975.
28. Yolken, R. H., H W Kim, T. Clem, R. G. Wyatt, R. M. Chanock, A. R. Kalika & A. Z. Kapikian  
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus like agent of infantile gastroenteritis.  
*Lancet* 2: 263, 1977.
29. Yolken, R. H., L. J. Mata, B. García, J. J. Urrutia, R. G. Wyatt, R. M. Chanock & A. Z. Kapikian  
Secretory antibody directed against rotavirus in human milk: measurement by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).  
*J. Pediat.* ( en prensa), 1978.