METODE DE LABORATOR UTILE ÎN ANALIZA COMPOZIȚIEI PROBELOR DE LAPTE MATERN ȘI LAPTE PRAF

BOGDAN NEAMȚU[1], OVIDIU TIȚA[2], MIHAI NEAMȚU[3], MIHAELA TIȚA[4], MIRELA HILA[5], IONELA MANIU[6], LUCA LIVIU RUS[7]

[1,2,3,4,6,7]Universitatea „Lucian Blaga" din Sibiu, [5]Spitalul Clinic de Pediatrie Sibiu

Cuvinte cheie: *metode de laborator, lapte matern, lapte praf, sugari, imunitate*

Rezumat: *Laptele matern conține substanțe cu rol antiinfecțios, imunoglobuline, celule implicate în răspunsuri imune, prebiotice, având totodată și roluri nutritive pentru sugari. Imunonefelometria, electroforeza în gel de poliacril amidă, spectroscopia cu ultrasunete pot fi utilizate și pentru analiza compoziției laptelui uman. În studiul propus am analizat sensibilitatea acestor metode în dozarea lactozei, a grăsimilor și a pH-ului din laptele matern și respectiv sensibilitatea în dozarea proteinelor, a imunoglobulinelor (A, G, M) din laptele matern (52 probe) și din laptele praf (48 probe). Rezultatele au arătat oportunitatea folosirii spectroscopiei cu ultrasunete doar în analiza conținutului în grăsimi, a pH-ului și a lactozei. Pentru imunograma probelor de lapte (matern și lapte praf) imunonefelometria poate fi considerată o metodă de referință, iar pentru evaluarea concentrației în proteine, electroforeza pe gel de poliacrilamidă rămâne metodă de elecție. Sugarii alimentați natural au protecție imună superioară în special prin titrul IgA și β-globuline.*

Keywords: *laboratory methods, breast milk, milk powder formula, infant immunity*

Abstract: *Human breast milk contains substances with anti-infective roles, immunoglobulins, cells involved in immune responses, prebiotics, and important nutrients for infants. Immunonephelometry, polyacrylamide gel electrophoresis, ultrasound spectroscopy can be used to analyze the composition of human milk. In our research, we have examined the sensitivity of these methods in the quantification of lactose, fat and pH of human breast milk and the sensitivity regarding evaluation of proteins, immunoglobulins (A, G, M) concentrations in both human breast milk (52 samples) and milk powder (48 samples). The results showed the appropriateness of using the ultrasonic spectroscopy only for the analysis of the fat content, pH and lactose. For milk samples immunogram (breast milk and milk powder) immunonephelometry can be considered as a reference method. Polyacrylamide gel electrophoresis remains the method of choice in assessing protein concentration. Breast fed infants have superior immune protection in particular by IgA titers and β-globulins.*

INTRODUCERE

Laptele matern conține substanțe cu rol antimicrobian și respectiv antiviral, imunoglobuline, celule implicate în răspunsuri imune, prebiotice, având roluri antiinfecțioase și nutritive pentru sugari.

Laptele matern este compus din grăsimi (AG-acizi grași, PUFA-AG acizi grași polinesaturați), proteine (cazeina, α-lactalbumina, albumina, β-lactoglobulina, lactoferina, IgA, IgG, lizozimul), carbohidrați (oligozaharide, lactoză), minerale (calciu, fosfor, sodiu, potasiu, clor), factori bioactivi.(1,2,3,4,5)

În pofida caracterului său complex laptele uman poate fi ușor fracționat prin centrifugare în cele trei componente majore și anume zer solubil, micelii de cazeină, globulele de grăsime din lapte (MFGs plutitoare). Laptele matern conține diferite componente necesare nou-născutului pentru creștere și dezvoltare. Printre aceste componente, proteine specifice din lapte și proteine plasmatice, cum ar fi β-cazeina, kapa-cazeina, α-lactalbumina, albumina serică, lactoferina, lizozimul, imunoglobulinele A, C3, C4 (fracțiunile complementului) care au funcții importante nutritive și imunologice.(1,2,3,5)

Numeroase metode au fost raportate ca teste utilizate pentru analiza compoziției laptelui uman: 1.Imunonefelometria; 2. Electroforeza în gel de poliacril amidă; 3. Cromatografia proteinelor în mediu lichid; 4. Cromatografia prin schimburi ionice; 5. Metoda Kjeldahl; 6. Metodele Mojonnier, Gerber și Babcock; 7. Spectroscopia cu ultrasunete.(6)

La baza metodei nefelometrice şi turbidimetrice de analiză stă fenomenul difuziunii sau a absorbției luminii de către particulele solide sau coloidale cu măsurarea intensității unui flux luminos difuzat de către particulele solide dintr-o soluție. Imunonefelometria convențională se bazează pe cuantificarea nefelometrică a luminii difuzate de complexele antigen-anticorp formate în timpul fazei lichide a reacției de imunoprecipitare şi este de obicei folosită pentru determinarea proteinelor serice umane, inclusiv IgA şi fracțiunile complementului C3, C4. Această tehnică permite măsurarea de IgA, fracțiunile complementului în laptele uman matur C3, C4 cu precizie şi acuratețe.(6)

Spectroscopia cu ultrasunete, tehnică analitică non-distructivă măsoară parametrii undelor ultrasonice de energie scăzută care se propagă prin probele analizate. Permite sondarea forțelor intermoleculare în eșantion, oferind noi informații cu privire la structură.(7) Se folosește la analiza conținutului de lapte în grăsimi, proteine, lactoză, a parametrilor fizico-chimici: densitate, punct de congelare, adaos de apă, pH, temperatură și conductivitate în laptele proaspăt de origine animală (vacă, oaie, bivoliță, capră).(8) O

[1]Autor corespondent: Bogdan Neamțu, Str. Lucian Blaga, Nr. 2A, 550169, Sibiu, România, E-mail. Bogdanneamtu76@gmail.com
Articol intrat în redacție în 14.08.2014 și acceptat spre publicare în 25.08.2014
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Septembrie 2014;2(3):61-64

abordare interesantă cu implicații în perfecționarea compoziției formulelor de lapte praf este testarea fiabilității și a oportunității folosirii în evaluarea compoziției probelor de lapte matern la sugarii internați, a unor metode de laborator dedicate în principal analizei serului uman (imunonefelometria, electroforeza pe gel de poliacrilamidă) și respectiv a unor metode de analiză a probelor de lapte de origine animală (spectroscopia cu ultrasunete).

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

În studiul propus s-a urmărit în principal analiza diferențelor dintre fracțiunile globulinice-α1, 2, β, γ, imunoglobulinele A și G între probele din laptele matern și laptele praf, folosind imunonefelometria și electroforeza pe gel de poliacrilamidă, dar și performanța analizorului ultrasonic în analiza probelor de lapte matern (folosit în industria alimentară pentru testarea probelor de lapte de origine animală). În acest sens, am colectat probe biologice de la mame care alăptează sugarii internați în Clinica de Pediatrie Sibiu în vederea studiului compoziției laptelui matern și a laptelui praf pentru a putea stabili limitele unor metode de laborator folosite în clinică până în acest moment, doar la analiza serului provenit din probe de sânge.

S-au recoltat probe în condiții de asepsie și antisepsie locală (areola mamară dezinfectată, folosirea de mănuși sterile), astfel: 52 probe de control (tegument nedezinfectat) pentru verificare, 52 probe de lapte matern și respectiv 48 probe de lapte praf pentru sugari. S-au folosit mănuși sterile, recipiente sterile de lapte. Probele au fost transportate în gheață până în laborator, iar păstrarea lor în vederea analizei s-a realizat la frigider (-20ºC). Probele biologice reprezentate de laptele matern și laptele praf au fost supuse centrifugării la 3000 rotații/minut, timp de 20 minute. S-a separat supernatantul reprezentat de substanța grasă și din filtrat s-au efectuat determinări de Ig A, M, G, proteine și electroforeze. Electroforezele s-au efectuat cu aparatul Genio S, pe folii de acetat de celuloză la un pH bazic. Determinările imunoglobulinelor (Ig A, M, G) s-au efectuat pentru probele din filtrat pe aparatul Hitachi 912, prin metoda imunoturbidimetrică (citire la λ=340 nm). Evaluarea parametrilor fizici și biochimici ai laptelui matern a fost realizată folosind un analizor ultrasonic. Corelațiile Pearson, testele statistice (Independent Sample Test) au fost studiate în concordanță cu obiectivele studiului.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În probele de lapte matern, conținutul de proteine a fost de 3.45g/dl (media) cu un minim de 3.24 g/dl și respectiv un maxim de 3.58 g/dl după analiza datelor furnizate de analizorul cu ultrasunete Ekomilk Total. Aceleași probe au fost testate și pe aparatul de electroforeză Genio S, valorile fiind exprimate în g/dl (media a fost de 1.021 g/dl cu un minim de 0.268 g/dl și respectiv un maxim de 1.48 g/dl). Practic există o neconcordanță între valorile măsurate și oferite de către analizorul cu ultrasunete și aparatul de electroforeză referitor la dozarea de proteine. Datele din literatură arată faptul că macronutrienții proteici ai laptelui matern matur (la termen) variază între 0.9 și 1.2 g/dl și diferă de la o mamă la cealaltă în timpul lactației și funcție de statusul nutrițional.(5,6,9) Într-un studiu recent, Zachariassen și ceilalți autori (2013) (10) au arătat un înalt grad de variabilitate a conținutului în proteine a laptelui matern pe 736 de probe de lapte recoltate de la mame care alăptează sugari prematuri. A fost descris practic un interval mult mai larg de la 1.06 g/dl până la 2.96 g/dl. Datele referitoare la concentrația de proteine în colostru exprimată procentual au arătat valori cu 2%, mai mari decât în laptele tranzițional (5%) sau laptele matur (1%).

Conținutul în grăsimi a probelor de lapte matern a avut o medie de 3.85 g/dl cu un minim de 0.79 g/dl și un maxim de 7.64 g/dl. În literatură sunt descrise valori de 3.6 g/dl cu un minim de 2.2 g/dl și un maxim de 5 g/dl pentru colostru (5, 6). Dozarea conținutului în grăsimi s-a făcut doar pe analizorul ultrasonic și este corespunzătoare.

Conținutul în lactoză al probelor de lapte matern a avut o medie de 5.021 g/dl cu un minim de 4.76 g/dl și cu un maxim de 5.25 g/dl. Au fost descrise valori de 6.6 g/dl în colostru, acestea crescând progresiv până la valori de 6.7 g/dl chiar 7.8 g/dl în laptele matern (Ballard et al 2012).(9) Valorile lactozei variază în timpul lactației deși există mai mulți autori care au raportat în procent mai mic lactoza, aproximativ 6 g/dl. Diferențele pot surveni funcție de metoda folosită.

Valorile obținute cu ajutorul analizatorului ultrasonic sunt comparabile cu cele raportate în compoziția laptelui de vacă (4.5 până la 5 g/dl). Valorile pH obținute din probele de lapte matern au fost în medie 7.042 cu un minim de 6.8 și un maxim de 7.16. Au fost descrise valori de 7.45 pentru colostru, 7.01-7.04 pentru primele 3 luni postpartum, apoi valorile cresc până la 7.4 la 10 luni.(9) Se remarcă valori scăzute ale pH-ului care împreună cu lactoza favorizează dezvoltarea bacteriilor lactice la nivel intestinal.

Valorile IgA dozate din probele de lapte matern au prezentat corelații pozitive cu β-globulinele ($p < 0.05$) și nu au prezentat niciun fel de corelații cu lactoza ($p=0.35 > 0.05$). Beta-globulinele dozate în serul uman cresc în infecțiile acute, mai ales prin fracțiunile proteice C_3 și respectiv C_4, astfel că este interesantă corelația pozitivă a β-globulinelor din laptele matern cu IgA. În formulele de lapte praf există corelații semnificative statistic între fracțiunile globulinice α_1 α_2, β și respectiv corelații negative între IgA și α2 - globuline.

Figura nr. 1. Sinopsis globuline lapte matern lapte praf

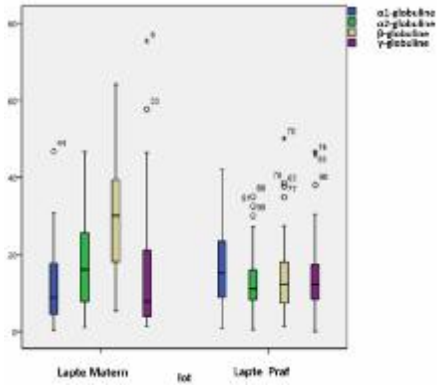
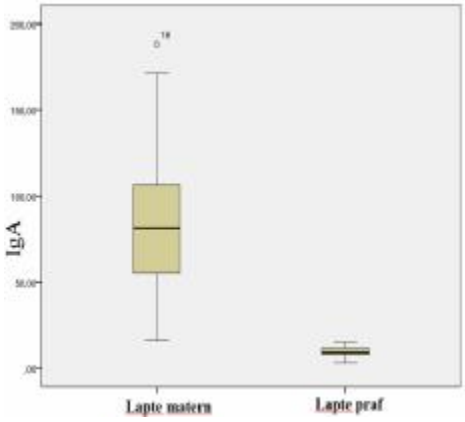


Figura nr. 2. Comparație IgA lapte matern/lapte praf



Tabelul nr. 1. Dozare proteine lapte matern

Dispozitiv	Proveniență proteine	Nr.	Medie	Deviație standard	Minim	Maxim	Percentile		
							25	50 Mediana	75
Aparat electroforeza	Proteinele totale lapte matern	52	1.022	0.2687	0.58	1.48	0.7375	1.075	1.252
Analizor ultrasonic	Proteina totală lapte matern ± 0.2,	52	3.456	660E-02	3.24	3.58	3.4	3.47	3.507

Tabelul nr. 2. Dozare grăsimi lapte matern

Dispozitiv	Tip biomarker	Nr	Medie	Deviație standard	Minim	Maxim	Percentile		
							25	50 Mediana	75
Analizator ultrasonic	Grăsimi ± 0.1%	52	3.8521	1.8869	79	7.64	2.72	3.45	4.94

Tabelul nr. 3. Dozare lactoză și pH lapte matern

Dipozitiv folosit	Analiză	Nr	Medie	Deviație standard	Minim	Maxim	Percentile		
							25	50 Mediana	75
Analizator ultrasonic	Lactoza ± 0.2 %	52	5.0218	1219	4.76	5.25	4.955	5.04	5.1075
Analizator ultrasonic	pH ± 0.02	52	7.0421	660E-02	6.8	7.16	7.01	7.06	7.09

Tabelul nr. 4. Corelații factori bioactivi în laptele matern și laptele praf

Lapte matern		Lapte praf	
Corelații Pearson pozitive	Corelații Pearson negative	Corelații Pearson pozitive	Corelatii Pearson negative
β –globuline cu IgA	β –globuline cu α1,γ	α1 globuline cu α2	α1 globuline cu IgA
	γ –globuline cu α2		

Media concentrației IgA din probele de lapte matern (83.71 mg/dl, SD=38.03) a fost mai mare semnificativ statistic ($p< 0.05$) decât media concentrației IgA din probele de lapte praf (9.45 mg/dl, SD=2.71). Media β-globulinelor în cazul laptelui matern (M=29.95%, SD=15.73) a fost semnificativ statistic mai mare decât media β-globulinelor în cazul laptelui praf (M=14.30 %, SD=10.52). Nu există diferențe semnificative între loturi în cazul γ -globulinelor ($p=0.697>0.05$), adică media γ-globulinelor în cazul laptelui matern (M=14.71%, SD=16.02) nu este semnificativ statistic mai mare decât media γ globulinelor în cazul laptelui praf (M=13.68%, SD=9.93). Media α1 globulinelor în cazul laptelui matern (M=11.89%, SD=9.41) a fost semnificativ statistic mai mică decât media α1 globulinelor în cazul laptelui praf (M=16.94%, SD=10.85). Media α2 globulinelor în cazul laptelui matern (M=18.41%, SD=11.87) a fost semnificativ statistic mai mare decât media α2 globulinelor în cazul laptelui praf (M=12.81%, SD=8.18).

Se remarcă o protecție antiinfecțioasă superioară a sugarilor alimentați natural în principal prin titrul de IgA și β globuline și respectiv γ globuline și în subsidiar α1,2 globuline iar în cazul sugarilor alimentați artificial protecția se realizează prin α1,2 globuline și respectiv γ globuline.

Datele explică de fapt de ce alimentația naturală scade riscul de infecții respiratorii la sugari. Este cunoscut faptul că alimentatul exclusiv la sân peste 4 luni scade riscul infecțiilor de căi respiratorii superioare cu 63%. Alimentatul exclusiv la sân peste 6 luni scade riscul infecțiilor de căi respiratorii superioare cu 72%.(11,12,13,14) S-a constatat o creștere a IgA în laptele matern la mamele care alăptează sugari cu infecții extrem de severe (sepsis) astfel: colostru (183.48 +/- 114.91 mg/l - lot martor; 221.22 +/- 115.46 mg/l - lot studiu), laptele matur (147.75 +/- 114.6 mg/l - lot martor; 267.81 +/- 77.89 mg/l - lot studiu), Ella et al 2011.(14) Creșterea concentrației acestor biomolecule se pare ca ar avea un rol protector.

CONCLUZII

Analizând datele prezentate se conturează următoarele concluzii în concordanță cu obiectivele studiului referitor la analiza probelor de lapte matern și lapte praf:

1. Electroforeza în gel de poliacril amidă se recomandă pentru dozarea proteinelor din laptele matern, dispozitivele de analiză pe bază de spectroscopie cu ultrasunete folosite în industria alimentară necesitând adaptări specifice tehnologice.
2. Imunonefelometria poate fi folosită cu succes în analiza serului rezultat din pregătirea probelor din laptele matern și respectiv laptele praf.
3. Dispozitivele pe bază de spectroscopie cu ultrasunete folosite în industria alimentară pot fi folosite cu succes în analiza conținutului în grăsime, a pH-ului și a lactozei.
4. Sugarii cu infecții respiratorii alimentați la sân au o protecție imună superioară față de cei alimentați cu lapte praf.

REFERINȚE

1. Garofalo R. Cytokines in Human Milk, The Journal of Pediatrics. www.jpeds.com, supplement, 2010, 156:S36-40;ISSN 00223476.
2. Chirico G, Gasparoni A. Immunologic components of human milk, Haematologica Reports 2006;2(10):27-30.
3. Honorio-França AC, França Eduardo CL. Human Milk: An Ecologically Functional Food; Environmental Sciences Relevant Perspectives in Global Environmental Change chapter 4, ISBN 978-953-307-709-3 DOI:10.5772/26520, 2011 December.
4. Work Group on Breastfeeding, Breastfedding and the Use of Human Milk, SECTION ON BREASTFEEDING, Pediatrics: Official Journal of the American Academy of Pediatrics. Vol 129, Number 3, 2012, DOI: 10.1542/peds2011-3552, ISSN:0031-4005.
5. Oddy H Wendy, Why Breast Milk Has Health Benefits for Infants and Children: A Review, Pakistan Journal of Nutrition 1(3), 106 – 118, 2002, ISSN 1680 – 5194, Departament of Nutrition, Dietetics and Food Science, School of Public Health.
6. Inês PA, Morais Ildikó V. Tóth, António OS, Rangel S. Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications; Spectroscopy Letters 2006;39(6):447-579. 2006 DOI:10.1080/00387010600824629;
7. http://www.scientistlive.com/content/9474.

8. http://www.metroninstruments.com/?p=567.
9. Ballard O et al. Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors, Pediatr Clin N Am 2013;60:49-74;DOI: 10.1016/j.pcl.2012.10.002; www.pediatric.theclinics.com.
10. Zachariassen G, Fenger-Gron J, Vogn Hviid M, Halken S. The content of macronutrients in milk from mothers of very preterm infants is highly variable, Danish Medical Journal 2013;60(6):A4631.
11. Lawrence Robert M, Pane Camille A. Human Breast Milk: Current Concepts of Immunology and Infectious Diseases, Current Probl Pediatr Adolesc HealthCare, January2007,37:7-36,DOI: 10.1016/j.cppeds.2006.10.002.
12. Chirico G, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C, Gasparoni A. Antiinfective properties of Human Milk, The Journal of Nutrition 2008;138:1801S-1806S, ISSN: 0022-3166/08;
13. Guilbert TW et al. Effect of Breastfeeding on Lung Function in Childhood and Modulation by Maternal Asthma and Atopy; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2007;176:843-848, DOI:10.1164/rccm.200610-1507OC.
14. Robinson S, Fall C. Infant Nutrition and Later Health: A Review of Current Evidence, Nutrients 2012;4(8):859-874; doi:10.3390/nu4080859, ISSN 2072 – 6643.
15. Ekah Elijah E et al. Studies on the Interaction between IgA, lactoferrin and lysozyme in the breastmilk of lactating women with sick and healthy babies; Journal of Infectious Diseases and Immunity, 2011;3(2):24-29, 2011 ISSN 2141-2375.