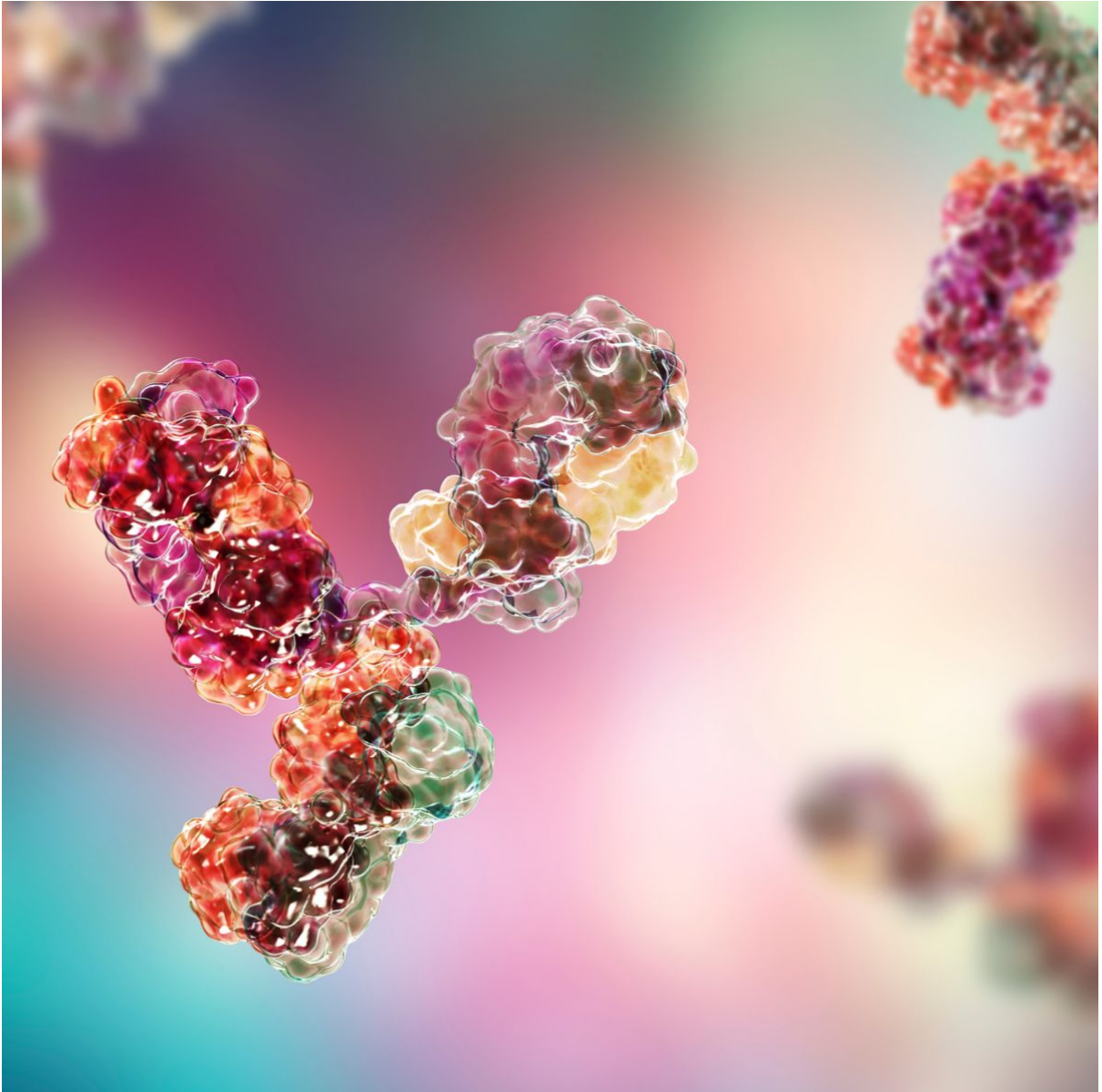


# DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN LA LECHE MATERNA



***Yanire García Corrales  
Paula Granda González  
Laura María Hernández Fernández***

Proyecto del Ciclo Formativo de Grado Superior Laboratorio Clínico y Biomédico.  
IES Isla de la Deva. Junio, 2022

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
3.1. Importancia de la lactancia y beneficios	4
3.2. Componentes inmunológicos de la leche materna	5
3.3. Inmunidad pasiva	6
3.4. COVID-19	7
3.5. Vacuna y embarazo	7
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>8</b>
5.1. Procesamiento de las muestras	9
5.1.1. Procesamiento de muestras con EDTA	9
5.1.2. Procesado de muestras con diálisis en polímeros de sílice	10
5.2. Test rápidos de anticuerpos COVID-19	11
5.3. Inmunodifusión radial	12
5.4. ELISA	13
5.5. Electroforesis de proteínas	14
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
6.1. Procesamiento de las muestras	15
6.1.1. Procesamiento de muestras con EDTA	15
6.1.2. Procesamiento de muestras con diálisis	16
6.2. Test rápidos anticuerpos anti-SARS-CoV-2	17
6.3. Inmunodifusión radial	19
6.4. ELISA	21
6.5. Electroforesis de proteínas	23
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>31</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>31</b>

## **1. RESUMEN**

Nuestra investigación consiste en la detección de anticuerpos en leche materna (LM), sobre muestras cedidas por el banco de leche del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

Para comenzar, hemos realizado una investigación sobre los componentes de la leche materna, los anticuerpos que posee y cómo influyen en el bebé lactante. Con estos datos, nos pusimos a hacer la investigación experimental.

Basándonos a su vez en el COVID-19 y la vacuna, ampliamos nuestra investigación a cómo la leche materna presenta anticuerpos de esta enfermedad.

Tras la investigación y experimentación, podemos concluir que las IgA se encuentran en cantidades más elevadas y se detectan con mayor facilidad, que el resto de las inmunoglobulinas.

Hemos realizado distintas formas de procesado de las muestras para poder llevar a cabo una comparativa sobre cuál podría ser la mejor forma de concentrar los anticuerpos y hemos llevado a cabo diferentes pruebas. Por ejemplo en el proteinograma no hemos podido encontrar ningún tipo de inmunoglobulina, mientras que en el ELISA distinguimos distintos tipos de anticuerpos según las muestras utilizadas y el tipo de procesamiento de las mismas.

**Palabras clave:** Leche materna, anticuerpos, COVID-19, inmunoglobulinas.

## **2. ABSTRACT**

Our investigation consists of the detection of antibodies in human milk (HM), on samples provided by the milk bank of the Central University Hospital of Asturias (HUCA).

To begin, we have done some investigation on the components of human milk, the antibodies it has and how they influence the nursing baby. With these data, we began doing experimental investigation.

Based on COVID-19 and the vaccine, we expanded our investigation to how human milk presents antibodies to this disease.

After research and experimentation, we can conclude that IgA are found in higher amounts and are more easily detected than the rest of the immunoglobulins.

We have carried out different ways of processing the samples to be able to carry out a comparative on what could be the best way to concentrate the antibodies and we have carried out different tests. For example, in the proteinogram we have not been able to find any type of immunoglobulin, while in the ELISA we distinguish different types of antibodies according to the samples used and the type of processing thereof

**Keywords:** Human milk, antibodies, COVID-19, immunoglobulins.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos son unas proteínas que forman parte del sistema inmune y circulan por la sangre. Cuando reconocen sustancias extrañas para el organismo, como los virus y las bacterias o sus toxinas, las neutralizan. Una vez el cuerpo se ha expuesto a una sustancia extraña concreta, también llamada antígeno, los anticuerpos producidos para atacarlo persisten en la sangre, ofreciendo protección en el caso que, en un futuro, volvamos a contactar con el mismo antígeno.(1)

#### ***3.1. Importancia de la lactancia y beneficios***

A lo largo de las generaciones, se ha demostrado la eficacia de la leche materna en los primeros meses de vida del bebé, protegiéndolo de un gran número de infecciones. Esto se debe a los anticuerpos que posee junto a componentes inmunológicos, humorales y celulares.(2)

La leche materna es un conjunto de más de 200 componentes que interactúan entre sí o poseen funciones individuales. Participan en la función de nutrición, defensa contra infecciones y desarrollo del estímulo cognoscitivo. (3)

Excepto en casos en los que la madre posee una enfermedad grave, cáncer, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o el virus linfotrópico (VHTL-1), la lactancia presenta una gran cantidad de beneficios durante, como mínimo, los 6 primeros meses de vida del recién nacido. En casos de bebés prematuros, la leche materna se adapta de forma óptima a las necesidades especiales que este necesita para su crecimiento. (3)

Esta forma natural de alimentación interviene en el establecimiento del apego y en la creación de un vínculo positivo madre e hijo. (2,4)

Se ha comprobado la multitud de beneficios a corto y largo plazo que proporciona al lactante, como la mejora de la inmunidad, de la función intestinal y el desarrollo neurocognitivo, protege contra las diarreas y deshidratación, alergias o enfermedades de la piel, disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o cáncer e influye en la obesidad, entre otras. (3,4)

A su vez, no beneficia únicamente al bebé, también favorece a la madre en la pérdida de peso, disminución del riesgo de padecer anemia, hipertensión y cáncer de mama u ovario. (4)

Tras el parto, la leche materna varía en su composición y volumen, pasando por tres etapas:

- Calostro, durante los tres primeros días, es rica en anticuerpos, poseyendo elevadas concentraciones de IgA secretora (IgAs) que intervienen en la protección inmune pasiva. También posee minerales y una concentración más alta de lactoferrina que interfiere de forma positiva en el crecimiento y desarrollo del neonato. (4,5,6)
- Leche transicional, hasta el día 15 postparto. Posee un color blanco por la emulsión de grasas y la presencia de caseinato de calcio. Las vitaminas solubles en agua aumentan, mientras que la concentración de inmunoglobulinas y proteínas, disminuyen. (7,8)
- Leche madura, a partir del día 16 tras el parto. Las vitaminas solubles en grasa disminuyen y la lactosa, grasas y contenido calórico aumentan, influyendo en el correcto crecimiento del bebé. (7,8)

### **3.2. Componentes inmunológicos de la leche materna**

La leche materna está compuesta por sustancias bioactivas como hormonas, enzimas e inmunoglobulinas que proporcionan al recién nacido protección tanto pasiva como activa directa. Estos ingredientes promueven el desarrollo del sistema inmunológico del lactante. (9)

Tras el nacimiento, el sistema inmunológico neonatal es inmaduro y está basado en anticuerpos maternos adquiridos de forma pasiva, destacando la Inmunoglobulina A (IgA) secretora, que se encuentra en mayor concentración en el calostro. La IgA secretora es la inmunoglobulina que actúa en primera línea de defensa contra patógenos que invaden y colonizan superficies cubiertas por secreciones. Toma un papel fundamental en la protección contra infecciones causadas por virus y enteropatógenos. (9)

Uno de los mecanismos de defensa más importantes de las IgA secretoras es la inhibición de la adherencia bacteriana, impidiendo que las bacterias se unan a las células epiteliales mucosas presentes en vías respiratorias, estómago, intestinos y zonas genitourinarias. También son capaces de inactivar enzimas y neutralizar toxinas.(9,10)

En menor proporción, se encuentran en la leche materna otras inmunoglobulinas como son las IgG, IgM, IgD e IgE. (9,10)

Entre las principales funciones de las IgM destacan su participación en la toxicidad anticuerpo dependiente y su acción contra bacterias y virus; las IgG tienen actividad opsonica contra virus y bacterias y activan el complemento. Las inmunoglobulinas E combinadas con antígenos y situadas en la luz intestinal, activan mediadores químicos para incrementar la permeabilidad vascular. Por su parte, las inmunoglobulinas D son anticuerpos contra bacterias y una de sus funciones más destacadas es influir en la especificidad de las inmunoglobulinas. (9,10)

### ***3.3. Inmunidad pasiva***

La inmunidad pasiva se debe a anticuerpos que se producen en un cuerpo diferente del nuestro. Los bebés tienen inmunidad pasiva, dado que nacen con los anticuerpos que la madre les transfiere a través de la placenta. Estos anticuerpos desaparecen entre los 6 y los 12 meses de edad. (11)

La inmunidad pasiva también puede deberse a la inyección de suero, que contiene anticuerpos formados por otra persona o animal. Esto brinda protección inmediata contra un antígeno, pero no suministra una protección duradera. La inmunoglobulina sérica (administrada para la exposición a la hepatitis) y la antitoxina para el tétanos son ejemplos de inmunidad pasiva. (11)

### **3.4. COVID-19**

La enfermedad por coronavirus (COVID-19) es una enfermedad infecciosa causada por el virus SARS-CoV-2. En diciembre de 2019, se informó de la aparición de un grupo de casos de neumonía con origen desconocido, tratándose de un nuevo brote de coronavirus que acabó declarándose como pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS). (12)

El virus se propaga con gran velocidad a través de la tos o secreciones respiratorias, gotas de Pflügge, o al tocar superficies previamente contaminadas por estas partículas y se considera que el periodo de incubación oscila entre 1 a 14 días.(13)

Para reducir el riesgo de contagio se han aplicado medidas de protección como el uso de mascarillas y el lavado de manos frecuente y medidas preventivas como la cuarentena. (14)

La mayoría de los casos son asintomáticos, leves o moderados, presentando síntomas como fiebre, tos seca, disnea, mialgia y cansancio. En una menor parte aparecen cuadros graves al tratarse de pacientes vulnerables, inmunodeprimidos o personas mayores y pueden presentar neumonía viral, disnea severa, accidentes cerebrovasculares, miocarditis fulminante o el fallecimiento del paciente. (13,14,16,18)

### **3.5. Vacuna y embarazo**

En el inicio de la campaña de inmunización masiva, se descarta en un primer momento a la población embarazada, a pesar de ser un grupo vulnerable a morir o padecer una infección severa puesto que se desconocía el riesgo que las vacunas de ARNm suponían tanto para la madre como para el feto. A medida que la vacunación iba avanzando, y ante la evidencia científica de los beneficios de la vacuna, comenzaron a modificarse las estrategias incluyendo a las mujeres embarazadas en la campaña. (17,19)



Se comprueba que las vacunas de ARN mensajero administradas durante la gestación poseen una elevada efectividad para prevenir la infección por COVID-19 y las complicaciones derivadas que genera el virus tanto para las embarazadas como para el neonato. Tras varios estudios, se evidencia la presencia de anticuerpos neutralizantes contra la proteína S del SARS-CoV-2, tanto en el suero de gestantes como en el del bebé, además de en la leche materna, aportando protección al lactante los primeros meses de vida. (17,19)

#### **4. OBJETIVOS**

El objetivo de nuestro proyecto es la detección de anticuerpos en leche materna que hemos obtenido del HUCA y de una alumna que se encontraba dando lactancia, centrándonos en los anticuerpos del COVID-19. Para ello hemos realizado test rápidos de anticuerpos, inmunodifusión radial, técnica de ELISA y electroforesis de proteínas.

#### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

- Materiales biológicos

Para llevar a cabo este proyecto, se ha utilizado leche materna (LM) de donantes anónimas procedentes del banco de leche del HUCA, numeradas con su fecha de extracción. También recibimos una muestra de leche materna y sangre, de una donante conocida.

- Muestra LM de donante anónima, extraída el 06/12/2019.
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 18/01/2020
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 01/09/2020
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 31/03/2021
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 31/05/2021
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 13/08/2021
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 03/06/2021
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 13/06/2021
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 22/07/2021, número 2

- Muestra LM de donante anónima, extraída el 22/07/2021, número 6
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 27/07/2021
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 06/08/2021
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 14/11/2021
- Muestra LM de donante anónima, extraída el 15/11/2021
- Muestra LM de donante de identidad conocida, extraída el 07/02/2022
- Muestra de sangre de donante de identidad conocida, extraída el 09/02/2022

## **5.1. Procesamiento de las muestras**

### **5.1.1. Procesamiento de muestras con EDTA**

- Muestra
  - Muestras de LM
- Reactivos
  - EDTA
- Equipos
  - Centrífuga

En un tubo de centrífuga, se vierte un volumen de leche materna por cada dos volúmenes de EDTA al 0'05M, preparado previamente en campana. (19) Se centrifuga a 4.200 rpm durante 15 minutos.

Al finalizar se puede observar cómo se han formado tres capas: en el sedimento se encuentran las proteínas, en el medio la fase acuosa que contiene las inmunoglobulinas y en la parte más alta y semisólida, la grasa. Retirar la grasa con cuidado, alicuotar en eppendorf con ayuda de una micropipeta y almacenar a -22°C.

Con este método se pretenden concentrar las inmunoglobulinas presentes en la leche materna para estudios posteriores.

### 5.1.2. *Procesado de muestras con diálisis en polímeros de sílice*

- Materiales
  - Muestras de LM
  - Polímeros de sílice
  - Membrana de celulosa para diálisis en tubo
  - Cubeta con agua
  - Jeringuilla

La diálisis es un método de filtrado molecular en función de su tamaño que emplea membranas semipermeables con un poro de tamaño inferior a macromoléculas. Esto permite que sales y metabolitos pequeños difundan a través de ella reteniendo las moléculas de mayor tamaño como las proteínas.(20,21,22)

Se humedecieron porciones de membrana para diálisis hasta su completa hidratación para después introducir en ellas 5ml de muestras de diferentes donantes, seleccionadas previamente mediante test rápido de anticuerpos con resultados positivos.

Se depositan las membranas cerradas en una bandeja con tapa, recubiertas por ambos lados con polímeros de sílice, durante 24 horas y a temperatura ambiente. Se retiran los polímeros, se introduce en las membranas 1 ml de solución salina con ayuda de una aguja y se ajustan las muestras obtenidas a 2 ml alicuotando en un eppendorf, almacenando a -22°C.



Fig. 1 Muestras de leche materna procesadas mediante diálisis con polímeros de sílice

## 5.2. Test rápidos de anticuerpos COVID-19

- Materiales
  - Test rápidos de anticuerpos COVID-19 (Test Nadal)
  - Muestras LM y muestras de sangre

Es una prueba diagnóstica cualitativa que utiliza la tecnología de inmunocromatografía de flujo lateral para la detección específica de los anticuerpos humanos IgG e IgM anti SARS-CoV-2 en muestras de suero, plasma o sangre completa. Estos test detectan proteínas virales, concretamente la proteína Spike (S). Esta prueba puede usarse en estudios de cribado sobre la presencia de anticuerpos frente al virus SARS-CoV-2. (23,7)

Los anti-IgM humanos están fijados en la región de test "IgM" y los anti-IgG humanos están recubiertos en la región de test "IgG" de la membrana. Durante el test, la muestra reacciona con los antígenos del SARS-CoV-2 que están conjugados con partículas coloreadas. A continuación, la mezcla migra cromatográficamente a lo largo de la membrana por acción capilar y reacciona con los anti-IgM y anti-IgG humanos en la región de test "IgM" e "IgG" de la membrana. La presencia de una línea coloreada en la región de test "IgM" y/o "IgG" indica un resultado positivo. La ausencia de una línea coloreada en la región de test "IgM" y/o "IgG" indica un resultado negativo.

La formación de una línea coloreada en la región de control "C" sirve como control del procedimiento, indicando que el volumen de muestra añadido ha sido adecuado y que la membrana se ha empapado suficientemente.

Para llevar a cabo la prueba, se siguen las instrucciones del fabricante. (24)



Fig. 2 Test rápidos anticuerpos SARS-CoV-2. Disponible en:

<https://www.nal-vonminden.com/es/nadalr-covid-19-igg-igm-test-10-test-cassettes.html>

### 5.3. Inmunodifusión radial

- Materiales
  - Muestras de LM
  - Muestras de sangre
  - Placa EASY RID MULTIPLATE de la casa Liofilchem s.r.l.

La inmunodifusión radial es una técnica en la que se produce la difusión del antígeno o anticuerpo atravesando un medio semisólido, produciendo anillos de precipitación que deben medirse. (27)



Fig. 3 Placa EASY RID MULTIPLATE

Esta placa permite realizar una determinación simultánea de IgG, IgA e IgM, ya que posee diferentes geles de agarosa con colores característicos y los antisueros monoespecíficos. Posee un total de 12 pocillos, distribuidos 4 pocillos en cada gel. (28)

Tras atemperar la placa, se preparan las muestras y se dejan incubar durante 48 horas siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Cuando ha pasado el tiempo correspondiente, se debe medir con una regla el diámetro, en milímetros, de los halos que se han formado y anotar los resultados, guiándose por la tabla de valores. (28)

## 5.4. ELISA

- Materiales
  - Placa VIRCELL COVID-19 IgM+IgA
  - Reactivos incluidos en el kit
  - Muestras LM y muestras de sangre
- Equipos
  - Espectrofotómetro de placas de ELISA

Para detectar los anticuerpos inducidos por vacunas o que se encuentran en los individuos tras contraer una infección, suelen emplearse técnicas *in vitro* no funcionales, muy útiles para estudios inmuno-epidemiológicos. Entre estos ensayos, la técnica de elección es el ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay), inmunoensayos heterogéneos en soporte sólido que permiten detectar la seroconversión inducida por vacunación, determinar el grado de protección y evaluar la inmunidad de una población, debido a su alta sensibilidad, especificidad y a su capacidad para procesar tanto un número de muestras pequeño como elevado, sin el riesgo del uso de materiales radioactivos.

Los ensayos ELISA para la detección de anticuerpos son denominados indirectos, basándose en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno que se encuentra unido a la superficie de poliestireno de los pocillos. (29, 30)



Fig. 4 y 5 Kit de ELISA y lector de placas

Se atemperan los reactivos una hora antes de iniciar y se ajusta la estufa a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Es importante agitar los componentes y sacar el número de pocillos necesarios antes de seguir el protocolo que proporciona la casa comercial. Entre los pocillos a usar, debemos utilizar uno como control positivo, uno como control negativo y dos para el suero cut off.

Realizar las diluciones correspondientes y añadir los reactivos y las muestras a la placa. Tapar e incubar 45 minutos en la estufa a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Pasado el tiempo, aspirar y realizar el proceso de lavado, que se encarga de eliminar las inmunoglobulinas que no han llegado a unirse al reaccionar con el antígeno.

Añadir el conjugado inmediatamente e incubar media hora a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Aspirar y lavar el contenido para eliminar los anticuerpos marcados no unidos.

Se añade la solución de sustrato a todos los pocillos y se incuba a temperatura ambiente en oscuridad. Pasados 20 minutos, añadir la solución de parada, observando un cambio de color en los pocillos, de azul a amarillo, ya que la globulina unida, reacciona con el sustrato.

Habiendo encendido previamente el espectrofotómetro de placas ELISA, introducir la placa y medir a 450 nm.

### **5.5. Electroforesis de proteínas**

- Materiales
  - Muestras de LM
  - Muestras de sangre
  - Tiras de acetato de celulosa
  
- Reactivos
  - Tris 0.025M
  - Glicina 0.192M
  - Tampón de carga: azul de bromofenol al 1% en alcohol de 96
  - Rojo Ponceau
  - Solución decolorante: metanol al 45% y ácido acético al 10%
  - Solución transparentizadora: metanol al 85% y ácido acético al 15%
  
- Equipos
  - Equipo de electroforesis

La electroforesis es una técnica muy utilizada en el laboratorio clínico que permite la separación de partículas sometiéndolas a un campo eléctrico. Existen diferentes modalidades de electroforesis. La técnica seleccionada en el presente proyecto es la electroforesis de proteínas o proteinograma en tiras de acetato de celulosa. La ventaja que presenta este soporte, es que las tiras son químicamente homogéneas y por su transparencia, permite cuantificar las bandas resultantes mediante densitometría.(25,26)

La aplicación de la electroforesis en celulosa consiste en separar las proteínas de suero, en este caso procedentes de leche materna.(25,26)

Para llevar a cabo la electroforesis, son necesarias cubeta y fuente de electroforesis, tiras de acetato de celulosa, soporte para tiras y aplicador para muestras. Se aplica una pequeña cantidad de muestra sobre una tira de celulosa humedecida con disolución tampón (tris 0.025M, glicina 0.192M). Cada uno de los extremos de la tira se encuentran sumergidos en compartimentos separados de la cubeta, que contiene la disolución tampón. En ellos se colocan los electrodos conectados a una fuente de tensión continua y se aplica el campo eléctrico durante el tiempo adecuado. Con la aplicación de la corriente directa, las moléculas cargadas de la muestra migran hacia los electrodos de polaridad opuesta, formando bandas en el papel. Tras completar el proceso, se desconecta el equipo y se procede a la tinción y revelado de las tiras para cuantificarlas posteriormente. (25,26)

## **6. RESULTADOS**

### ***6.1. Procesamiento de las muestras***

#### ***6.1.1. Procesamiento de muestras con EDTA***

Mediante el procesamiento con EDTA hemos logrado separar de cada muestra las proteínas de la grasa y otras sustancias que componen la leche. Con esas muestras, realizamos los test rápidos, la electroforesis y unos pocillos del ELISA.



### **6.1.2. Procesamiento de muestras con diálisis**

#### **➤ Primera prueba**

Con el objetivo de comprobar el funcionamiento de esta técnica y concentrar la muestra para evitar resultados negativos debido a las bajas concentraciones que poseen las inmunoglobulinas, se realizó la diálisis con una disolución de agua y cloruro sódico, con dos muestras y 10 mililitros de cada una.

- Muestra de leche materna, extraída el 03/06/2021.
- Muestra de leche materna, número 6, extraída el 22/07/2021.

Tras 48 horas el agua sobresaturada se introdujo en la membrana, provocando un aumento de volumen y disminuyendo la concentración.

#### **➤ Segunda prueba**

En este caso, realizamos deshidratación por diálisis con polímeros absorbentes con 5 mililitros de una de las muestras.

- Muestra de leche materna, número 6, extraída el 22/07/2021.

Introducimos la membrana en un vaso de precipitados con bolsas de sílice y esperamos 24 horas, observando una completa deshidratación de la membrana.

Comprobamos que la concentración final de esta muestra permite detectar los anticuerpos presentes en la leche materna, realizando un test rápido de anticuerpos, obteniendo un resultado positivo en IgG e IgM.

#### **➤ Tercera prueba**

Con los resultados de la prueba anterior, confirmamos esta forma de concentración del suero con polímeros absorbentes, por lo que realizamos la preparación de todas las muestras siguiendo los pasos anteriores.

Se observó una deshidratación demasiado intensa que dificulta la obtención de la muestra, por lo que se recurre a humedecer la membrana e introducir 1 mililitro de solución salina con una aguja, ajustando posteriormente las muestras a 2 mililitros para que no sean tan espesas y se pueda trabajar posteriormente mejor con ellas.

Podemos destacar el buen funcionamiento de esta técnica para la preparación de las muestras, aunque sea un método más lento.



Fig. 6 Resultado diálisis con polímeros absorbentes

## 6.2. Test rápidos anticuerpos anti-SARS-CoV-2

Se emplean test de detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 de la casa Nadal. Se usan muestras puras y con diferentes tipos de procesado expuestos con anterioridad. Los test empleados detectan IgM o IgG, que en caso de resultado positivo reflejan una banda rojiza. Disponen de una banda control que ha de estar marcada para considerar la prueba válida.

Para comprobar el correcto funcionamiento de los test realizamos varias pruebas en personas que han padecido la infección y personas inmunizadas. Para el control se usa sangre de un donante de identidad conocida que ha pasado la covid recientemente, obteniendo resultado positivo en IgG y sangre de personas inmunizadas recientemente, obteniendo resultados positivos en la banda correspondiente a IgG.

Los resultados son:

- Muestra de leche materna procesada con EDTA, extraída el 03/06/2021: negativo
- Calostro extraído el 27/07/2021: Puro: negativo; procesado con EDTA: positivo en IgM.
- Muestra extraída el 22/07/2021 sin tratar: Negativo; procesada con EDTA: positivo en IgM; procesada por diálisis: positivo en IgM
- Muestra extraída el 07/02/2022 procesada con EDTA: positivo en IgM
- Muestra extraída el 15/11/2021 procesada por diálisis y EDTA: positivo en IgG

- Muestra de la donante en lactancia con resultado positivo en IgG en sangre, en muestra de leche materna tratada con EDTA y en muestra de leche materna tratada con diálisis

<b>MUESTRAS LM EDTA</b>	<b>IGM</b>	<b>IGG</b>
3/06/2021	negativo	negativo
Calostro	positivo	negativo
22/7/2021	positivo	negativo
7/2/2022	positivo	negativo
15/11/2021	negativo	positivo
Donante en lactancia	negativo	positivo

Tabla. 1 Resultados de muestras de LM procesadas con EDTA en test de anticuerpos

<b>MUESTRAS LM DIÁLISIS</b>	<b>IGM</b>	<b>IGG</b>
22/7/2021	positivo	positivo
15/11/2021	negativo	positivo
Donante en lactancia	negativo	positivo

Tabla. 2 Resultados de muestras LM procesadas con diálisis en test de anticuerpos.



Fig. 7 Test de anticuerpos de COVID-19 usados como control positivo.

### 6.3. Inmunodifusión radial

Utilizando las placas de gel de agarosa del Kit Easy Rid Multiplate de la casa Liofilchem, se realizan dos ensayos.

En el primer gel, se carga suero sanguíneo del donante de identidad conocida inmunizado recientemente (1), muestra de calostro procesada con EDTA suero de leche materna de donante de identidad conocida y suero sanguíneo de la misma donante (2) . Se obtienen los siguientes resultados:

MUESTRAS	Rojo (IgA)	mg/dl	Verde (IgG)	mg/dl	Azul (IgM)	mg/dl
<b>Suero sangre 1</b>	4 mm	42	7 mm	1900	5 mm	90
<b>Calostro</b>	7 mm	319,2	0 mm	0	0 mm	0
<b>Suero leche Carmen</b>	0 mm	0	0 mm	0	0 mm	0
<b>Suero sangre 2</b>	7 mm	319,2	6 mm	1250	4 mm	32,1

Tabla. 3 Resultado de IDR 1.

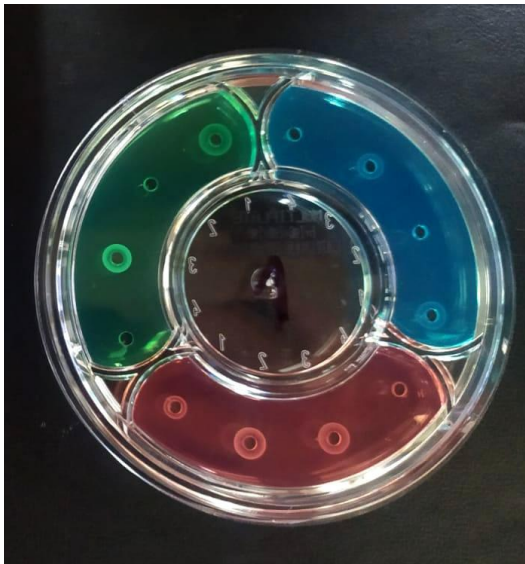


Fig. 8 Resultado de la IDR 1, observación de los halos formados.

En el segundo gel, se carga muestra de sangre de donante conocida inmunizada con dos dosis(1), y muestras de leche materna procesadas mediante diálisis extraídas el 27/7/21 , el 15/11/21 y el 22/7/21, obteniendo los siguientes resultados:

<b>MUESTRAS</b>	<b>Rojo (IgA)</b>	<b>mg/dl</b>	<b>Verde (IgG)</b>	<b>mg/dl</b>	<b>Azul (IgM)</b>	<b>mg/dl</b>
<b>Suero sangre 1</b>	6 mm	210	6 mm	1250	5 mm	90
<b>27/7/21</b>	5 mm	117,6	0 mm	0	0 mm	0
<b>15/11/21</b>	4 mm	42	0 mm	0	0 mm	0
<b>22/7/21</b>	4 mm	42	0 mm	0	0 mm	0

Tabla. 4 Resultados IDR 2.

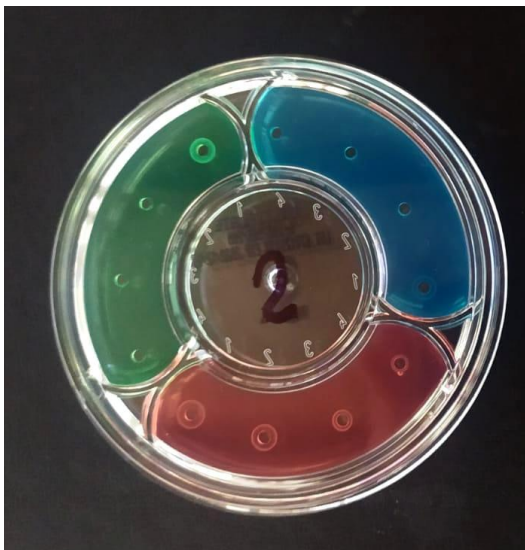


Fig. 9 Resultados IDR 2, observación de los halos que se forman.

## 6.4. ELISA

Introducción de las muestras, por duplicado, siguiendo el esquema que se muestra en la siguiente figura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Control positivo	LM de donante de identidad conocida, procesada con EDTA	Muestra LM 31/05/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 14/11/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 06/12/2019, procesada con EDTA	Muestra LM 31/05/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 06/08/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 15/11/2021, pura	Muestra LM 13/06/2021, pura	Muestra LM 31/03/2021, pura	Muestra LM 06/12/2019, pura
B	Control positivo	LM de donante de identidad conocida, procesada con EDTA	Muestra LM 31/05/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 14/11/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 06/12/2019, procesada con EDTA	Muestra LM 31/05/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 06/08/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 15/11/2021, pura	Muestra LM 13/06/2021, pura	Muestra LM 31/03/2021, pura	Muestra LM 06/12/2019, pura
C	Control negativo	Muestra LM 27/07/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 22/07/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 31/03/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 27/07/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 22/07/2021, n°2 procesada con diálisis	Muestra LM 14/11/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 13/08/2021, pura	Muestra LM 03/06/2021, pura	Muestra LM 22/07/2021, n°6, pura	Muestra LM 14/11/2021, grasa
D	Control negativo	Muestra LM 27/07/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 22/07/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 31/03/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 27/07/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 22/07/2021, n°2 procesada con diálisis	Muestra LM 14/11/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 13/08/2021, pura	Muestra LM 03/06/2021, pura	Muestra LM 22/07/2021, n°6, pura	Muestra LM 14/11/2021, grasa
E	Cut off	Muestra LM 15/11/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 03/06/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 01/09/2020, procesada con EDTA	Muestra LM 15/11/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 13/06/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 31/03/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 31/05/2021, pura	Muestra LM 06/08/2021, pura	Muestra LM 01/09/2020, pura	Muestra LM 27/07/2021, proteínas
F	Cut off	Muestra LM 15/11/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 03/06/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 01/09/2020, procesada con EDTA	Muestra LM 15/11/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 13/06/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 31/03/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 31/05/2021, pura	Muestra LM 06/08/2021, pura	Muestra LM 01/09/2020, pura	Muestra LM 27/07/2021, proteínas
G	Suero sangre donante de identidad conocida	Muestra LM 13/08/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 06/08/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 18/01/2020, procesada con EDTA	Muestra LM 13/08/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 03/06/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 27/07/2021, pura	Muestra LM 22/07/2021, n°2, pura	Muestra LM 14/11/2021, pura	Muestra LM 18/01/2020, pura	Muestra LM 13/06/2021 procesada con EDTA
H	Suero sangre donante de identidad conocida	Muestra LM 13/08/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 06/08/2021, procesada con EDTA	Muestra LM 18/01/2020, procesada con EDTA	Muestra LM 13/08/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 03/06/2021, procesada con diálisis	Muestra LM 27/07/2021, pura	Muestra LM 22/07/2021, n°2, pura	Muestra LM 14/11/2021, pura	Muestra LM 18/01/2020, pura	Muestra LM 13/06/2021 procesada con EDTA

Tabla. 5 Observación de cómo se han introducido las muestras en la placa del ELISA

Interpretación de la tabla según sus colores:

- Naranja: controles
- Rosa: suero de sangre
- Azul: muestras procesadas con EDTA
- Amarillo: muestras procesadas por diálisis con polímeros absorbentes
- Morado: muestra procesada con EDTA, obteniendo la grasa
- Rojo: muestra procesada con EDTA, obteniendo el pellet.
- Verde: muestra pura, sin procesar

Realizamos una medición a 450 nm, obteniendo los siguientes valores.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	1,8535	0,1260	0,1322	0,1363	0,3226	0,2197	0,1611	0,9218	0,2964	0,2562	0,5512
B	1,5001	0,1125	0,2342	0,1307	0,4212	0,2102	0,1678	1,1253	0,2766	0,2109	0,4822
C	0,1205	1,2411	0,1726	0,1441	2,4839	0,2423	0,1417	0,2087	0,2025	0,3645	0,1860
D	0,1055	1,1975	0,2059	0,1247	2,8885	0,3773	0,1818	0,2296	0,1665	0,3551	0,1528
E	0,5999	0,7197	0,1821	0,1517	1,2369	0,2210	0,1625	0,2573	0,2593	0,1755	1,7686
F	0,6121	0,5566	0,1530	0,1680	1,3402	0,2826	0,1676	0,2132	0,2264	0,2192	1,5026
G	0,7475	0,1635	0,2046	0,3013	0,2506	0,1615	2,1290	0,2050	0,2279	0,2832	0,2391
H	1,3075	0,1637	0,2025	0,2774	0,2400	0,2517	2,8599	0,3282	0,2333	0,3289	0,2428

Tabla. 6 Resultados del ELISA, realizando una medición a 450 nm.

- El control positivo debe tener una densidad óptica mayor a 0'9. Nuestros resultados son 1'8535 y 1'5001, encontrándose en el rango. Estos resultados demuestran el correcto rendimiento de la prueba.
- El control negativo debe ser inferior a 0'5. Obtenemos unos resultados inferiores a esa cantidad: 0'1205 y 0'1055, demostrando que no existe contaminación.
- Para la interpretación de los resultados debemos observar el cut off y realizar la media de ambos valores. Obtenemos una absorbancia de 0,5999 y 0,6121 respectivamente. Tras calcular la media de ambos valores, se procede a calcular la concentración de anticuerpos aplicando la ecuación: **Índice de anticuerpos=( D.O. de la muestra/ media de D.O. del suero cut off) x 10**. Los valores obtenidos tras este cálculo han de ser mayores a 8 para considerar el resultado como positivo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A		1,2856243	1,3488851	1,390719	3,2916063	2,2416798	1,6437625	9,4054639	3,024278	2,6141027	5,624096
B		1,1478788	2,3896286	1,3335801	4,2976583	2,1447478	1,712125	11,481849	2,8222514	2,1518901	4,9200637
C		12,663399	1,7611012	1,4703052	25,344144	2,4722759	1,4458171	2,1294427	2,0661819	3,7191274	1,8978263
D		12,218532	2,1008733	1,2723599	29,472426	3,8497305	1,8549722	2,3426931	1,6988606	3,6232157	1,5590745
E		7,3433634	1,8580332	1,5478508	12,620545	2,2549442	1,6580472	2,6253264	2,6457331	1,7906909	18,045675
F		5,6791942	1,5611152	1,7141657	13,674553	2,8834716	1,7100843	2,1753579	2,3100423	2,2365781	15,33158
G	7,627017	1,6682505	2,0876089	3,0742745	2,5569638	1,6478438	21,722969	2,0916903	2,3253474	2,8895936	2,4396251
H	13,340903	1,6702912	2,0661819	2,8304141	2,4488081	2,5681875	29,18061	3,3487451	2,3804456	3,3558875	2,4773776

Tabla.7 Interpretación del ELISA.

Interpretación de la tabla según sus colores:

- Rojo: resultado negativo (<5)
- Verde: resultado positivo (>7)
- Azul: resultado dudoso (5-7)

## 6.5. Electroforesis de proteínas

### ➤ *Primer intento*

Con el fin de observar diferencias y como las proteínas se encontraban más o menos concentradas, realizamos esta primera prueba con muestras variadas:

- Muestra de calostro puro, extraído el 27/07/2021.
- Suero de muestra de calostro procesado con EDTA, extraída el 27/7/2021.
- Muestra de leche materna pura, extraída el 14/11/2021.
- Muestra de leche materna pura, extraída el 15/11/2021.
- Muestra de leche materna pura, extraída el 13/08/2021.
- Suero de muestra de leche materna de la donante procesada con EDTA, extraída el 07/02/2022.
- Suero de muestra de sangre de la donante procesada con EDTA, extraída el 07/02/2022.

La muestra de leche materna es demasiado líquida y se expande en la tira de Celogell, impidiendo que se produzcan resultados. Por otro lado, la sangre sí queda fijada.

### ➤ *Segundo intento*

Al realizar la preparación de las muestras con EDTA, observamos como las proteínas quedaban en el sedimento, por lo que en esta prueba recurrimos a ellas y a comparar con muestras puras y procesadas con EDTA, con el objetivo de indicar donde aparecen mejores resultados. Las muestras utilizadas son:

- Proteínas de muestra de calostro, extraída el 06/12/2019.
- Muestra de calostro puro, extraída el 06/12/2019.
- Proteínas de muestra de leche materna procesada con EDTA, extraída el 01/09/2020.
- Proteínas de muestra de leche materna procesada con EDTA, extraída el 22/07/2021.
- Muestra de calostro puro, extraída el 27/07/2021.
- Suero de muestra de calostro procesado con EDTA, extraída el 27/07/2021.
- Suero de muestra de leche materna de la donante procesada con EDTA, extraída el 07/02/2022.
- Proteínas de muestra de leche materna procesada con EDTA, extraída el 27/07/2021.



Aunque el sedimento es más sólido que el suero, seguimos observando que se trata de una muestra demasiado líquida y se sigue expandiendo sobre la tira de Celogell.

➤ *Tercer intento*

Debido a la densidad de las muestras, intentamos buscar un espesante que permita que se adapten mejor a la tira de acetato de celulosa. Se ha utilizado glicerina, introduciendo una gota directamente en la muestra, para un mejor manejo de la misma.

- Proteínas de muestra de leche materna procesada con EDTA, número 2, extraída el 22/07/2021.
- Proteínas de muestra de leche materna procesada con EDTA, extraída el 13/06/2021.
- Proteínas de muestra de leche materna procesada con EDTA, número 6, extraída el 22/07/2021.
- Proteínas de muestra de leche materna procesada con EDTA, extraída el 31/03/2021.
- Suero de muestra de leche materna procesado con EDTA, extraída el 22/07/2021.
- Muestra de leche materna pura, número 6, extraída el 22/07/2021.

La muestra es más espesa y al colocarla en la tira de celulosa no se expande y permite que se realice correctamente la electroforesis. Sin embargo, al continuar con los siguientes pasos con la solución colorante, decolorante y transparentadora, se observa como las proteínas no han quedado adheridas a la tira de Celogell y las bandas desaparecen por completo, dejando como resultado unas tiras sin señal, no pudiendo observar las proteínas.

➤ *Cuarto intento*

Recurrimos a las muestras procesadas por diálisis y así poder comparar con resultados anteriores.

- Muestra procesada por diálisis, número 6, extraída el 22/07/2021.

Se usaron dos tiras con la misma muestra para posteriormente teñir una con negro amida y otra con rojo Ponceau. Con la transparentación o el secado, la muestra vuelve a desaparecer, quedando como resultado la transparentación completa de la tira de acetato de celulosa.

➤ *Quinto intento*

Para descartar posibles errores en la realización de las electroforesis anteriores, repetimos los mismos pasos, pero bajando los voltios de la fuente de alimentación y aumentando el tiempo. Variando de 200 V durante 35 minutos a 45 minutos y 150 V.

- Proteínas de muestra de leche materna procesada con EDTA, número 6, extraída el 22/07/2021.
- Muestra de leche materna pura, número 6, extraída el 22/07/2021.

Usamos cuatro tiras de Celogell, por lo que colocamos estas dos muestras con y sin glicerina. No se observan las proteínas.

➤ *Sexto intento*

Utilizamos muestras de sangre y leche materna para comparar entre ambos resultados. Como tinción usamos el rojo Ponceau.

- Muestra sangre de la donante.
- Suero de muestra de leche materna de Carmen Amalia procesada con EDTA, extraída el 07/02/2022.
- Muestra sangre de hombre.
- Suero de muestra de calostro procesada con EDTA, extraída el 27/07/2021.

Observamos que se ha formado una banda con las muestras de sangre (primera y tercera tira de Celogell), sin embargo, las proteínas de la leche (segunda y cuarta tira de Celogell) no se consiguen ver, dejando la tira sin señal, como puede observarse en la figura 10.



Fig. 10 Resultado electroforesis, sexto intento.

## 7. DISCUSIÓN

Los pasos iniciales del presente estudio consistieron en realizar distintos procedimientos de procesado para las muestras de LM, con el objetivo de extraer y concentrar las proteínas, para su posterior uso en las técnicas a utilizar para la detección de anticuerpos. Inicialmente, se lleva a cabo un procedimiento con EDTA empleando centrifugación, que divide la muestra en tres fases, permitiendo extraer una fase acuosa donde se encuentran las inmunoglobulinas (pág. 9).

El siguiente método empleado para tratar las muestras, a destacar por su eficacia, fue la diálisis mediante el uso de polímeros de sílice. Aunque este procesado necesita más tiempo para su obtención, al emplear las muestras concentradas por diálisis se obtienen muy buenos resultados en las diferentes pruebas (pág. 16).

La prueba base para verificar que las inmunoglobulinas estaban presentes fueron los tests comerciales de detección de anticuerpos. A pesar de que los test están preparados para suero sanguíneo, demostramos que son funcionales con otro tipo de fluidos biológicos.

Los test utilizados permitieron además clasificar las inmunoglobulinas en IgG e IgM. Estudios anteriores demuestran que en función del tipo de anticuerpo detectado en la prueba, es posible determinar si la persona está infectada o ha tenido contacto con el virus. La IgM es el primer anticuerpo que produce el organismo tras la infección. Es el encargado de activar el complemento señalando que hay infección y favoreciendo la eliminación del agente. La detección de IgM indicaría que el individuo se encuentra en una fase aguda de la infección. A lo largo de la infección las IgM van disminuyendo, dando paso a las IgG, que es más específica y permanece circulante en la sangre protegiendo el organismo de futuras infecciones. Esta inmunoglobulina también es inducida por la vacunación. Por consiguiente, su detección en los test de anticuerpos indicaría que la persona de la que procede la muestra ha sido inmunizada con éxito o ha pasado la infección. Otra posibilidad sería obtener positivo en ambas Ig, que indicaría que la infección se produjo de forma reciente. Los mejores resultados los obtenemos en la muestra de calostro (muestra extraída el 27/07/2021). (pág.17).

Tras estos primeros pasos, procedimos a desarrollar nuestros ensayos. Llevamos a cabo dos pruebas de inmunodifusión radial.

En la primera de ellas, empleamos muestra de suero sanguíneo de un donante de identidad conocida y que ha sido inmunizado recientemente con la tercera dosis, obteniendo una alta concentración en IgG y cantidades moderadas en IgM e IgA. Esta muestra nos sirve de control para comprobar el correcto funcionamiento de la placa. En otro pocillo cargamos muestra procedente de calostro, obteniendo un único anillo en las IgA. Este hecho, nos llama la atención puesto que usamos esa misma muestra en el test de anticuerpos obteniendo resultado positivo en IgM, por lo que observamos que en función de la prueba utilizada obtenemos de manera indistinta uno u otro. Estos resultados pueden deberse a una reacción inespecífica por tratarse de un test preparado para sangre y no para leche. La IgA es una proteína dimérica que se encuentra principalmente en la mucosa respiratoria, intestinal y genital en grandes cantidades. Se encuentra también en la leche materna y, durante la lactancia, pasa al bebé estimulando el desarrollo del sistema inmunitario. Revisando la literatura existente sobre el tema, vemos que puede tener que ver tanto con el tipo de muestra (leche materna), siendo esta inmunoglobulina predominante en esta secreción, como con la vía de entrada del virus, por tratarse de un virus respiratorio que penetra a través de las mucosas, estimulando la producción de IgA en primer lugar.

En esa misma placa, se carga una muestra procedente de suero de leche procesada con EDTA sin obtener resultado ninguno para los tres anticuerpos. Este hecho puede ser otra prueba de inespecificidad de la prueba por tratarse de leche materna y no estar preparada para este tipo de muestra, puesto que conocemos que procede de una persona inmunizada y sus inmunoglobulinas sí han sido detectados en el test rápido de anticuerpos (pág. 19).

En el segundo ensayo de IDR, cargamos una muestra de sangre de la donante de identidad conocida, de la que procede la leche materna, y tres muestras de leche tratadas con diálisis con las que hemos obtenido resultados en los test de anticuerpos. En estas muestras de leche se obtienen solamente IgA, con lo que podríamos reforzar nuestras hipótesis expuestas anteriormente (pág. 20).

Otra de las pruebas que realizamos para nuestra caracterización fue la electroforesis de proteínas, usando como soporte para cargar las muestras tiras de acetato de celulosa. Observamos en nuestros primeros intentos que, tras finalizar el proceso, las muestras sí se han desplazado formando bandas pero éstas son muy difusas y se expanden de manera irregular en la tira de Celogell. Intentamos corregir este hecho añadiendo glicerina para espesar la muestra con ello logramos que la banda cargada no se expanda y se estabilice. Continuamos con el resto de los pasos, y tras el secado, las bandas desaparecen dando el aspecto de estar vacías, lo que demuestra que no hemos conseguido afinar la técnica y subsanar los errores, no obteniendo ningún resultado (pág 23).

La prueba de detección más sensible y que además nos ha permitido cuantificar la concentración de las muestras de una manera más precisa ha sido el ensayo ELISA específico en la detección de IgA-IgM. Cargamos todas las muestras disponibles con los distintos tratamientos descritos anteriormente y en su lectura observamos que obtenemos mejores resultados en las muestras procesadas por diálisis con lo que concluimos que es el mejor método de concentración de los empleados. Otro resultado llamativo, es que cargamos dos muestras procedentes del pellet obtenido tras centrifugación de una muestra pura y obtenemos una concentración de 18,045675 EU/ml (cargada por duplicado en E y F 11). En los primeros pasos de nuestro estudio, utilizamos esa fracción para comprobar si su uso era viable en los test de anticuerpos y al no obtener resultados la descartamos en el resto de pruebas para asegurar resultados. Este hecho resalta que la prueba presenta un mayor rendimiento.

Si hacemos una comparativa de los resultados positivos obtenidos en los diferentes ensayos llevados a cabo, podemos observar que la inmunoglobulina predominante es la IgA, confirmando que existen anticuerpos del SARS-CoV-2 que la madre proporciona al bebé lactante a través de la inmunidad pasiva.

POSITIVOS	IG DETECTADAS		POSITIVOS	IG DETECTADAS
Suero	IgA, IgM, IgM		03/06/2021 (procesada con EDTA)	No se ha detectado ninguna
27/07/2021	IgA		Calostro (procesado con EDTA)	IgM
15/11/2021	IgA		22/07/2021 (procesado con EDTA)	IgM
22/07/2021	IgA		07/02/2021 (procesado con EDTA)	IgM
22/07/2021 (procesada con diálisis)	IgM		15/11/2021 (procesada con EDTA)	IgG
15/11/2021 (procesada con diálisis)	IgG		Donante en lactancia (procesada con EDTA)	IgG
Donante lactante (procesada con diálisis)	IgG			

Tabla 8: Resumen de resultados obtenidos en todas las pruebas

## 8. CONCLUSIONES

De nuestro estudio extraemos las siguientes:

1. Los métodos empleados para separar las proteínas del resto de sus componentes (diálisis con polímeros de sílice y procesado con EDTA) han dado buenos resultados, permitiendo el uso de la fracción necesaria de muestra de LM para llevar a cabo nuestras pruebas con resultados positivos. Se observa mayor efectividad en el procesamiento de muestras mediante diálisis de polímeros de sílice.
2. Los test comerciales para anticuerpos COVID-19 son efectivos para detectar los mismos en muestras de leche materna procesadas con las técnicas anteriormente expuestas. Estos dispositivos son capaces de distinguir el tipo de inmunoglobulinas presentes en las muestras, diferenciando entre IgG e IgM. Se puede concluir que la leche materna presenta IgG fruto de la inmunización natural o por inoculación de la vacuna, y la detección de IgM

podría indicar que la mujer estaba en una fase de infección temprana y ha desarrollado los primeros anticuerpos.

3. Con la inmunodifusión radial se detectan únicamente IgA en las muestras procedentes de leche materna. En muestras de suero sanguíneo, se forma un anillo de diferentes concentraciones tanto en IgA como en IgG y en IgM. Concluimos que las IgA son las inmunoglobulinas predominantes en leche materna.
4. Con el kit comercial ELISA para la detección de Inmunoglobulinas G y el kit de IgA-IgM, se comprueba que en varias muestras fechadas durante los años de la pandemia por COVID-19 existen anticuerpos en concentración detectable, permitiendo además determinar el tipo de anticuerpo presente en cada muestra. Se demuestra la efectividad y sensibilidad de la prueba, siendo la técnica con la que se obtiene mayor número de resultados positivos.
5. Electroforesis de proteínas con resultado no concluyente. Tras varias repeticiones de la técnica y después de intentar rectificar los errores detectados en cada intento, no se detectan bandas visibles por lo que determinamos que no se consigue adherir las proteínas de las muestras a la tira de acetato de celulosa. Únicamente se obtienen resultados positivos en las muestras de suero sanguíneo. Concluimos que las proteínas tienen un elevado peso y no se fijan al soporte, desapareciendo con los procesos de tinción y decoloración.

## 9. AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a todas las personas que nos ayudaron para poder realizar este proyecto.

En primer lugar, agradecer al Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) por cedernos las muestras de leche materna.

A nuestros profesores, José Arrojo por su colaboración y ayuda, a Óscar Jodra por estar presente en todas las veces en las que hacíamos las técnicas, proporcionándonos asistencia y posibles soluciones y a Conchi por interesarse en el avance del proyecto y ayudarnos.

Por último, agradecer a Carmen Amalia, alumna del centro que nos donó muestras de leche materna y de sangre.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Anticuerpo. Natural human genome research institute [Internet] [citado el 8 de Mayo 2022]. Disponible en: [Anticuerpo | NHGRI \(genome.gov\)](http://www.nhgri.nih.gov/)
- (2) González Méndez I, Pileta Romero B. Lactancia materna. Rev Cubana Enferm [Internet]. 2002 [citado 17 de mayo de 2022];18(1):15-22. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03192002000100003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03192002000100003&lng=es)
- (3) Urquiza Aréstegui R. Lactancia materna exclusiva: ¿siempre? Rev peru ginecol obstet [Internet]. 2014 [citado 17 de mayo de 2022];60(2):171-6. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2304-51322014000200011&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322014000200011&lng=es)
- (4) Sacristán Martín AM, Lozano Alonso JE, Gil Costa M, Vega Alonso AT. Situación actual y factores que condicionan la lactancia materna en Castilla y León. Pediatr atención primaria [Internet]. 2011;13(49). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4321/s1139-76322011000100004>
- (5) Álvarez N, Otero O, Falero G, Cádiz A, Marcet R, Carbonell AE, et al. Purificación de inmunoglobulina A secretora a partir de calostro humano. Vaccimonitor [Internet]. 2010 [citado 17 de mayo de 2022];19(3):26-9. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-028X2010000300005&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2010000300005&lng=es)
- (6) Ceriani Cernadas JM. El calostro y la leche materna en el período neonatal. Sus beneficios siguen aumentando. Arch Argent Pediatr [Internet]. 2018 [citado 17 de mayo de 2022];116(4):234-5. Disponible en:



[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-00752018000400001&lng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-00752018000400001&lng=es)

- (7) Suarez-Villa M, Carrero G C, Granadillo M V, Lastre-Amell G, Orostegui MA, Delgado D F. Niveles de cobre y zinc en diferentes etapas de la leche materna y la influencia del estado nutricional de madres lactantes. Rev Chil Nutr [Internet]. 2019 [citado 1 de junio de 2022];46(5):511-7. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-75182019000500511&script=sci\\_arttext](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-75182019000500511&script=sci_arttext)
- (8) Mendoza M, Katherine V. Asociación entre ausencia de lactancia materna exclusiva e infecciones intestinales en lactantes menores de 6 meses atendidos en consulta externa del hospital Belén de Trujillo Enero - Marzo, 2014. Universidad Privada Antenor Orrego; 2014. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12759/1587>
- (9) Propiedades inmunológicas de la leche materna [Internet]. Intramed.net. [citado el 15 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=98185>
- (10) Los Factores Inmunológicos y los Otros Componentes de la Leche Materna [Internet]. encolombia.com. 2000 [citado el 15 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://encolombia.com/medicina/revistas-medicas/pediatria/vp-353/pediatria35300factores/>
- (11) Respuesta inmunitaria. Medline plus [Internet]. medline.gov.[citado el 8 de Mayo de 2022] Disponible en: [Respuesta inmunitaria: MedlinePlus enciclopedia médica](#)
- (12) Aquino Canchari CR, Ospina Meza RF. Estudiantes de medicina en tiempos de la COVID-19. Educ médica super (Impresa) [Internet]. 2020 [citado 17 de mayo de 2022];34(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21412020000200001&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21412020000200001&lng=es)
- (13) Ferrer LP. El COVID 19: Impacto psicológico en los seres humanos. Revista Arbitrada Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud Salud y Vida [Internet]. 2020 [citado 17 de mayo de 2022];4(7):188-99. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7407744>
- (14) Maguiña Vargas C, Gastelo Acosta R, Tequen Bernilla A. El nuevo Coronavirus y la pandemia del Covid-19. Rev Medica Hered [Internet]. 2020 [citado 17 de mayo de 2022];31(2):125-31. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2020000200125&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2020000200125&lng=es)
- (15) Irabien-Ortiz Á, Carreras-Mora J, Sionis A, Pàmies J, Montiel J, Tauron M. Fulminant myocarditis due to COVID-19. Rev Esp Cardiol [Internet]. 2020 [citado 17 de mayo de 2022];73(6):503-4. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0300893220301743?token=9DB6D64DD910B247AD3507528A5EA48314246E004B023AA0D2750A3EE50C6CE6F104BDDE85F227D9FC050AD9BB5B25C9&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220517174453>
- (16) Lino LLP, Tóala SJM, Cedeño MPM, Holguín GAV. Secuelas que enfrentan los pacientes que superan el COVID 19. Análisis del comportamiento de las líneas de crédito a través de la corporación financiera nacional y su aporte al desarrollo de las PYMES en Guayaquil

- 2011-2015 [Internet]. 2020 [citado 17 de mayo de 2022];4(3):153-62. Disponible en: <https://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/858>
- (17)Carla Lorena M de S, Villalba Vizcaíno VT. Vacunación contra COVID y embarazo. Duazary [Internet]. 2021 [citado el 16 de mayo de 2022];18(3):309–20. Disponible en: <https://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/duazary/article/view/4247>
- (18)Ginecología y Obstetricia de México. Vol. 89. Nieto Editores; 2021.
- (19)Castillo R, Gilman R, Miranda E, Echevarria M, Lembcke J, Sterling C. Anticuerpos IgA secretores de la leche materna protectores contra la infección por *Cryptosporidium parvum*. Parasitol al día [Internet]. 2001 [citado 17 de mayo de 2022];25(1-2):3-7. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-07202001000100001&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-07202001000100001&lng=es)
- (20)Maya EM, Sandín Rodríguez R. Instalación para filtración de agua por ósmosis inversa y ultrafiltración. 2019 [citado el 17 de mayo de 2022]; Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/24319>
- (21)Diálisis y Ultrafiltración [Internet]. Docplayer.es. [citado el 17 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://docplayer.es/69607561-Dialisis-y-ultrafiltracion.html>
- (22)Chávez Julca VA, Manco Pérez AA. Influencia del PH, tiempo de almacenamiento y temperatura del suero de leche en la recuperación de proteínas por la técnica de microfiltrado. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; 2015.
- (23)Mom0\_Adm1N. Test Rápido COVID-19 IgG/IgM [Internet]. Biomedal Ivydal. 2020 [citado 17 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://ivydal.biomedal.com/tests-de-anticuerpos/test-rapido-covid-19-igg-igm/>
- (24)Test de anticuerpos Covid- 19. testbiotech.es[Internet] Disponible en: [https://www.testbiotech.es/producto/test-de-anticuerpos-covid-19-ncov-caja-de-10-uds/?qclid=CjwKCAjwi42UBhAAEiwACIhADpnxma1r0Z4T2t2CgAqrrL92ALMCyIm9q5iRcnBPalt4f1iDVR-R-hhoCD6MQAvD\\_BwE](https://www.testbiotech.es/producto/test-de-anticuerpos-covid-19-ncov-caja-de-10-uds/?qclid=CjwKCAjwi42UBhAAEiwACIhADpnxma1r0Z4T2t2CgAqrrL92ALMCyIm9q5iRcnBPalt4f1iDVR-R-hhoCD6MQAvD_BwE)
- (25)Cidoncha Gallego A, Pérez Lucena E, Vinuesa López A, Zaro Bastanzuri MJ, Zafra Mezcua A, Valencia Roldán C. El proteinograma en la práctica clínica. Med Integr [Internet]. 2001 [citado el 13 de mayo de 2022];38(3):127–32. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-el-proteinograma-practica-clinica-13016401>
- (26)Maya GC. La electroforesis de proteínas: más que una prueba de laboratorio. Medicina y Laboratorio [Internet]. 2006 [citado el 14 de mayo de 2022];12(1–2):47–68. Disponible en: <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/520>
- (27)Alves B/. O/. DeCS [Internet]. Bvsalud.org. [citado 17 de mayo de 2022]. Disponible en: [https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=30294&filter=ths\\_exact\\_term&q=INMUNODIFUSIoN](https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=30294&filter=ths_exact_term&q=INMUNODIFUSIoN)
- (28)Protocolo EASY RID MULTIPLATE
- (29)Examen de sangre ELISA [Internet]. Medlineplus.gov. [citado el 4 de junio de 2022]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003332.htm>

(30)García Mendoza MP, Fernández Navarro MG. Informe técnico: Anticuerpos IgG y anticuerpos neutralizantes en personas que han recibido la vacuna BBIBP-CorV. 2021 [citado el 4 de junio de 2022]; Disponible en: <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/1311>

(31)Bioted.es. [citado el 4 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.bioted.es/protocolos/INTRODUCCION-ELISA.pdf>

Los autores del presente trabajo se reservan todos los derechos sobre el mismo, sin más limitaciones que las contenidas en la normativa vigente en materia de propiedad industrial e intelectual.

Los autores del presente trabajo autorizan al IES Isla de la Deva a la publicación total o parcial del mismo tanto en medios impresos como en páginas web. Siempre citando la autoría.

Se permite el uso de los datos recogidos en el presente trabajo para la realización de estudios de agregación en próximos años, en el marco de la realización de futuros proyectos por parte del alumnado del IES Isla de la Deva.

Los autores del presente trabajo también autorizan a los profesores del IES Isla de la Deva a la publicación del mismo en páginas web. Siempre citando la autoría.