

Evaluación de la transferencia pasiva de la inmunidad en equinos mediante el uso de diferentes pruebas

Evaluation of the immunity passive transfer in horses using different tests

CARABETTA, D.¹; FERNÁNDEZ, D.^{1,2}; ETCHEVERRÍA, A.^{1,2}; VALLE, M.¹ & PADOLA, N. L.^{1,2}

¹ UNCPBA, Facultad de Cs Veterinarias. ² UNCPBA, Facultad de Cs. Veterinarias, Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue utilizar diferentes métodos de evaluación de la inmunidad tanto en calostro de yeguas como en suero de sus crías, analizar beneficios y desventajas de cada uno y determinar cuál de éstos es el más adecuado para el uso en temporada de partos. Se tomaron 13 muestras de calostro y suero y se realizaron las siguientes pruebas: evaluación subjetiva del calostro por su aspecto, evaluación de la densidad específica mediante calostrómetro, concentración de azúcares y proteínas totales por refractometría y determinación de la concentración de IgG con glutaraldehído (Inmuno-G Test®). Se observó que dos potrillos tuvieron bajas concentraciones de IgG, debido probablemente a que ninguno calostró bien a causa de pérdida de calostro por la madre antes del parto. Determinamos que la prueba de precipitación con glutaraldehído es la más conveniente a incluir, por ser precisa, rápida y fácil de realizar, sobre todo en establecimientos con muchos animales, evitando gastos en laboratorio para la determinación de gammaglobulinas. Esto los hace más económicos. Las pruebas restantes no serían obsoletas pero no se aconseja realizarlas como pruebas individuales para determinar calidad de calostro o una buena transferencia de inmunidad. Sí se pueden realizar como pruebas complementarias.

Palabras clave: (calostro), (suero), (aglutinación con glutaraldehído).

Correspondencia e-mail: Daniel Fernández dfer_inm@vet.unicen.edu.ar

Recibido: 21-07-2015

Aceptado: 15-06-2017

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate different methods of detecting IgG both mares colostrum and serum of their pups, to analyse benefits and drawbacks of each against each other and determine which of them is best suited for use in season delivery. Thirteen colostrum and serum samples were taken to realize the following tests: Subjective evaluation of colostrum in appearance, evaluation of the specific density by colostrometer, sugar concentration and total protein by refractometry and determination of the concentration of IgG with glutaraldehyde. The data obtained was observed that two foals had low concentrations of IgG, probably because none colostrum either because of loss of colostrum by the mother before delivery. We determined that the precipitation test with glutaraldehyde is the most convenient to include, to be precise, quick and easy to perform, especially in places with many animals, avoiding expenses laboratory gamma globulins. This makes them cheaper. The remaining tests would not be advisable obsolete but not perform them as individual testing to determine quality of colostrum or a good transfer of immunity, you can make as complementary tests.

Key words: (colostrum), (serum), (agglutination with glutaraldehyde).

INTRODUCCIÓN

La placenta de la yegua es histológicamente de tipo epiteliocorial, lo cual le impide la transferencia de inmunoglobulinas (Igs) al feto durante la gestación, además de servir como barrera para patógenos ambientales^{8,15}.

Los potrillos neonatos desarrollan una respuesta de tipo primario, producen concentraciones bajas de anticuerpos específicos de antígeno y tienen un período de latencia largo para las formas de inmunidad adaptativa¹⁴. El potrillo si bien es inmunocompetente desde la mitad de la gestación, la inmunidad celular se considera inmadura desde el nacimiento hasta el mes de vida extrauterina⁸. Por lo tanto, estos neonatos dependen de la inmunidad transferida de forma pasiva para la protección de las enfermedades infecciosas¹⁴.

El calostro es rico en IgG e IgA, pero también contiene IgM e IgE y en las yeguas la inmunoglobulina más importante en el calostro es la IgG, pero su concentración cae con prontitud conforme avanza la lactancia y el principal isotipo en la leche pasa a ser la IgA¹⁵.

La protección conferida por el calostro depende de: volumen ingerido, concentración e isotipos de Igs y diversidad de especificidades de las mismas¹².

La transferencia de Igs del calostro al organismo se produce por un mecanismo

transitorio y no selectivo a través de las células epiteliales del intestino delgado. Estas células son remplazadas con rapidez por un epitelio maduro 36 horas después del parto⁵. Los potrillos normales comienzan a amamantarse entre las 1 a 3 h del nacimiento y la capacidad absorbente del tracto gastrointestinal del potrillo para las Igs es mayor durante las primeras 6 horas después del nacimiento y luego disminuye, siendo nula la absorción luego de las 24 h de vida¹⁴. Se ha demostrado que se absorben alrededor del 50 % de las inmunoglobulinas si se ingieren 3,2 a 3,6 litros de calostro en las primeras 12 h postparto⁸.

La calidad del calostro se puede evaluar subjetivamente por su aspecto. Una secreción espesa, amarillenta y pegajosa suele ser de buena calidad, mientras que si está diluida, blanca o translúcida es probablemente inadecuada. Las evaluaciones más objetivas son la densidad específica (>1065), la refractometría de azúcares (>20%) y la concentración de IgG (>70 g/L)¹¹. Leblanc y cols. (1986) demostraron que un calostro con densidad específica de 1060 o mayor contiene en promedio una concentración de IgG de 3.000 mg/dl y proporciona al potrillo aproximadamente 879 mg/dl de IgG sérica, lo cual se considera un nivel adecuado de protección⁸.

Existen tres razones principales para la falta de transferencia adecuada de calostro: 1. Falla en la producción; 2. Falla en la ingestión; 3. Falla en la absorción¹⁵.

La concentración sérica de IgG en el potrillo por debajo de lo normal, 24 h después del nacimiento es la base para el diagnóstico del fracaso de la transferencia pasiva. Una concentración sérica de IgG inferior a 200 mg/dl indica un fracaso de la transferencia pasiva, mientras que una concentración de 200 a 800 mg/dl debe considerarse un fracaso parcial. Muchos potrillos bajo un buen manejo pueden estar sanos cuando la concentración sérica de IgG es inferior a 400 mg/dl y, en consecuencia, este punto de inflexión es evaluado mediante pruebas diagnósticas rápidas¹⁴.

Hay disponibles varias técnicas para determinar la concentración de inmunoglobulinas séricas¹⁵:

- Prueba de turbidez con sulfato de zinc
- Coagulación con glutaraldehído
- Inmunodifusión radial simple (IDR)
- Aglutinación con látex
- ELISA
- Electroforesis de proteínas séricas
- Refractometría

El fracaso de la transferencia pasiva puede ocurrir por diversos factores tales como, lactancia prematura, debilidad neonatal, muerte de la madre o calostro con baja densidad específica.

Algunos autores sostienen que una razón por la cual se produce una falla en la transferencia pasiva podría ser la incapacidad de la madre para concentrar suficiente cantidad de inmunoglobulinas en el calostro. No todas las yeguas tienen la misma concentración de IgG en el calostro; sin embargo, los valores son comúnmente más altos que los séricos, hasta que el potrillo mama el calostro⁸. Por esta razón, es importante detectar los bajos niveles de inmunoglobulinas inmediatamente después del parto; pues permitirá al veterinario identificar los potrillos con alto riesgo de falla en la inmunidad pasiva y así poder suplementarlos⁸.

En cualquiera de los casos al potrillo se le puede administrar un calostro alternativo por vía oral. Lo óptimo es dar un mínimo de 2 litros de calostro equino, administrando 500 ml cada hora durante las primeras 8 horas de nacido¹⁴, mediante biberón o sonda nasogástrica¹⁵. El calostro bovino puede ser un sustituto seguro cuando no se dispone de calostro equino. Sin embargo, los potrillos que reciben calostro bovino también pueden necesitar una transfusión de plasma debido a que las inmunoglobulinas bovinas tienen una vida media corta en los potrillos y no están dirigidas específicamente contra los patógenos del caballo¹⁴.

Si un potrillo tiene más de 12 h de nacido cuando se sospecha o diagnostica el fracaso de la transferencia pasiva, está indicada la transfusión de plasma administrado por vía intravenosa. El volumen de plasma necesario para llevar la IgG sérica a un nivel aceptable no puede predecirse con seguridad porque tal parámetro depende de la gravedad del fracaso de la transferencia pasiva, el contenido de Ig del plasma y la enfermedad simultánea, la cual puede acelerar el catabolismo de la Ig. En general, 1 litro de plasma aumenta la concentración sérica de IgG en 200 a 300 mg/dl en un potrillo de 50 kg. De esta manera, se pueden necesitar de 2 a 4 litros para alcanzar la concentración sérica de IgG superior a 800 mg/dl. Se debe administrar una dosis terapéutica de plasma y luego volver a medir la IgG sérica. Si no se ha logrado la concentración deseada, será necesario administrar más plasma. Algunos potrillos con fracaso parcial de la transferencia pasiva (IgG entre >400 y <800 mg/dl) pueden encontrarse bien sin transfusión de plasma siempre que no existan infecciones y se minimice la exposición a patógenos. Estos potrillos deben ser muy controlados¹⁴.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en un establecimiento de cría de caballos S.P.C. en la provincia de Buenos Aires, a partir de los datos obtenidos de

muestras tomadas de yeguas y sus potrillos en temporada de parición.

Animales. Se tomaron muestras de 13 yeguas, de acuerdo a la disponibilidad de animales en el momento del estudio. La edad y número de partos de cada yegua se detalla en la tabla 1.

Muestras. Se tomaron 50 ml de calostro de cada yegua luego del parto. A las 12 h postnacimiento, a cada potrillo se le tomó una muestra de sangre sin anticoagulante.

Métodos. El calostro se colocó en tubos de ensayo para realizar una evaluación macroscópica de su aspecto, teniendo como control un calostro de muy buena calidad.

Se utilizó un calostrómetro, que posee una escala de 1030 a 1090, para determinar la densidad específica del calostro. Se colocó la muestra, que debía estar a una temperatura aproximada de 27°C, dentro de una probeta y se introdujo el calostrómetro.

Para determinar la concentración de azúcares se utilizó refractometría. Con una pipeta se tomó una gota de calostro y se descargó sobre el refractómetro, luego se colocó una gota de agua destilada de la misma forma y se observó a la luz. La línea divisoria entre el azul oscuro y el blanco indica los grados brix siendo 20-30% el valor adecuado.

La prueba de precipitación con glutaraldehído se realizó con el kit comercial Inmuno G Test Calostro® (ACV-EQUIMEL, S.R.L. Buenos Aires-Argentina). Se colocó en los tubos de reacción (con jeringa de 1 ml) 0,5 ml de calostro. Se adicionó una gota (50 µl) de reactivo, manteniendo el gotero en posición vertical. A partir del agregado del reactivo, se tomó el tiempo hasta verificar la coagulación (solidificación) del calostro. Cuando el calostro coagula dentro de los 10 min de adicionado el reactivo, tiene concentraciones de IgG superiores a 3 g/dl (densidad del calostrómetro mayor a 1.060). Cuando el coágulo se forma luego de los 10 min posteriores al agregado del reactivo, el calostro presenta concentraciones de IgG inferiores a 3 g/dl (densidad de calostrómetro inferior a 1.060).

A las 12 h postparto, a cada potrillo se le tomó una muestra de sangre sin anticoagulante y se obtuvo el suero dejando el tubo a temperatura ambiente (37°C) 1 o 2 horas, para favorecer la retracción del coágulo.

Se colocó una gota del suero en el refractómetro para determinar el contenido de proteínas totales. La técnica consistió en depositar el suero del tubo en el prisma del refractómetro con un movimiento rápido del tubo hacia abajo y en dirección al prisma teniendo en cuenta de no tocar el prisma con el tubo. Luego de cerrar la tapa del prisma se observa la escala interna correspondiente al nivel de proteínas. El valor obtenido debe ser mayor a 6.

La prueba de coagulación con glutaraldehído se realizó mediante un kit comercial Inmuno-G Test® (ACV-EQUIMEL, S.R.L. Buenos Aires-Argentina), similar al utilizado en la prueba de calostro. Se tomaron 0,5 ml de suero con jeringa de 1ml y se colocaron en el tubo pequeño transparente, enrasando en la marca inferior del mismo. Se agregó una gota (50 µl) de Reactivo IgG Inmuno-G Test® (ACV-EQUIMEL, S.R.L. Buenos Aires-Argentina) en tiempo cero y se mezcló suavemente. Se tomó el tiempo desde la adición del reactivo. La reacción es positiva cuando se forma un “gel sólido” (coágulo) *a posteriori* de la adición del reactivo. Esto se visualiza inclinando el tubo unos 45°. Si el tiempo de reacción obtenido es entre 0 y 10 min, la concentración de IgG (mg/dl) es mayor a 800, por lo que no es necesaria la transfusión de plasma. Si el tiempo es entre 10 y 60 min, la concentración de IgG (mg/dl) es de 400 a 800. En esta última hay una falla parcial de transferencia y el potrillo está en riesgo, por lo que hay que transfundir 500 cc de plasma. Si existe riesgo de infección se duplica la dosis. Si es mayor a 60 min, la concentración es menor a 400 mg/dl, hay una falla total de transferencia pasiva, por lo que hay que transfundir mínimo 1000 cc de plasma, ya que el potrillo se encuentra en alto riesgo.

RESULTADOS

Como se describe en la tabla 1, de las 13 muestras de calostro analizadas por densitometría sólo una muestra perteneciente a la yegua 5, de 14 años, presentó una densidad de 1030 con una concentración de IgG menor de 3 g/dl cuando se evaluó el calostro con el kit comercial Inmuno G Test Calostro®. El resto de las muestras presentaron una densidad que osciló entre 1055 y 1080 con una concentración de IgG mayor a 3 g/dl.

Si bien el valor de referencia tomado como aceptable con respecto a los grados Brix fue de 20%, la muestra de calostro de la

yegua 5 demostró un menor valor (29%) en comparación con las otras muestras (entre 45% y 50%).

Las muestras de suero de los potrillos 1 y 5 (hijos de dos yeguas de 18 y 14 años, respectivamente) analizadas con el kit comercial Inmuno-G Test® presentaron una concentración de Ig G entre 400 y 800 mg/dl, aunque los valores obtenidos con las otras técnicas fueron normales (Tabla1).

Las concentraciones de proteínas totales de los sueros de los potrillos fueron consideradas normales, encontrándose variaciones entre 4,2 y 7,5.

Muestra	Edad (Nro. De partos)	Calostro				Suero del potrillo	
		Aspecto	Densidad	Grados Brix	IgG	Prot. Totales	IgG
1	18 (6)	AB	1057	45%	> 3 g/dl	5,2	400 - 800 mg/dl
2	8 (2)	AA	1060	> 50%	> 3 g/dl	6,6	> 800 mg/dl
3	4 (1)	AA	1087	> 50%	> 3 g/dl	7	> 800 mg/dl
4	7 (1)	AA	1065	> 50%	> 3 g/dl	5,2	> 800 mg/dl
5	14 (7)	BL	1030	29%	< 3 g/dl	4,2	400-800 mg/dl
6	5 (1)	AA	1065	> 50%	> 3 g/dl	6,3	> 800 mg/dl
7	5 (1)	AB	1055	48%	> 3 g/dl	5	> 800 mg/dl
8	14 (7)	A	1060	> 50%	> 3 g/dl	5,8	> 800 mg/dl
9	10 (2)	AA	1080	> 50%	> 3 g/dl	7	> 800 mg/dl
10	10 (5)	BL	1060	> 50%	> 3 g/dl	7,5	> 800 mg/dl
11	8 (1)	AA	1063	> 50%	> 3 g/dl	7	> 800 mg/dl
12	17 (5)	AA	1080	> 50%	> 3 g/dl	7	> 800 mg/dl
13	19 (6)	AA	1080	> 50%	> 3 g/dl	7	> 800 mg/dl

Ref.: AB: Amarillento Blancuzco; AA: Amarillento Azucarado; A: Amarillento; BL; Blanco Lechoso

Tabla 1. Edades y número de partos de las yeguas, características de sus calostros y de los sueros de sus potrillos en las diferentes pruebas realizadas.

DISCUSIÓN

En el establecimiento en el cual se llevó a cabo este estudio no se realizaban pruebas para evaluar la concentración de IgG ni en calostro ni en suero de los potrillos, a excepción de la prueba para determinar la concentración de proteína total sérica.

En la muestra 1 de calostro, la densidad del mismo estuvo por debajo del valor normal (1065)

pero la concentración de IgG fue normal (>3 g/dl). Sin embargo, el potrillo tuvo bajos valores de IgG correspondiéndose con una falla parcial en el calostrado. Esto pudo deberse a que previo al parto, la yegua perdió cierta cantidad del mismo, debido a un efecto de ordeño espontáneo.

En la muestra 5 se observaron todos valores de IgG, tanto del calostro como del suero del

potrillo, muy por debajo de los normales. Esta muestra también se obtuvo de una yegua que tuvo ordeño espontáneo, por lo cual se presume que perdió todo el calostro y el potrillo sólo ingirió leche.

Respecto de los niveles de azúcares del calostro medidos por refractometría, los valores tampoco fueron indicativos de la concentración de IgG, pues cuando los valores de azúcares son mayores a 30%, la concentración de IgG es muy buena (>80%). En la mayoría de las muestras, este valor fue normal o mayor al normal, excepto en la muestra 5, donde todos los valores determinados fueron bajos.

La observación del aspecto del calostro ni bien es extraído de la yegua puede orientar acerca de la calidad del calostro, pero no es una medida eficaz y exacta. El calostro de las yeguas 5 y 10 presentaron aspecto similar al de la leche (blanco lechoso). Sin embargo, en el caso de la muestra 5 coincidió con que era un calostro de mala calidad, no así en el caso de la muestra 10, en la cual todos los valores fueron normales.

La determinación de la concentración de proteínas totales en el suero, mediante una reacción de Biuret o un refractómetro, no brinda una idea de la cantidad de globulinas, dado el gran rango de concentraciones “normales” de proteína total en potrillos normales⁸. Tanto Tizard (2009) como McAuliffe (2010) concuerdan con que las técnicas de refractometría de proteína total sérica y electroforesis no son adecuadas. La primera por ser poco confiable y dar resultados falsos, y la segunda porque requiere equipos especializados y lleva mucho tiempo. Además, la refractometría es poco confiable como indicador de niveles de globulinas, dado el amplio rango de concentraciones normales. La correlación de la proteína total con el nivel de IgG también es poco precisa en el potrillo enfermo, en términos generales (tanto en condiciones clínicas como subclínicas), debido al aumento de otras proteínas (globulinas alfa y beta y proteínas de fase aguda)^{8,11}. En los potrillos, los valores de proteínas totales fueron variables. Los animales 1 y 4 tuvieron el mismo valor por refractometría, sin embargo el contenido de IgG fue mayor a

800 mg/dl en el potrillo 4 y menor a 800 mg/dl en el potrillo 1.

La prueba de coagulación con glutaraldehído es económica y confiable, no es afectada por la hemólisis en comparación con otros métodos y se puede hacer en la caballeriza⁸. Se debe tener en cuenta que este método es semicuantitativo y podría dar lugar a algún error de interpretación.

Existen otras pruebas como ELISA o IDR, que aunque no se utilizan de rutina en Haras debido al costo y tiempo de lectura, deberían utilizarse para determinar la validez del IgG Inmuno-G Test[®].

La prevalencia de falla parcial de la transferencia pasiva de la inmunidad tiene varía de 3 a 37%¹⁴, y parecería depender, principalmente, de factores de manejo que aseguran la ingestión precoz del calostro. La inclusión de pruebas tales como coagulación con glutaraldehído a la rutina del haras es de suma importancia para detectar una falla en la transferencia pasiva de Ig, prevenir un riesgo de sepsis y lograr la sobrevivencia del recién nacido.

CONCLUSIONES

La prueba de coagulación con glutaraldehído usando kits comerciales es un método práctico, rápido y económico. Es de suma importancia que se incorporen estas pruebas a la rutina del haras en temporada de partos. Con la detección de IgG mediante kits comerciales en calostro, se puede determinar la calidad del calostro y por ende si éste es de buena calidad, conservarlo para suplementar a otros potrillos cuyas madres tengan un calostro de mala calidad y evitar futuros tratamientos por enfermedades o la mortandad del animal. Con la detección de IgG mediante kits comerciales en suero, se determina si el potrillo no adquirió la suficiente cantidad de Ac y así poder tratarlo a tiempo.

Lo recomendable es usar dos métodos en paralelo y evitar cualquier tipo de falla en la transferencia de inmunidad, ya sea por mala calidad de calostro, pérdida de calostro antes del parto o mal calostrado por parte del potrillo recién nacido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kalinbacak, A.; Guzel, M.; Altintas, I. *Incidence of failure of immune passive transfer (FPT) in thoroughbred foals - Interest of a rapid diagnosis for FPT*. *Revue Méd. Vét.*, 2005, 156, 3, 163-165
2. Drogoul, C.; Clément, F.; Ventorp, M.; Curadi, M.C.; Orlandi, M. *Equine passive immune transfer through colostrum*. Proceedings of the 4th European Equine Nutrition & Health Congress April. 18-19, 2008, The Netherlands (p.23-27).
3. Carleton Hill, Penrith, Cumbria CA11 8TZ England. *A Review of Plasma in Equine Practice*. VETERINARY IMMUNOGENICS LTD En: <http://www.veterinaryimmunogenics.com/News/REview%20finished.pdf>.
4. Caviglia, J.; Perrone, G. *Producción y Manejo del Caballo*. Editorial Agro-Vet. La industria del caballo "Usos medicinales del equino". 3:32-34. (2004).
5. Colahan, P. T.; Mayhew, I. G.; Merritt, A. M.; Moore, J. N. (1998). *Medicina y Cirugía Equina. 4ta Edición*. Editorial: Inter-medical. Vol. 1. Abordajes diagnósticos a los problemas de presentación más frecuente. 1:29.
6. Watt, B.; Wright, B. *The Importance of Colostrum to Foals Colostrum and Passive Transfer Assessment*. En: http://www.equineguelph.ca/pdf/facts/Importance%20of%20Colostrum%20to%20Foals%20Apr_08.pdf.
7. Squires, E.L.; MS, PhD. *Failure of Passive Transfer in Horses*. En: <http://www.thehorse.com/articles/10565/failure-of-passive-transfer-in-horses>.
8. García Pasquel, S.; Masri Daba, M. *Neonatología Equina. 1º Edición*. Editorial Inter-Médica. Información perinatológica. 3:23-26. Procedimientos y técnicas diagnósticas. 6:61-63. (2010).
9. Lennart Denkhuis Wageningen, *The Development of the Immune System in Foals (Equus Caballus). Passive immunity, the microbial colonization of the digestive tract and factors affecting this development*. 10th of December 2010. En: <http://www.hoefbalans.nl/wp-content/uploads/2013/02/De-ontwikkeling-van-het-immunsysteem-bij-veulens.pdf>.
10. Sedlinská, M.; Krejál, J.; Vyskočil, M.; Kudláčková, H. *Postnatal Development of Blood Serum Concentrations of Immunoglobulin IgG, IgA and IgM Isotypes in Suckling Foals*. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic; Veterinary Research Institute Brno, Czech Republic. En: http://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_2006075020175.pdf.
11. McAuliffe, S. B.; et al. *Atlas Color de Enfermedades y Alteraciones del Potro. 1º Edición*. Editorial Inter-Médica. Examen neonatal, procedimientos clínicos y atención en enfermería. 3:58-60. (2010).
12. Mórtola, E.; Pennimpe, E. F. F.; Gomez, C. M.; Stanchi, N. O. *Introducción a la Inmunobiología*. Cap. 16. 1ra Edición. Editorial de la Universidad de la Plata. (2004).
13. Chavatte-Palmer, P.; Duvaux-Ponter, C.; Clément, F. *Passive transfer of immunity in horses*. INA P-G, Paris; Haras Nationaux, Station expérimentale de la Valade, Chamberet. En: www.hippiatrika.com/download.htm?id=20010627 pdf.
14. Reed, S. M.; et al. *Medicina Interna Equina. 2º Edición*. Editorial Inter-Médica. Volumen 1. Parte 1 Mecanismos de las enfermedades y principios terapéuticos. El sistema inmune del caballo. D. Paul Lunn, David W. Horobov. Inmunodeficiencia. 1.3: 51-54. (2005).
15. Tizard, I. R. *Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8º Edición*. Editorial Elsevier. Inmunidad en el feto y en el neonato. 19: 259-265. (2009).

