



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE GLOBULINAS EN NEONATOS EQUINOS FINA
SANGRE DE CARRERA SOMETIDOS A TRATAMIENTO DE PLASMA HIPER
INMUNE**

María Asunción Espinosa Aguirre

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

Profesor Guía: Enrique Pinto Peña
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

SANTIAGO, CHILE
2015



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE GLOBULINAS EN NEONATOS EQUINOS FINA
SANGRE DE CARRERA SOMETIDOS A TRATAMIENTO DE PLASMA HIPER
INMUNE**

María Asunción Espinosa Aguirre

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

Nota Final

Profesor Guía	Enrique Pinto Peña
Profesor Corrector	Mario Acuña Bravo
Profesor Corrector	Lorena Aguilar Guzmán

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

SANTIAGO, CHILE

2015

*Quiero dedicar esta memoria a mi
familia y al Dr. Enrique Pinto.*

*Gracias por formarme como persona y
como profesional. Les dedico esta
memoria como agradecimiento por su
cariño incondicional, por su paciencia
eterna y por tener siempre un espacio y
una palabra amiga.*

Son un ejemplo para mí.

*También al Guille, la abuela Anita y la
Gorda que espero de una u otra forma
la lean, por cuidarme y enseñarme
tanto.*

AGRADECIMIENTOS

En la realización de esta memoria de título, numerosas personas me colaboraron de diversas maneras. A todos aquellos que tuvieron un minuto para mí les agradezco sinceramente. En especial a las siguientes personas:

Al doctor Enrique Pinto, profesor guía en este trabajo. Le agradezco por su tiempo, nunca dudó en darme espacio para las dudas, ayuda y correcciones que necesitara. Por su paciencia y entrega en mi aprendizaje, no solo en esta memoria sino durante toda la carrera, ha sido un ejemplo y un excelente profesor tanto en lo académico como en los valores personales, ética y formación global de mi persona. Estoy agradecida de su confianza y apoyo.

A los doctores Claudio Omón y Roberto Navarrete. Les agradezco la posibilidad de experimentar todo el trabajo que se realiza en el Haras Don Alberto, sus conocimientos y la disponibilidad para resolver dudas y problemas. Muchas gracias. A todos los trabajadores del Haras también muchas gracias por prestarme más de una mano cuando fue necesaria, por sus palabras y consejos.

Al Laboratorio de Diagnóstico Bioleche, por su buena disposición y por permitirme la obtención de los datos.

A Mariana Díaz del Laboratorio de Mejoramiento Genético y Calidad de la Fruta por su asesoría en el análisis estadístico.

A toda la gente de la ciudad de Los Ángeles que por diversos motivos estuvieron a mi lado en la realización de este trabajo, me acogieron como familia y me prestaron más ayuda de la que pedí. Gracias por su amistad, entrega y ayuda. En particular gracias a la maravillosa familia que me adoptó durante todo el tiempo del estudio.

A todos mis compañeros y amigos que me ayudaron en diversas dudas y conflictos. Gracias por su ayuda, palabras y amistad. A Daniel en especial por su cariño y por motivarme siempre a dar lo mejor.

Por último gracias a mi familia. Sin mis papás nada de este sueño sería posible, por su apoyo económico, moral y académico. A Adrián, mi hermana, mi cuñado, mis tíos y mi tata por su ayuda en libros, dudas gramaticales, tiempo y cariño. Les debo todo el trabajo.

RESUMEN

Con el objetivo de determinar si el uso de plasma hiper inmune es capaz de aumentar de manera estadísticamente significativa la concentración de globulinas séricas en los neonatos equinos Fina Sangre de Carrera, se efectuó el siguiente estudio en el Haras Don Alberto de la ciudad de Los Ángeles. En primer lugar, mediante un protocolo específico, se extrajo plasma a caballos adultos previa vacunación, sanos, del mismo Haras y se congeló a -18° C para su posterior uso. Luego se extrajo tres muestras de 10 mL de sangre a cada uno de los potrillos del estudio, en total 68 potrillos sanos. Las muestras se tomaron en tres tiempos de medición. La primera muestra de sangre se extrajo al nacer, la segunda entre las veinticuatro a treinta y seis horas de vida. Luego de esto se les administró a cada potrillo 800 mL de plasma hiper inmune. La tercera muestra se extrajo veinticuatro a treinta y seis horas posteriores a la administración del plasma. Cada una de las muestras de sangre se utilizó para medir la concentración de globulinas totales en el suero, mediante espectrofotometría UV-visible. Se ordenaron los resultados de cada medición en un archivo Excel y, finalmente, fueron sometidos a un análisis de varianza y a una prueba de comparaciones múltiples. Los resultados indican que existe un aumento estadísticamente significativo en la concentración de globulinas séricas en los neonatos.

Palabras clave: Globulinas, plasma hiper inmune, potrillos, neonato, fina sangre de carrera.

ABSTRACT

In order to determine if the use of hyper-immune plasma is capable of statistically increase the levels of serum globulins in neonate thoroughbred, the following study was performed at Haras Don Alberto, Los Angeles city of Bio-Bio, Chile. First, plasma of healthy adult horses of the same Haras was extracted and frozen at -18°C for later use. Then, three blood samples of 10 mL were extracted for each foal in study. A total of 68 healthy foals were tested. The samples were taken in three measurement times. The first extraction of blood was done at birth. The second extraction was done at twenty-four to thirty-six hours of life. After this, each foal was given 800 mL of hyper-immune plasma. The third extraction took place twenty-four to thirty-six hours after the administration of plasma. Each blood sample was analysed in order to measure the concentration of total serum globulins, using UV-visible spectrophotometry. The results of each sample were analysed using variance and multiple comparisons test. The results of this study indicate that there is a statistical significant increase in the concentration of serum globulins in neonates.

Key words: Globulins, hyper-immune plasma, foals, neonate, thoroughbred.

INTRODUCCIÓN

La reproducción equina y la consecuente obtención de crías sanas es un proceso que largo y costoso. La gestación de la yegua es de aproximadamente treientos treinta a treientos cuarenta y cinco días; previo a esto, se debe preparar a la madre para lograr una gestación, elegir un reproductor, coordinar la monta con la ovulación, detectar preñez y muchos otros manejos en los cuales se invierten tiempo y recursos considerables (McKinnon *et al.*, 2011). Debido a esto, es importante asegurar la sobrevivencia de la cría y sus aptitudes deportivas futuras, además de cerciorarse de que el potrillo desarrolle su sistema inmune y se encuentre protegido de patógenos durante los primeros meses de vida (Higgins y Snyder, 2006; McKinnon *et al.*, 2011).

Se han realizado diversos estudios referentes a la medición de inmunoglobulinas séricas en potrillos, con el fin de determinar sus niveles y asociarlos con el riesgo de desarrollar diversas infecciones (Higgins y Snyder, 2006).

El periodo neonatal es una fase vulnerable en el desarrollo del potrillo, ya que la transición entre un ambiente uterino protegido a un estado de relativa independencia está sujeto a numerosos obstáculos (Blanchard *et al.*, 2011). Por lo tanto, los equinos se ven sometidos a una gran presión selectiva debido a que el neonato se expone a una gran cantidad de patógenos (McKinnon *et al.*, 2011).

Las características morfológicas de la placenta epiteliocorial de los equinos no permite la transferencia de inmunoglobulinas de la madre a la cría. En consecuencia, los potrillos nacen prácticamente agammaglobulinémicos, por lo que se vuelve fundamental la absorción desde el calostro de las inmunoglobulinas maternas, es decir la inmunización pasiva (Higgins y Snyder, 2006).

El calostro es una forma especializada de leche rica en inmunoglobulinas, las que son producidas durante las dos últimas semanas de gestación por influencia hormonal (Horohov y Lunn, 2004). Las inmunoglobulinas calostrales comprenden IgA e IgM, pero principalmente las IgG, que incluye los subtipos IgG1, IgG3, e IgG4, antes llamadas IgGa, IgGb e IgG(T) (Tizard, 2013). Los potrillos normales deben estar mamando el calostro de la glándula mamaria no más allá de una a dos horas de nacido, con el fin de asegurar una máxima absorción de inmunoglobulinas y los anticuerpos de origen maternos pueden ser

medidos a las seis horas de vida (Paradis, 2006). Las proteínas absorbidas en el intestino delgado mediante pinocitosis, incluidas las inmunoglobulinas, pasan por el espacio intercelular a la circulación sistémica, a través de la vía linfática (Paradis, 2006). La absorción de estas moléculas de gran tamaño por el sistema gastrointestinal es elevada dentro de las primeras seis horas de vida, disminuyendo paulatinamente en el tiempo; sin embargo, la mayor cantidad de IgG puede ser medida en el suero a las veinticuatro horas del nacimiento (Aoki *et al.*, 2013). La permeabilidad del tracto intestinal a las inmunoglobulinas se detiene a las veinticuatro horas de edad debido a que los enterocitos que permiten el paso de estas moléculas, son reemplazados por otras células maduras, impermeables a macromoléculas (Horohov y Lunn, 2004).

El potrillo neonato es inmunológicamente competente, no obstante, su sistema inmune aún desconoce cualquier microorganismo o agente patógeno, careciendo de células de memoria, por lo que es incapaz de montar una respuesta rápida que le permita defenderse de ellos (Paradis, 2006). Sumado a lo anterior, se ha determinado que el equino nace con una concentración sérica marginal de IgG de 0,3 mg/mL, la cual no le permite responder adecuadamente frente a los patógenos (Erhard *et al.*, 2001; Laus *et al.*, 2012; Aoki *et al.*, 2013) solo siendo capaz de sintetizar sus propios anticuerpos en niveles protectivos, a los dos meses de edad (Horohov y Lunn, 2004).

La incapacidad o dificultad del potrillo de ingerir o absorber calostro se denomina “falla en la transferencia pasiva de inmunidad” lo que según Paradis (2006) corresponde a una concentración de IgG sérica menor a 400 mg/dL a las veinticuatro horas de vida.

El recién nacido equino comúnmente adquiere infecciones y desarrolla septicemia debido al ingreso de microorganismos por vía respiratoria, oral o vía umbilical. La falla en la transferencia de inmunoglobulinas a través del calostro aumenta la susceptibilidad del potrillo a la infección por parte de patógenos ambientales (McKinnon *et al.*, 2011).

Las causas de la falla de transferencia pasiva pueden ser tanto maternas como propias del neonato. Dentro de las causas maternas tenemos a aquellas que provocarán una lactación prematura. Estas son placentitis, gestaciones gemelares y separación prematura de la placenta. Por otro lado las yeguas primerizas y viejas tienen una pobre calidad calostrual lo que también será causal de falla en la transferencia pasiva de inmunidad. Por último, puede

ocurrir una falla en la lactación por agalaxia o toxicosis. Por otra parte, las causas propias del neonato son la falla en la ingesta y la falla en la absorción de calostro; la primera puede deberse a debilidad o deformidad muscular y síndrome de asfixia perinatal, y la segunda, ocurre en potrillos con enterocolitis y potrillos prematuros, es decir con menos de 320 días de gestación (McKinnon *et al.*, 2011; Wilkins, 2004).

La falla en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas es uno de los principales factores de riesgo de septicemia (Galvin, 2008). En estas situaciones existen diversos tratamientos, como la administración de calostro, el uso de sueros comerciales o la administración de plasma natural (Wilkins, 2004).

El uso de calostro es recomendable en potrillos menores de veinticuatro horas de vida. Éste se administra por vía oral y tiene la ventaja de poseer diversos factores, además de inmunoglobulinas, que contribuyen a la inmunidad del potrillo (Wilkins, 2004).

La utilización de plasma comercial o concentrado de IgG, tiene diversos beneficios entre los cuales se distingue un ahorro de tiempo, pues no es necesario extraer sangre y separar el plasma de caballos adultos, están libres de aloanticuerpos y son negativos a infecciones. No obstante el problema que presentan es que entre los anticuerpos que contiene podría ser deficiente contra los patógenos ambientales, ya que estos varían de un lugar a otro (Horohov y Lunn, 2004). Tanto el plasma comercial como los concentrados de IgG se administran vía endovenosa lenta y se debe estar atento a reacciones anafilácticas (McKinnon *et al.*, 2011). Por otra parte, los productos comerciales normalmente se centran en la deficiencia de IgG y no contienen otros factores inmuno protectivos importantes (Wilkins, 2004).

Por otra parte, el plasma natural es extraído de los caballos adultos, normalmente del mismo predio o haras, y por lo tanto posee anticuerpos contra los patógenos ambientales (Paradis, 2006) y otros componentes inmuno protectivos, por ejemplo interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, células *natural killer*, entre otros (Wilkins, 2004; Gokturk *et al.*, 2013). Además, posee factores de coagulación y fibronectina de gran utilidad, por ejemplo, en potrillos que estén cursando con sepsis (McClure *et al.*, 2001).

El concentrado de IgG, el plasma comercial y el natural pueden ser administrados vía oral, sin embargo, se utilizan vía endovenosa lenta cuando sospecha de una deficiente absorción de macromoléculas en el intestino del neonato (McKinnon *et al.*, 2011).

Se ha establecido que la administración de plasma endovenoso es efectiva en cuanto a la capacidad de aumentar los niveles de inmunoglobulinas de los neonatos y por lo tanto su posibilidad para defenderse de los patógenos ambientales que pueden producirle sepsis o infecciones que conllevarán a una pérdida de la capacidad deportiva futura de estos atletas o directamente a la muerte del individuo, lo que significa la pérdida del producto completo de una temporada reproductiva (Higgins y Snyder, 2006).

Este estudio tiene como propósito determinar si existe un aumento en la concentración de globulinas séricas en neonatos equinos Fina Sangre de Carrera posterior al uso de un plasma hiper inmune producido en su mismo Haras de origen.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Haras Don Alberto, en el fundo El Mirador, de la ciudad de Los Ángeles, Región del Bio-Bio, Chile. Se seleccionó un total de 68 potrillos de la raza Fina Sangre de Carrera nacidos durante la temporada reproductiva del año 2013. Los potrillos que se incluyeron en el estudio correspondían a crías sanas nacidas de hembras sanas, considerando como “sano” el que se encontraran libre de enfermedades infecciosas o inmunológicas diagnosticadas. Todas eran crías que nacieron entre el 8 de Agosto y el 19 de Noviembre del año 2013.

Por cada sujeto en estudio, se tomaron tres muestras de sangre en tubos Vacutainer® con tapa roja, sin aditivos, con el fin de obtener muestras de suero apropiadas para la medición de globulinas totales. La sangre se extrajo por venipunción yugular con jeringa desechable NIPRO® y aguja de 21G x 1½”, previa desinfección local con alcohol yodado que se dejó actuar por tres minutos.

Para la primera muestra, que se denominó tiempo 0, se extrajo 10 mL de sangre del potrillo inmediatamente posterior al nacimiento, sin que éste hubiera ingerido calostro.

Se tomó otra muestra de sangre de 10 mL, denominada tiempo 1, posterior a la toma de calostro del potrillo. Considerando que la absorción de calostro ocurre hasta las veinticuatro horas de vida, esta muestra se tomó entre veinticuatro a treinta y seis horas post parto para asegurar darle el tiempo necesario al neonato de absorber el máximo de calostro.

Luego de esto se le administró al potrillo, vía endovenosa lenta, plasma hiper inmune producido en el mismo Haras Don Alberto. Para esto, por cada potrillo se utilizaron dos bolsas para plasma TERUMO Teruflex® de 400 mL, una jeringa de 5 mL con aguja de 21G x 1½”, un TERUMO Terufusion® *blood administration set*, un catéter endovenoso SAFELET® 18G x 2” y una bandeja de plástico para transportar el material.

Para la producción de este plasma hiper inmune se extrajo plasma de distintos caballos adultos pertenecientes al Haras Don Alberto, los cuales no se encontraban en competencia ni en reproducción. Previo a la extracción del plasma se les realizó a todos los animales un examen clínico completo para certificar la ausencia de cualquier enfermedad. Posteriormente, todos los animales sanos fueron vacunados con EQUILIS® PREQUENZA-TE contra la influenza y tétano, al mismo tiempo con Pneumabort K® + 1B

contra herpes virus tipo 1 subtipo 1b; luego de cinco días se vacunaron con RHODOVAC® contra *Rhodococcus equi* y también contra *Streptococcus equi* con GURVAC®. Pasado quince días desde la última vacuna se repitió el examen clínico. A todos los caballos sanos se les depiló el área de la yugular y se desinfectó la zona aplicando durante tres minutos alcohol yodado. Finalmente, de cada animal se extrajo seis bolsas de sangre para transfusión TERUFLEX® *Blood bag Systems* de 450 mL con CPDA-1 anticoagulante, es decir con citrato, fosfato, dextrosa y adenina. Posteriormente, estas bolsas se dejaron en reposo por seis horas, así los glóbulos rojos decantan por gravedad. Luego se extrajo manualmente el plasma hacia las bolsas de plasma TERUMO Teruflex® de 400 mL. Este plasma se congeló a -18° C. Para su utilización se descongeló sumergiendo las bolsas de plasma durante treinta minutos en agua a 37° C.

Después de veinticuatro a treinta y seis horas desde la administración del plasma hiper inmune a los potrillos en estudio, se tomó una tercera muestra de sangre de 10 mL, denominada tiempo 2.

Las tres muestras tomadas a cada potrillo fueron enviadas al Laboratorio de Diagnóstico Bioleche para la medición de las globulinas séricas, las que fueron cuantificadas mediante el uso del analizador clínico METROLAB 2300 PLUS WIENER LAB. Este equipo determina la concentración mediante espectrofotometría UV-visible y cuenta con certificación ISO 9001:2008, número de certificación 01 100 88071 (anexo 1).

Las moléculas tienen la capacidad de absorber radiaciones, entre ellas la UV-visible. Esto ocurre según su estructura atómica y las condiciones del medio como son el pH y la temperatura. Gracias a esto se puede caracterizar y determinar grupos de moléculas, como las globulinas totales, y su concentración en un solvente según la luz que absorbe la muestra. Por lo tanto, se establece la concentración de las globulinas, mediante la determinación de la absorbancia producida por la muestra. La absorbancia es la diferencia que se produce entre un haz de luz que incide sobre la muestra y la luz que la atraviesa, es decir, corresponde a la luz que es absorbida por la muestra.

Para determinar la concentración se interpola una curva de calibración de absorbancia versus concentración, dado que se cumple que absorbancia es igual a un coeficiente que

depende de lo que se desea medir, el largo de la celda donde se deposita la muestra y la concentración del compuesto a medir.

A partir de estos resultados se ordenó la información en un archivo Excel separando los resultados de globulinas en cada uno de los grupos de muestra, para así poder proceder a la siguiente etapa del análisis.

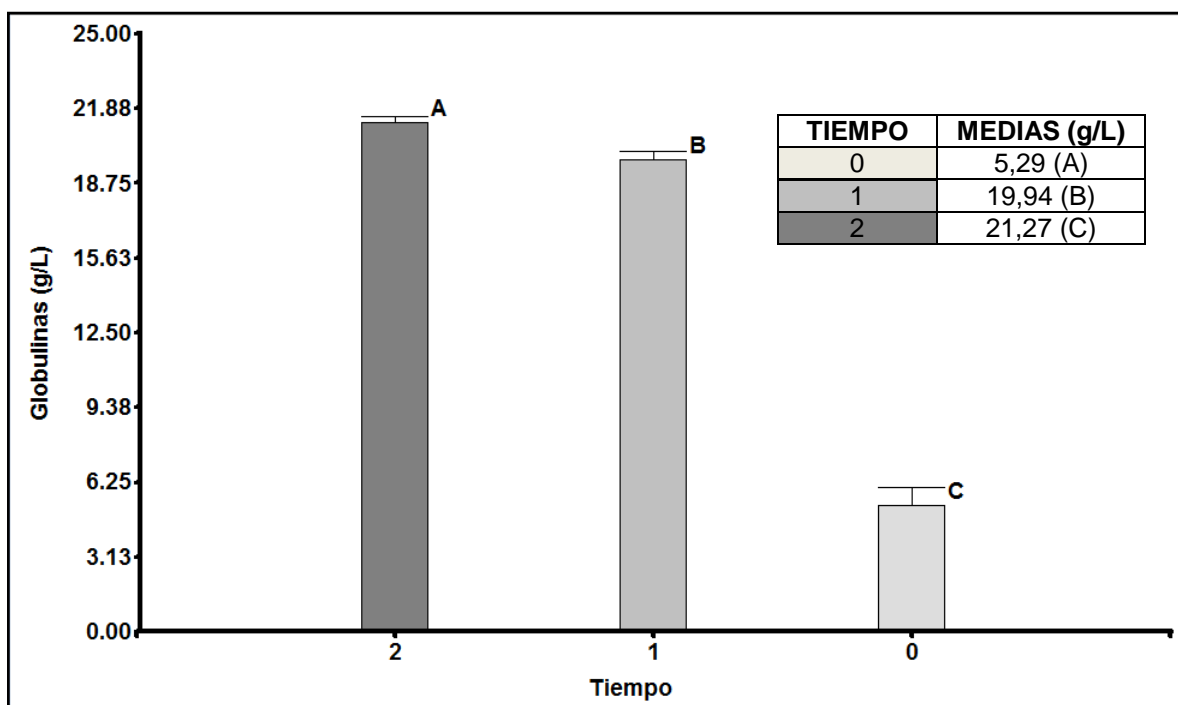
Los resultados de la medición de globulinas fueron sometidos a un análisis estadístico. Este consistió primero en comprobar los supuestos bajo términos del error, es decir, los supuestos de normalidad y varianzas homogéneas. Luego se realizó un análisis de varianza y finalmente una prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher ambas con un 95% de confianza.

RESULTADOS

Los datos obtenidos en las mediciones de globulinas de todos los potrillos muestreados, al tiempo 0, 1 y 2 como se explicó en materiales y métodos, fueron analizados estadísticamente para determinar si las concentraciones medias (g/L), mostraban variaciones que indicaran que había diferencia significativa entre un tiempo y el siguiente.

El análisis estadístico se realizó considerando $p \leq 0.05$ y utilizando la prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher.

En la figura N°1 se muestran los valores promedio de globulinas (g/L) medidos para cada uno de los tiempos. Además, se observa una letra (A, B, C) diferente para cada tiempo. Esto indica que cada uno de los valores promedio pertenece a un grupo diferente de acuerdo al análisis de comparaciones múltiples, es decir, hay una variación significativa entre un tiempo y otro.



“Figura 1: La administración de plasma hiper inmune en neonatos equinos Fina Sangre de Carrera genera un aumento estadístico de las globulinas séricas entre los tiempos de medición.” Entre el tiempo 0 y 1, es decir previo y posterior al consumo de calostro hay una diferencia estadística representada por C y B. Entre el tiempo 1 y 2 la diferencia estadística está representada por las letras B y A. Según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, con un 95% de confianza, la letra distinta indica que la diferencia es estadísticamente significativa, por tanto hay un aumento de globulinas séricas con respecto al tiempo de medición anterior.

Se tomaron tres muestras de sangre a cada potrillo, la primera o tiempo 0 inmediatamente posterior al nacimiento; la segunda o tiempo 1 a las veinticuatro a treinta y seis horas del parto y la última o tiempo 2 a las veinticuatro a treinta y seis horas posterior a la administración del plasma. La concentración media de globulinas séricas al tiempo 0 es de 5,29 g/L. Al tiempo 1, es decir posterior al consumo de calostro, la concentración media es de 19,94 g/L. Al tiempo 2, posterior a la administración del plasma hiper inmune es de 21,27 g/L. Cada una de las letras distintas indica que hay una diferencia estadística con respecto al grupo anterior. Es decir hay una diferencia estadística, según la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, entre el tiempo 0 y el 1 con un $p = 0,0001$; y entre el tiempo 1 y 2 con un $p = 0,05$.

De acuerdo a esto, los resultados indican que la variación en las medias a cada uno de los tiempos, con un 95% de confianza, corresponde a una diferencia estadística.

Por lo tanto, podemos concluir que según este estudio, el plasma hiper inmune es capaz de aumentar la concentración de globulinas séricas en los neonatos equinos Fina Sangre de Carrera significativamente, desde un punto de vista estadístico.

DISCUSIÓN

La obtención de una cría sana, en la reproducción equina, es costosa y larga. Se requiere un gran uso de recursos, tanto materiales como humanos, destinados a mejorar la sobrevivencia y las futuras capacidades deportivas de los neonatos Fina Sangre de Carrera. En este contexto, durante los últimos años, se han desarrollado nuevas y diversas medidas de manejo que buscan asegurar la correcta inmunidad del potrillo (Wilkins, 2004).

Al respecto, el consumo de una cantidad adecuada de calostro es una medida necesaria, pero no suficiente, ya que la sola ingesta no permite asegurar que el neonato será capaz de defenderse de los patógenos, por lo tanto, también se debe garantizar su absorción y calidad (Wilkins, 2004; McKinnon *et al.*, 2011). Por este motivo, es necesario implementar medidas que garanticen una concentración apropiada de globulinas durante los primeros días, con el fin de favorecer una respuesta adecuada por parte del potrillo, hasta que su sistema inmune sea capaz de alcanzar niveles protectivos. Con este propósito, se administra plasma hiper inmune a los neonatos (Wilkins, 2004).

El uso de plasma hiper inmune ha sido utilizado como una medida de prevención y tratamiento de falla en la transferencia pasiva de inmunidad, onfaloflebitis, artritis séptica, *Rhodococcus equi* y sepsis (Horohov y Lunn, 2004; Wilkins, 2004). Se ha establecido que éste es capaz de aumentar los niveles de inmunoglobulinas en los neonatos (Higgins y Snyder, 2006), lo que se corresponde con los resultados entregados por el presente trabajo, donde el uso del plasma genera un aumento en la concentración de globulinas posterior a su administración. Como se observa en los resultados, existe una diferencia estadística en la concentración de globulinas comparando los tiempos 1 y 2, muestras tomadas previo y posterior al uso del plasma, respectivamente; la que pasa de una concentración media de globulinas séricas de 19,94 g/L a una de 21,27 g/L. Este resultado se condice con los obtenidos por Wilkins y Dewan-Mix (1994), donde el uso de plasma logra aumentar los niveles de inmunoglobulinas, siendo mayor el aumento en potrillos sanos en comparación con los que presentan falla en la transferencia pasiva, a diferencia de esto, en este estudio solo se evaluó la concentración de globulinas en potrillos sanos. El mismo resultado obtiene Kalinbaca *et al.* (2005) al medir la eficacia del plasma en el tratamiento de falla en la transferencia pasiva, logrando que todos los potrillos del estudio alcanzaran, posterior al

tratamiento con plasma, una concentración de inmunoglobulinas mayor. Por el contrario Stoneham *et al.* (1991) indica que no hay un aumento proporcional entre la cantidad de globulinas presentes en el plasma y los niveles de inmunoglobulinas alcanzados posterior a su administración, lo que indicaría que el aumento no solo estaría dado por la cantidad de inmunoglobulinas administradas, sino también por otros factores como el paso de éstas entre el líquido intra y extra vascular.

Por otro lado, es importante destacar que en este trabajo, a diferencia de Wilkins y Dewan-Mix (1994) y de Kalinbaca *et al.* (2005), se midió la concentración de globulinas totales, las que comprenden no solo a las γ -globulinas, compuestas por IgG, IgA e IgM, sino también, incluyen a las α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β_1 -globulinas y las β_2 -globulinas. Debido a esto, variaciones en la concentración de α o β globulinas generan una alteración de la cuantificación de las globulinas totales (Crisman *et al.*, 2008). Por consiguiente, es importante determinar que el aumento de las globulinas, en cada caso particular, se deba al aumento de inmunoglobulinas por el uso del plasma. Sin embargo, en este estudio se ha descartado que las variaciones de la concentración de globulinas totales sean debido a aumentos o disminuciones en α o β globulinas, ya que se descartaron del estudio a todos aquellos potrillos enfermos, condición que alteraría la concentración de α o β globulinas (Crisman *et al.*, 2008).

La concentración sérica de globulinas como indicador de falla en la transferencia pasiva de inmunidad es valorada de manera desigual entre los diversos autores. La capacidad de esta medición para detectar a animales que realmente presentan falla en la transferencia pasiva de inmunidad (verdaderos positivos), se evalúa mediante la sensibilidad del método. La capacidad en tanto, de detectar cuáles animales están sanos (verdaderos negativos) se clasifica como la especificidad. Según Metzger *et al.* (2006) y Fouché *et al.* (2014), este método presenta buena sensibilidad y pobre especificidad, aunque previamente, Hurcombe *et al.* (2012) la habría considerado de sensibilidad y especificidad moderada. En este ámbito, Stoneham *et al.* (1991) indica que la correlación entre las globulinas séricas totales y las inmonoglobulinas séricas en neonatos es alta. Por otro lado, Fouché *et al.* (2014) destaca la importancia de la utilización de un método que rápidamente identifique a los animales que podrían presentar falla en la transferencia pasiva, es decir, que sea altamente sensible; ya que lo importante es tratar a los animales que estén en riesgo, obteniendo los

resultados para clasificarlos de esta manera velozmente; por lo tanto, la concentración de globulinas séricas totales sería apropiada en este aspecto. Todo lo anterior nos llevó a decidir utilizar este método, considerando su característica de sensibilidad. Sin embargo, también consideramos que como una segunda etapa sería conveniente repetir este estudio midiendo las inmunoglobulinas directamente utilizando métodos más sensibles y específicos, mediante por ejemplo, inmunodifusión radial (Metzger *et al.*, 2006; Barton, 2008; Hurcombe *et al.*, 2012) o la electroforesis (Fouché *et al.*, 2014).

Otro factor importante a considerar es el tipo y vida media de las inmunoglobulinas absorbidas. A este respecto McClure *et al.* (2001) señala que la concentración total de inmunoglobulinas séricas no es un buen indicador de la calidad de IgG transferida, por lo que sería importante evaluar los subtipos de las IgG, ya que además de tener diferencias en su capacidad de defender frente a diferentes patógenos, cada subtipo es eliminado a distinta velocidad, por lo que su vida media sería diferente en el suero del potrillo. Esta faceta de inmunización pasiva es importante considerando que es muy amplia la gama de protección que se busca, principalmente frente a bacterias o virus, particulares para cada sistema productivo. Esta es una de las limitaciones de este estudio. En este caso, en el Haras Don Alberto la presencia de *Rhodococcus equi* es el motivo principal del uso del plasma hiper inmune⁽¹⁾. En este aspecto algunos estudios como el de Hurley y Begg (1995), indican que no hay una diferencia estadística en la frecuencia de presentación de neumonías causadas por *Rhodococcus equi* en potrillos tratados con plasma o sin este. Debido a esto, es que sería interesante continuar esta línea de investigación, evaluando directamente cada tipo y subtipo de inmunoglobulina, donde vuelve a surgir la idea de la utilización de la electroforesis, debido a su buena especificidad y sensibilidad (Fouché *et al.*, 2014). Pese a que, a nivel práctico se ha visto que el uso de este plasma hiper inmune en el Haras Don Alberto ha disminuido las muertes de neonatos, aún no es posible establecer si es un efecto directo del uso de este plasma o si se debe a otras condiciones de manejo. Sería importante, por tanto, investigar y establecer correctamente las propiedades de este plasma como su concentración de inmunoglobulinas, de citoquinas, entre otros.

Es posible medir cada subtipo de IgG y evaluar, como se dijo anteriormente, la efectividad de ésta para detectar y neutralizar antígenos. Esto puede realizarse *in vivo*, inoculando

(1): Omón, Claudio. 2013. [Comunicación personal]. Médico Veterinario Haras Don Alberto.

patógenos específicos para luego medir las concentraciones y vida media de los distintos subtipos de IgG; e *in vitro*, evaluando la eficacia frente a un patógeno de cada subtipo de IgG en un laboratorio, midiendo su capacidad de adherirse al patógeno. La primera alternativa sería mayor utilidad, ya que representa mejor la realidad de la función de las IgG en los potrillos. Sin embargo, por razones bioéticas y la baja probabilidad de disponibilidad de animales para realizar un estudio de esta índole en Chile, es preferible orientar los análisis a la medición y caracterización de las inmunoglobulinas mediante técnicas *in vitro*.

Por otra parte, el rango de referencia de la concentración de IgG sérica para determinar una falla en la transferencia pasiva de inmunidad, es sujeto de controversias. Paradis (2006), consideró como falla en la transferencia de inmunidad una concentración sérica de IgG menor a 400 mg/dL. No obstante para McClure *et al.* (2001) una concentración menor a 1000 mg/dL sería una falla en transferencia pasiva. Según Barton (2008), los potrillos saludables tendrían una concentración de IgG sérica mayor a 2400 mg/dL. En conclusión, no existe un acuerdo en tanto a la concentración de inmunoglobulinas necesaria para diagnosticar una falla en la transferencia pasiva de inmunidad, aunque todos los autores coinciden en que concentraciones menores a 400 mg/dL de IgG séricas incrementan el riesgo de infecciones y sepsis en los potrillos.

Faltan evidencias que permitan probar el efecto real de la administración de plasma hiper inmune sobre la concentración de inmunoglobulinas séricas en los neonatos en Chile. Esta investigación, justamente, ha querido demostrar la efectividad de ésta medida en el aumento de la concentración de globulinas séricas de los neonatos equinos y, en consecuencia, su efecto en las posibilidades del potrillo de enfrentar los microorganismos patógenos de manera eficiente. Fouché *et al.* (2014) y Metzger *et al.* (2006) indican que la medición de globulinas totales es un buen estimador de falla en la transferencia pasiva de calostro. Sin embargo, hay que precisar que la concentración no es un indicador de la capacidad de las inmunoglobulinas frente a cada patógeno en particular; por lo que este sería otro parámetro interesante de evaluar en el futuro.

Es importante destacar que se logró el objetivo principal del estudio, se determinó que el uso de plasma hiper inmune aumenta la concentración de globulinas séricas en los neonatos equinos Fina Sangre de Carrera. Los resultados del estudio demuestran estadísticamente

que éstas aumentan de manera significativa luego de la administración del plasma hiper inmune lo que muy probablemente sea la causa de la mayor sobrevivencia de las crías observada hasta ahora en el Haras Don Alberto. Esto es importante, ya que como se ha mencionado anteriormente, son muchos los recursos destinados a la extracción del plasma y a la administración de este. Todos estos procedimientos requieren, no solo el material antes mencionado, sino también personal capacitado trabajando durante toda la temporada de partos. Por ende, para el dueño o administrador del criadero o haras donde se utilizaría este método, el retorno en los costos involucrados justifica el uso de recursos humanos e insumos en este método de prevención. Y, por otra parte, los resultados obtenidos justifican la necesidad de continuar estos estudios, mejorando las técnicas utilizadas y explorando nuevas facetas del tema permitiendo utilizar de mejor manera este plasma en los potrillos.

Finalmente, la literatura presenta algunos estudios en otros países que mostraban efectos positivos del uso de plasma hiper inmune en potrillos, aumentando las concentraciones séricas de inmunoglobulinas y una disminución de las pérdidas de crías por falla en la transferencia pasiva de inmunidad. Nuestro trabajo demuestra estas mismas propiedades a nivel local, con un plasma de producción propia del mismo Haras del estudio, del cual aún no se conocen cabalmente sus propiedades, lo que abre una gama de nuevas interrogantes interesantes de investigar.

REFERENCIAS

- **AOKI, T.; HONDA, H.; ISHII, M.** 2013. Immunologic Profiles of Peripheral Blood Leukocytes and Serum Immunoglobulin G Concentrations in Perinatal Mares and Neonatal Foals. *J Equine Vet Sci.* 33: 989-995.
- **BARTON, M.** 2008. What's Got Them Covered? Innate Immunity and Passive Transfer of IgG. [en línea] <<http://www.veterinaryimmunogenics.com/News/REview%20vol%202%20finished.pdf> [consulta: 18-12-2014]
- **BLANCHARD, T.; BRINSKO, S.; VARNER, D.** 2011. Routine Magement of the Neonatal Foal. **In:** Manual of Equine Reproduction. 3ª edición. Editorial Elsevier. Maryland Heights. Estados Unidos. pp 143-159.
- **CRISMAN, M.; SCARRATT, K.; ZIMMERMAN, K.** 2008. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Vet Clin Equine* 24: 285-297.
- **ERHARD, M.; LUFT, C.; REMLER, H-P.; STANGASSINGER, M.** 2001. Assessment of Colostral Transfer and Systemic Availability of Immunoglobulin G in Newborn Foals Using a Newly Developed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) System. *J. Anim Physiol Anim Nutr* 85: 164-173.
- **FOUCHÉ, N.; GRAUBNER, C.; HOWARD, J.** 2014. Correlation Between Serum Total Globulins and Gamma Globulins and Their Use to Diagnose Failure of Passive Transfer in Foals. *Vet J.* 202 (2): 384-386.
- **GALVIN, N.** 2008. The Immune System. **In:** Color Atlas of Diseases and Disorders of the Foal. Editorial Saunders. St Louis, Estados Unidos. pp 293-304.
- **GOKTURK, A.; SULU, N.; ALTINSAAT, C.; ERGUN, A.** 2013. Blood Levels of Selected Metabolic Factors, Cytokines, and Lymphocyte Subpopulations in Arabian and Thoroughbred Horses During the Longest and Shortest Days of the Year. *J Equine Vet Sci.* 33: 969-976.
- **HIGGINS, A.; SNYDER, J.** 2006. The Inmune System. **In:** The Equine Manual. 2ª edición. Editorial Saunders. Los Ángeles, Estados Unidos. pp 113-149.

- **HOROHOV, D.; LUNN, P.** 2004. The Equine Immune System. **In:** Equine Internal Medicine. 2^a edición. Editorial Saunders. St. Louis, Estados Unidos. pp 1-93.
- **HURCOMBE, S.; MATTHEWS, A.; SCOTT, V.; WILLIAMS, J.; KOHN, C.; TORIBIO, R.** 2012. Serum Protein Concentrations as Predictors of Serum Immunoglobulin G Concentrations in Neonatal Foals. J Vet Emerg Crit Car. 22 (5): 573-579.
- **KALINBACAK, A.; GUZEL, M.; ALTINTAS, I.** 2005. Incidence of Failure of Immune Passive Transfer (FPT) in Thoroughbred Foals – Interest of a Rapid Diagnosis for FPT. Revue Med Vet. 156 (3): 163-165.
- **LAUS, S.; TRAILOVIC, R.; DOKOVIC, S.; LAZAREVIC, M.; TRAILOVIC, D.** 2012. Comparative Analysis of Some Serum Proteins and Immunoglobulin G Concentration in the Blood of Yugoslav Trotter Mares and Newborn Foals. Acta Vet-Beograd 62: 569-578.
- **MCKINNON, A.; SQUIRES, E.; VAALA, W.; VARNER, D.** 2011. Equine Reproduction. 2^a edición. Editorial Wiley-Blackwell. Oxford, Inglaterra. Volumen 1.
- **MCCLURE, J.; DELUCCA, J.; LUNN, D.; MILLER, J.** 2001. Evaluation of IgG Concentration and IgG Subisotypes in Foals With Complete or Partial Failure of Passive Transfer After Administration of Intravenous Serum or Plasma. Equine Vet J. 33 (7): 681-686.
- **METZGER, N.; HINCHCLIFF, K.; HARDY, J.; SCHWARZWALD, C.; WITTUM, T.** 2006. Usefulness of a Commercial Equine IgG Test and Serum Protein Concentration as Indicators of Failure of Transfer of Passive Immunity in Hospitalized Foals. J Vet Intern Med 20: 382-387.
- **PARADIS, M.** 2006. Equine Neonatal Medicine. Editorial Saunders. Grafton, Estados Unidos. pp 31-50.

- **STONEHAM, S.; WINGFIELD, N.; RICKETTS, S.** 1991. Failure of Pasive Transfer of Colostral Immunity in the Foal: Incidence, and the Effect of Stud Management and Plasma Transfusions. Vet Rec 128: 416-419.
- **TIZARD, I.** 2013. Veterinary Immunology. 9^a edición. Editorial Saunders. St. Louis. Estados Unidos. pp 172-173.
- **WILKINS, P.; DEWAN-MIX, S.** 1994. Efficacy of Intravenous Plasma to Transfer Passive Immunity in Clinically Healthy and Clinically Ill Equine Neonates with Failure of Passive Transfer. Cornell Vet 84: 7-14.
- **WILKINS, P.** 2004. Disorders of Foals. **In:** Equine Internal Medicine. 2^a edición. Editorial Saunders. St. Louis, Estados Unidos. pp 1381-1440.

ANEXO

Anexo 1

Certificado

Normativa de aplicación **ISO 9001:2008**

N° registro certificado 01 100 88071

TÜV Rheinland Cert GmbH certifica:

Titular del certificado: **Wiener Laboratorios S.A.I.C.**
Riobamba 2944
S2003GSD Rosario
Santa Fe
Argentina

Ámbito de aplicación: Diseño, producción, venta y servicio post-venta de kits para diagnóstico in vitro.
Diseño, producción, venta y servicio post-venta de productos médicos para diagnóstico in-vitro.

Mediante auditoría realizada, según consta en el informe n° 88071 se verificó el cumplimiento de los requisitos recogidos en la norma ISO 9001:2008.
La fecha límite para la auditoría de seguimiento es 31-Agosto.

Validez: Este certificado es válido desde 2012-10-16 hasta 2015-08-31.
Primera auditoría de certificación 1998

2012-10-16

Mouou Haucci

TÜV Rheinland Cert GmbH
Am Grauen Stein · 51105 Köln



DGA-ZM-58-95-00

www.tuv.com

 **TÜVRheinland®**
Precisely Right.

Anexo del certificado

N° registro certificado 01 100 88071

Normativa de aplicación **ISO 9001:2008**

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
S2003GSD Rosario
Santa Fe
Argentina

Sitios:

Planta Industrial de IVD: Maipú 2571
S2000FSQ Rosario
Santa Fe
Centro de Investigación y Biotecnología: Avda. Perón 2991
S2003FXB Rosario
Santa Fe
Planta Industrial de productos médicos: Pje. Ceres 3060
S2003GPB Rosario
Santa Fe
Oficina Comercial: Moreno 1850 2º piso
C1094ABB Ciudad de Buenos Aires
Argentina

2012-10-17


TÜV Rheinland Cert GmbH
Am Grauen Stein · 51105 Köln



DGA-ZM-58-95-00

Hoja 1 de 1

www.tuv.com

 **TÜVRheinland®**
Precisely Right.