



Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ciencias Veterinarias

Especialización en Diagnóstico de Laboratorio Veterinario

Cohorte 2017

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

**“Evaluación de la Transferencia Pasiva en potrillos Silla
Argentino de un Haras del Centro de la Provincia de Buenos
Aires”.**

AUTORA: Vet. María Belén Costanzo

DIRECTOR: Dr. Eduardo Mortola

RESUMEN

En los potrillos recién nacidos medir la concentración de IgG después de la toma de calostro es una técnica diagnóstica útil que permite evaluar la transferencia pasiva de la inmunidad. Por tal motivo, se necesita implementar una prueba sencilla, rápida, económica y fiable que permita detectar la deficiencia de IgG e implementar un tratamiento para reducir las tasas de morbilidad y mortalidad en la población de potrillos. El objetivo de este estudio fue evaluar la concentración de IgG en suero de potrillos neonatos después de la toma de calostro por el método de inmunocrito para determinar la falla en la transferencia pasiva de la inmunidad y compararlo con la prueba de coagulación por el glutaraldehído. Se analizaron 57 potros Silla argentino y se les extrajo una muestra de sangre entre las 10 y 14 horas de nacidos. A cada muestra se le realizó la prueba de inmunocrito y se la comparó con la prueba de coagulación con glutaraldehído. Si bien la comparación de la técnica de inmunocrito con la de coagulación por el glutaraldehído indicó un mediano coeficiente de correlación ($k = 0,56$), la curva ROC mostró un área bajo la curva de 99,04% y el límite de corte inferior del inmunocrito resultó ser de 7,5% con una sensibilidad y especificidad muy adecuadas (90 y 95,7% respectivamente). Estos datos sugieren que la técnica de inmunocrito es precisa para identificar la transferencia pasiva. La determinación temprana de la concentración de IgG permitió la aplicación de un tratamiento precoz a los potrillos con fallas parciales o totales de la transferencia pasiva de la inmunidad.

PALABRAS CLAVE: Transferencia pasiva de la inmunidad; potrillos; inmunocrito

ABSTRACT

In newborn foals, measuring IgG concentration after colostrum feeding is a useful diagnostic technique to assess passive transfer of immunity. For this reason, it is necessary to implement a simple, fast, cheap, and reliable test to detect IgG deficiency and implement a treatment to reduce morbidity and mortality rates in the foal population. The aim of this study was to evaluate the immune status of foals

from an establishment in the Province of Buenos Aires. Fifty-seven Argentine Silla foals were analyzed, and a blood sample was drawn between 10 and 14 hours after birth, each sample was subjected to the immunocrit test and compared with the glutaraldehyde coagulation test. Although the comparison of the immunocrit technique with that of glutaraldehyde coagulation indicated a medium correlation coefficient ($k = 0.56$), the ROC curve showed an area under the curve of 99.04% and the lower cut-off limit of the immunocrit turned out to be 7.5% with a very adequate sensitivity and specificity (90 and 95.7%, respectively). These data suggest that the immunocrit technique is accurate in identifying passive transfer. The early determination of IgG concentration allowed the application of early treatment to foals with partial or total failure of passive transfer of immunity.

KEY WORDS: Passive immunity; newborn foals; immunocrit

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de las fallas en la Transferencia Pasiva de la Inmunidad es una herramienta importante para el manejo adecuado de los potrillos recién nacidos (LeBlanc y col., 1992). La rapidez con que se efectúa la evaluación del calostro y de los neonatos facilitará la implementación de las medidas necesarias para suplementarlos y determinar la vía por la que se aplicará (Pennimpede y col., 2004).

Al momento de elegir una técnica para determinar la Transferencia Pasiva de la Inmunidad en los potrillos neonatos es importante tener en cuenta el tiempo que consume la realización de esta, debido a las pocas horas en que el epitelio intestinal es permeable a la absorción de inmunoglobulinas intactas. La técnica empleada debe ser fehaciente y de resultados rápidos (Mortola, 2017).

El equino neonato es considerado inmunocompetente al nacimiento, ya que el feto es capaz de producir anticuerpos específicos alrededor de los 180-200 días de su gestación. Sin embargo, su sistema inmune es inmaduro e incapaz de montar una respuesta inmune frente a la flora patógena (bacterias comensales, parásitos y patógenos virulentos) con la que toma contacto al abandonar el vientre materno

(Perkins y col, 2015; Mortola, 2017; Castoldi y col, 2019;). Esto se debe a la falta de estimulación antigénica durante la gestación ya que la placenta de la yegua es de tipo epiteliochorial, por lo tanto, el pasaje de inmunoglobulinas es nula. Por esta razón, la protección humoral del potrillo recién nacido depende exclusivamente de la ingesta y absorción de anticuerpos maternos concentrados en el calostro inmediatamente después del nacimiento (Lunn y col., 2005; Sedlinska y col, 2006; Galvin, 2010; Castoldi y col, 2019).

El calostro, o primera secreción láctea, se forma por el pasaje de inmunoglobulinas, células y distintas sustancias y moléculas de la circulación general a la glándula mamaria (inmunidad transmamaria) durante las últimas semanas que preceden al parto, bajo la influencia de niveles relativos de estrógeno y progesterona. Además, incluye otros mediadores producidos localmente por la mama (inmunidad diatélica). La calidad del calostro depende del volumen, concentración e isotipos de inmunoglobulinas relacionado con la experiencia inmune de la madre (Pennimpede y col ,2004).

La IgG se presenta en una concentración sérica de 1500-5000 mg/dl y consta de varias subclases; que debido a su reducido tamaño molecular puede abandonar los vasos sanguíneos y participa en la respuesta inmune en los espacios tisulares y superficies corporales. La IgM presenta una concentración máxima en el suero (100-300 mg/dl). y debido a su gran tamaño molecular no se escapa de la circulación sanguínea. La IgA es la principal inmunoglobulina presente en las secreciones y protege a las mucosas del tracto respiratorio e intestinal, y también aparece en calostro y en leche (500-1500 mg/dl) (Powell y col, 1994; Videla Ricci, 2006; Montenegro y col 2008; Mortola, 2017).

Es de vital importancia que un animal recién nacido tome calostro. El intestino del potrillo recién nacido contiene un epitelio con células especializadas en la absorción de calostro a través de pinocitosis. La duración del período de absorción es tiempo dependiente, con una eficiencia máxima entre las 6 y 8 horas, para luego descender paulatinamente y ser insignificante a las 24 horas donde un alto porcentaje de células epiteliales son reemplazadas por enterocitos maduros (Hines, 2003; Pennimpede y col ,2004; Videla Ricci, 2006; Orozco, 2009).

Una vez absorbidas, las inmunoglobulinas son detectadas en la sangre de los potrillos a partir de las 3, 4 y 6 horas, logrando una concentración próxima a la sangre materna entre las 12 y 18 horas posteriores (Pennimpede y col, 2004). A medida que la capacidad del potro para absorber inmunoglobulinas intactas se disipa y el calostro de la yegua se convierte en leche, la transferencia pasiva es importante para la supervivencia neonatal (Perkins y col, 2015).

Por ello, una adecuada protección contra enfermedades infecciosas que puedan comprometer la vida del neonato depende de la presencia de más de 400-800 mg/dl de la IgG transferida pasivamente. La incapacidad del potrillo de ingerir o absorber cantidades suficientes de calostro es denominada falla en la transferencia pasiva (FTP) (Barrington y col, 2010). Valores entre 200-400 mg/dl indican falla parcial en la Transferencia Pasiva (FPTP) y menores a 200 mg/dl son indicativos de Falla Total en la Transferencia Pasiva de la Inmunidad materno filial. (Montenegro y col, 2008).

Algunas características clínicas generales que nos hacen sospechar de una falla en la TPI incluyen la aparición de enfermedades durante las primeras 6 semanas de vida, infecciones repetidas que responden mal al tratamiento normal, aumento de la susceptibilidad frente a organismos con baja patogenicidad o infecciones por organismos rara vez observados en sujetos inmunocompetentes (Sellon, 2006; Tallmadge, 2016).

Las presentaciones clínicas que generalmente se manifiestan en las dos primeras semanas de vida son: septicemia, artritis séptica, neumonía y enteritis (Barrington y col 2010; Castoldi y col, 2019).

Entre los factores que condicionan la transferencia de inmunidad pasiva se pueden mencionar a aquellos provenientes de la madre y del potrillo. Con respecto a las madres se destacan los siguientes (Pennimpede y col ,2004):

- 1) Calostros de escaso volumen y bajo contenido de inmunoglobulinas: Esta característica es común en las primerizas y mejora en las lactaciones posteriores. Esta mejora se debe a una mayor experiencia inmune materna, a un aumento de la actividad secretoria y habilidad para el transporte de inmunoglobulinas.

- 2) Lactación prematura o pérdida de calostro prenatal: Es producida por cambios hormonales que acompañan a las placentitis, desprendimientos de placenta o parición de mellizos.
- 3) Edad: Entre 3 a 10 años las yeguas producen calostro de mejor calidad.
- 4) Malnutrición calórico-proteica: Si se produce hacia el final de la gestación, puede reducir su volumen.
- 5) Partos prematuros: Generalmente se observan 30 o 40 días antes de la fecha prevista para la finalización de la gestación y, por lo tanto, el tiempo es insuficiente para formar el calostro.
- 6) Gestaciones prolongadas: Esta situación determina que el epitelio intestinal del recién nacido es maduro y ya no absorben macromoléculas intactas.
- 7) Partos distócicos y abortos: El calostro de estos animales es por lo general de baja calidad. También puede incidir la eventual falta de tiempo para producirlo.
- 8) Rechazo de las crías: De comprobación común en hembras de primera parición o carencia de instinto maternal.
- 9) Retención de placenta.
- 10) Ubres tensas en las yeguas: que no aceptan a la cría por el dolor.
- 11) Mastitis: Las glándulas mamarias inflamadas producen calostro de baja calidad, poco palatable e infeccioso.
- 12) Pezones lesionados: el dolor al mamar causa que se rechacen las crías.

En las crías, los factores más comunes serán:

- 1) Nacimientos prematuros: los neonatos son débiles y sus madres quizás no formen adecuado volumen de calostro.
- 2) Neonatos débiles o enfermos: no se ponen de pie para mamar o lo hacen en pocas oportunidades.
- 3) Ausencia del reflejo de succión o deformación del paladar.

Existe una variedad de pruebas diagnósticas con las que se puede determinar si la eficiencia de la transferencia pasiva de la inmunidad materna a través del calostro es suficiente para proteger a los potrillos. Es importante tener en cuenta el periodo

de máxima absorción intestinal (hasta las 12 horas de vida). (Pennimpepe y col ,2004).

Estas pruebas podrán clasificarse en directas e indirectas. Entre las primeras se pueden mencionar la Electroforesis, Inmunodifusión radial, Nefelometría y ELISA. Dentro de las pruebas indirectas se incluyen Refractometría, Turbidez, Precipitación por sales, Coagulación por el glutaraldehído y Aglutinación de partículas de látex (Mortola,2017).

La determinación electroforética, método en el cual se consigue la separación de las proteínas debido a diferencias en sus cargas eléctricas, es muy precisa, pero lleva tiempo y requiere equipos especializados (Castoldi y col, 2019).

La inmunodifusión radial simple (IDRS) se considera la prueba diagnóstica cuantitativamente más fiable, precisa y útil como prueba de confirmación. Sin embargo, es más cara que otras pruebas de elección y los resultados demoran entre 15 y 24 horas, lo cual la vuelve poco práctica cuando se necesita un diagnóstico y un tratamiento rápido (Castoldi y col, 2019).

La prueba de inmunoensayo: requiere mediciones precisas con pipeta y seguir exactamente las instrucciones. Se puede usar sangre entera, suero o plasma. La técnica utiliza un gradiente de color con estándares de calibración que se correlacionan con concentraciones de 2,4 a 8 g/L de IgG. La realización es rápida (10-15 min) y los resultados tienen una elevada correlación con los de la IDRS. (Castoldi y col, 2019).

La prueba de turbidez por sulfato de zinc consiste en combinar químicamente las gammaglobulinas séricas (principalmente IgG) con trazas de zinc, que las precipita y produce diferentes grados de turbidez u opacidad (Pennimpepe y col ,2004). Es una técnica rápida, sencilla y económica, aunque la exactitud de la medición disminuye en los valores más bajos del rango (4 g/L). Se debe usar suero en vez de plasma, ya que una alta concentración de fibrinógeno plasmático puede interferir con los resultados La hemólisis puede causar resultados falsamente elevados (Castoldi y col, 2019).

La prueba de aglutinación con partículas de látex, consiste en la aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos contra IgG equina de origen

conejo por las IgG presentes en la muestra a estudiar. Se puede realizar con sangre o suero. La técnica es simple y rápida; sin embargo, los kits son caros y los resultados se ven afectados por la temperatura. La precisión es alta con valores de 4 g/L o menos, pero disminuye en rangos más altos. (Castoldi y col, 2019).

En la prueba de coagulación por glutaraldehído ocurre una reacción del aldehído bifuncional con grupos amino de los residuos de lisina, que forma enlaces intermoleculares con las proteínas básicas. La distribución de los grupos reactivos y la conformación estérica de las gammaglobulinas séricas favorecen la reacción con bajas concentraciones de glutaraldehído, formando complejos insolubles que recuerdan un proceso de coagulación.

Se preparan soluciones de glutaraldehído al 10 y 20% en agua destilada que se refrigeran para su conservación. (Pennimpepe y col ,2004). En dos tubos pequeños se coloca 0,5 ml de suero libre de hemólisis y a cada uno de ellos se adiciona 0,05 ml de glutaraldehído al 10%. Se agitan brevemente y se observa la consistencia de la mezcla cada 5 a 10 minutos hasta los 60 minutos. La aparición en el tiempo de un coágulo inmóvil adherido en el fondo del tubo indica una adecuada concentración de inmunoglobulinas (Pennimpepe y col ,2004).

Si el tiempo de reacción obtenido es entre 0 y 10 minutos, la concentración de IgG es mayor o igual a 800 mg/dl, por lo que no es necesaria la transfusión de plasma. Si el tiempo es entre 11 a 20 minutos, la concentración de IgG es mayor o igual a 600 mg/dl. En cambio, sí se halla un coagulo entre 21 a 60 minutos la concentración de IgG es mayor o igual a 400 mg/dl (Pennimpepe y col ,2004; Castoldi y col, 2019). Por tratarse de una prueba semicuantitativa sus resultados no son precisos en cuanto a la concentración de inmunoglobulinas. Se considera que la coagulación se produce en sueros cuya concentración es > 600 mg/100 ml y no se observa en aquellos con < 400 mg/100 ml. Sus resultados son variables si la concentración de IgG es de 400 a 600 mg/100 ml (Pennimpepe y col ,2004).

Posteriormente al diagnóstico de la falla de la transferencia pasiva es importante implementar un tratamiento de suplementación adecuado, para que el neonato cuente con anticuerpos maternos de protección que eviten su muerte. (Mortola, 2017).

El tratamiento depende del estado del animal, del ambiente en el que se encuentra, de la edad en el momento del diagnóstico y de la presencia de infecciones secundarias (Galvin, 2010).

Si la calidad del calostro no es satisfactoria o el neonato no mama vigorosamente en las primeras horas de vida, debe disponerse de nodrizas o de un banco de calostro. Para ello, se ordeñan las yeguas de las cuales se obtienen 100 a 200 ml por animal, luego de haber amamantado a su cría por primera vez. Inmediatamente se envasa en bolsas plásticas de forma rectangular o cuadrada de 1 litro de capacidad y se congelan a 20°C. En estas condiciones el calostro conserva sus propiedades intactas por varios años. Cuando se van a utilizar se disponen en un recipiente con agua tibia, donde el escaso espesor de las bolsas (3 cm) asegura su rápida descongelación. Otra forma de conservarlo es a temperatura de refrigeración, aunque sólo durante unos pocos días.

Una vez descongelado, se entibia y dispone en mamaderas, suministrándolo en dos o más tomas durante las primeras 6 horas de vida o hasta las 12 horas, según el caso. También puede introducirse a través de una sonda nasogástrica, respetando los tiempos indicados y en una sola aplicación. Los volúmenes por suministrar dependen de la gravedad específica o concentración de inmunoglobulinas del calostro, desde 250 ml a 1 litro, o más, en potrillos (Pennimpede y col ,2004).

Si un potrillo tiene más de 12 horas de nacido cuando se diagnostica el fracaso de la transferencia pasiva, está indicada la transfusión de plasma de equinos de la zona por vía intravenosa. El volumen de plasma necesario en general es de 1 litro que 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 (Carabetta y col ,2016).

Para la terapia con plasma, la sangre proviene de bolsas recolectoras de sangre con anticoagulante (ACD = ácido cítrico dextrosa). El rendimiento por cada litro de sangre es de 500 ml de plasma. A continuación, se deja reposar en refrigeración durante 48 horas para la sedimentación celular. La extracción del plasma se realiza asépticamente y por sifonaje para envasarse en volúmenes de 500 ml a 1

litro. Luego se identifican las bolsas y se congelan a -20°C (Pennimpepe y col ,2004). El plasma congelado se descongela lentamente y se calienta a baño maría hasta llegar a temperatura ambiente. Antes de utilizarlo se realiza una prueba de compatibilidad sanguínea cruzada (Galvin,2010; Castoldi y col, 2019).

La eficacia del tratamiento, evaluada por la concentración de inmunoglobulinas presente, es superior en potrillos sanos con fallas de transferencia en comparación a la observada en enfermos con diferentes patologías infecciosas y metabólicas. Por lo tanto, una vez finalizada la suplementación, es necesario evaluar el potrillo por alguna de las técnicas diagnósticas descritas (Pennimpepe y col ,2004).

En caso de usar suero equino, se procede a extraer la sangre en las condiciones mencionadas y luego de su coagulación se extrae el suero y es envasado en volúmenes de 200 ml. Se puede conservar a 4°C luego de su tinalización o bien congelado a -20°C . Se inocula a temperatura ambiente por vía subcutánea en la región costal, en dos o tres dosis de 150 a 175 ml cada una separada por 12 horas, alternando el lateral de aplicación. (Pennimpepe y col ,2004).

OBJETIVO GENERAL

Detectar la concentración de IgG en suero de potrillos neonatos después de la toma de calostro por el método de inmunocrito para detectar falla en la transferencia pasiva de la inmunidad y compararlo con la prueba de coagulación por el glutaraldehído.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la capacidad del método de inmunocrito para detectar fallas en la transferencia pasiva de la inmunidad en potrillos neonatos después de la toma de calostro.

- Comparar estadísticamente los resultados obtenidos con el método de inmunocrito con los obtenidos por la técnica de coagulación con el glutaraldehído.
- Evaluar las ventajas del uso de la técnica de inmunocrito para implementar su uso en la rutina de un haras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Este trabajo se realizó en un establecimiento de cría de caballos Silla Argentino, ubicado en el centro de la Provincia de Buenos Aires, en temporada de parición del año 2021(Imagen 1). Se obtuvieron 57 muestras de sangre de potrillos neonatos después de la toma de calostro.





Imagen 1: Haras de caballos Silla Argentino de donde se obtuvieron las muestras.

Obtención del suero sanguíneo

Las muestras se obtuvieron de la vena yugular de los potrillos mediante venopunción directa, después de la succión de calostro entre las 10 y 14 horas de nacido aproximadamente.

La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente, el suero se recuperó por centrifugación y se transvasó a tubos de 1,5 ml para su utilización en el desarrollo de las técnicas para medir la transferencia pasiva de la inmunidad.

El suero luego de su utilización se conservó a -20°C.

Prueba de inmunocrito

Se utilizó la solución de sulfato de amonio al 40% para precipitar las inmunoglobulinas de las muestras de suero de potrillos recién nacidos. Se considera que la solución de sulfato de amonio al 40% es la solución más eficaz que permite visualizar un límite claro entre las inmunoglobulinas precipitadas y el sobrenadante en el capilar de microhematocrito (Mortola y col, 2019).

Para el desarrollo de la técnica, se tomó 70 µL de suero de cada muestra y se mezcló, en un tubo de 1,5 ml, con igual volumen de la solución de sulfato de amonio al 40%. Luego de reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente para que las inmunoglobulinas precipiten; se agitó y se llenaron los capilares para microhematocrito de 75 mm no heparinizados, se sellaron, y se centrifugaron a 12.000 g durante 5 minutos. Los resultados se leyeron con un lector de hematocrito y se expresaron en porcentaje (Imagen 2). Se incluyó un control negativo proveniente de una muestra de suero tomada antes de que el potrillo tome el calostro (Mortola y col, 2019).



Imagen2: equipamiento mínimo necesario para realizar la Prueba de Inmunocrito

Prueba de coagulación por el glutaraldehído

La prueba de coagulación por el glutaraldehído se realizó con un kit comercial provisto por el Laboratorio de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Brevemente, se tomó una muestra de 0,5 ml de suero y se colocó en un tubo de vidrio pequeño transparente. Se agregó 50 μ l de reactivo (Solución de glutaraldehído al 10%) y se agitó suavemente. Se tomó el tiempo desde la adición del reactivo. La reacción fue positiva cuando se formó un coágulo, firme y adherente a las paredes del tubo, luego de la adición del reactivo.

Esto se visualizó inclinando el tubo unos 45° y el coagulo permaneció adherido al fondo del tubo. Si el tiempo de reacción obtenido es entre 0 y 10 min, la concentración de IgG es mayor a 800mg/dl, por lo que se considera como una buena transferencia pasiva de la inmunidad y no sería necesario realizar una terapia para alcanzar la transferencia pasiva adecuada. Si el tiempo es entre 10 y 60 min, con la aparición de un gel semisólido la concentración de IgG es de 400 a 800 mg/dl. En esta última hay una falla parcial de transferencia y el potrillo está en riesgo, por lo que habría que realizar una terapia. Si es mayor a 60 min y la mezcla queda en estado líquido, la concentración es menor a 400 mg/dl, hay una falla total de transferencia pasiva, el neonato está en alto riesgo, por lo que hay que realizar una terapia para complementar la inmunidad pasiva del potrillo (Carabetta y col, 2016).

Análisis estadístico

La comparación entre los resultados que arrojan las técnicas de inmunocrito y coagulación por el glutaraldehído se realizó mediante el uso de EpiInfo V.7.0.

Se empleó el coeficiente Kappa (K) de Cohen (Cohen, 1960) para evaluar la concordancia entre las técnicas de coagulación por el glutaraldehído y el inmunocrito destinadas a medir la concentración de inmunoglobulinas en los sueros de los potrillos neonatos. El coeficiente k se calculó e interpretó de acuerdo con Landis y Koch: 1,00-0,81 excelente, 0,80-0,61 bueno, 0,60-0,41 moderado, 0,40-0,21 débil y 0,20-0,00 despreciable.

Para obtener los puntos de corte para la interpretación y la validez de la prueba de inmunocrito, los datos fueron computados y visualizados mediante el cómputo de curvas de características operativas del receptor (ROC). En la coagulación por glutaraldehído, la formación de un coágulo firme y adherente dentro de los 5 minutos es indicativo de que no hay falla en la TPI y equivaldría a una concentración de inmunoglobulina sérica ≥ 8 g/L; mientras que valores menores y la no formación del coágulo es indicativo de fallas totales o parciales en la TPI (Hines, 2003; Auad y Col. 2010). Por lo tanto, para realizar las curvas ROC,

categorizamos esta variable y asignamos 1 a valores ≥ 8 g/L y 0 a valores menores.

El punto de corte óptimo en la curva ROC se identificó como el punto más cercano a la parte superior izquierda de la gráfica con máxima sensibilidad y especificidad, minimizando las proporciones de animales mal clasificados. Asimismo, se calculó el área bajo la curva (AUC). Una prueba perfecta debería arrojar un AUC de 1, mientras que una prueba no informativa arrojará un valor de 0,5 (Thrusfield, 2005) El AUC se comparó con pruebas estadísticas basadas en estadísticas U o bootstrap. Todas las operaciones de bootstrap se realizaron con remuestreo no paramétrico estratificado o no estratificado (según el argumento estratificado) y con el método de percentiles, como lo describen Carpenter y Bithell (2000). Luego, calculamos el intervalo de confianza (IC) para la curva ROC, el AUC y la sensibilidad-especificidad en los puntos de corte dados y viceversa con el límite inferior, la mediana y el límite superior del IC. El IC del 95 % se calculó con 2000 réplicas de arranque estratificadas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete pROC13 dentro del entorno R (R Core Team, 2014).

RESULTADOS

Tabla de resultado de las muestras

Número de muestra	Sexo del potrillo	Coagulación por el glutaraldehído	Inmunocrito
1	Hembra	Falla Total	2%
2	Macho	Falla parcial	8%
3	Macho	Sin falla	10%
4	Macho	Sin Falla	14%
5	Macho	Sin Falla	14%
6	Macho	Sin Falla	13%
7	Macho	Sin Falla	12%
8	Macho	Sin Falla	14%
9	Macho	Sin Falla	16%
10	Macho	Falla parcial	5%

11	Macho	Sin Falla	17%
12	Macho	Sin Falla	16%
13	Macho	Sin Falla	13%
14	Macho	Sin falla	12%
15	Hembra	Sin Falla	16%
16	Hembra	Sin falla	16%
17	Hembra	Sin Falla	15%
18	Macho	Sin Falla	16%
19	Macho	Sin Falla	17%
20	Hembra	Sin Falla	10%
21	Macho	Sin Falla	11%
22	Hembra	Falla Total	4%
23	Macho	Sin Falla	10%
24	Hembra	Falla parcial	5%
25	Macho	Falla parcial	6%
26	Macho	Sin Falla	18%
27	Hembra	Falla parcial	7%
28	Macho	Sin Falla	10%
29	Hembra	Sin Falla	9%
30	Macho	Sin Falla	10%
31	Macho	Falla Total	5%
32	Hembra	Sin Falla	20%
33	Hembra	Falla Total	2%
34	Hembra	Sin Falla	8%
35	Macho	Sin Falla	10%
36	Macho	Sin Falla	10%
37	Hembra	Sin Falla	10%
38	Hembra	Sin Falla	7%
39	Hembra	Sin Falla	9%
40	Macho	Sin Falla	10%
41	Hembra	Sin Falla	10%
42	Hembra	Sin Falla	10%
43	Hembra	Sin Falla	7%
44	Hembra	Sin Falla	11%
45	Macho	Sin falla	9%
46	Hembra	Sin Falla	11%
47	Hembra	Sin Falla	10%
48	Macho	Sin Falla	9%
49	Hembra	Sin Falla	8%
50	Hembra	Sin Falla	11%
51	Macho	Sin Falla	14%

52	Macho	Sin Falla	9%
53	Macho	Sin Falla	12%
54	Hembra	Sin Falla	8%
55	Macho	Sin Falla	14%
56	Hembra	Sin Falla	11%
57	Macho	Falla Parcial	6%

Análisis Estadísticos

El análisis entre las dos técnicas empleadas, arrojó un valor de coeficiente kappa de 0,56, definido como medianamente preciso. Asimismo, el intervalo de confianza fue estrecho (IC del 95%, 0,34 a 0,78), y resultó ser estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

El área bajo la curva (Figura 1) fue del 99,04% (95% IC: 85,18%-100%) (2000 réplicas de arranque estratificado). En la comparación entre las dos técnicas, el límite de corte inferior del inmunocrito resultó ser de 7,5% con 90% de sensibilidad y 95,7% de especificidad.

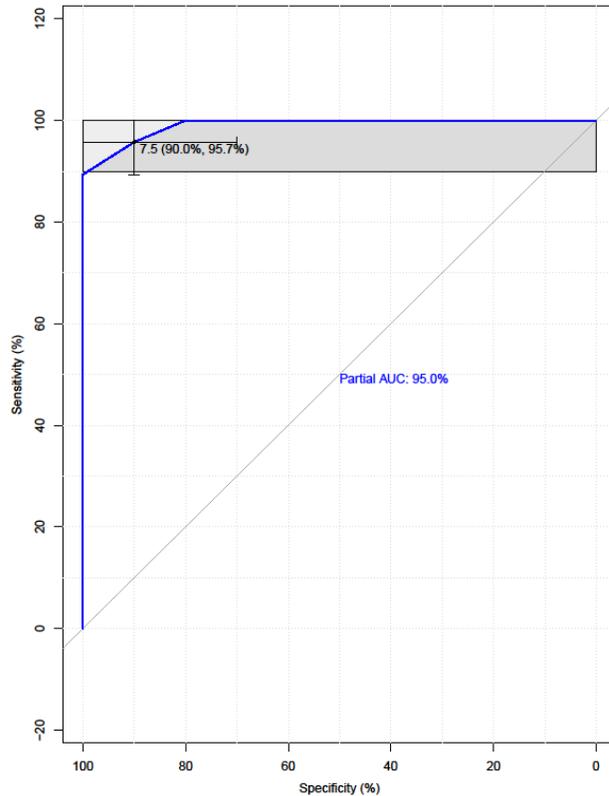


Figura 1: Curva ROC. El límite de corte inferior del inmunocrito resultó ser de 7,5% con 90% de sensibilidad y 95,7% de especificidad. La curva mostró el área máxima posible como un polígono con los intervalos de confianza

De los 57 sueros analizadas, 10 de ellos presentaron falla en la transferencia pasiva de la inmunidad (17,5%).

DISCUSIÓN

Con el objetivo de introducir la técnica del inmunocrito en un haras del centro de la Provincia de Buenos Aires con la finalidad de medir la concentración de IgG en suero de potrillos recién nacidos después de la toma de calostro, se evaluó la capacidad del método de determinar la falla en la transferencia pasiva de la inmunidad y comparar los resultados obtenidos con la técnica de coagulación por el glutaraldehído.

La prueba de inmunocrito fue evaluada y puesta a punto en la especie equina en publicaciones previas (Mortola y col, 2019). La precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio, si bien no corresponde a una fracción pura de inmunoglobulinas, permite una recuperación suficiente para detectar cambios cuantitativos, relativamente leves, en los rangos en los que este constituyente es bajo, normal o está moderadamente o muy aumentado (Jager y col.,1948; Vallet y col., 2013). Si bien, la comparación de la técnica de inmunocrito con la de coagulación por el glutaraldehído indico un mediano coeficiente de correlación ($k = 0,56$), la curva ROC mostró un área bajo la curva de 99,04% y el límite de corte inferior del inmunocrito resultó ser de 7,5% con una sensibilidad y especificidad muy adecuadas (90 y 95,7% respectivamente). Estos datos sugieren que el inmunocrito es preciso para identificar la transferencia pasiva adecuada.

Nuestra elección de comparar el inmunocrito con la coagulación con glutaraldehído, radica en que esta técnica es la que se implementaba rutinariamente en el haras y que ambas cuantifican las Inmunoglobulinas totales sin discriminar entre IgG, IgM e IgA.

Otros métodos comúnmente utilizados para detectar fallas en la transferencia pasiva en potros recién nacidos son la turbidez del sulfato de zinc (Bauer y col., 1990), las pruebas de coagulación (Beetson y col.,1985) que son cualitativas o semicuantitativas y subjetivas. El inmunocrito es un método cuantitativo, rápido, económico, fiable y objetivo para medir fallas en la transferencia pasiva en establecimientos de equinos, es fácil de realizar con un mínimo equipo de laboratorio, utiliza un pequeño volumen de muestra de suero (70 μ l) y tiene un tiempo de lectura muy rápido (6-7 minutos, importante en aquellos casos en los que se debe instaurar una terapia de sustitución con calostro al potrillo.

La aparición de fallas en la transferencia pasiva de la inmunidad en los haras, podría estar relacionado con la falta de detección temprana y de instauración de tratamiento para reducir el riesgo de enfermedades y muerte de los potrillos recién nacidos. En este estudio, el porcentaje de potrillos neonatos con FPT es del 17,5%, relativamente alto cuando se compara con estudios en otros países, por ejemplo: 13% en Estados Unidos, 15% en el Reino Unido, 10% en Australia y

16.7% en Turquía (; Kalinbacak y col., 1996; McGowan y col., 1997; Pusterla y Col., 2002). El valor en la falla en la transferencia pasiva informado para nuestro haras en estudio, podría ser relacionado con la falta de conocimiento, entre los criadores de caballos, sobre la importancia de la detección temprana y el tratamiento de fallas para reducir el riesgo de enfermedad en los potros recién nacidos (Wilkins y col., 1994). Por lo tanto, las medidas para aumentar la conciencia de la importancia de medir la inmunidad de transferencia pasiva en potros recién nacidos con el uso de una prueba confiable (como el inmunocrito), puede reducir la tasa de fallas en la transferencia pasiva de la inmunidad en Argentina.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todo el personal del Haras que contribuyó al manejo de los potrillos para la extracción de la muestra y a la colaboración de la Dra. Laura Alarcon con el análisis estadístico de los resultados.

BIBLIOGRAFIA

Auad, J; Marini, V; Lozano, A; Cooper, L; Cerutti, J; Davalos, M; Mangeaud, A (2010) Fisiología de la transferencia pasiva de anticuerpos en equinos. Artículo de Revista FAVE Ciencias Veterinarias. 9(2);69–75.

Barrington, M. G.; Johnson, R. J. (2010). Chapter 53. Immunologic disorders. Large Animal Internal Medicine. Fourth Edition Mosby, Elsevier .53;1665-1690.

Bauer, JE; Brooks, TP (1990). Immunoturbidimetric quantification of serum immunoglobulin G concentration in foals. Am J Vet Res.51(8);1211–4.

Beetson, SA; Hilbert, BJ; Mills, JN. (1985) The use of the glutaraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinaemia in neonatal foals. Aust Vet J 62(8);279–81.

Carabetta, D; Fernández, D; Echeverría, A; Valle, M; Padola; N. (2016). Evaluación de la transferencia pasiva de la Inmunidad en equinos mediante el uso de diferentes pruebas. Artículo de Revista Invet. Buenos Aires, Argentina 18(2) ,333-339.

Carpenter, J; Bithell ,J.(2000) Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Statistics in Medicine* 19(9);1141–64.

Castoldi, M; Alberdi; M; Cantón, J. (2019) Evaluación del nivel de proteínas séricas totales en potrillos SPC y su relación con la presentación de enfermedades. Tesina de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Cohen, J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*. 20(1);37–46

Galvin, N (2010). Capítulo 11. Sistema Inmune. Enfermedades y Alteraciones del potro. Inter-Médica S.A.I.C.I. Buenos Aires, Argentina, 11;297-298.

Hines, M.T. (2003). Immunodeficiencies of foals. *Current Therapy in Equine Medicine* 5th Ed. Philadelphia Saunders.2003;692-697.

Jager, BV; Nickerson, M. (1948) A simple quantitative chemical method for estimating γ -globulin in human serum. *Journal of Biological Chemistry* .173;683–90.

Kalinbacak, A; Or, ME. (1996) Yeni dogan taylarda hipogamaglobulineminin saptanmasinda glutraldehit koagulasyon testinin kullanimi. *Ankara Univ Vet Fak Derg*.43;203–7.

Landis, JR; Koch, GG. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33,159–74.

Leblanc, M.M; Tran, T; Baldwin, JL; Pritchard, EI (1992) Factors that influence passive transfer of immunoglobulins in foals. *Artículo de American Veterinary Medical Association*. 200(2);179-183.

Lunn, D. P; Horohov, D. W. (2005). Capítulo 1 El sistema Inmune del caballo. *Medicina equina*. Ed. Inter-Médica .1;1-32.

McGowan, C.M.T; Hodgson, JL; Hodgson DR. (1997) Failure of passive transfer in foals: incidence and outcome on four studs in New South Wales. *Aust Vet* .75(1)56-9.

Montenegro, D; Becerra Sandoval, C (2008) Medición de inmunidad pasiva en potros de madres inmunoestimuladas con células inactivadas de *Propionibacterium granulosum* y LPS. Tesina de Universidad de la Salle, Colombia.

Morris, DD; Meirs, DA; Merryman, GS. (1985) Passive transfer failure in horses: Incidence and causative factors on a breeding farm. *Am J Vet Res*.46(11);2294–9.

Mortola, E (2017). Inmunidad calostrual en el potrillo neonato. Artículo de Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Motivar ISSN1667-6566. Buenos Aires, Argentina.172, 8.

Mortola, E; Miceli, G; Alarcón, L; Azcurra, M; Larsen, A (2019). Assessment of the immunocrit method to detect failure of passive immunity in newborn foals. Artículo del Departamento de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de la Plata, Argentina.

Orozco, G (2009). Inmunodeficiencia Pasiva en Potranca media sangre y efectos colaterales sistémicos. Artículo de Revista de Medicina Veterinaria. Bogotá, Colombia.17;69-75.

Pennimpede, E; Gómez, C; Stanchi, N. (2004) Capitulo 16. Transferencia pasiva de la inmunidad materna. Introducción a la Inmunobiología, República Argentina. Editorial de la Universidad de la Plata.16;1-31

Perkins, G; Wagner, B (2015). The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. Artículo de Equine Vet. Cornell University, Ithaca, NY, USA.47(3);267-74.

Powell, D.G.; Jackson, S.G. (1994). El Caballo, Salud y Cuidados. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Pusterla, N; Pusterla, JB; Spier, SJ; Puget, B; Watson, JL. (2002) Evaluation of the Snap Foal IgG test for the semiquantitative measurement of immunoglobulin G in foals. Vet Rec.151(9);258–60.

R Core Team, R. (2014) a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>

Sedlinska, M.; Krejci, J.; Vyskocil, M; Kudlackova, H. (2006). Postnatal development of blood serum concentration of immunoglobulin IgG, IgA and IgM isotypes in suckling foal. Acta Vet Brno. 75;175-182.

Sellon, D. C. (2006). Chapter 3. Neonatal Immunology Equine Neonatal Medicine. Neonatal Immunology, Elsevier. Saunders. 3;31-50.

Tallmadge, L. R. (2016). Chapter 2: The Immune System of the Young Horse. Equine Clinical Immunology. Equine Clinical Immunology. Wiley, Blackwell.2;11-22.

Thrusfield, M. (2005) Veterinary epidemiology, 2nd edn. Oxford: Blackwell Science.117–98.

Vallet, JL; Miles, JR; Rempel, LA. (2013) A simple novel measure of passive transfer of maternal immunoglobulin is predictive of preweaning mortality in piglets. Vet J.; 195(1);91–7.

Videla Ricci, L (2006). Niveles de inmunoglobulinas calostrales totales en yeguas con y sin secreción mamaria preparto y su relación con inmunoglobulinas séricas de sus respectivos potrillos. Tesina de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Chile.

Wilkins, PA; 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(1);7–14.