

DETERMINACIÓN DE LA INMUNIDAD PASIVA DEL BECERRO RECIÉN NACIDO POR EL USO DE CALOSTRO ENRIQUECIDO CON IgY

Autor/es: Sonia Vázquez-Flores, Ricardo Paredes-Parra, Juan Carlos Urquiza-Roiz, Alejandra Berenice Tovar García, Juan Ángel Zubiri-Suárez. DBI-Tecnológico de Monterrey-Querétaro, Querétaro, México.

Resumen

La inmunidad pasiva en el becerro recién nacido depende del calostro que ingiere en las primeras horas del nacimiento, la industria lechera está en constante búsqueda de formas complementarias y alternativas para proveer esta protección, dado que el becerro nace amaglobulinémico¹. Las IgY constituyen esta alternativa, dado que pueden desarrollarse específicamente contra los patógenos virales, bacterianos y parásitarios que afectan más comúnmente al becerro². El objetivo de este proyecto fue comparar tres tipos de inmunidad pasiva para identificar si las IgY muestran interacción con la absorción de IgG para protección inmunológica en el recién nacido. El estudio incluyó 50 becerros desde el nacimiento, a los que se les administraron tres diferentes tratamientos en forma aleatoria: 1. Calostro; 2. y 3. Calostro + IgY. El calostro se cosechó por tres semanas, se mezcló, congéñandose en bolsas de 2 L, para ser suministrado solo o enriquecido según el grupo de estudio. El suero sanguíneo de cada becerro, se colectó a las 24 h de vida, analizándose con ELISA para determinación de IgG. No se encontraron diferencias estadísticas en la absorción de IgG, aunque si se observaron diferencias en refractometría con mejor respuesta fueron para Calostro + IgG. Si bien no se midieron las IgY circulantes, no se identifica una competencia en la absorción de IgG. Ninguno de los tratamientos demostró un mejor control del parásito *Cryptosporidium spp.*, en la época de mayor eliminación del parásito al ambiente a los 14 días de edad, en el caso de calostro se observaron $2,83 \times 10^4$ oocistos por ml, en los becerros con calostro + IgG: $2,5 \times 10^4$ oocistos por ml y para los becerros con calostro + IgY: $3,07 \times 10^4$ oocistos por ml.

INTRODUCCIÓN

La inmunidad pasiva a través del calostro materno es fundamental para la salud y supervivencia del ternero en las primeras semanas de vida, y a largo plazo para una eficiente producción láctea. La cría bovina presenta una condición de agamaglobulinemia a nacimiento, por el tipo de placentación sindesmocorial (Wooding et al., 1994). El calostro, es la principal fuente inmunitaria contra patógenos, su consumo no solo suministra immunoglobulinas. El primer producto de la glándula mamaria de los bovinos después del parto, también

contiene factores de crecimiento, linfocitos y nutrientes de primera calidad. Los factores de crecimiento actúan como promotores de desarrollo de las vellosidades intestinales del neonato (Xu, 2014).

El tiempo en el cual se alimenta el calostro a la cría recién nacida es de importancia vital para una absorción eficiente. Durante las primeras horas de vida, la permeabilidad intestinal para los receptores FcR permite que las macromoléculas tales como las inmunoglobulinas, puedan llegar a torrente sanguíneo en cuanto llegan al duodeno (Baumrucker, 2010). El calostro está representado por IgG1 la cual constituye el 80%, las IgG2 el 7%, IgA alcanza el 8% y la IgM solamente representa el 5% del total (Butler, 1995; Besser et al., 1985).

Se recomienda suministrar a la becerra el 10% de su peso corporal en las primeras dos a cuatro horas del nacimiento, para que posteriormente ofrecerle otra toma del 4-5% de su peso antes de las 12 horas de vida (Vázquez- Flores et al., 2018). La eficiencia en la absorción está determinada por la calidad inmunológica, microbiológica, así como el suministro eficiente del calostro, de preferencia en biberón (Quigley et al., 2002). Menos del 40% de las beceras en EUA presentan la cantidad mínima de IgG/ml en suero sanguíneo a las 48 h del nacimiento, esto se conoce como falla en la inmunidad pasiva, lo que constituye por sí mismo un 3.2% de mortalidad (Health Inspection Service, 1993; Tyler et al., 1999). Aquellos becerros que no reciben calostro tienen 74 veces más probabilidades de morir que un becerro que consume alguna cantidad. La mortalidad según Wells y cols., se puede disminuir en 31% en las primeras tres semanas de vida de la becerra, con ofrecer 2.5 L calostro en menos de 4 horas posparto (Wells et al., 1996).

TEORÍA

Diarrea como complejo sindrómico en neonatos

Una de los complejos sindrómicos más relevantes en los bovinos recién nacidos es el causando por las diarreas neonatales, la cual se considera que es la principal causa de morbilidad y mortalidad en becerros (Vázquez Flores, S et al., 2018). El estándar de oro actuales determinados por la DCHA en 2016, indican que no debería de haber más del 15% de becerras con diarrea. Las diarreas son multifactoriales, con diferentes tipos de patógenos asociados, con distintos daños histopatológicos en las vellosidades intestinales. La estrategia actual de control de enfermedades como Cryptosporidium parvum, E. coli K99, Rotavirus y Coronavirus, se basa en un control de vacunación a la madre, de tal manera que esta inmunidad pasiva sea transferida vía calostro. Aunque este tipo de tratamientos reduce la severidad de la diarrea, no la erradica (Parreño et al., 2010). Actualmente, el proceso de inmunización pasiva usando inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo de gallina (IgY's) se ha propuesto como una alternativa para el tratamiento y control de la diarrea en animales. Existen diferencias entre las IgY aviares y las IgG de los mamíferos: las IgY no se enlazan con proteínas A o G, las inmunoglobulinas no interfieren con las IgG en pruebas serológicas y no activan el complemento mamífero (Vega et al., 2011). El funcionamiento de este tipo de

inmunidad, es mediante la inmunización de gallinas con patógenos, respondiendo con la producción de antígenos específicos para el patógeno con el que fueron infectadas (Carlander, 2000). El aislamiento de las IgY es muy simple y se pueden

obtener hasta 25mg de IgY por yema de huevo, siendo del 2-10% antígenos específicos contra los patógenos por medio de hiper-inmunización de las aves. Existen diferencias entre las IgY aviares y las IgG de los mamíferos: las IgY no se enlazan con proteínas A o G, las inmunoglobulinas no interfieren con las IgG en pruebas serológicas y no activan el complemento mamífero (Vega et al., 2011). Según los experimentos dirigidos por Vega et al. en el caso de Rotavirus y, Lee et al. en el caso de Salmonella; la IgY es determinante para disminuir las incidencias de BVR y de Salmonella respectivamente, en becerros neonatos (Lee et al. 2002; Vega et al. 2011). Sin embargo, Pérez no encontró valores estadísticamente significativos, que demostrarían que la IgY tuviera efectos positivos en la salud animal, ni en ningún parámetro zootécnico (peso y estatura a destete) (Pérez, 2015). Además, en bovinos ha sido demostrada su efectividad contra patógenos como rotavirus, coronavirus, E. coli enterotoxigénica (ETEC) y Salmonella spp y, en años recientes contra enfermedades causadas por protozoarios (Eimeria) presentándose así, como una alternativa prometedora contra C parvum. A pesar de lo anterior, aún no existen evidencias científicas concluyentes para su uso como una alternativa al tratamiento convencional (Diraviyam et al., 2014).

Una vez que se pierde la homeostasis intestinal, una de las complicaciones es la pérdida neta de líquidos y de iones de sodio, bicarbonato, cloro y potasio. La pérdida de líquidos corporales puede llegar a ser de hasta 100ml/kg de peso en las primeras horas de vida dando como resultado diferentes grados de deshidratación, hipovolemia, acidosis metabólica e hipocloremia (Quigley, 2012).

Sistemas de prevención inmunológica de diarreas

Los animales afectados generalmente reciben terapia para la pérdida de fluidos, así como electrolitos y antibióticos para el tratamiento de enfermedades secundarias. La estrategia actual de control de patógenos como rotavirus, se basan en un control de vacunación a la madre, de tal manera que esta inmunidad sea transferida vía calostro con IgG contra el virus, la falta de eficiencia del sistema radica en que generalmente este rotavirus vacunal para el grupo A, sin embargo, se ha detectado una gran variedad antigenica caracterizados como N y G, que no necesariamente coinciden con la variedad vacunal (Rao et al., 2000). La suplementación de calostro con IgG específicas contra rotavirus permite reducir la severidad de la diarrea, no lo erradica (Parreño et al., 2010). La falla de inmunidad pasiva a un nivel menor de 5.2 g/dL tiene mayor relación con la presencia de problemas respiratorios, por lo que la suplementación de calostro con IgG reduce la presencia de estos problemas después de las 5 semanas de edad (Windeyer et al., 2014).

Otro método estudiado es la adición de calostro inmunizado, el cual, según Parreño et al. tiene un efecto estadísticamente positivo para controlar Rotavirus en neonatos, causado por una elevación de IgA ASC y una mayor diversificación de los isotipos en la mucosa intestinal (Parreño et al., 2010).

El suplemento de calostro y el reemplazo de calostro, se diferencian, únicamente por la cantidad de IgG que contiene cada uno. El primero contiene una cantidad menos a 100 g de IgG, el segundo contiene una cantidad mayor a los 100g de IgG. En el estudio de Quigley, et al (2002), se concluye que tanto el suplemento como el reemplazo, son absorbidos correctamente por los recién nacidos. En este mismo artículo se recomienda que el neonato ingiera entre 150 y 200 gr de IgG dentro de

sus primeras 24 horas de vida para garantizar la transferencia pasiva de la inmunidad (Quigley, et al 2002).

Justificación del estudio

La tendencia actual es proveer al becerro recién nacido la mejor inmunidad posible, por lo que el presente estudio revisa tres alternativas, el consumo de calostro de vacas multíparas, el calostro suplementado con calostro liofilizado y el calostro suplementado con IgY específicas. La ingestión de IgY no interfiere con la absorción de IgG en becerros neonatos comparando con el mismo calostro natural, o el mismo calostro natural suplementado con IgG. Se requiere cuantificar el nivel de control del enteropatógeno de mayor importancia en esta producción pecuaria, el protozoario *Cryptosporidium parvum* cuya prevalencia es del 100% en becerras menores a tres semanas de edad y que es letal en el 15% de las crías.

Objetivo

Demostrar que la ingestión del suplemento de IgY en becerros neonatos al nacimiento no interfiere en la absorción de IgG de calostro natural analizando el suero sanguíneo a las 24 horas de vida.

Comprobar que agregar IgG o IgY al calostro natural permite aumentar la inmunidad pasiva para el control de *Cryptosporidium parvum*, un patógeno de alta prevalencia en el sitio de estudio.

11. PARTE EXPERIMENTAL

Sitio de estudio

El estudio se realizó en el estado de Querétaro, en una producción lechera de 800 vacas lecheras, donde se crían hembras y machos Holstein y F1 con razas como Jersey, Suizo y Angus. El clima en los meses de junio a septiembre de 2017, cuando se llevó al cabo el estudio fluctuaron entre máximas de 32.5 y 16.5°C. Siendo los meses más calurosos del año, representan el periodo de mayor reto para control de enteropatógenos.

Colección de calostro

Se colectaron 100 litros de calostro paulatinamente en un periodo de 3 meses congelando el mismo para evitar el crecimiento microbiano. Una vez que se obtuvo el total del calostro, se reunió para hacer un calostro compuesto, y se dividió en bolsas de 2 L hasta su uso. A este calostro compuesto se le denominará calostro natural.

Animales en estudio

Se seleccionaron aleatoriamente 50 becerros recién nacidos hembras o machos de raza Holstein. Se les asignaron uno de los siguientes tratamientos:

- 1) Grupo de calostro natural: 10 becerros recibieron 2 litros en su primera toma.
- 2) Grupo calostro natural adicionado de 50 g de calostro liofilizado.
- 3) Grupo calostro natural adicionado con IgY (producto comercial). Muestreo de calostro, sanguíneo y fecal

Monitoreo de Calostro

Se tomaron tres muestras de calostro de 5 ml por cada tratamiento y se congelaron de inmediato a -20°C.

Toma de Muestra Sanguínea

A las 24 h de la toma de calostro, se tomaron muestras sanguíneas en tubo vacutainer. Se permitió que se hiciera el coágulo sanguíneo a temperatura ambiente y se colectó el suero sanguíneo. Las muestras se congelaron a -20°C en tubos Eppendorf para ser analizadas en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular.

Diagnóstico de IgG

Se hicieron análisis por medio de refractometría por el sistema Brix de los calostros y sueros sanguíneos. Los calostros congelados serán analizados en laboratorio por el sistema de determinación de IgG Bovina por ELISA (Laboratorios Bethyl).

Diagnóstico parasitológico

Los análisis de laboratorio se realizarán en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Departamento Regional de Bio-inginería, del Tecnológico de Monterrey campus Querétaro.

Las muestras se llevaron en refrigeración en guantes, y se colocaron en frascos identificados con el número de muestra, día de muestreo y fecha de muestreo.

Diagnóstico de Cryptosporidium spp.

1. Días de muestreo de excretas: 0, 7, 10, 14 y 21 días de edad como se muestra en a figura 1.
2. Se etiquetaron las muestras con número del becerro, grupo de tratamiento y fecha.
3. Las muestras fecales se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta llevarlas al laboratorio de Diagnóstico Molecular, donde se almacenaron hasta su análisis
4. Se realizaron pruebas parasitológicas morfológicas y de cuantificación de los oocistos de *Cryptosporidium parvum* (Tabla 1).

Tabla 1. Muestreo secuenciado de los becerros en tratamiento

Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 22
Muestreo fecal, obtenido directamente del recto del animal. Refrigerar inmediatamente	Muestreo fecal, obtenido directamente del recto del animal. Refrigerar inmediatamente	Muestreo fecal, obtenido directamente del recto del animal. Refrigerar inmediatamente	Muestreo fecal, obtenido directamente del recto del animal. Refrigerar inmediatamente	Se llevaron las muestras al laboratorio de Diagnóstico Molecular

Diagnóstico morfológico

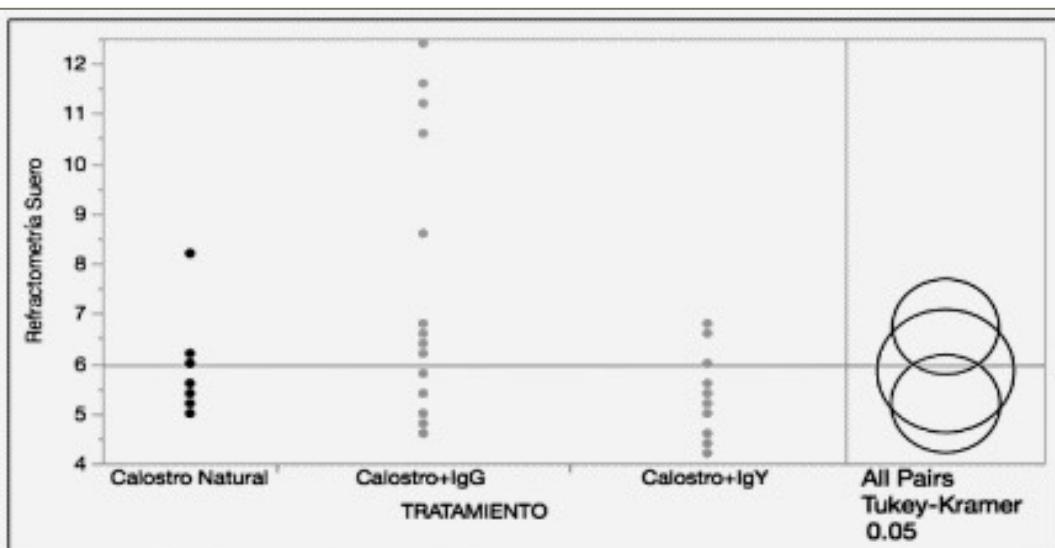
Para el análisis morfológico se hicieron frotis en un sólo portaobjetos con hisopo de cada una de las muestras por becerro en estudio. La lectura se realizará por muestra al microscopio óptico con aumento al 40x.

Análisis estadísticos

Se llevó a cabo con la prueba de Tukey- Kramer para determinación de las IgG en suero y grados Brix. Se hicieron análisis demográficos, por género y peso de los animales asignados a los diferentes tratamientos. Se realizaron pruebas de T de Student y Least square para la comparación de número de oocistos de *Cryptosporidium* spp por turno de trabajo y días de análisis. Para los análisis estadísticos se conformó una base de datos y el análisis estadístico se realizó por medio del software JMP 13.1.0 (licencia N15DC1JJ0R).

RESULTADOS

Se analizaron 36 hembras y 16 machos, agregándose 2 becerros mas al estudio porque dos becerros murieron durante la primera semana de vida. Las hembras presentaron pesos de 32.2 ± 4.32 Kg, mientras que los machos de 40 ± 5.3 Kg, siendo estadísticamente diferentes Valor $p= 0.05$) por medio de la prueba T de Student. Esto indica que los 2 litros de calostro ofrecidos como primera toma, cubrían escasamente el 5% de peso vivo en inmunidad pasiva en todos los casos.



Gráfica 1. Contenido de proteínas totales en suero en los diferentes tratamientos de calostro.

En cuanto a los datos de calostro y suero sanguíneo, los resultados fueron: el sistema Brix identificó que el calostro natural adicionado con IgG presentaba una densidad mayor y el adicionado con IgY se diluía más que el calostro natural, no se identificaron diferencias estadísticas. En cuanto a la refractometría, se encontraba en los estándares de 5.5 g/dl deseables en todos los tratamientos, ligeramente más bajos en el grupo adicionado con IgY (Gráfica1). En cuanto al contenido de inmunoglobulinas en suero, se determinó que el calostro natural y el calostro agregado con IgG, no llegaba al estándar de la industria del mínimo de 1340 mg/dl de IgG en suero sanguíneo.

Si bien el calostro natural agregado con IgY si sobrepasa este estándar no presenta diferencias estadísticas con los otros dos tratamientos. Sin embargo, si indica que no hay interferencia en la absorción de IgG, e incluso aumenta la eficiencia (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los tres grupos de estudio

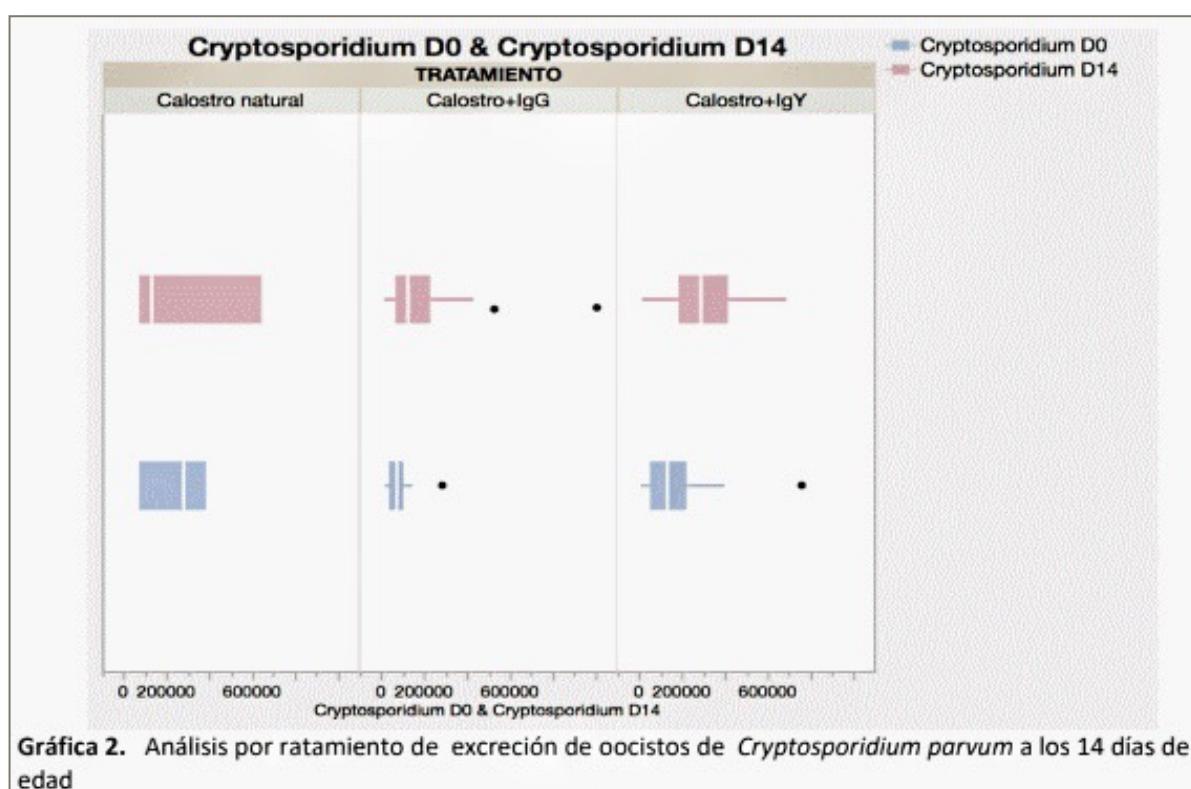
Tratamiento	Brix suero	Refractometría (g/dl)	IgG's (ELISA) (mg/dl)
Calostro	9.4 ± 0.98	5.86 ± 0.83 ^a	1268.54 ± 93.3
Calostro + IgG	10.4 ± 2.9	6.75 ± 2.6 ^a	1265.97 ± 219.40
Calostro + IgY	8.72 ± 0.80	5.2 ± 0.77	1375.65 ± 158.77 ^b

^a Calostro+IgG (p= 0.02) ^b Calostro+IgY (p= 0.06)

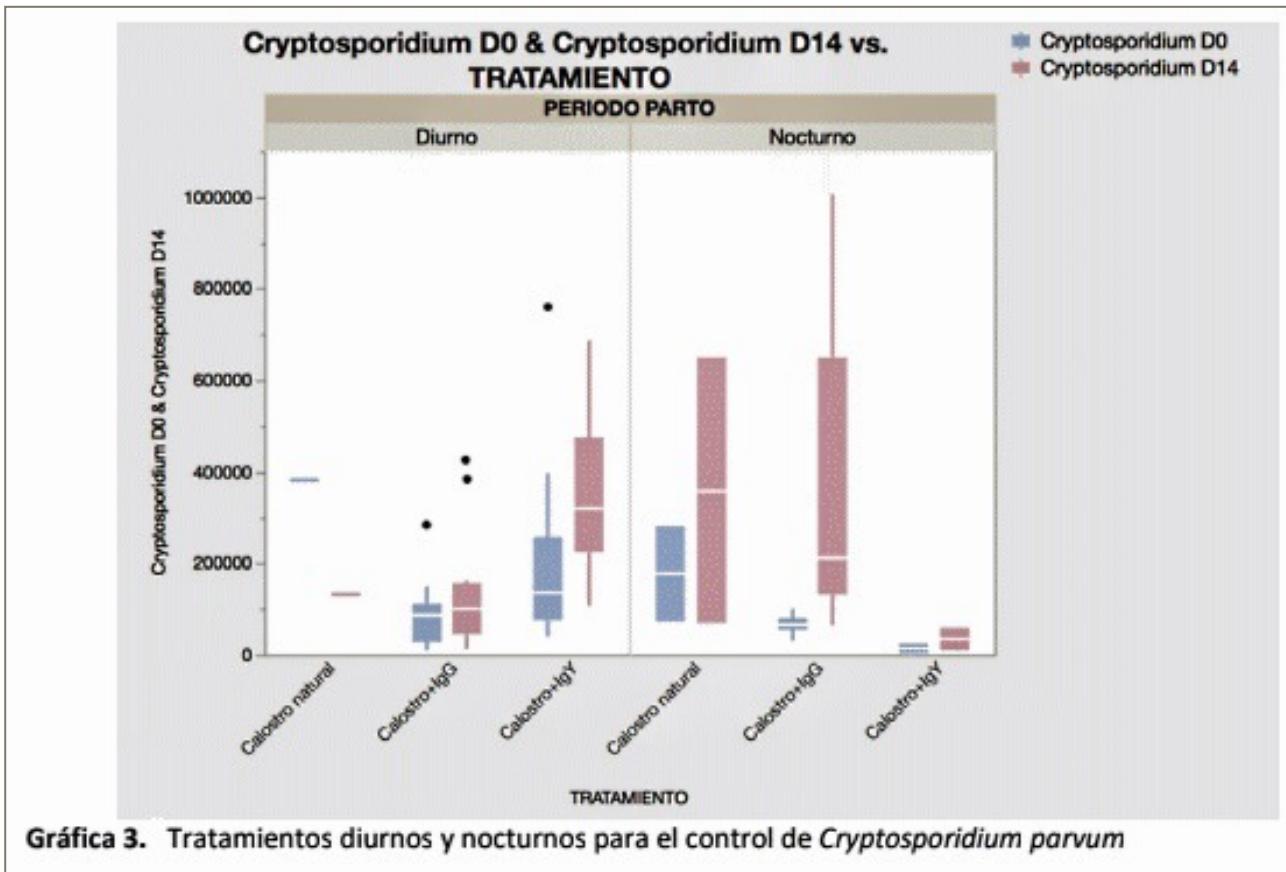
*Estándares refractometría 5.5 g/dl

*Estándares Ig's 1340 mg/dl.

La gráfica 2 muestra que durante el día de pico de producción de *Cryptosporidium parvum* en los becerros, no hubo diferencias entre los tratamientos, de tal manera que la inmunidad pasiva adquirida en las primeras horas de vida, no importando el producto agregado al calostro natural, no es suficiente para evitar la excreción en millones de oocistos de *Cryptosporidium* al ambiente. A los 14 días de edad, en el caso de calostro se observaron 2,83 x 10⁴ oocistos por ml, en los becerros con calostro + IgG: 2,5 x 10⁴ oocistos por ml y para los becerros con calostro + IgY: 3,07 x 10⁴ oocistos por ml. Esto solo representa un análisis preliminar, se debe analizar hasta los 28 días de edad, para ver si la inmunidad activa de los becerros se ve influenciada por el tratamiento (Gráfica 2).



La gráfica 3 demuestra que los tratamientos nocturnos fueron más eficientes que los diurnos, por lo que se revisaron los sistemas de descongelamiento y ofrecimiento del calostro a los becerros, lo que puede representar un sesgo en el control de enteropatógenos.



CONCLUSIONES

En otros estudios el grupo de Calostro + IgG ha demostrado ser superior a calostro sin suplementar, una de las razones de su baja absorción es la deficiente mezcla del producto. Esto generó un sesgo en el estudio, demostrado por la gran variabilidad de absorción de IgG en los calostros suplementados (Vázquez-Flores et al., 2018).

El sistema Brix no resultó confiable, dado que algunos sueros se hemolizaron, esto hace que los sólidos parezcan más elevados, por lo que esos datos no se utilizaron en el estudio. Se demuestra que no hay interferencia en la absorción de IgG aunque se agreguen IgY durante la primera toma de calostro, y los tres grupos se mostraron similares en nivel de inmunoglobulinas absorbidas. No se midieron las IgY circulantes. La cuantificación de oocistos de *Cryptosporidium spp.* al día 14 fue similar en los tres grupos, siendo menor en el grupo de Calostro + IgG. Falta realizar análisis del día 21 de edad, para identificar si hay control del protozoario más eficientemente después del periodo de mayor riesgo de enfermedad. El lactato de halofuginona no mostró ninguna ventaja aparente en el control de eliminación de los oocistos al ambiente con los diferentes tratamientos para mejorar la inmunidad pasiva.

*Capítulo del libro módulo Jean Monnet de marzo de 2018 de la Ciudad de México.
Referencias bibliográficas*

<https://www.engormix.com/Articles/References.aspx?Id=43218>

Fuente.

<https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/bienestar-determinacion-inmunidad-pasiva-t43218.htm>

Clic Fuente



MÁS ARTÍCULOS