

## Concentraciones de inmunoglobulina G sérica en alpacas neonatas muertas por enterotoxemia

### IGG SERUM CONCENTRATIONS IN ALPACAS NEONATES KILLED BY ENTEROTOXEMIA

Jorge Maximiliano G.<sup>2</sup>, Lenin Maturrano H.<sup>1,2,3</sup>, Hugo Castillo D.<sup>3</sup>, Karol Guzmán M.<sup>2</sup>, David Pérez J.<sup>2</sup>, Luis Luna E.<sup>1</sup>, Nidia Puray C.<sup>1</sup>, Raúl Rosadio A.<sup>2,3,4</sup>

#### RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los niveles de Inmunoglobulina G (IgG) sérica en alpacas neonatas (5-23 días de edad) muertas por enterotoxemia y en animales de edades similares, pero clínicamente sanos. En una primera fase se estableció una curva estándar de degradación fisiológica de la IgG sérica a partir de sueros sanguíneos de seis neonatos aparentemente sanos a partir del día 2 y hasta los 21 días de edad (n=9). En una segunda fase se determinaron las concentraciones de IgG sérica en 17 alpacas neonatas muertas con lesiones compatibles con enterotoxemia y en 26 animales, de edades similares, aparentemente sanos. Las concentraciones de IgG, determinadas por la prueba de Inmunodifusión Radial, evidenciaron que todas las crías a las 48 horas del nacimiento presentaron concentraciones adecuadas de IgG, mientras que solo tres de los animales muertos por enterotoxemia tenían niveles de IgG por debajo de la curva estándar de degradación, aunque solo una de ellas con niveles inferiores a 900 mg/dl a los 14 días, lo que podría ser considerado como falla parcial de transferencia pasiva. Las concentraciones de IgG sérica de los 26 animales clínicamente normales (2893 mg/dl) y aquellas obtenidas de animales muertos por enterotoxemia (2361 mg/dl) fueron estadísticamente similares. El análisis de riesgo mediante la prueba de Odds Ratio (OR: 5.35; IC= 0.50-57.22) indicó que no existe asociación entre niveles adecuados de IgG y la mortalidad por enterotoxemia en alpacas neonatas.

**Palabras clave:** IgG sérica; enterotoxemia; alpacas neonatas

<sup>1</sup> Laboratorio de Zootecnia y Producción Agropecuaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>3</sup> CONOPA- Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos, Lima, Perú

<sup>4</sup> E-mail: rrosadio@gmail.com

Recibido: 16 de julio de 2017

Aceptado para publicación: 23 de enero de 2018

## ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the levels of serum immunoglobulin G (IgG) in neonatal alpacas (5-23 days of age) killed by enterotoxemia and in animals of similar ages, but clinically healthy. In a first phase, a standard curve of physiological degradation of serum IgG was established from blood sera of six apparently healthy neonates from day 2 to 21 days of age (n=9). In a second phase, serum IgG concentrations were determined in 17 dead neonatal alpacas with lesions compatible with enterotoxemia and in 26 animals of similar ages, apparently healthy. The concentrations of IgG, determined by the Radial Immunodiffusion test, showed that all the animals at 48 hours of birth had adequate concentrations of IgG, while only three of the animals killed by enterotoxemia had IgG levels below the obtained standard curve, although only one of them with levels below 900 mg/dl at 14 days, which could be considered as a partial passive transfer failure. The serum IgG concentrations of the 26 clinically normal animals (2893 mg/dl) and those obtained from animals killed by enterotoxemia (2361 mg/dl) were statistically similar. The risk analysis using the Odds Ratio test (OR: 5.35, CI = 0.50-57.22) indicated that there is no association between adequate levels of IgG and mortality from enterotoxemia in neonatal alpacas.

**Key words:** serum IgG; enterotoxaemia; neonatal alpacas

## INTRODUCCIÓN

La producción alpaquera, principal actividad pecuaria en las zonas altoandinas del Perú (FAO, 2005), afronta anualmente elevadas pérdidas neonatales ocasionadas principalmente por el denominado complejo entérico neonatal, el cual puede afectar hasta un 70% de las crías durante periodos epizooticos (Ameghino y de Martini, 1991). Esta enfermedad es producto de interacciones entre dos o más agentes microbianos (Rosadio *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2016) capaces de producir patologías intestinales que desencadenan una disbiosis a nivel intestinal, caracterizada por una excesiva proliferación clostridial (*Clostridium perfringens*, tipo A) asociada con producción de fosfolipasa C y, en un menor porcentaje, producción de exotoxinas secundarias como la  $\beta_2$  (Pérez, 2010; Rosadio *et al.*, 2012).

Las alpacas poseen una placenta de tipo epiteliocorial difusa, la cual impide el transporte de inmunoglobulinas de la madre hacia el feto durante la gestación, razón por la cual las crías nacen prácticamente agammaglobulinémicas y dependen del calostro para la transferencia pasiva de anticuerpos maternos (Garmendia *et al.*, 1987).

La concentración de IgG en suero sanguíneo de las crías, luego de la ingesta de calostro, aumenta hasta niveles que proporcionan resistencia contra agentes infecciosos. La falla de la transferencia pasiva (FTP) se define como un nivel de inmunoglobulina G sérica inferior a 900 mg/dl a las 48 horas de vida (Garmendia *et al.*, 1987). Los primeros estudios realizados en el Perú indican que el 9% (11/82) de crías en Puno presentaban FTP, asociando esta condición con susceptibilidad a infecciones neonatales (Garmendia *et al.*, 1987). Una asociación similar fue reportada por Weaver *et al.* (2000a,b) al rela-

cionar el 15% de alpacas y 20% de llamas americanas con FTP con susceptibilidades a procesos infecciosos. Sin embargo, otros estudios descartan esta posible asociación; así, Bravo *et al.* (1997), en un estudio realizado en 150 llamas y 300 crías de alpacas, encontraron solamente seis crías con concentraciones séricas de IgG menores a 1000 mg/dl, y Flodr *et al.* (2012) detectaron una sola cría entre 77 animales con niveles de IgG séricas menores de lo normal.

El presente estudio, utilizando la prueba serológica de inmunodifusión radial (IDR) (Mancini *et al.*, 1965), fue diseñado para elucidar la posible asociación entre niveles insuficientes de IgG y la mortalidad por enterotoxemia en alpacas neonatas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fase I: Estandarización de la Curva de Cinética de Degradación de Inmunoglobulina

Seis alpacas neonatas saludables, con antecedente de ingestión de calostro en las primeras horas de vida, fueron seleccionadas para el muestreo sanguíneo. Los animales procedieron del Centro de Investigación y Producción La Raya de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar, departamento de Puno, Perú.

Se colectaron muestras de sangre a los 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18 y 21 días de edad. El suero fue obtenido por centrifugación a 2500 g durante 5 min y conservado a -20 °C hasta el momento del análisis. Las concentraciones de IgG (mg/dl) séricas fueron determinadas mediante kits de inmunodifusión radial (IDR) (Triple J, EEUU) específico para IgG de camélidos. Las lecturas fueron realizadas mediante la medición del diámetro del anillo de precipitación formado alrededor de cada pocillo, y la concentración de IgG para cada una de las muestras fue determinada a partir

de la comparación con la curva estándar resultante del análisis de los sueros de referencia.

Se elaboró un modelo de regresión exponencial, considerando las variables concentración sérica de IgG y edad de la cría, para determinar la cinética de degradación fisiológica de IgG en alpacas durante las primeras tres semanas de vida. Este resultado fue empleado en la segunda fase del estudio.

### Fase II. Asociación de FTP de IgG con Mortalidad por Enterotoxemia

Se trabajó con 43 muestras de sangre de crías de alpacas (17 crías muertas por enterotoxemia y 26 crías saludables sobrevivientes a brotes de la enfermedad) con edades entre los 5 y 21 días. Las muestras fueron colectadas durante las campañas de parición 2007-2010 en comunidades alpaqueras de los departamentos de Puno y Cusco, y en el Centro de Investigación y Producción CIP-La Raya de la Universidad Nacional del Altiplano, Puno.

Los casos mortales de enterotoxemia fueron confirmados por el hallazgo de lesiones compatibles con la enfermedad a la necropsia en campo y por análisis microbiológicos en el laboratorio. Las muestras de crías de alpacas saludables (animales entre 1 y 3 semanas de edad que no mostraban signos clínicos de la enfermedad) fueron obtenidas de los mismos predios donde se registraron los casos mortales de enterotoxemia.

Las muestras de sangre de animales muertos por enterotoxemia fueron tomadas de individuos dentro de las cinco horas de la muerte, vía punción cardiaca. Las muestras de animales sanos fueron tomadas de la vena yugular mediante el sistema *vacutainer*. La conservación de las muestras desde la toma de muestra hasta su llegada al laboratorio no presentó problemas debido al frío intenso, típico de la región. Las muestras fueron procesadas y analizadas en forma similar a aque-

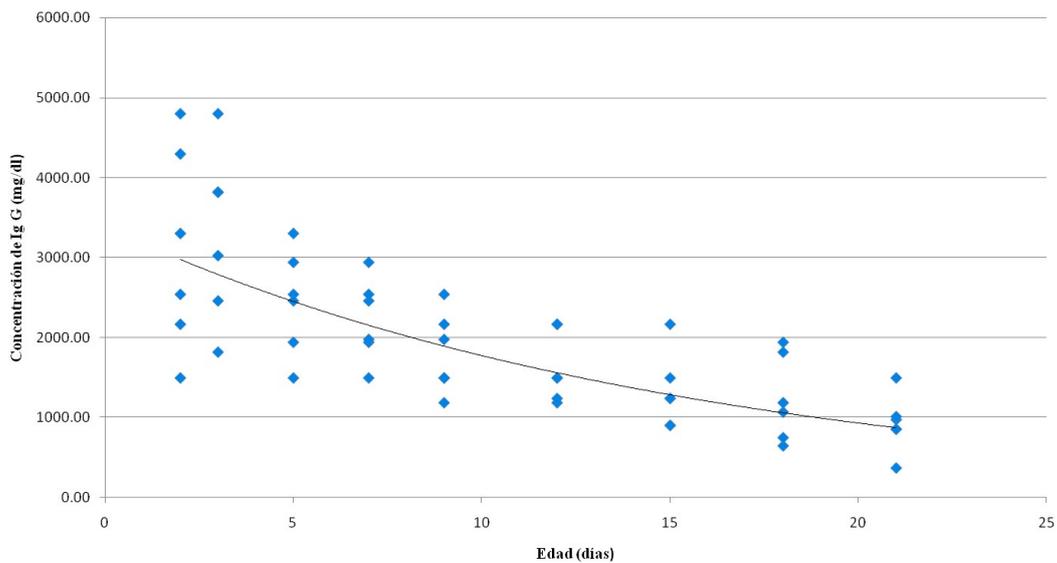


Figura 1. Concentraciones de IgG séricas de seis crías de alpacas aparentemente normales. Las concentraciones promedio permiten diseñar una curva de cinética de degradación de las IgG. Los puntos azules indican cada muestra en el gráfico de dispersión

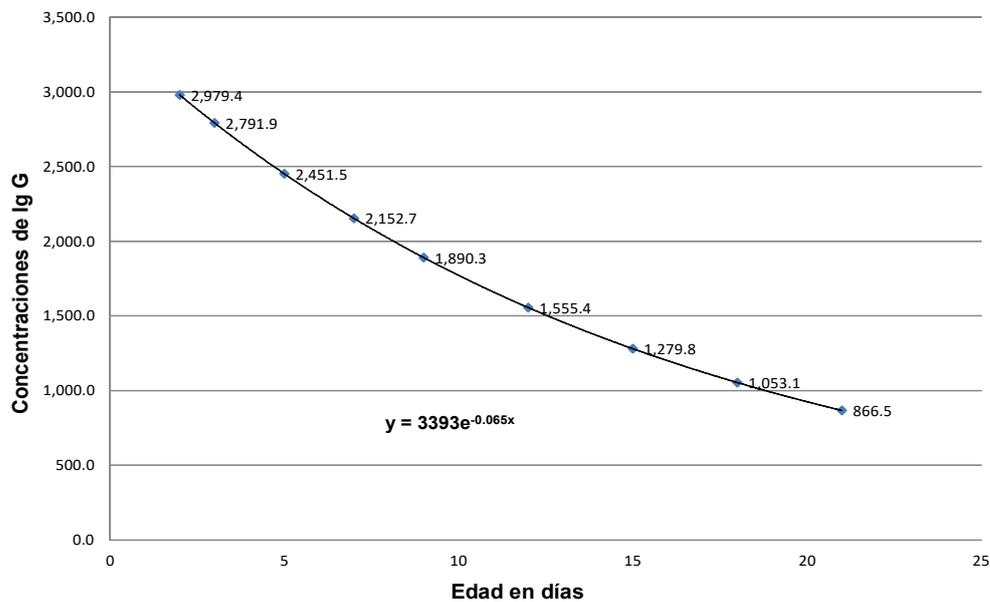


Figura 2. Cinética de la concentración de IgG en suero de alpacas neonatas por días de edad

llas de la Fase A. Para la valoración de la transferencia pasiva, las concentraciones de IgG sérica localizadas por debajo de la curva de degradación fisiológica de IgG, obtenida

en la primera fase del estudio, fueron consideradas como casos de inadecuados niveles de IgG (FTP parcial) (Garmendia *et al.*, 1987).

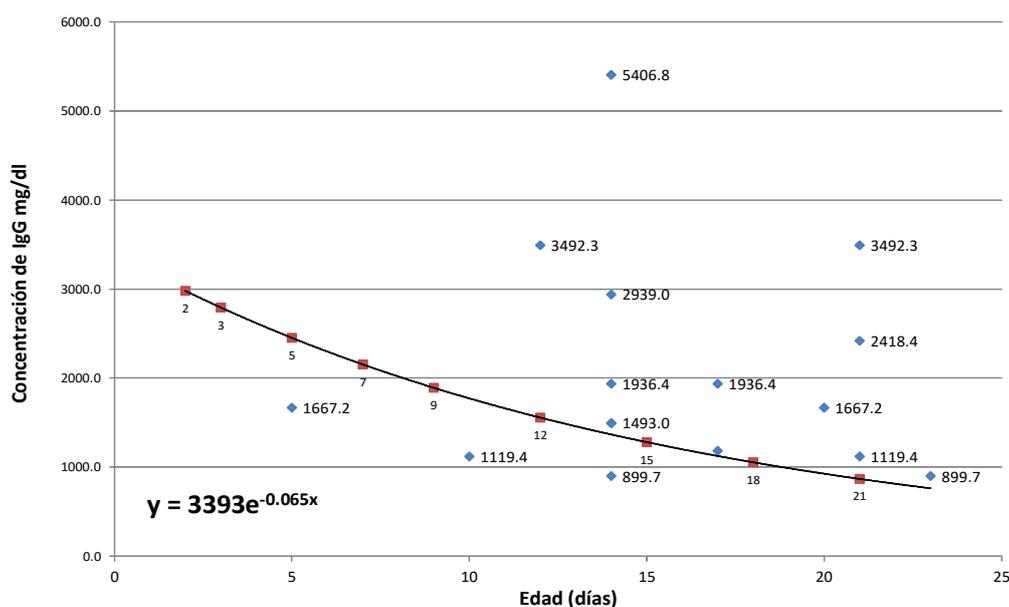


Figura 3. Cinética de las concentraciones de las IgG en sueros de 17 alpacas neonatas muertas por enterotoxemia (puntos azules) comparadas con la curva de degradación de los seis animales saludables. Se observa tres muestras con lecturas por debajo de la curva de degradación, pero sola una con niveles menores de 900 mg/dl

### Análisis Estadístico

Para determinar la asociación entre niveles insuficientes de IgG y mortalidad neonatal por enterotoxemia se utilizó la prueba de Odds Ratio a un nivel de nivel de  $p < 0.05$ . Asimismo, las concentraciones de IgG de ambos grupos fueron comparadas mediante la prueba de «t» Student, utilizando el software estadístico IBM SPSS Statistics 22.

## RESULTADOS

### Fase I

En el muestreo de seis animales saludables, a partir de las 48 h de nacido y hasta los 21 días de edad, se observaron concentraciones de IgG por encima de los 900 mg/dl

a las 48 h (1493-4798 mg/dl), que fueron decreciendo en forma progresiva hasta el último día del muestreo (366-1492 mg/dl) (Figura 1). La ecuación generada de la función exponencial con su equivalente curva de degradación de IgG se muestra en la Figura 2.

### Fase II

Las concentraciones de IgG sérica de los 17 animales muertos por enterotoxemia y de los 26 animales sobrevivientes de brotes de la enfermedad se presentan en las figuras 3 y 4, respectivamente. Se encontraron concentraciones de IgG por debajo de la curva de degradación de IgG en tres animales. Dos de ellos, muertos a los 5 y 10 días de edad, tenían concentraciones superiores a 900 mg/dl, mientras que el tercero, muerto en el día 14, presentaba una concentración ligeramente por debajo del límite inferior (Figura 3).

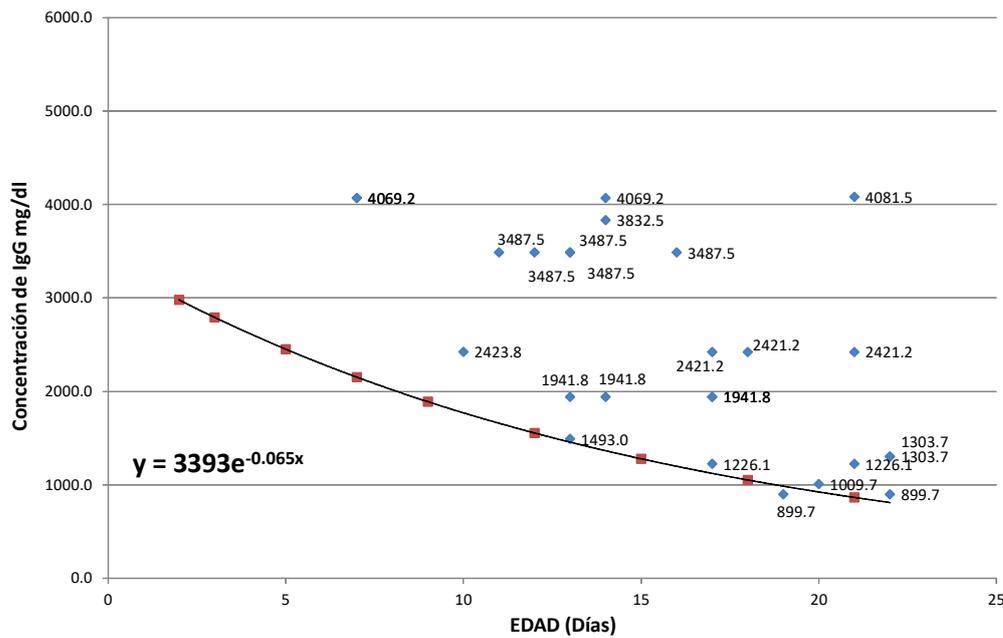


Figura 4. Cinética de la concentración de IgG en sueros de 26 alpacas neonatas que sobrevivieron brotes de enterotoxemia (puntos azules). Nótese que solo hay un punto por debajo de la curva de degradación proteica

Asimismo, el análisis de 26 animales que resistieron el brote de la enfermedad muestra una mayor cantidad de animales con concentraciones de IgG mayores que las crías muertas por enterotoxemia, registrándose solo un animal con concentraciones de IgG por debajo de la curva de degradación a los 19 días de edad (Figura 4). Sin embargo, ambos grupos presentaron, en general, niveles adecuados de IgG séricas, y no mostraron diferencias significativas en las concentraciones de IgG entre animales de edades similares.

El análisis de la prueba de OR determinó que los niveles de IC oscilaban entre 0.50 y 57.22, descartando una posible asociación entre niveles insuficientes de IgG (FTP parcial) y susceptibilidad a padecer infecciones fatales de enterotoxemia.

## DISCUSIÓN

La enterotoxemia, al parecer, producto de coinfecciones clostridiales y coccidiales, fue inicialmente asociada con inadecuadas concentraciones de IgG maternas y descritas como fallas de transferencia pasiva (Garmendia *et al.*, 1987). Los resultados del presente estudio, obtenidos a partir de la evaluación de 17 crías muertas por enterotoxemia, evidencian que estos animales presentaban adecuadas concentraciones séricas de IgG, sugiriendo que estas fatalidades no serían consecuencias de fallas en la transferencia pasiva.

El análisis progresivo de crías saludables desde las 48 horas hasta los 21 días de edad permitió demostrar una degradación

proteica progresiva similar a otras reportadas por varios autores (Bravo *et al.*, 1997; Weaver *et al.* 2000b; Garnica y Bravo, 2001). Asimismo, la evaluación sérica realizada en la primera fase del estudio permitió encontrar adecuadas concentraciones de IgG en crías de alpacas a las 48 horas (rango de 1493 a 4798 mg/dl; promedio de 3098 mg/dl), valores similares o ligeramente superiores a lo reportado por otros autores (Bravo *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2000a,b) (Figura 1).

Los resultados de la primera fase también muestran que un animal (cría 3) tenía concentraciones de IgG por debajo del resto de las concentraciones de los otros animales, indicando que este animal padecía de FTP parcial. Esto representa el 16.7% de la población en estudio, valor semejante a otros estudios relacionados (Garnica y Bravo, 2001; Weaver *et al.*, 2000a), pero superior al 9% de FTP reportados por Garmendía *et al.* (1987) y Bravo *et al.* (1997). Estas diferencias probablemente se deban al mayor número de muestras utilizado en dichos estudios.

El análisis de las concentraciones de los 17 animales muertos por enterotoxemia mostró que si bien, tres animales tenían niveles por debajo de la curva de degradación, solo uno presentó un valor de IgG (899.70 mg/dl) que podría ser considerado como FTP. Los menores niveles de IgG de los animales muertos por enterotoxemia sugieren un gasto de IgG en afán de contrarrestar infecciones microbianas. Las concentraciones de estos animales fueron menores a las halladas en los seis animales sanos utilizados en la primera fase, así como de los 26 animales aparentemente normales de la segunda fase. En estos dos últimos grupos se presentaron animales con niveles de IgG menores a 900 mg/dl a partir de los 15 días de edad (1/17 y 1/26 animales, respectivamente), evidenciando que a partir de estas edades, en teoría, serían susceptibles a infecciones microbianas.

## CONCLUSIONES

- Los seis animales utilizados para construir curva de degradación de IgG tenían adecuadas concentraciones de IgG a las 48 horas del nacimiento.
- Los niveles de IgG permanecen superiores a los 900 mg/dl hasta los 18 días de edad en crías aparentemente saludables.
- Una de las crías muertas por enterotoxemia presentó una concentración de IgG de 899.70 mg/dl a los 14 días de edad, por debajo de 900 mg/dl considerado como nivel mínimo de protección.
- La prueba de Odds Ratio no evidenció a la concentración deficiente de IgG sérica como factor de riesgo a morir por enterotoxemia.
- No existe diferencia significativa entre las concentraciones séricas de IgG de animales muertos por enterotoxemia y animales con edades similares que sobrevivieron a brotes de esta enfermedad.

## Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento al Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología FINCyT (INNOVATE PERU), a la Universidad Complutense de Madrid, al Centro de Investigación y Producción CIP-La Raya, Puno, de la Universidad Nacional del Altiplano y al Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos, por las facilidades brindadas para el desarrollo del estudio.

## LITERATURA CITADA

1. **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. Lima: IVITA, RERUMEN. 128 p.
2. **Bravo W, Garnica J, Fowler M. 1997.** Immunoglobulin G concentration in periparturient llamas, alpacas and their crias. *Small Ruminant Res* 26: 145-149. doi: 10.1016/S0921-4488(96)00965-0

3. [FAO] *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. TCP/RLA/2914. Lima: FAO. 62 p.
4. **Flodr H, Wheeler J, Krüger P, Olazabal L, Rosadio R**. 2012. Pruebas de campo para evaluar calidad calostrual en la alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 23: 307-316. doi: 10.15381/rivep.v23i3.913
5. **Garmendia A, Palmer G, DeMartini J, McGuire T**. 1987. Failure of passive immunoglobulin transfer: a major determinant of mortality in newborn alpacas (*Lama pacos*). *Am J Vet Res* 48: 1472-1476.
6. **Garnica J, Bravo W**. 2001. Absorción de inmunoglobulina G calostrual en alpacas crías durante la vida perinatal. *ALLPAK'A* 9: 95-101.
7. **Lucas JR, Morales S, Barrios M, Rodríguez J, Vázquez M, Lira B, Torres B, et al.** 2016. Patógenos involucrados en caso fatales de diarrea en crías de alpaca de la sierra central del Perú. *Rev Inv Vet Perú* 27: 169-175. doi: 10.15381/rivep.v27i1.11465
8. **Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF**. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2: 235-254. doi: 10.1016/0019-2791(65)90004-2
9. **Pérez D**. 2010. Caracterización toxigénica de la fosfolipasa C del *Clostridium perfringens* y su relación con aislados de *C. perfringens* en casos de enterotoxemia en alpacas. Tesis de Maestría. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 151 p.
10. **Rojas M, Manchego A, Rocha CB, Fornells L, Silva R, Mendes GS, Días HG, et al.** 2016. Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern Peruvian Highland. *J Infect Dev Ctries* 10: 269-274. doi: 103855/jidc.7398
11. **Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L**. 2010. *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol* 168: 116-120. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.10.010
12. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Luna L, Yaya K, Londoño P**. 2012. Avances en el estudio de la patogénesis y prevención de la enterotoxemia en alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 251-260. doi: 10.15381/rivep.v23i3.907
13. **Weaver D, Tyler JW, Marion RS, Wallace LM, Nagy J, Holle J**. 2000a. Evaluation of assays for determination of passive transfer status in neonatal llamas and alpacas. *J Am Vet Med Assoc* 216: 559-563.
14. **Weaver D, Tyler JW, Scout MA, Wallace LM, Marion RS, Holle J**. 2000b. Passive transfer of colostral immunoglobulin G in neonatal llamas and alpacas. *Am J Vet Res* 61: 738-741. doi: 10.2460/ajvr.2000.61.738