

Obtención de un bioproducto aplicable al control de infecciones perinatales en terneros, basado en Inmunoglobulina G partir de calostro bovino hiperinmune.

Director: MANFREDI María José

Integrantes: SODERO Sonia Gisela, RAMPONE Alberto Oscar, ANUNZIATA Jorge Daniel, FOGLIA Franco Emanuel.

Informe Académico

Para cumplimentar con el objetivo general planteado, se avanzó sobre el protocolo diseñado a los fines de obtener, a lo largo de 5 meses, las muestras de suero y calostro bovino necesarias para la realización del presente proyecto.

Se trabajó con animales del Tambo Marcatto, situado en las afueras de la localidad de Villa del Rosario.

La primera semana de noviembre de 2016 se seleccionan 60 bovinos hembras con alrededor de 90 días de preñez, del siguiente modo: 30 vacas adultas (Grupo A) con no más de 5 partos y 30 vaquillonas (Grupo V). Dentro de cada uno de los grupos, se seleccionaron al azar 10 animales que servirán como control para el presente trabajo.

A mediados del mismo mes, se puso en marcha el cronograma de inmunización, vacunando a los animales con Rotatec J5 (Biogénesis Bagó) de acuerdo al siguiente esquema: para el Grupo V (vaquillonas) se administrará una primera dosis luego de confirmada la concepción (tiempo 0) y se realizarán 4 refuerzos a 160, 190, 220 y 250 días de confirmada la concepción. Para el Grupo A (vacas adultas) una primera dosis a los 190 días y refuerzos a los 220 y 250 días de confirmada la concepción. Los animales que integran los grupos VC y AC (control) no son vacunados. En todas las instancias de vacunación se tomará muestra de sangre periférica de todos los animales incluidos en el esquema. Notese que la fecha de finalización del cronograma de vacunación y de la extracción de la totalidad de las muestras de sangre es muy cercana a la fecha de entrega de este informe.

La extracción de sangre en el mes de febrero no pudo realizarse debido a cuestiones climáticas desfavorables, en primera instancia días lluviosos y luego un calor intenso que llevó a los bovinos a un

cuadro complicado de deshidratación, por lo cual debieron pasar a secado.

Por otra parte, la toma de muestras de calostro está prevista luego de los partos de los animales, siendo la primera fecha aproximada de algunos de ellos, el 1 de abril, y la última el 1 de junio aproximadamente, por lo que todas las muestras serán procesadas a partir de esa fecha.

Con respecto al trabajo de laboratorio, tras la evaluación de resultados obtenidos con anterioridad y en base a los recursos económicos disponibles, se decidió reemplazar la técnica de Inmunodifusión Radial Simple (IDRS) planteada originalmente, por una técnica de Enzimoimmunoensayo (ELISA). Por lo que luego de la recepción del subsidio correspondientes al primer período, en setiembre de 2016, se procedió a la compra de los reactivos e insumos necesarios para poner a punto la técnica propuesta, un ELISA sándwich para determinación de Inmunoglobulina G (IgG) bovina Total. En diciembre de 2016 se comenzó a trabajar en el Laboratorio de la UNVM con la puesta a punto de esta técnica Inmunológica a los fines de determinar la cinética de la respuesta inmunológica de los bovinos vacunados.

Para el ensayo, se sensibilizaron placas de fondo plano de alta absorción de 96 pocillos con un Ac anti IgG bovino (Ac de captura) a los fines de que la IgG presente en la muestra de suero bovino forme con aquel un complejo. Su presencia se detecta con la adición de un segundo Ac anti IgG bovino marcado con peroxidasa (Ac de detección), que se revela con un kit enzimático adecuado. Posteriormente, se leen las DO de cada uno de los pocillos a 450 nm mediante un lector de ELISA.

Para la puesta a punto de esta técnica, se realizaron diferentes instancias de prueba con modificaciones sobre las variables del ensayo a los fines de encontrar curvas de calibración que nos permitan trabajar con diluciones de suero y de calostro bovino.

Se probaron dos tipos de buffer: buffer fosfato pH 6,5 y buffer carbonato pH 9,5. El standard se probó en diferentes diluciones al igual que los Anticuerpos (Ac) tanto de captura como de detección. Se trabajó con dos diferentes Acs de detección y dos estándares comerciales. Se evaluó además la diferencia de generar bloqueo con leche descremada bovina o con leche de

cabra. Se modificaron y ajustaron los tiempos de incubación y las repeticiones de lavados.

Se realizaron 5 instancias de prueba evaluando las distintas variables de la técnica, lo que permitió definir algunos parámetros, pero es preciso continuar para establecer el protocolo definitivo de trabajo que se aplicará a partir de junio, momento en el cual se dispondrá de todas las muestras de suero y calostro bovino.

En líneas generales se presenta el inconveniente de que los blancos de muestra evidencian DO mayores a lo esperado, probablemente debido a una falla en el Ac de captura, por lo que se seguirá trabajando hasta lograr blancos de reacción que permitan garantizar buenos resultados, con miras a obtener una curva de calibración con estándar de IgG bovina que permita determinar las concentraciones tanto en diluciones de suero como de calostro bovino.

En cuanto a otras técnicas realizadas en el laboratorio, en el marco de este proyecto se desarrolla una beca EVC CIN: "Estudio de la relación de la calidad del calostro y la morbi-mortalidad neonatal en terneros, en un tambo de la cuenca lechera de Villa María", para lo cual se trabajó con 20 hembras bovinas sanas cercanas al parto del tambo Marcatto, a los fines de evaluar la Transferencia de Inmunidad Pasiva al ternero, proceso de alta importancia para el desarrollo de la cría y estrechamente relacionado a la calidad y contenido de IgG en calostro.

Las muestras de suero bovino de las vacas preñadas fueron sometidas al Test de Glutaraldehído para estimar la concentración de Inmunoglobulinas, técnica semicuantitativa que clasifica los sueros en Normogamaglobulinémicos e Hipogamaglobulinémicos; y las muestras de calostro recolectadas luego del parto fueron analizadas mediante la técnica de Refractometría Digital, correspondiendo valores iguales o superiores a 22° Brix a calostros de buena calidad.

Pudo observarse que las madres que presentaron sueros normogamaglobulinémicos, produjeron calostros de alta calidad, mientras que las que presentaron sueros hipogamaglobulinémicos no necesariamente producen calostros de mala calidad. En este sentido, pensamos que estas técnicas

semicuantitativas no serían suficientemente confiables para estimar la calidad de calostro.

Por último, en base a lo observado durante el desarrollo del proyecto de calostro 2014 -2015 en cuanto a la variabilidad en el aspecto de las muestras de calostro recolectadas (examen organoléptico), se realizó nuevamente el análisis y se graficó la distribución de las características de los calostros recolectados, con la finalidad de aclarar que no necesariamente el aspecto del calostro se relaciona con la calidad del mismo.

Producción científica relevante

Presentaciones en eventos científicos

"Determinación de inmunoglobulina G en suero y calostro bovino en un tambo de la cuenca lechera de Villa María" Sodero Sonia; Porporatto Carina; Rampone Alberto; Álvarez Emanuel; Delgado Silvina; Manfredi María José - Presentado en las IX Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria - AAIV 2016, organizado por la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria - Noviembre de 2016 – CABA. El trabajo fue evaluado y aprobado por un Comité Científico y fue publicado en el Libro de Resúmenes de la Jornada.