



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACIÓN DE IgA SECRETORA EN
CALOSTRO Y LECHE DE CERDAS A
DIFERENTES NÚMEROS DE PARTOS A
PARTIR DE UN REBROTE DE DIARREA
EPIDÉMICA PORCINA**

TESIS

Que para obtener el título de
Médica Veterinaria Zootecnista

PRESENTA

Selene Fernández Hernández

ASESORES DE TESIS

Mc. Rolando Beltrán Figueroa

Dra. María Elena Trujillo Ortega



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mis padres por darme su amor, confianza, los mejores consejos, paciencia y por haberme forjado como la persona que soy hoy en día, gracias a eso es que he podido lograr cada una de mis metas.

A Ángel Granados gracias por tu cariño, comprensión, por ser mi compañero y darme tu apoyo durante este proyecto, por ayudarme a levantarme en cada tropiezo, dándome la fuerza para seguir adelante y guiarme para ser una mejor persona.

Y especialmente a Camila (mi gordis) esa pequeña de cuatro patas que a pesar de no tener el mismo lenguaje siempre me comprendías, en un mal día me recibías con esa carita y cuerpecito ansioso para alegrarme, sobre todo por ser la base de mi inspiración para lograr este cometido y aunque hoy en día no te encuentras conmigo sé que siempre estarás presente formando parte importante en mi vida. Por ultimo sin menos importancia a cada uno de esos caninos Joy, Goyo, Tobías, Lulú y Chester que han formado o forman parte de mi familia y que al igual son parte de mi inspiración para el término de esta etapa y como persona.

Agradecimientos

A la Dra. María Elena Trujillo Ortega y al M en C Rolando Beltrán Figueroa por brindarme la oportunidad de pertenecer a este proyecto, trabajar con ustedes compartiendo su conocimiento y experiencia.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y a la M en C Montserrat Elemei García Hernández por brindarme transmitir su conocimiento y guiarme en este proyecto, por darme su confianza y amistad.

A mis amigos del CEIEPP Gabriela, Carlos, Mariana Frida, Rodrigo, Cynthia etc., por darme su amistad, su apoyo y hacer más divertidos los días durante la estancia en el centro. Principalmente a Claudia que además compartió conmigo esta aventura y me brindo sus conocimientos.

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo del proyecto PAPIIT No. 221218; Análisis diferencial de proteínas expresadas en cultivo celular con diferentes aislados del virus de la diarrea epidémica porcina obtenidos en México y su relación con cambios en antigenicidad.

Contenido

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Diarrea epidémica porcina y su impacto en la historia	2
1.1.1. Distribución del VDEP en México	3
1.2. Descripción del agente etiológico	3
1.3. Signos y lesiones	5
1.4. Diagnóstico	7
1.5. Prevención y control	8
1.5.1. Limpieza y buenas prácticas	8
1.5.2. Exposición oral de virus vivo y su problemática	8
1.5.3. Inoculo a partir de aislamiento viral	10
1.5.4. Vacunación	11
1.6. La importancia de la inmunidad	12
1.6.1. Inmunoglobulinas	12
1.6.1.1. IgA	12
1.6.1.2. Absorción	13
1.6.2. Producción láctea de la cerda	13
1.6.3. Efecto de la paridad en las inmunoglobulinas	15
1.6.4. Importancia de la producción de la IgA e SIgA	16
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVO GENERAL	19
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Muestreo	19
6.2. Procesamiento de las muestras en el laboratorio	21
6.3. Cultivo del VDEP	22
6.4. Concentración del virus por precipitación	22
6.5. Titulación del virus concentrado	23
6.6. Cuantificación de proteínas virales	23
6.7. Ensayo de ELISA para IgA	24
6.8. Análisis estadístico	25

7. RESULTADOS	25
7.1. Ensayo de ELISA para IgA	25
7.2. Análisis estadístico	28
7.2.1. Resultados de IgA por número de parto	28
7.2.2. Resultados de IgA por días de lactancia	30
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIÓN	35
10. ANEXOS	36
10.1. Anexo 1. Abreviaturas	36
10.2. Anexo 2. Índice de figuras	39
10.3. Anexo 3. Índice de cuadros	40
10.4. Anexo 4. Índice de gráficas	41
10.5. Anexo 5. Soluciones utilizadas para la realización de la ELISA	42
11. REFERENCIAS	43

RESUMEN

FERNÁNDEZ HERNÁNDEZ SELENE. **DETERMINACIÓN DE IgA EN CALOSTRO Y LECHE DE CERDAS A DIFERENTES NÚMEROS DE PARTOS A PARTIR DE UN REBROTE DE DIARREA EPIDÉMICA PORCINA** (BAJO LA DIRECCIÓN DE: MC. ROLANDO BELTRÁN FIGUEROA Y DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA).

El virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP), se caracteriza por causar diarrea, vómito y deshidratación en cerdos, principalmente en lechones, llegando a presentar mortalidades del 100%. Debido al tipo de placentación epiteliochorial que presenta el cerdo, los lechones son susceptibles a muchas infecciones en las primeras semanas de vida, por lo que es fundamental estimular la inmunidad lactogénica por medio de inmunoglobulinas que son secretadas en calostro y leche. Los recientes brotes de diarrea epidémica porcina han representado un fuerte impacto económico para las producciones de cerdos. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de IgA en calostro y leche en cerdas inmunizadas en relación con el número de parto y días de lactancia por medio de una prueba de ELISA indirecta. En este estudio, las cerdas primerizas presentaron mayores niveles de IgA en calostro y leche que las cerdas multíparas (DO 0.406), destacando el Parto 2 y el Parto 4, en el que se observa que descienden (0.249 y 0.316 respectivamente y $P < 0.05$). El compartamiento de las IgA respecto a los días presenta su nivel más alto en el día 0 (0.388) y va disminuyendo a lo largo de los días de la lactancia. No existió evidencia estadísticamente significativa respecto al día de la lactancia, aunque existe una correlación significativa del 32% entre niveles de IgA y días de lactancia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diarrea epidémica porcina y su impacto en la historia

El virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) fue reportado por primera vez en 1971 en Europa como una enfermedad entérica aguda, altamente contagiosa y grave que afecta a los cerdos, pero fue hasta 1978 en Bélgica que fue identificado el agente causal y clasificado dentro de la familia *Coronaviridae* (Bjuström et al., 2018 y Vlasova et al., 2014).

En Asia se detectó por primera vez en Japón en 1982, extendiéndose a varios países vecinos, incluidos Corea, China, Tailandia, Taiwán y Vietnam. A diferencia de Europa el impacto fue clínicamente más grave, lo que llevó a la comercialización de las primeras vacunas inactivadas y atenuadas (Crawford et al., 2015 y Diel et al., 2016). Pero fue hasta 2010 que los brotes masivos se reportaron en China, caracterizados por presentar una tasa de morbilidad entre 80% y el 100%, la tasa de mortalidad fue del 50% al 90% en lechones lactantes (Vlasova et al., 2014).

En Estados Unidos la enfermedad se reportó por primera vez en abril del 2013 y se diseminó rápidamente por todo el país, causando la muerte de más de 7 millones de lechones neonatos lo cual provocó que en 2014, una pérdida anual de \$900 millones a \$1.8 billones de dólares para los productores porcinos estadounidenses. Desde su introducción a los Estados Unidos se extendió a México, Canadá, Caribe, América Central y Sudamérica (Figura 1) (Bjuström et al., 2018; Joshi et al., 2018 y Langel et al., 2016).

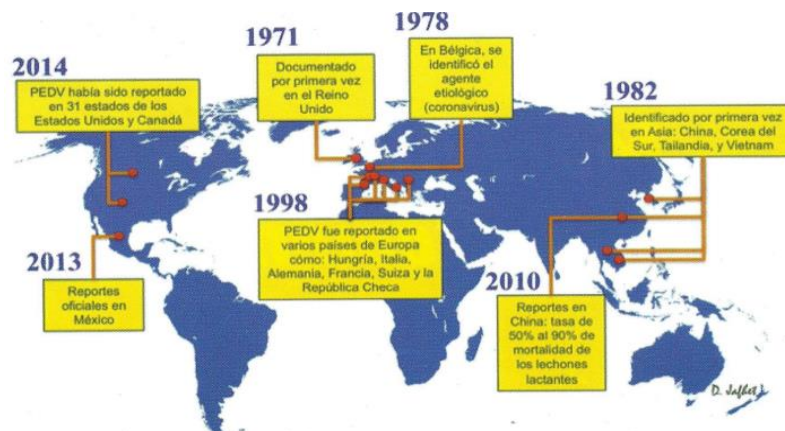


Figura 1. Mapa del tiempo y diseminación del VDEP (Bolaños et al., 2016).

1.1.1. Distribución del VDEP en México

El primer caso en México se presentó en julio del 2013 en la región de Degollado, Jalisco y La Piedad, Michoacán (Figura 2). Para febrero del 2014 se confirmó la presencia del VDEP a través de la prueba de RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR). El 22 de mayo de 2014 el Servicio Nacional de Salud, Seguridad Alimentaria y Calidad de los Alimentos (SENASICA) realizó el reporte oficial en los estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California, Colima, Distrito Federal, Guerrero, Puebla, Veracruz, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa y Sonora. Hoy en día el VDEP es considerado un agente endémico y de distribución mundial (Bolaños et al., 2016 y OIE, 2014).



Figura 2. Mapa con la localización del primer foco de DEP en 2013 (OIE, 2014).

1.2. Descripción del agente etiológico

La diarrea epidémica porcina (DEP) es causada por un virus *Alphacoronavirus*, dentro del orden *Nidoviridales*, pertenece a la familia *Coronaviridae*, que está dividida en *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Siendo responsables de enfermedades respiratorias, entéricas, hepáticas y neurológicas en diversos animales (Woo et al., 2012). Se han identificado cuatro coronavirus porcinos (CoV): virus de la gastroenteritis transmisible (VGET); el coronavirus respiratorio porcino (VCRP); virus de la

diarrea epidémica porcina (VDEP); y el virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina (VEH) (Zimmerman et al., 2012).

De acuerdo a recientes análisis filogenético de genomas de VDEP, se dividen en dos genotipos denominados el grupo pandémico o S INDEL que es altamente virulento (39 cepas) y el grupo clásico o INDEL (10 cepas), en donde se identificó que son antigénicamente y genéticamente distintos (Figura 3) (Sun et al., 2015). Sin embargo el porcentaje de nucleótidos de los genomas del VDEP entre los genotipos es de 96 a 98% de similitud. La tasa de mutación es relativamente baja 6.2×10^{-4} sustituciones/sitio/año similar al VGET y otros coronavirus animales (Jarvis et al., 2016).

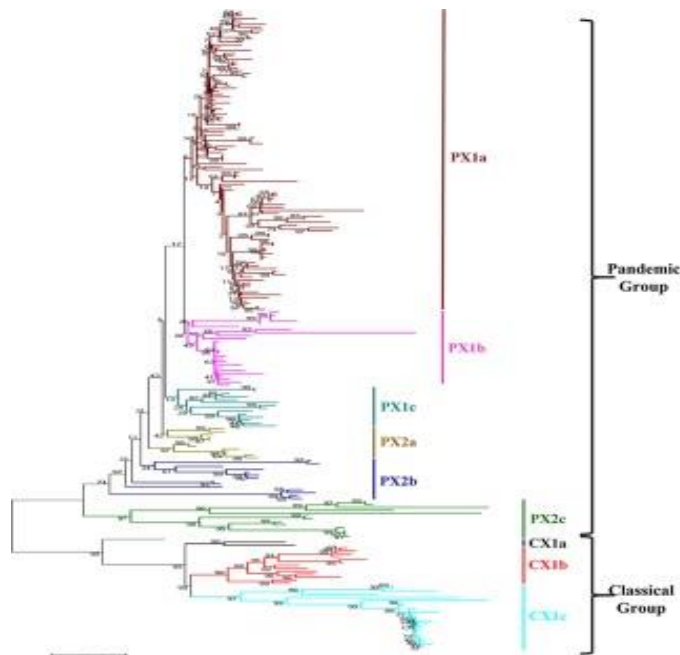


Figura 3. Árbol filogenético de las cepas del VDEP correspondientes a los dos grupos: pandémicas y clásicas (Sun et al., 2015).

El VDEP es un virus envuelto con ARN de cadena sencilla en sentido positivo, tiene una longitud de 28 kb. Contiene una región no traducida (UTR) y siete marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF1 codifica para una poliproteína replicativa (Rep), está dividida en ORF1a y ORF1b que codifica para proteínas no estructurales que dirigen la replicación y la transcripción del genoma viral. Seguidas por los ORF que codifican para proteínas estructurales: proteína spike

(S), proteína accesoria (ORF3), proteína de la envoltura (E), proteína de la membrana (M) y proteína de la nucleocápside (N) (Figura 4) (Duarte y Laude, 1994 y Piñeros y Mogollón, 2015).

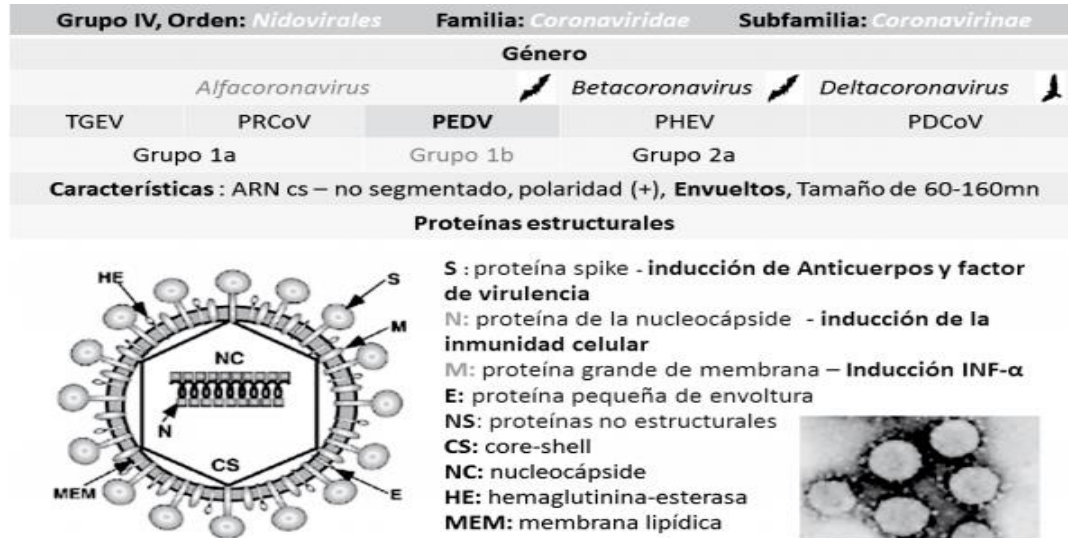


Figura 4. Esquema de las características estructurales del genoma de los coronavirus (Piñeros y Mogollón, 2015).

1.3. Signos y lesiones

La transmisión del VDEP puede darse de manera directa por vía fecal-oral, o indirecta por fómites como ropa, calzado y camiones de transporte contaminados con vómito o heces que promueven su propagación, o reservorios como cerdos adultos que presentaron una enfermedad subclínica. Pero la gran importancia de la transmisión de este virus radica en que puede diseminarse por vía aérea, algunos estudios han identificado el movimiento de partículas virales o material genético hasta 16 km alrededor de granjas (Crawford et al., 2015 y Hernández, 2016). Por otra parte, se ha identificado genoma viral por medio de la PCR en leche de cerdas lactantes afectadas por el VDEP sin tratamiento, lo que incluso sugiere una transmisión a través de la leche de la cerda de manera vertical (Jung y Saif, 2015).

La replicación del VDEP ocurre en el citoplasma de las células epiteliales de las vellosidades a lo largo del intestino delgado, ocasionando una degeneración de los

enterocitos que con lleva a la atrofia de las vellosidades. Esto producirá una diarrea acuosa, vómitos, anorexia, deshidratación y emaciación en cerdos de cualquier edad, afectando principalmente a lechones llegando a presentar tasas de hasta el 100% en recién nacidos y alta morbilidad, pero baja mortalidad en cerdos destetados y en la etapa de engorda (Figura 5 A). También reportan que presenta un impacto en el rendimiento reproductivo en cerdas jóvenes y cerdas gestantes con la disminución en el porcentaje de fertilidad del 12,6% y aumentando el porcentaje de abortos del 1,3% y momificaciones del 2,0% (Poonsuk et al., 2016).

La lesiones macroscópicas que se observan son: estómago distendido lleno de leche cuajada, intestino con contenido acuoso amarillento, las paredes de la mucosa intestinal adelgazadas (aspecto trasparente), linfomegalia mesentérica (agrandamiento de los ganglios mesentéricos) (Figura 5 B). Microscópicamente, se observa vacuolización citoplasmática y exfoliación de enterocitos del intestino delgado con acortamiento de vellosidades superficiales, atrofia de las vellosidades reducidas o ausentes (Duarte y Laude, 1994 y Lv et al., 2016).

Lo cual explica que el acortamiento de vellosidades intestinales se asocia con la etapa de infección o proceso de enfermedad. Y la pérdida masiva de enterocitos da lugar a la mala absorción, diarrea acusa y deshidratación en lechones (Lv et al., 2016).



Figura 5. (A) Lechón con diarrea amarilla. (B) Lesiones encontradas en lechón lactante muerto por el VDEP (Trujillo-Ortega et al., 2016).

1.4. Diagnóstico

Los diferentes métodos para el diagnóstico de DEP principalmente se basan en los signos y lesiones observadas en los cerdos, sin embargo, el VDEP no se distingue de otras enfermedades gastroentéricas de los cerdos por lo tanto requiere de un diagnóstico diferencial.

Los métodos diagnósticos se pueden dividir en diferentes categorías: virológicos, serológicos y moleculares (Diel et al., 2016 y Lv et al., 2016).

Las pruebas serológicas detectan anticuerpos inducidos en respuesta a la infección en suero, calostro, leche, heces y fluido oral. Sirven para determinar si la población tuvo exposición previa con el virus, evaluación y estrategias de vacunación, evaluar la inmunidad de las cerdas. Los procedimientos más comunes son el ensayo de inmunofluorescencia (IF), los ensayos de neutralización de virus, el ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Diel et al., 2016).

Dentro de los métodos serológicos, los estuches de ensayos inmunocromatográficos son una opción para el diagnóstico diferencial rápido en granja es una prueba con alta sensibilidad pero baja especificidad, los resultados se obtienen en promedio en 10 minutos, el fundamento de la prueba se basan en el uso de anticuerpos monoclonales contra el VDEP, VGET y Rotavirus (Figura 6).



Figura 6. Kit de ensayos inmunocromatográficos PED Ag Test Kit de Bionote®.

El diagnóstico molecular se basa en la detección del ácido nucleico viral ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) (Diel et al., 2016).

Los métodos virológicos se basan en el aislamiento viral, confirmando la presencia del virus mediante la identificación de proteínas virales; a través del ensayo de inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHQ), o el genoma viral por RT-PCR.

1.5. Prevención y control

1.5.1. Limpieza y buenas prácticas

La implementación de protocolos de alta bioseguridad es eficaz para prevenir la introducción y propagación del VDEP. Se ha demostrado la eficacia de la práctica de “todo dentro, todo fuera” para romper el ciclo de transmisión dentro de la granja (OIE, 2014).

Es importante que dentro del protocolo se incluyan programas de limpieza y desinfección para instalaciones, material y transportes de animales como de alimento, limpiando las instalaciones removiendo excretas, lavados con alta presión y con el uso de detergentes enjuagando evitando residuos y desinfección (Bolaños et al., 2016).

También se debe considerar que un brote de diarrea epidémica porcina existen manejos zootécnicos que son relevantes para su control como:

- Ventilación y temperatura adecuada en salas de maternidad
- Evitar manejos de muesqueo o descolmillado
- Evitar cerdas nodrizas, adopciones y donaciones

1.5.2. Exposición oral de virus vivo y su problemática

La exposición oral de virus vivo o Feedback (retroalimentación) es un método por el cual se suministra vía oral a las hembras pie de cría, material intestinal infectado

con el VDEP, es decir, diarrea (heces) y tejidos intestinales recolectados de lechones lactantes entre 12 y 18 horas de haber iniciado la sintología clínica ya que es el momento en el cual existe la mayor carga viral en la mucosa intestinal (Figura 7) (Langel et al., 2016 y Piñeros y Mogollón, 2015).



*Figura 7. Elaboración del licuado para la exposición oral de virus vivo de DEP
(Foto por Rolando Beltrán).*

Esta estrategia tiene como objetivo que los individuos que fueron previamente expuestos intencionalmente a productos infecciosos ocasionen la enfermedad en una etapa y nivel en que la salud general no se ve comprometida, en este caso a las hembras de pie de cría, para desarrollar inmunidad en las cerdas que será transferida a sus lechones por medio del calostro y la leche. Estos anticuerpos pueden ayudar a prevenir la unión del virus a los receptores de superficie (Langel et al., 2016, Hill et al., 2014 y Clement et al., 2016).

Langel et al, 2016 observó un éxito relativo en los casos que optaron por este protocolo de exposición ya que la incidencia de la enfermedad clínica disminuyó dramáticamente, pero los resultados no fueron 100% efectivos. La exposición oral puede fallar por razones como: la dosis del virus es demasiado baja, el virus no es infeccioso debido a condiciones inadecuadas de la muestra o almacenamiento, si

los cerdos presentan inmunidad preexistente se bloquea la replicación viral en el intestino (Langel et al., 2016).

Además, se requiere conocer el estatus sanitario de las cerdas para identificar la posibilidad o riesgo de transmisión de otros patógenos dentro del hato, y la posible propagación del VDEP a granjas no infectadas. Es importante previamente tener un diagnóstico por pruebas de laboratorio positivas al VDEP, para tener precaución con el suministro de macerados (vísceras, pulmón, ganglio linfático, bazo) de lechones que presenten Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo (PRRS), enfermedad de Aujeszky o Peste porcina clásica (PPC), debido al alto riesgo que esto representa para la salud de los cerdos. Este tipo de tratamiento no cuantifica la cantidad de virus administrado ya que en la mayoría de los casos en los que se emplea el feedback, no se realiza ningún tipo de titulación o cuantificación viral (Clement et al., 2016 y Piñeros y Mogollón, 2015).

1.5.3. Inoculo a partir de aislamiento viral

Actualmente hay varios estudios que han experimentado otro tipo de profilaxis, la cual consiste en someter a los individuos afectados a un inóculo por vía oral obtenido a partir del aislamiento del VDEP. El aislamiento viral se obtiene de órganos tales como intestino, pulmón, estomago de lechones afectados por el VDEP, propagado en cultivo celular Vero, este cultivo se titula, se diluye y administra vía oral a los animales con diferentes vehículos (Suzuki et al., 2016; Joshi et al., 2018 y Poonsuk et al., 2016).

Los resultados obtenidos mediante este tipo de profilaxis han determinado que la respuesta de las cerdas y los lechones después de su inoculación directa, se detectó la respuesta de IgG, IgA y su capacidad neutralizante específica de VDEP en aquellas cerdas que recibieron el tratamiento y en lechones nacidos de las cerdas inmunizadas. En el caso de los lechones nacidos de cerdas inmunizadas mostraron una mejor termorregulación, mayores tasas de crecimiento, una menor morbilidad y mortalidad en comparación con los grupos control. Lo que demuestra la transferencia de anticuerpos a través del calostro y la leche para controlar la enfermedad (Joshi et al., 2018 y Poonsuk et al., 2016).

1.5.4. Vacunación

La protección que proporciona el VDEP después de un brote es muy poca, debido a esto es posible que muchas granjas observen rebrotes clínicos después de un tiempo. Este punto favorece la utilización de una vacuna, ya que la granja debe estar previamente expuesta al virus (Bolaños et al., 2016).

En México son comercializadas dos biológicos a partir del 2016. El primer método de inmunización fue desarrollado por Harrisvaccines™ es una vacuna de subunidad inactivada de VDEP, que contiene completa la proteína S. La indicación para su aplicación es 1 dosis de 1ml vía intramuscular (IM) en cerdas gestantes (Figura 8A). En el caso de México quien comercializó esta vacuna fueron los laboratorios MSD® (Figura 8B).

La segunda vacuna es por parte de Zoetis, Inc (Florham Park, Nueva Jersey, Informe de estudio nº B826R-US-13-258, Zoetis Inc.) una vacuna de VDEP inactivada y con adyuvante. Se indica para cerdas gestantes 2 dosis de 2ml cada una administradas por vía IM, la primera dosis administrada 5 semanas antes del parto y la segunda dosis debe administrarse 2 semanas antes del parto (Figura 8C) (Zoetis, 2016).

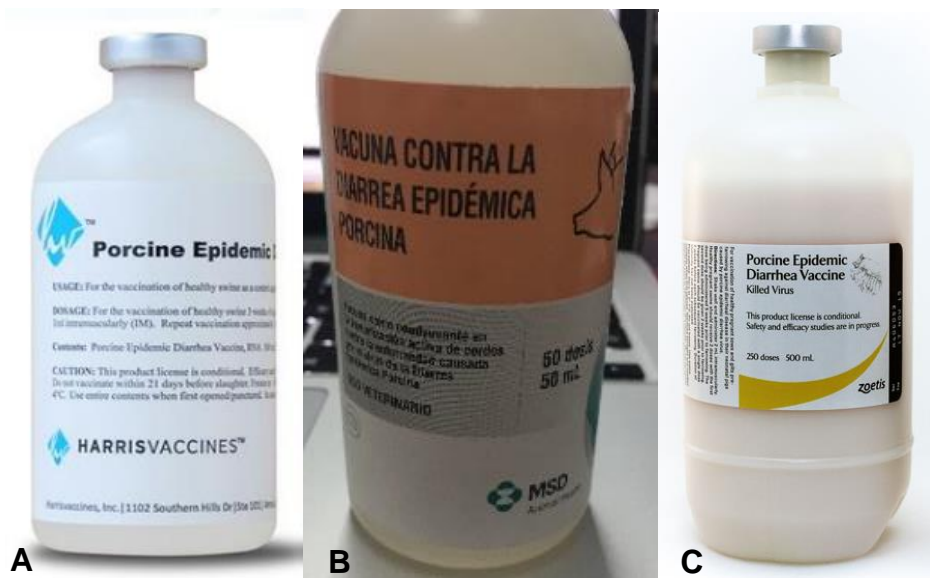


Figura 8. Vacunas contra DEP. (A) vacuna de Harrisvaccines™. (B) vacuna comercializada en México por MSD®. (C) vacuna de Zoetis® (Zoetis, 2016).

1.6. La importancia de la inmunidad

Debido al tipo de placentación epiteliocorial que presenta el cerdo, con una naturaleza impermeable a moléculas de inmunoglobulina, los lechones son susceptibles a muchas infecciones en las primeras semanas de vida (Joshi et al., 2018). Por lo tanto, el lechón recién nacido depende completamente del suministro de nutrientes por medio del calostro y la leche (Theil y Hurley, 2016).

1.6.1. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por los linfocitos B (células plasmáticas). Se encuentran en el suero y fluidos biológicos de todos los mamíferos. Son las mediadoras de la respuesta humoral.

Se han descrito cinco tipos de inmunoglobulinas, denominadas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. La IgG es la más abundante en el suero y se produce en grandes cantidades en las respuestas secundarias, la IgM produce una respuesta humoral primaria y es fijadora del complemento. La IgA predominante en secreciones e impide el ingreso de microorganismos. La IgD localizada en la superficie de linfocitos inmaduros. Por último IgE presenta la concentración más baja y se asocia a reacciones de hipersensibilidad (Tizard, 2009).

1.6.1.1. IgA

Es una molécula de cuatro cadenas en forma de Y, es sintetizada y secretada por células plasmáticas localizadas bajo las superficies corporales, puede pasar a través de las células epiteliales hacia secreciones externas o difundirse en el torrente sanguíneo. Es predominante en secreciones como saliva, líquido intestinal, leche, calostro, y orina que protegen a las superficies corporales (Tizard, 2009).

Los dímeros de IgA se une al componente secretor (pIgR) para formar una IgA secretora (SIgA), protegiendo a la IgA de la digestión de las proteasas intestinales (Figura 9).

Su importancia es principalmente la protección que brinda neutralización de virus y puede evitar la replicación viral. El modo principal de acción de la IgA consiste en evitar la adhesión a las superficies corporales (Tizard, 2009).

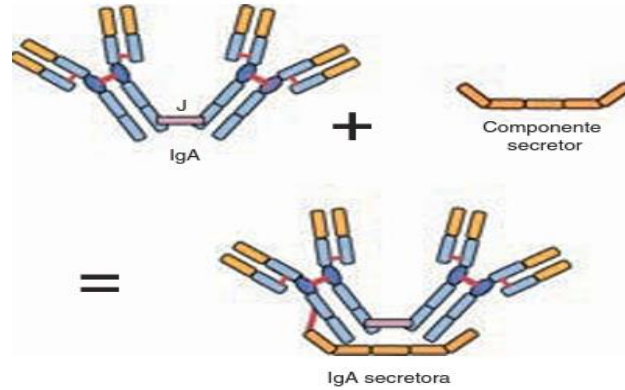


Figura 9. Representación esquemática de la inmunoglobulina IgA e SIgA (Tizard, 2009).

1.6.1.2. Absorción

Después del nacimiento los neonatos ingieren calostro, al tener una actividad de proteasa baja y con los inhibidores de tripsina presentes en calostro permiten que las proteínas no se degraden y lleguen intactas al intestino delgado y sean absorbidas. La permeabilidad intestinal va a permitir una absorción elevada en las primeras 6 horas después del nacimiento y disminuye a las 24 horas.

En cerdos la absorción es selectiva, la IgG e IgM se absorben en su mayoría, mientras que la IgA permanece en el intestino. La cantidad de IgA en el intestino en un lechón a las 3 semanas de edad es de 1.6 g al día a través de la leche de su madre (Tizard, 2009).

1.6.2. Producción láctea de la cerda

El aporte de nutrientes al lechón se va a dar por medio de secreciones mamarias que son acumuladas durante las últimas semanas de gestación, las cuales durante las primeras 24 horas después de iniciado el parto serán ricas en proteínas y se le denomina calostro, seguida de la leche de transición en el periodo de 24 y 96 horas después del parto, y por último la leche madura. Esta producción puede variar en las cerdas por diferentes factores como el tamaño de

la camada, el tamaño de los lechones, la frecuencia de lactancia, la etapa de lactancia, la edad de la cerda, la condición corporal, el número de parto y el comportamiento materno (Tizard, 2009 y Theil y Hurley, 2016).

La descripción de la curva de lactancia muestra que la producción diaria de leche aumenta durante las dos primeras semanas de lactancia alcanzando un máximo nivel el día 17 aproximadamente, se puede ver afectado por el número de lechones que amamanta. El rendimiento que presenta es de aproximadamente 13-15 kg/día al máximo de lactancia en cerdas prolíficas con 14 lechones. Siguiendo un patrón similar a la curva de lactancia, la producción de proteínas alcanza un máximo de 700 a 800 g secretada diariamente, por otra parte la lactosa aumenta su concentración de 5.2% a 5.5%, mientras que la grasa disminuye de 8.0% a 6.3% desde el día 2 al 28.

El contenido más importante del calostro y la leche son las inmunoglobulinas que son proteínas que brindan protección al neonato. Durante o inmediatamente después del parto se presentan concentraciones más altas de inmunoglobulinas, en promedio 65 g/L de IgG total, 13 g/L de IgA y 8 g/L de IgM aproximadamente, permanecen por 6 horas post parto y disminuyen entre un 30% a 45% a las 12 horas y continúan disminuyendo en los próximos días. En la leche madura las concentraciones son aproximadamente de IgG 1 g/L e IgM 1.6 g/L. Sin embargo la principal inmunoglobulina en la leche madura de cerda es la IgA con una concentración de 4 g/L aproximadamente (Figura 10) (Theil y Hurley, 2016).

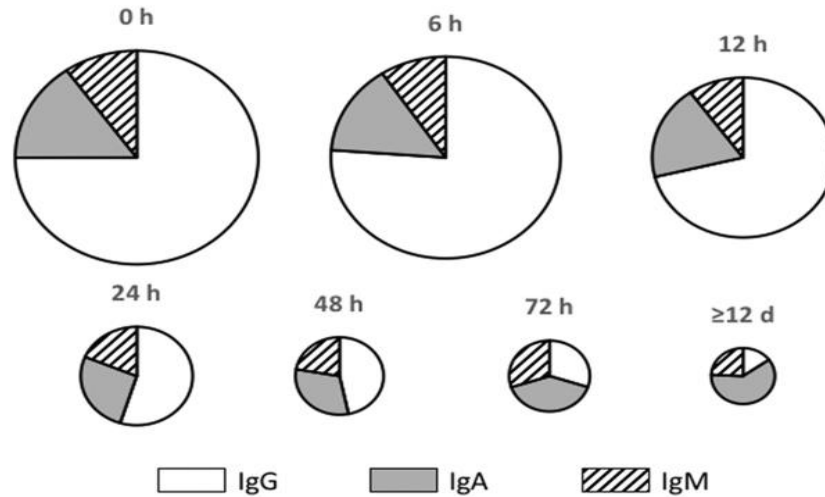


Figura 10. Proporciones de las inmunoglobulinas secretadas desde las primeras 6 horas hasta los 12 días post parto (Theil y Hurley, 2016).

1.6.3. Efecto de la paridad en las inmunoglobulinas

La concentración de inmunoglobulinas (Ig) en suero de mamíferos es un reflejo de experiencia inmunológica, edad, estado fisiológico, cepa o raza. El estado fisiológico como la gestación o lactancia también puede influir en los niveles de Ig en suero (Klobasa et al., 1985). La concentración de Ig en el suero de las cerdas aumenta con la edad, la concentración de Ig que circula es importante ya que se transporta al calostro y la leche. Las IgA se transportan a la glándula mamaria desde los tejidos linfoides asociados al intestino.

Se han reportado que el efecto del número de parto es el efecto más influyente en las concentraciones de IgA e IgG en calostro, de acuerdo a lo reportado por Carney-Hinkle et al., 2012, las cerdas de Parto 1 a Parto 3 presentan menor concentración de Ig se respecto a Parto 4. Sin embargo, Klobasa et al., 1986 reportaron que la paridad afectaba las concentraciones de Ig, pero no podían definir un aumento o disminución en función del número de paridad. Las razones de estas diferencias podrían deberse a que actualmente contamos con métodos más sensibles para la cuantificación de Ig. (Hinkle, 2012 y Klobasa et al., 1986)

1.6.4. Importancia de la producción de la IgA e SIgA

Debido al tipo de placentación que presenta la cerda, el lechón al nacer es agammaglobulinémico, por lo que los cerdos neonatos son capaces de desarrollar una respuesta inmune, a partir de las 2 y 5 semanas de edad el lechón, donde comienza a sintetizar activamente las inmunoglobulinas. Por lo tanto, existe una brecha potencial en la protección inmune entre el momento en que la inmunidad pasiva adquirida por la cerda se desvanece y comienza la inmunidad activa, lo que hace dependientes de las inmunoglobulinas del calostro para una protección inmunitaria inicial y los deja muy susceptible a agentes infecciosos (Langel et al., 2016 y Carney-Hinkle et al., 2013).

Para el caso de la DEP crear una inmunidad lactogénica efectiva es la clave primordial y más importante para el control de la enfermedad en los lechones, debido a que es una infección localizada principalmente en el intestino por lo tanto las estrategias efectivas deben centrarse en inducir inmunidad en la mucosa intestinal (Langel et al., 2016).

El tratamiento de la enfermedad dirigido a estimular la inmunidad lactogénica se aplica mediante la estimulación continua de inmunoglobulinas secretadas en el calostro, las cuales se transportaran a través del epitelio intestinal del lechón en la primeras 24 a 48 horas después del nacimiento, la inmunoglobulina predominante es IgG que según Bjustrom et al., 2018 mejora la supervivencia de lechones infectados. Los siguientes 2 a 3 días, en la transición de calostro a leche, la IgA se vuelve dominante y persiste durante toda la lactancia, es estable a la degradación proteolítica en el intestino (Joshi et al., 2018) y por su parte brinda protección al tracto intestinal de los lechones (Bjustrom et al., 2018 y Langel et al., 2016).

Para que la producción de SIgA en glándula mamaria se lleve cabo se requiere de una replicación viral que estimule el desarrollo de plasmoblastos de IgA (Poonsuk et al., 2016 y Carney-Hinkle et al., 2013). Por ello es importante que los linfocitos proporcionen una vigilancia contra patógenos que circulan continuamente por todo el organismo, entren a la sangre y tejidos linfoides. Los linfocitos migran dentro y fuera de los órganos linfoides secundarios cruzando vasos sanguíneos

especializados conocidos como vénulas endoteliales altas. De acuerdo con Langel et al. 2016, se estima que más del 80 % de las células secretoras de anticuerpos SIgA están localizadas en los tejidos linfoides asociados al intestino, por lo tanto cuando se da una estimulación en el intestino se inician las señales de tráfico específicas para la migración eficiente de células B de la mucosa del intestino en cerdos, a la circulación y el tráfico a otros sitios como glándula mamaria (Langel et al., 2016).

Posterior a una infección de manera natural o una vacunación oral, se inicia el eje intestino-mamario-SIgA en el intestino los plasmablastos viajan a la glándula mamaria para suministrar inmunidad específica a través de las secreciones mamarias. La SIgA es la más abundante en secreciones intestinales, una vez en el lumen, SIgA proporciona inmunoprotección y contribuye a la homeostasis intestinal neutralizando la replicación viral (Figura 11) (Langel et al., 2016).

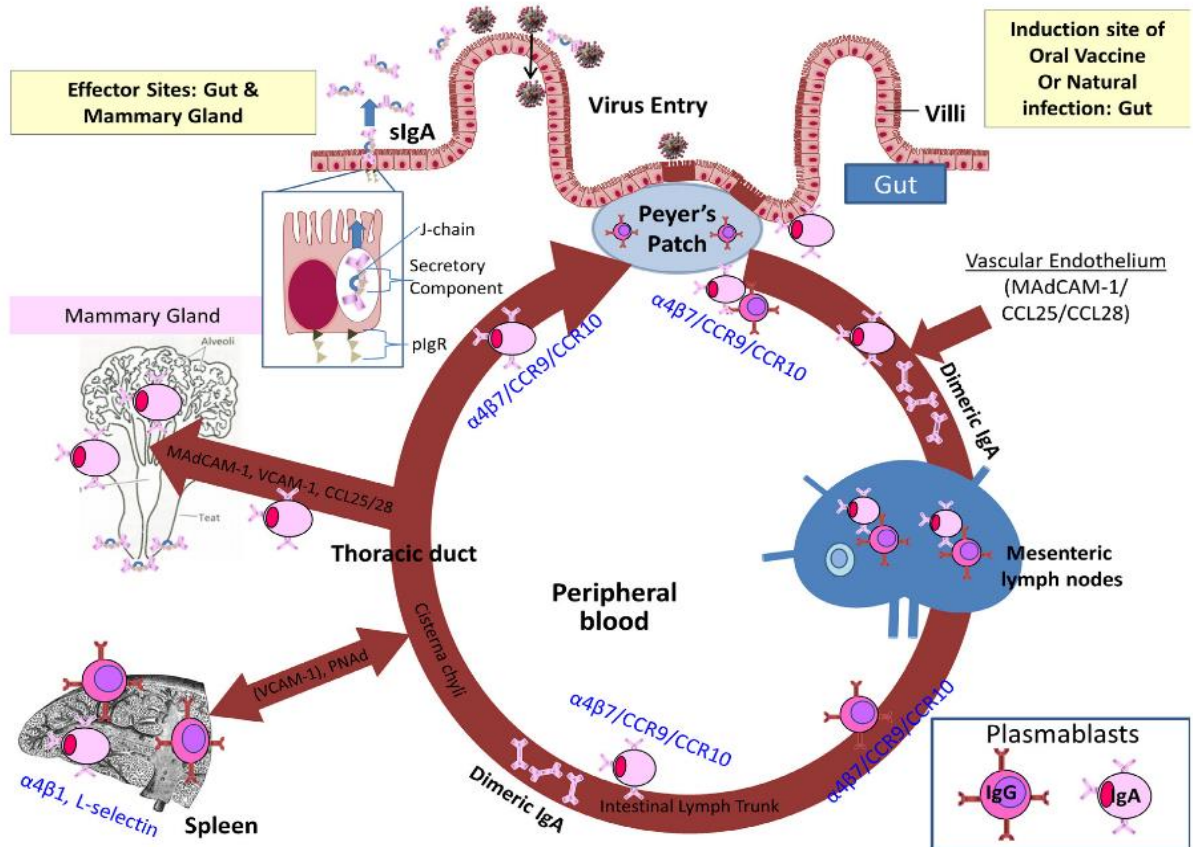


Figura 11. Esquema para representar el eje intestino-mamario-SIgA (Langel et al., 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

Los recientes brotes de diarrea epidémica porcina han representado un fuerte impacto económico para las producciones de cerdos, los métodos de prevención y control de la enfermedad hacen necesario explorar la eficacia de los métodos de inmunización. Por lo tanto, el determinar los niveles de IgA en calostro y leche en cerdas primerizas y múltiparas permitirá evaluar la inmunidad lactogénica.

3. HIPÓTESIS

Las cerdas primerizas inmunizadas vía oral con el virus aislado de DEP del brote 2014 en el CEIEPP presentarán menores niveles de IgA a lo largo de la lactancia en comparación con hembras multíparas inmunizadas.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración de IgA en calostro y leche de cerdas en diferentes números de parto por medio de la prueba de ELISA indirecta, para obtener la concentración de anticuerpos y su relación con el número de parto.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar la prueba de ELISA indirecta para determinar las concentraciones de IgA.
- Medir IgA en calostro y leche a diferentes números de parto usando la prueba de ELISA.
- Analizar estadísticamente por número de parto y días de lactación los resultados obtenidos de la prueba de ELISA indirecta.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Muestreo

Las muestras de calostro y la leche fueron obtenidas de cerdas lactantes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma México (UNAM), está ubicado en el Km. 2 de la carretera Jilotepec-Corrales, en Jilotepec, Estado de México.

Los grupos experimentales están divididos en 7 grupos identificados de acuerdo al número de parto de la cerda que corresponde al momento de la toma de las muestras. Los grupos de Parto 1, Parto 2, Parto 3, Parto 4, Parto 5, Parto 6 está conformados por cerdas pie de cría que fueron inoculadas con una sola dosis en sabana vía oral con el virus aislado de DEP del brote 2014 en la misma granja (CEIEPP). El grupo Control o testigo está conformado por cerdas pie de cría de diferentes números de parto, que no recibieron ninguna profilaxis (Cuadro 1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

SUJETOS DE ESTUDIO					
Grupo experimental	n	Calostro	Leche 7 días	Leche 14 días	Leche de destete
Primer parto	8	8	8	8	8
Segundo parto	11	11	11	11	11
Tercer parto	7	7	7	7	7
Cuarto parto	5	5	5	5	5
Quinto parto	9	9	9	9	9
Más de quinto parto	16	16	16	16	16
Control	6	6	6	4	0

Número de muestras/ día	62	62	60	56
Total de muestras	240			
Numero total de animales experimentales	62			
Número de animales por grupo	5-16			

Cuadro 1. Número total de sujetos de estudio

Las muestras de calostro se obtuvieron durante las primeras 12 horas de iniciado el parto (día 0), posteriormente se obtuvieron las muestras de leche a los 7, 14 días y al momento del destete (día 21). Previo a la recolección de las muestras se llevó a cabo la limpieza de la glándula mamaria con toallas desechables y cloruro de benzalconio. El número total de muestras colectadas e identificadas fue de 240, cada una almacenada en tubos de centrifuga estériles de 15 ml (Falcon™) a -20°C para su conservación (Figura 12. (A) realización de toma. (B) *almacenamiento de*

las muestras), posteriormente fueron trasladadas al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo (DMZC) de la FMVZ para conservarse a -70°C .

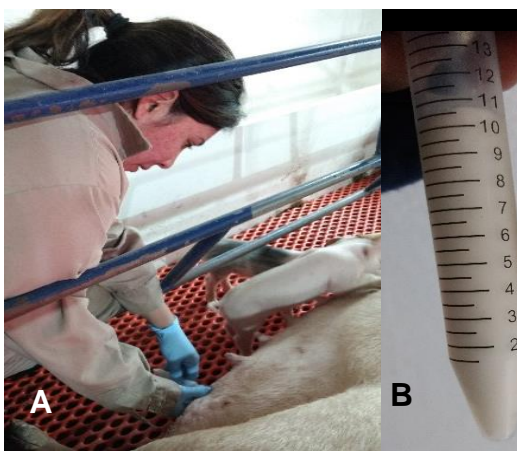


Figura 12. (A) realización de toma. (B) almacenamiento de las muestras.

6.2. Procesamiento de las muestras en el laboratorio

Las muestras fueron descongeladas (Figura 13 A) y se obtuvo 1.5 ml para procesarlas en tubos criogénicos estériles (Eppendorf TM) (Figura 13 B), se centrifugaron a 13,000 g (Eppendorf® Microcentrifuge 5415) por 15 minutos a 4°C para eliminar grasa y suciedad (Figura 13 C) finalmente se almacenaron en tubos criogénicos estériles de 1.5 ml (Eppendorf TM) a -20°C (Poonsuk et al., 2016).

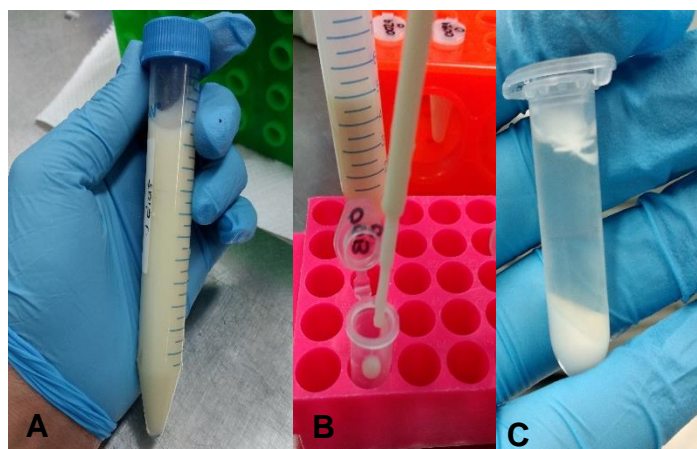


Figura 13. (A) muestra descongelándose. (B) procesamiento de la muestra en tubo criogénico estéril (Eppendorf TM) de 1.5 ml. (C) muestra centrifugada.

6.3. Cultivo del VDEP

Se realizó el cultivo celular de VDEP cepa MX.EdoMexC2A1S_2014 (No. GenBank KM044335.1) en células Vero, aisladas e identificadas por Becerra, 2016.

La presencia del VDEP se determinó por medio de la observación de efecto citopático, destrucción de las células y formación de sincitios y confirmado por RT-PCR (Figura 14 B).

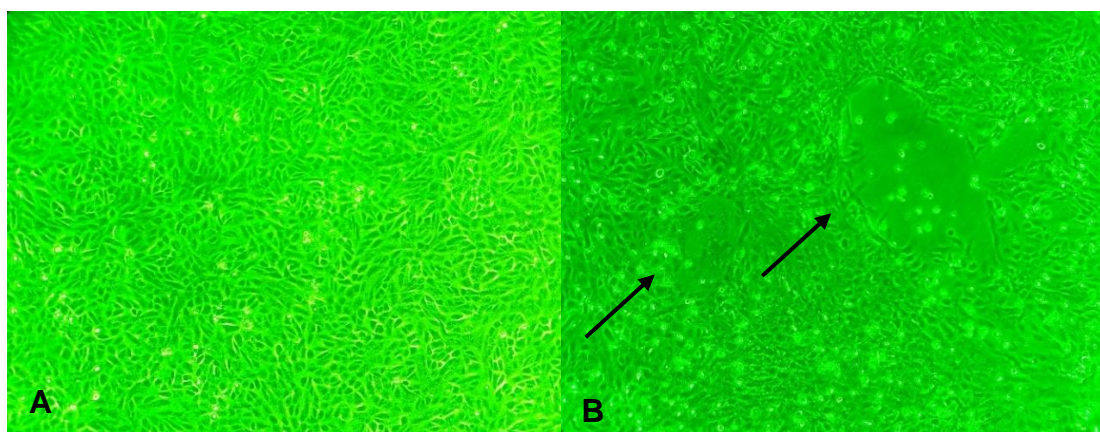


Figura 14. (A) Cultivo de células Vero grupo control. (B) cultivo de células vero infectadas con el VDEP a partir de pulmón, donde se observa el efecto citopático.

6.4. Concentración del virus por precipitación

Una vez que recolectado el sobrenadante el cultivo de VDEP se almacenó a -70°C . Para la precipitación viral se descongeló el sobrenadante recolectado del cultivo de VDEP, el contenido se vació en una probeta para medir la cantidad total

En un matraz se colocó el contenido viral y se le agregó Polyethylene glycol 8000 (PEG) al 8%, con ayuda de una bala magnética y un agitador se disolvieron todos los grupos. Se dejó en refrigeración y agitación toda la noche.

Posteriormente se retiró el matraz de refrigeración y agitación, y el contenido se vertió en tubos de centrifuga estériles de 50 ml (Falcon™). Se centrifugó a 8000 rpm por 3 horas a 4°C . Se retiró el sobrenadante y el botón obtenido se

resuspendió con 1 ml de TNE Buffer y se traspasó a un tubo criogénico de 1.5 ml (Eppendorf™) y se almacenó a -20°C (Becerra, 2016).

6.5. Titulación del virus concentrado

Se preparó una placa de 96 pozos con cultivo de células Vero hasta obtener una monocapa de 80%. En otra placa de 96 pozos se realizaron diluciones decuplas seriadas de suspensión viral en medio DMEM con 10 µg/ml de tripsina. Posteriormente a la placa de cultivo de células Vero se le cambió el medio de mantenimiento DMEM con SFB 10% y se agregó 100 µl de cada dilución de VDEP para infectar a las células Vero, después de 96 horas se observó efecto citopático. El título se determinó por método de Reed-Muench, el cual se estimó el 50% de las células infectadas y se expresó en Dosis Infecciosas en Cultivo Celular al 50% por mililitro (DIC50%/ml) (Figura 15) (Chen et al., 2014).

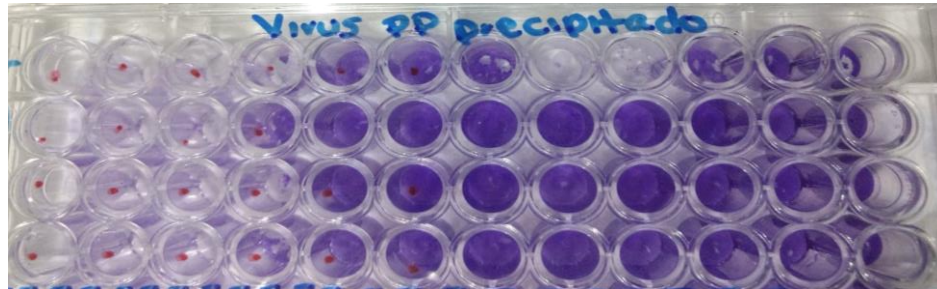


Figura 15. Los títulos obtenidos del virus precipitado fueron $10^{6.8}$ DIC50%/ml

6.6. Cuantificación de proteínas virales

Se realizó por medio del kit Qubit™ Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante Thermo Fisher Scientific, 2015 (número de catálogo. Q33211, Q33212). Se utilizó 195 µl de solución de trabajo más 5 µl virus diluido 1:10 mezclado por vortex y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura con el fluorómetro Qubit®3.0 (Becerra, 2019).

6.7. Ensayo de ELISA para IgA

Se realizó el ensayo de ELISA de acuerdo a lo reportado por Becerra, 2019 y Bjustrom et al., 2018, con algunas modificaciones, como se describe posteriormente.

Se realizó una dilución 1:100 del precipitado viral en solución amortiguadora de carbonatos. En una placa para ELISA (Costar™ EIA/RIA de 96 pocillos) se colocaron 100 µl en cada pozo, se cubrió con parafilm y aluminio y se dejó incubar por 16 horas a 4°C (Becerra, 2019 y Bjustrom et al., 2018).

Transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados con solución de lavado (PBS con Tween 20 al 0.2%). Con la finalidad de disminuir las uniones no específicas se adicionó 200 µl de solución de bloqueo (PBS con 2% de leche descremada y 0.02% de Triton X-100) y se dejó incubando 1 hora a 37° C. Al concluir se realizaron nuevamente tres lavados con solución de lavado (Becerra, 2019 y Bjustrom et al., 2018).

Se agregaron 100 µl de las diluciones del suero del calostro y la leche en una dilución 1:10, utilizando como control negativo leche descremada con el fin de eliminar la densidad en blanco, cubriendo todos los pozos con 90 µl de solución amortiguadora de fosfatos y agregando 10 µl de cada muestra correspondiente, se dejó incubar 1 hora a 37°C y finalizando se realizaron tres lavados (Becerra, 2019 y Bjustrom et al., 2018).

En cada pozo se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario Goat Anti-pig IgA HRP Conjugated (Bethyl laboratorios) diluido 1:500, se dejó incubar 1 hora a 37°C y posteriormente se lavó la placa tres veces con solución de lavado (Becerra, 2019 y Bjustrom et al., 2018).

Por último, se agregaron 100 µl de Novex® HRP Chromogenic Substrate TMB (Invitrogen™) y se incubó a 37°C, se realizaron mediciones de densidad óptica a los 15, 30 y 40 minutos con un filtro de 405 nm en el espectrofotómetro Multiskan Ex (Thermo Fisher Scientific) (Becerra, 2019 y Bjustrom et al., 2018).

6.8. Análisis estadístico

Para determinar la estadística descriptiva se realizaron las gráficas por medio de Box Plot un programa en línea para ordenar y resumir los resultados de los tratamientos.

Por medio del programa estadístico IBM® SPSS® Statistics Versión 25 se realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) para determinar y contrastar nuestra hipótesis, con un nivel de significancia de la prueba que fue del 5% (0.05). Posteriormente se realizó una prueba Levene para determinar la homogeneidad entre varianzas. Los resultados que no presentaron normalidad fueron seleccionados para utilizar pruebas estadísticas no paramétricas (Kruskal-Wallis). Finalmente para determinar la correlación entre las variables (número de parto e IgA) se realizó un análisis de correlación de Spearman (SPSS, 2018)

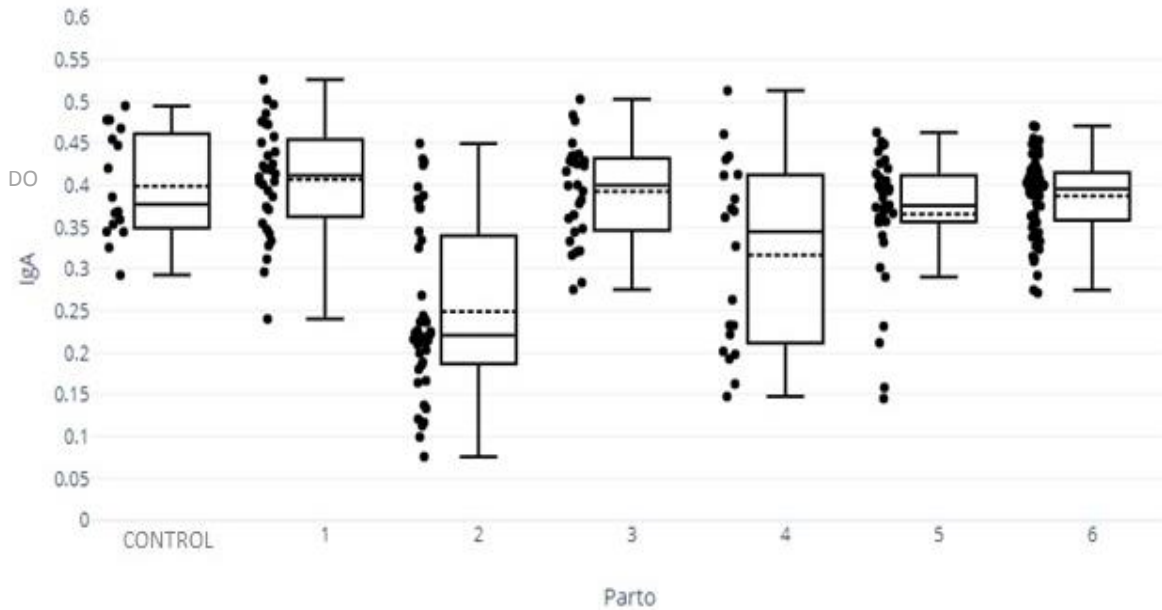
7. RESULTADOS

7.1. Ensayo de ELISA para IgA

El resultado obtenido en la cuantificación de proteínas virales fue una concentración de 303 µg/ml.

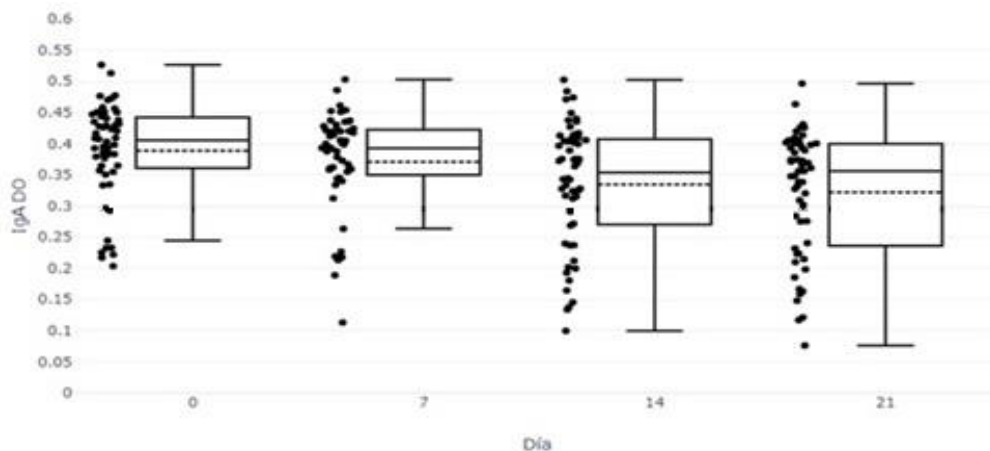
En la Grafica 1, se describe el comportamiento general de los niveles de IgA de los diferentes tratamientos, la media poblacional (0.249) de los títulos de

anticuerpos en el Parto 2 es el que presenta menores niveles de IgA en comparación con los diferentes tratamientos evaluados (Gráfica 1).



Gráfica 1. Niveles de IgA poblacionales por parto por cada uno de los tratamientos.

En los resultados obtenidos por día de muestro a lo largo de la lactancia (Gráfica 2) observamos que el compartamiento de las IgA en el día 0 presentan su nivel más alto y va disminuyendo a lo largo de los días de la lactancia.



Gráfica 2. Comportamiento de los niveles de IgA poblacionales por días de muestreo.

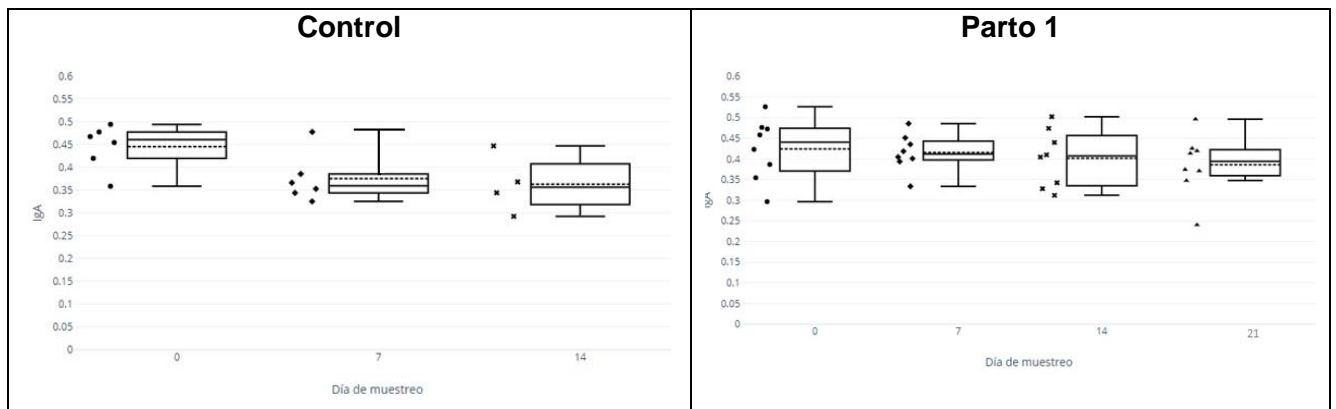
Los resultados obtenidos por cada tratamiento a lo largo de la lactancia fueron:

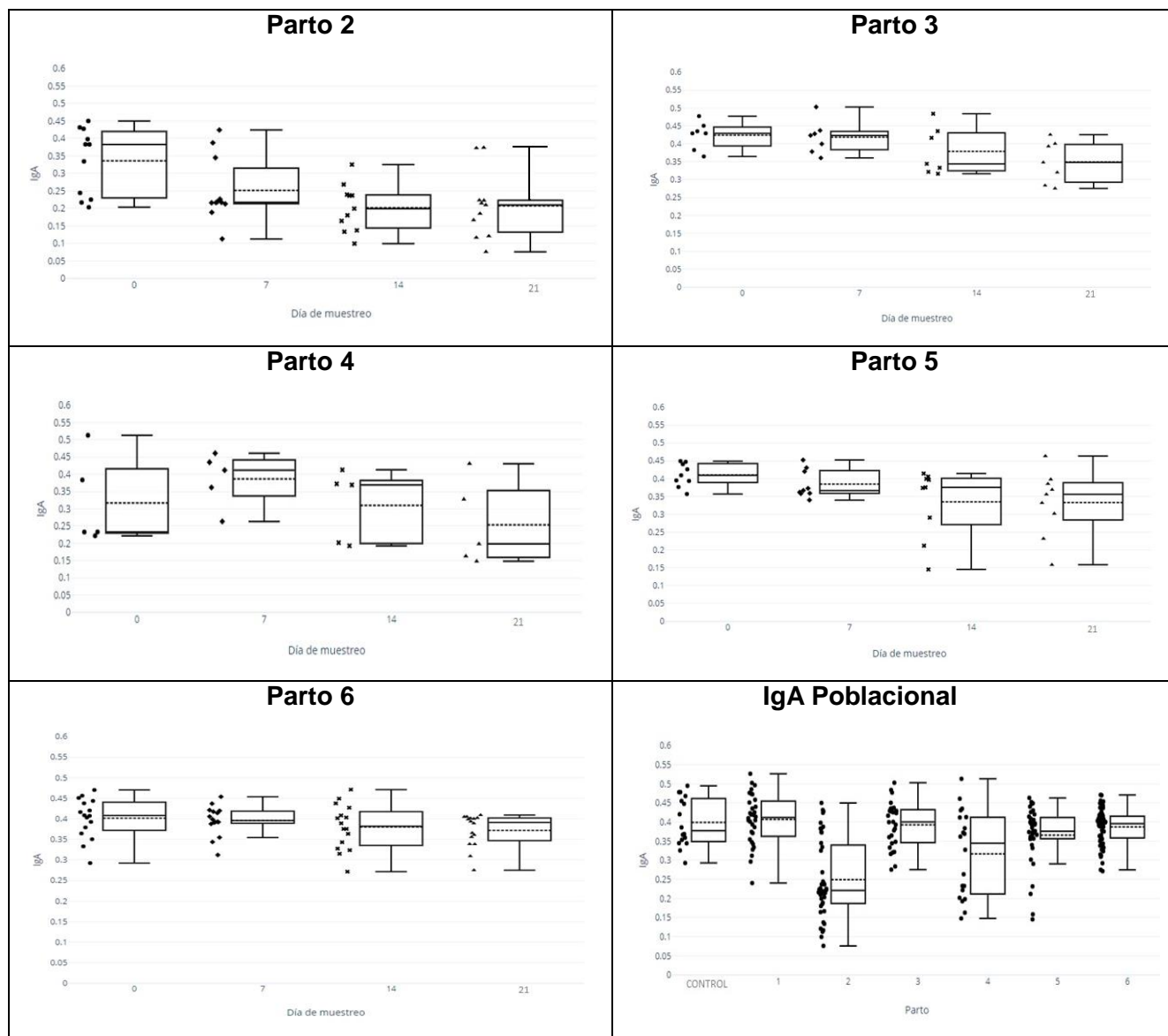
El control presentó densidades ópticas poblacionales en las muestras de 0, 7 y 14 días obtuvieron una media del 0.446, 0.375 y 0.363 respectivamente. No se obtuvieron resultados al destete por manejo del hato.

En Parto 1, las medias poblacionales de los niveles de IgA son 0.424 para el día 0, 0.415 en el día 7, 0.401 para el día 14 y 0.386 en el día 21. En comparación con el Parto 2 en donde las medias poblacionales disminuyen drásticamente desde el día 0 con 0.336, en el día 7 de 0.251, en el día 14 de 0.202 y en el día 21 de 0.207.

En el Parto 3 presentan un comportamiento similar que en el Parto 1, con medias poblacionales 0.424, 0.416, 0.378, 0.349 del día 0, 7, 14 y 21 respectivamente. En el Parto 4 las medias poblacionales son de 0.316, 0.386, 0.309 y 0.253 de los días 0, 7, 14 y 21 respectivamente. Sin embargo en comparación con el Parto 3 los niveles de IgA disminuyen. Para nuevamente el Parto 5 las medias poblacionales se incrementan y para el Parto 6 se mantiene el nivel de inmunidad poblacional.

El comportamiento de la media poblacional a lo largo de la lactancia en los diferentes tratamientos se presentó de manera descendiente con excepción del Parto 4 donde la media tuvo un comportamiento de manera ascendente en el día 7 (Gráfica 3).





Gráfica 3. Resultados de los niveles de IgA en cerdas de pie de cría durante la lactancia identificados por la prueba de ELISA indirecta.

7.2. Análisis estadístico

7.2.1. Resultados de IgA por número de parto

De acuerdo a la prueba de normalidad realizada (Cuadro 2) los resultados obtenidos en los tratamientos Control, Parto1, Parto 3, Parto 4, Parto 6 presentaron normalidad, mientras que los datos del Parto 2 y Parto 5 no presentaron normalidad.

Pruebas de normalidad

	Parto	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
IgA	0	0.184	16	0.152	0.924	16	0.195
	1	0.090	32	0.200*	0.983	32	0.884
	2	0.201	44	0.000	0.922	44	0.006
	3	0.126	28	0.200*	0.971	28	0.595
	4	0.173	20	0.119	0.930	20	0.155
	5	0.227	36	0.000	0.849	36	0.000
	6	0.143	64	0.002	0.965	64	0.068

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro 2. Resultados obtenidos de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) por partos.

En el Cuadro 3, se muestra que no hay homogeneidad en las varianzas de los datos por parto mediante el análisis estadístico de Levene. $P < 0.05$

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de			Sig.
		Levene	gl1	gl2	
IgA	Se basa en la media	9.014	6	233	0.000
	Se basa en la mediana	6.060	6	233	0.000
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	6.060	6	163.222	0.000
	Se basa en la media recortada	8.781	6	233	0.000

Cuadro 3. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas por número de parto.

En el Cuadro 4, existe evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis nula, debido a la distribución de IgA es diferente entre el número de partos ($P < 0.05$).

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IgA es la misma entre las categorías de Parto.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de .05.

Cuadro 4. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis por partos.

La prueba de correlación de Spearman indica que existe una asociación significativa del 32% entre los niveles de IgA y días de lactación, por el contrario no hay asociación entre de número de parto y los niveles de IgA (Cuadro 5).

Correlaciones

			Parto	Dia	IgA
Rho de Spearman	Parto	Coefficiente de correlación	1.000	0.061	-0.068
		Sig. (bilateral)	.	0.344	0.294
		N	240	240	240
	Dia	Coefficiente de correlación	0.061	1.000	0.321**
		Sig. (bilateral)	0.344	.	0.000
		N	240	240	240
	IgA	Coefficiente de correlación	-0.068	0.321**	1.000
		Sig. (bilateral)	0.294	0.000	.
		N	240	240	240

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Cuadro 5. Resultado de la prueba de correlación.

7.2.2. Resultados de IgA por días de lactancia

En el análisis estadístico por día, la prueba de normalidad nos muestra que todos los datos no presentaron normalidad (Cuadro 6).

Pruebas de normalidad

	Dia	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
IgA	0	0.134	62	0.007	0.907	62	0.000
	7	0.156	62	0.001	0.888	62	0.000
	14	0.118	60	0.038	0.947	60	0.011
	21	0.155	56	0.002	0.918	56	0.001

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro 6. Resultados de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) por días de muestreo.

En el Cuadro 7, se observa que no hay homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene en los datos por día. $P < 0.05$.

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de			Sig.
		Levene	gl1	gl2	
IgA	Se basa en la media	3.401	3	236	0.018
	Se basa en la mediana	2.364	3	236	0.072
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2.364	3	227.345	0.072
	Se basa en la media recortada	3.224	3	236	0.023

Cuadro 7. Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas por días de lactancia.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencia estadística significativa entre los días de muestreo (Cuadro 8).

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IgA es la misma entre las categorías de Día.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	.000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de .05.

Cuadro 8. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis por días de muestreo.

8. DISCUSIÓN

Para el control de DEP se requiere de estrategias de vacunación materna para estimular la inmunidad lactogénica y así brindar una protección a los lechones que dependen principalmente de la presencia de anticuerpos IgA secretores en la mucosa intestinal. La vacunación oral puede estimular la inmunidad de la mucosa y producir anticuerpos IgA protectores más eficazmente que otras vías de vacunación.

En el presente estudio, cerdas primerizas presentaron un comportamiento de los niveles de IgA poblacionales superiores en comparación con las cerdas multíparas de Parto 2 y Parto 4, contrario a lo reportado por Carney-Hinkle et al., 2013, donde obtuvieron resultados diferentes en las concentraciones de IgA las cuales tienden a ser mayores en cerdas de mayor parto en comparación a las cerda de parto 1 ($P = 0.09$; 7.98 vs. 5.08 mg/ml) demostrando que las cerdas multíparas tienen un mayor rendimiento de calostro en comparación con las cerdas primíparas.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que los grupos con inoculación y el grupo control presentaron concentraciones de IgA a nivel poblacional similares, sin embargo el comportamiento de los niveles de IgA en el grupo control presentó una disminución notoria conforme avanza la lactancia. De acuerdo al estudio realizado por Joshi et al., 2018 en las muestras de calostro recolectadas de cerdas expuestas a PEDV vivo presentaron niveles más altos en los grupos de cerdas inmunizadas con ORFV-PEDV-S vía IM y en el de cerdas inmunizadas con ORFV-PEDV-S vía IM expuestas a PEDV vivo VO, en comparación con el grupo control, donde no se detectaron niveles de IgA.

Los resultados de Carney-Hinkle et al., 2013, Theil y Hurley, 2016 y Joshi et al., 2018 coinciden con variaciones de niveles de IgA durante la lactancia, siendo mayores en día 0 y disminuyeron en día 7 y 14. Mencionan que en el calostro inmediatamente después del parto se presentan concentraciones elevadas de cada inmunoglobulina (IgG, IgA e IgM), estas concentraciones permanecen durante las primeras 6 h postparto, y disminuyen entre un 30 a 45%

aproximadamente las siguientes 12 horas y continúan descendiendo a lo largo de la lactancia.

Estudios recientes evalúan la aplicación de diferentes dosis de exposición oral de virus vivo o Feedback como lo realizado por Srijangwad et al., 2017, en ese estudio el comportamiento de IgA coincide con nuestros resultados en donde el día 0 (calostro) presenta una concentración de niveles de IgA mayor y disminuyó gradualmente a lo largo de la lactancia. Con respecto al grupo con doble dosis los niveles de IgA son similares a excepción del día 14 en donde ellos presentan un pico de IgA por arriba del día 7.

Los resultados de Langel et al., 2019 presentaron niveles descendientes de IgA del día 0 al día 3-5 pero se elevan para el día 8-14 y para el día 15-22 para cerdas inoculadas en primer y segundo tercio de la gestación, y en las cerdas inoculadas en el tercer tercio de la gestación es opuesto a nuestros resultados siendo menores los niveles en día 0 y aumentan hasta su mayor valor en los días 15-22.

En el presente trabajo se observó que las cerdas del Parto 2 y Parto 4 (cerdas multíparas) presentaron una caída en los niveles de IgA debido al manejo zootécnico (destete-servicio), en el caso de las cerdas primerizas del CEIEPP, se ven afectadas por diversos factores de manejo de la granja (manejo al parto, peso al primer servicio, condición corporal) Ek-Mex et al., 2014 describe que las cerdas primerizas presentan una inmadurez fisiológica e inmunológica por lo tanto una menor capacidad de producción láctea y esto se vio reflejado en el peso al destete de los lechones en comparación con cerdas multíparas, se ha reportado que las cerdas con destetes menores a 21 días presentan una disminución en el número total de lechones nacidos al segundo parto situación que se conoce como la caída del segundo parto.

La inmunidad lactogénica es una alternativa para controlar la enfermedad de diarrea epidémica porcina. Es necesario evaluar la inmunidad lactogénica para saber si las estrategias de control de la enfermedad están brindando protección eficiente al lechón, se requiere complementar los estudios para evaluar el

comportamiento en los lechones midiendo los niveles de IgG e IgA, anticuerpos neutralizantes, así como también IgG en calostro y leche.

9. CONCLUSIÓN

La prueba de ELISA indirecta determinó los niveles de IgA en calostro y leche de cerdas de pie de cría de diferente número de parto y a lo largo de la lactación.

Existe evidencia significativa para demostrar que estadísticamente hay diferencias entre los diferentes números de parto y los días de lactación. Los resultados indican que las cerdas primerizas presentan mayores niveles de IgA en calostro y leche que cerdas multíparas de Parto 2 y 4 pero similares a las de Parto 3, 5 y 6. En calostro se presentan los niveles de IgA más altos y decrecen conforme avanza la lactancia.

Existió una correlación significativa entre día de lactación y los niveles de IgA.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Abreviaturas

- **µg** Microgramo
- **AN** Anticuerpo neutralizante
- **ARN** Ácido ribonucleico
- **CEIEPP** Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina
- **CoV** Coronavirus porcinos
- **DEP** Diarrea epidemica porcina
- **DICC** Dosis infectivas en cultivo celular
- **DMEM** Medio de cultivo esencial minimo de Eagle modificado por Dubelcco
- **DMZC** Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos
- **DO** Densidad optica
- **DTT** Destete
- **E** Proteína de la envoltura
- **ELISA** Ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas
- **FMVZ** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- **g** Gramo
- **HRP** Peroxidasa de rábano por sus siglas en ingles
- **IF** Ensayo de inmunofluorecencia
- **IFA** Ensayo de inmunofluorescencia
- **Ig** Inmunoglobulinas
- **IgA** Inmunoglobulina A
- **IgD** Inmunoglobulina D
- **IgE** Inmunoglobulina E
- **IgG** Inmunoglobulina G
- **IgM** Inmunoglobulina M
- **IHQ** Inmunohistoquímica

- **IM** Intramuscular
- **kb** Kilobase
- **kg** Kilogramo
- **km** Kilometro
- **L** Litro
- **Log10** Logaritmo base 10
- **M** Proteína de la membrana
- **mg** Miligramos
- **ml** Mililitro
- **N** Proteína de la nucleocápside
- **nm** Nanometros
- **° C** Grados centígrados
- **OIE** Organización Mundial de la Sanidad Animal
- **ORF** Marcos de lectura abiertos
- **ORF3** Proteína accesoria
- **PBS** Buffer fosfato salino
- **PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PEG** Polyethylene glycol 8000
- **pIgR** Componente secretor
- **PPC** Peste porcina clásica
- **PRRS** Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo
- **Rep** Poliproteína replicativa
- **Rpm** Revoluciones por minuto
- **rRT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
- **RT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- **S** Proteína spike
- **SENASICA** Servicio Nacional de Salud, Seguridad Alimentaria y Calidad de los Alimentos

- **SFB** Suero fetal bovino
- **SIgA** Inmunoglobulina A secretora
- **TMB** Tetrametilbencidina
- **UNAM** Universidad Nacional Autónoma México
- **UTR** Región no traducida
- **VCRP** Coronavirus respiratorio porcino
- **VDEP** Virus de la diarrea epidémica porcina
- **VEH** Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina
- **VGET** Virus de la gastroenteritis transmisible
- **VO** Vía oral
- **vs** Versus

10.2. Anexo 2. Índice de figuras

Figura 1. Mapa del tiempo y diseminación del VDEP (Bolaños et al., 2016).	3
Figura 2. Mapa con la localización del primer foco de DEP en 2013 (OIE, 2014)...	3
Figura 3. Árbol filogenético de las cepas del VDEP correspondientes a los dos grupos: pandémicas y clásicas (Sun et al., 2015).	4
Figura 4. Esquema de las características estructurales del genoma de los coronavirus (Piñeros y Mogollón, 2015).	5
Figura 5. (A) Lechón con diarrea amarilla. (B) Lesiones encontradas en lechón lactante muerto por el VDEP (Trujillo-Ortega et al., 2016).	7
Figura 6. Kit de ensayos inmunocromatográficos PED Ag Test Kit de Bionote®.	7
Figura 7. Elaboración del licuado para la exposición oral de virus vivo de DEP (Foto por Rolando Beltrán).	9
Figura 8. Vacunas contra DEP. (A) vacuna de Harrisvaccines™ . (B) vacuna comercializada en México por MSD®. (C) vacuna de Zoetis® (Zoetis, 2016).	11
Figura 9. Representación esquemática de la inmunoglobulina IgA e SIgA (Tizard, 2009).	13
Figura 10. Proporciones de las inmunoglobulinas secretadas desde las primeras 6 horas hasta los 12 días post parto (Theil y Hurley, 2016).	15
Figura 11. Esquema para representar el eje intestino-mamario-SIgA (Langel et al., 2016).	18
<i>Figura 12. (A) realización de toma. (B) almacenamiento de las muestras.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 13. (A) muestra descongelándose. (B) procesamiento de la muestra en tubo criogénico estéril (Eppendorf™) de 1.5 ml. (C) muestra centrifugada.</i>	<i>21</i>
Figura 14. (A) Cultivo de células Vero grupo control. (B) cultivo de células vero infectadas con el VDEP a partir de pulmón, donde se observa el efecto citopático.	22
Figura 15. Los títulos obtenidos del virus precipitado fueron $10^{6.8}$ DICCC50%/ml .	23

10.3. Anexo 3. Índice de cuadros

Cuadro 1. Número total de sujetos de estudio	20
<i>Cuadro 2. Resultados obtenidos de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) por partos.</i>	29
Cuadro 3. Resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas por número de parto.	29
Cuadro 4. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis por partos.	30
Cuadro 5. Resultado de la prueba de correlación.	30
Cuadro 6. Resultados de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) por días de muestreo.	31
Cuadro 7. Resultado de la prueba de homogeneidad de varianzas por días de lactancia.	31
Cuadro 8. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis por días de muestreo.	32

10.4. Anexo 4. Índice de gráficas

Gráfica 1. Niveles de IgA poblacionales por parto por cada uno de los tratamientos.	26
Gráfica 2. Comportamiento de los niveles de IgA poblacionales por días de muestreo.	27
<i>Gráfica 3. Resultados de los niveles de IgA en cerdas de pie de cría durante la lactancia identificados por la prueba de ELISA indirecta.</i>	<i>28</i>

10.5. Anexo 5. Soluciones utilizadas para la realización de la ELISA

- Solución amortiguadora de carbonatos 0.05M pH 9.6
 - NA₂CO₃ 0.795g
 - NAHCO₃ 1.46g
 - NAN₃ 0.1g
 - Cbp agua destilada 500ml
 - Ajustar pH con NaOH

- Solución amortiguadora de FOSFATOS SALINOS (PBS)
 - NAH₂PO₄ 0.2M 5.421g
 - NA₂HPO₄ 0.2M 8.66g
 - NACl 4.35g
 - Cbp agua destilada 500ml
 - Ajustar pH con NaOH

- Solución DE BLOQUEO
 - PBS
 - Leche descremada 2%
 - Tritón al 0.2%

- Solución DE lavado
 - PBS
 - Tween 20 al 0.1%

- TNE Buffer
 - 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)
 - 100 mM NaCl
 - 0.1 mM EDTA

11. REFERENCIAS

1. Becerra J.F., (2016). Asilamiento del virus de la diarrea epidémica porcina en cultivo celular (Tesis de licenciatura) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, Ciudad de México.
2. Becerra J.F., (2019). Estandarización de la Técnica de ELISA indirecta para el diagnóstico del virus de la Diarrea Epidémica Porcina usando como antígenos el virus completo o mimótopos obtenidos mediante la técnica de Despliegue de Fagos (Tesis de maestría) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, Ciudad de México.
3. Bjustrom J., Woodard K, Giménez-Lirola L., Setness B., Ji J.; Lasley P., Nelson E., Zhang J., Baum D., Gauger P., Main R., Zimmerman J., 2018. Serum and mammary secretion antibody responses in porcine epidemic diarrhea-immune gilts following porcine epidemic diarrhea vaccination. *Journal of Swine Health and Production*. 26(1). 34-40.
4. Bolaños D.J, Trujillo-Ortega M.E., Hernández E. y Beltrán R., 2016. El Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDV). *Los Porcinocultores y su entorno*. No. 114. ISSN 2395-8545
5. Carney-Hinkle E.E., Tran H., Bundy J. W., Moreno R., Miller P. S., and Burkey T. E., 2013. Effect of dam parity on litter performance, transfer of passive immunity, and progeny microbial ecology. *J. Anim. Sci.* 2013.91:2885–2893 doi: 10.2527/jas2011-4874.
6. Chen Q., Li g., Stasko J., Thomas J.T., Stensland W.R., Pillatzki A.E., Gauger P.C., Schwartz K.J., Madson D., Yoon K., Stevenson G.W., Burrough E.R., Karen M. Harmon K.M., Main R.G., Zhang J., 2014. Isolation and Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Associated with the 2013 Disease Outbreak among Swine in the United States. *J Clin Microbiol.* 52(1):234-43. doi: 10.1128/JCM.02820-13

7. Clement T., Singrey A., Lawson S., Okda F., Nelson J., Diel D., Nelson E.A., Christopher-Hennings J., 2016. Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and in piglet serum samples after feedback. *Journal of Swine Health and Production*. 24(3):147–153.
8. Crawford K., Lager K., Miller L., Opriessnig T., Gerber P. and Hesse R., 2015. Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. *Veterinary Research*. 46:49. DOI 10.1186/s13567-015-0180-5
9. Diel D.G., Lawson S., Okda F., Singrey A., Clement T., Fernandes M.H.V., Christopher-Hennings J., Nelson E.A., 2016. Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Research*. 226. 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.013>
10. Duarte M. y Laude H., 1994. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J Gen Virol*. 75 (Pt 5):1195-200. DOI: 10.1099/0022-1317-75-5-1195
11. Ek-Mex J.E., Segura-Correa J.C., Batista-Garcia L. y Alzina-López A., 2014. Factores ambientales que afectan los componentes de producción y productividad durante la vida de las cerdas. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 447 – 462.
12. George D., Mallery P., 2018. IBM SPSS Statistical Package for the Social Sciences. Version 25.0. Edición 15. Armonk, NY: IBM Corp.
13. Hernández E.N., 2016). Estandarización de la técnica de RT-PCR para el diagnóstico del virus de la diarrea epidémica porcina y su evaluación en muestras clínicas obtenidas en un brote de diarrea en una granja porcina de ciclo completo (Tesis de licenciatura) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, Ciudad de México.
14. Hill C., Raizman E., Snider T., Goyal S., Torremorell M. and Perez A.M. 2014. Emergence of porcine epidemic diarrhoea in North America. *FOCUS ON*, No. 9. <http://www.fao.org/3/a-i3967e.pdf>

15. Hinkle E.E (2012). The effect of dam parity on progeny growth performance, passive immunity, and gastrointestinal microbiota (Dissertation for Doctor of Philosophy) Faculty of The Graduate College at the University of Nebraska. Lincoln, Nebraska.
16. Jarvis M.C., Lam H.C., Zhang Y., Wang L., Hesse R.A., Hause B.M., Vlasova A., Wang Q., Zhang J., Nelson M.I., Murtaugh M.P., Marthaler D., 2016. Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Preventive Veterinary Medicine* Volume 123, Pages 175-184.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.10.020> Get rights and content
17. Joshi L.R., Okda F.A., Singrey A., Maggioli M.F., Faccin T.C., Fernandes M.H.V., Hain K.S., Dee S., Bauermann F.V., Nelson E.A., Diel D.G., 2018. Passive immunity to porcine epidemic diarrhea virus following immunization of pregnant gilts with a recombinant orf virus vector expressing the spike protein. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3855-1>
18. Jung K. and Saif L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J.* 204, 134-43.
19. Klobasa F., Habe F., Werhahn E. y Bufler J.E., 1985. The influence of age and breed on the concentrations of serum iga, iga and igm in sows throughout the reproductive cycle. *Vet Immunol Immunopathol.* 10 355-366.
20. Klobasa F., Butler J.E., Werhahn E., Habe F., 1986. Maternal-neonatal immunoregulation in swine. if. influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets. *Vet Immunol Immunopathol.* 11:149-59.
21. Langel S.N., Paima F.C., Lager K.M., Vlasovaa A.N, Saif L.J., 2016. Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Research.* 226, 93–107.

22. Langel S.N., Paim F.C., Alhamo M.A., Buckley A., Van Geelen A., Lager K.M., Vlasova A.N. and Saif L.J., 2019. Stage of Gestation at Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection of Pregnant Swine Impacts Maternal Immunity and Lactogenic Immune Protection of Neonatal Suckling Piglets. *Front. Immunol.* 10:727. doi: 10.3389/fimmu.2019.00727
23. Lv C., Xiao Y., Li X. Tian K., 2016. Porcine epidemic diarrhea virus: current insights. *DovePress Journal: Virus Adaptation and Treatment*.m <https://www.dovepress.com/> by 132.248.50.91
24. OIE, 2014. Ficha técnica de la OIE; infección por el virus de la diarrea epidémica porcina. (Online) <https://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDF>
25. Piñeros R. Y Mogollón J.D., 2015. Coronavirus en porcinos: importancia y presentación del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en Colombia. *Rev Med Vet.* (29):73-89. . ISSN 0122-9354
26. Poonsuk K., Zhang J., Chen. Q., Gonzalez W., Carrion L.C.S., Sun Y., Ji J., Wang C., Main R., Zimmerman J., Giménez-Lirola L., 2016. Quantifying the effect of lactogenic antibody on porcine epidemic diarrhea virus infection in neonatal piglets. *Veterinary Microbiology.* 197. 83–92.
27. Srijangwad A., Stott C.J., Temeeyasen G., Senasuthum R., Chongcharoen W., Tantituvanont A., and Nilubol D., 2017. Immune response of gilts to single and double infection with porcine epidemic diarrhea virus. *Journal Arch Virol,* 162:2029–2034. DOI 10.1007/s00705-017-3307-3
28. Sun M., Ma J., Wang Y., Wang M., Song W., Zhang W., Lu C., y Yao H., 2015. Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of porcine epidemic diarrhea virus in Asia. *J Clin Microbiol.,* 53(5):1484-92. doi: 10.1128/JCM.02898-14.
29. Suzuki T., Shibahara T., Yamaguchi R., Nakade K., Yamamoto T., Miyazaki A. and Ohashi S., 2016. Pig epidemic diarrhoea virus S gene variant with a large deletion non-lethal to colostrum-deprived newborn piglets. *Journal of General Virology,* 97, 1823–1828. DOI 10.1099/jgv.0.000513.

30. Theil P.K. and Hurley W.L., 2016. The Protein Component of Sow Colostrum and Milk. Intech Open. Chapter 9. <http://dx.doi.org/10.5772/62841>
31. Tizard I.R., 2009. *Inmunología Veterinaria*. Elsevier. 8th edición, capítulo 14, páginas 170-173.
32. Trujillo-Ortega M.E., Beltran-Figueroa R., Garcia-Hernandez M.E., Juarez-Ramirez M., Sotomayor-Gonzalez A., Hernandez-Villegas E.N., Becerra-Hernandez J.F., y Sarmiento-Silva R.E., 2016. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Veterinary Research*, 12(1):132. DOI: 10.1186/s12917-016-0763-z.
33. Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, et al. Distinct Characteristics and Complex Evolution of PEDV Strains, North America, May 2013–February 2014. *Emerging Infectious Diseases*. 2014; 20(10):1620-1628. doi:10.3201/eid2010.140491
34. Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.S., Lau, C.C., Tsang, A.K., Lau, J.H., Bai, R., Teng, J.L., Tsang, C.C., Wang, M., Zheng, B.J., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2012. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of Virology*. 86 (7), 3995–4008.
35. Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., 2012, *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell. 10th edición, capítulo 35, páginas 501- 503.0.
36. Zoetis, 2016. Estados Unidos. https://extension.oregonstate.edu/sites/default/files/documents/12281/pedv_vaccination.pdf