

Respuesta Inmunológica en Cerditos Recién Nacidos de  
Madres Vacunadas con las Cepas K88, K99, F41 y 987P de *Escherichia coli*

por

CARLA C. TORO COLÓN

Tesis sometida como parte de los requisitos para el grado de

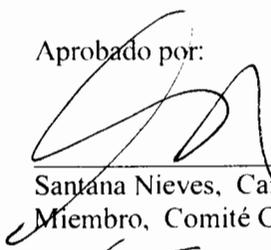
MAESTRO EN CIENCIAS

en

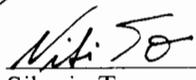
INDUSTRIA PECUARIA

Universidad de Puerto Rico  
Recinto Universitario de Mayagüez  
2004

Aprobado por:

  
Santana Nieves, Carmen Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

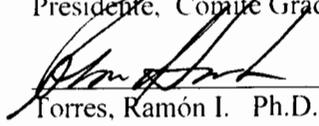
27/may/04  
Fecha

  
Siberio Torres, Víctor Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

28/V/04  
Fecha

  
Rivera Colón, Edgardo D.V.M.  
Presidente, Comité Graduado

27 mayo 2004  
Fecha

  
Torres, Ramón I. Ph.D.  
Representante de Escuela Graduada

27 mayo 2004  
Fecha

  
Latorre Acevedo, José R. Ph.D.  
Director del Departamento

28 mayo de 2004  
Fecha

  
Martí Mutt, José A. Ph.D.  
Director de Estudios Graduados

28 mayo 2004  
Fecha

## ABSTRACT

Ten Yorkshire sows with variable numbers of previous parturitions were divided into two equal groups to test two treatments. Five sows were injected with a vaccine against the strains K88, K99, F41 and 987P of *Escherichia coli* at five and two weeks prior to farrowing while the remaining 5 were injected with a placebo. All the sows were bled via jugular puncture before each injection and at 24 hours, 48 hours, 7 days, and 21 days post – partum. All of the piglets born to them were also bled at 24 hours, 48 hours, 7 days, and 21 days after birth. Blood serum was obtained by centrifugation and stored at 4.0°C until analyzed. An ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay*) test was used to determine antibody titers in serum of IgM, IgA, and IgG.

Results demonstrated a significant  $P < 0.05$  rise in serum immunoglobulins M and A levels in the sows that were vaccinated for *E. coli* and their piglets. Immunoglobulin M, A and G were found to be affected by a direct correlation with their initial concentration and the initial concentration of IgA and IgG were found to be affected by the number of parturitions in the sows. Levels of immunoglobulins for piglets showed a significant value of difference between those from vaccinated sows and unvaccinated sows. The average level of immunoglobulins more than double for those from vaccinated sows and unvaccinated sows. A gradual decline during the first 3 weeks post-partum was found, but this trend was slower in the piglets born to vaccinated sows. However, under the conditions of good management and hygiene that prevailed in this study, no significant positive effect of the vaccination was found in regard to pre-weaning mortality, number of piglets weaned, or body weight gain. The results support the

hypothesis that the passive immunity of piglets can be enhanced by vaccination of the dam prior to farrowing, which should provide improved protection against colibacillosis.

## RESUMEN

Diez cerdas de la raza Yorkshire se dividieron al azar en dos grupos de cinco cerdas cada uno. Un grupo fue vacunado contra las cepas K88, K99, F41 y 987P de *E. coli* a las 5 y 2 semanas antes del parto mientras las otras cinco fueron inyectadas con un placebo bajo el mismo régimen de tiempo. Cada cerda fue sangrada vía punción yugular antes de ser vacunada en ambas ocasiones y a las 24 horas, 48 horas, 7 días y 21 días post – parto. Todos los cerditos nacidos fueron sangrados a las 24 horas, 48 horas, 7 días y 21 días de nacidos. Se separó el suero sanguíneo por centrifugación y se mantuvo a una temperatura de 4.0°C hasta el momento de análisis. Se realizaron pruebas de ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay*) en todas las muestras de suero para determinar los niveles de IgM, IgA e IgG.

Los resultados demostraron un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en los niveles de las inmunoglobulinas M y A presentes en el suero de las cerdas madres y los cerditos paridos en el grupo vacunado con la vacuna de *E. coli*. La inmunoglobulina M, la inmunoglobulina A y la inmunoglobulina G fueron afectadas por una correlación directa con la concentración inicial de inmunoglobulina en el suero de la sangre de todas las cerdas y la concentración inicial tuvo correlación con el número de partos de las cerdas. Los niveles de las inmunoglobulinas en cerditos demostraron un valor significativo de diferencia entre aquellos nacidos a cerdas vacunadas y cerdas no vacunadas. Los niveles promedios de inmunoglobulinas fueron un poco más del doble para aquellas cerdas vacunadas y su progenie. Hubo una tendencia decreciente paulatina en los niveles de inmunoglobulinas durante las primeras tres semanas post - parto, pero esta decadencia

fue más lenta en los cerditos nacidos de cerdas vacunadas. Sin embargo, bajo las condiciones de buen manejo e higiene imperantes en este estudio no se encontró ningún efecto positivo significativo de la vacunación en la mortalidad pre-destete, el número de cerditos destetados, el peso corporal al destete o en la incidencia de diarreas. Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis que la inmunidad pasiva de los cerditos puede incrementarse mediante la vacunación de la madre antes del parto lo cual debería proveer una protección mayor contra la colibacilosis.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi familia la cual estuvo apoyándome todos estos años.

**A**

**Mis Padres**

**Plinio A. Toro y Marta I. Colón**

Ustedes siempre me han inspirado a seguir adelante.  
Su testimonio como matrimonio y siervos de  
nuestro Señor Jesucristo ha sido de gran ejemplo.

Los amo con todo mi corazón

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quiero dar gracias a mi Dios Jesucristo por ayudarme todos estos años de estudios. Cuando me faltaban fuerzas él me levantaba, cuando me faltaba sabiduría él me la daba y cuando pensaba que la puerta estaba cerrada él habría una ventana. Gracias doy a mi Salvador y Rey.

Quisiera agradecer también a todos las personas que de algún modo tuvieron que ver en este proyecto. A mi comité graduado, los doctores Edgardo Rivera, Carmen Santana y Víctor Siberio. A los doctores Danilo Cianzio y Carmen Santana que junto con el Departamento de Industria Pecuaria me proveyeron con el sustento económico necesario para poder realizar el proyecto. A los doctores Juan Carlos Martínez Cruzado y Carlos Castillo, del Departamento de Biología por proveerme de sus recursos intelectuales como materiales. Al Sr. Miguel Rivera y la Sra. Carmen Withers quienes siempre estuvieron dispuestos a dar de su tiempo, fuerzas y recursos. A la maestra en ciencias, Yadira Pantoja, por todas las veces que me acompañó a la finca y por ser una gran amiga. A la profesora Ivelisse Padilla del Departamento de Química, por todas las oportunidades brindadas durante mis últimos dos años académicos. A todos mis estudiantes que de alguna manera fueron a la finca a ayudarme. Los trabajadores y encargados de la Granja de Cerdos en Lajas, gracias por toda su ayuda. También quisiera agradecer a los profesores de estadística, el Dr. Raul Machiavelli del Colegio de Ciencias Agrícolas, la Prof. María Medina del Colegio de Administración de Empresas y el Dr. Guillermo Rodríguez del Departamento de Ciencias Marinas.

En especial quiero agradecer a mi familia, a la familia González y a mi querida Iglesia Nueva Esperanza por todo su esfuerzo, ayuda y oración. Papi y Alex José, gracias por ir conmigo todos esos sábados, domingos y días feriados a la finca. Mami gracias por apoyarme y por las fuerzas que me diste cuando más las necesite. Nunca olvidaré toda su ayuda.

## TABLA DE CONTENIDO

Lista de Tablas.....	vii
Lista de Gráficas.....	viii
Lista de Apéndices.....	ix
Introducción.....	1
Revisión de Literatura.....	6
A. Caracterización de <i>Escherichia coli</i> .....	6
B. Efectos Diversos de Colibacilosis.....	7
C. Prevención y Tratamiento de Colibacilosis.....	8
D. Vacunación y Prevención contra <i>E. coli</i> .....	11
Objetivos.....	21
Materiales y Métodos.....	22
Resultados y Discusión.....	32
Conclusión.....	50
Bibliografía.....	52

## LISTA DE TABLAS

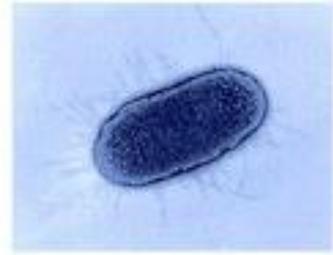
Tabla 1	Promedio de IgM para cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml)....	32
Tabla 2	Promedio de IgA para cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).....	34
Tabla 3	Promedio de IgG para cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).....	36
Tabla 4	Promedio de inmunoglobulinas M, A y G para Cerdas vacunadas y no vacunadas desde los 100 días de gestación hasta los 21 días post - parto(ng/ml).....	37
Tabla 5	Promedio de IgM para cerditos de cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).....	37
Tabla 6	Promedio de IgA para cerditos de cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml). ....	40
Tabla 7	Promedio de IgG para cerditos de cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml). ....	42
Tabla 8	Promedio de inmunoglobulina M, A y G para cerditos de madres vacunadas y no vacunadas.....	44
Tabla 9	Promedio de ganancia en peso corporal y mortalidad de los cerditos .....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de la IgM en forma de pentámero.....	39
Figura 2	Esquema de la IgA en forma de dímero.....	41
Figura 3	Esquema de la estructura de la IgG.....	43
Figura 4	Niveles Promedio de IgM, IgA e IgG en Cerditos de Madres Vacunadas vs. No Vacunadas.....	47

## INTRODUCCIÓN

Originalmente descrita y nombrada por *Theodore Escherich* en 1885 *bacterium coli commune*, y luego renombrada ***Escherichia coli* (*E. coli*)**, es un miembro de la familia ***Enterobacteriaceae***, y se describe como un bacilo gram negativo que usualmente es motil con flagelos o fimbria. Las enfermedades causadas por la ***E. coli*** son numerosas e incluyen meningitis, infecciones del tracto



urinario, diarreas, infecciones de heridas, septicemia y endocarditis. La ***E. coli*** es probablemente la causa más común de diarrea provocada por bacterias que afectan el mundo entero. En términos generales, el género de ***E. coli*** se puede dividir en varios



grupos de acuerdo a su mecanismo patogénico. Estos grupos incluyen las Enterohemorrágicas (EHEC), Enteropatógenicas (EPEC), Enterotoxigénicas (ETEC), Enteroinvasivas (EIEC) y las Uropatógenicas (UPEC). Los más importantes para los cerdos recién nacidos es el grupo de los Enterotoxigénicos (ETEC) con las cepas K99, K88 F41 y 987P. Los ETEC son los que mayormente causan diarrea en infantes y animales jóvenes, aunque pueden afectar a animales de todas las edades. Comúnmente son la causa de diarreas en personas que viajan a países de bajo desarrollo. Las cepas K88 y K99 son pertenecientes a este grupo de bacterias y han sido unas de las cepas más estudiadas para combatir esta bacteria por poseer *pili*, la parte de ésta que se agarra a la pared del intestino.

La colibacilosis es una de las enfermedades más comunes en los hatos de cerdos debido a la bacteria *E. coli* y sus diferentes cepas y comúnmente afecta a los cerditos de 10 días de edad o menos. De acuerdo con el “Nacional Animal Health Monitoring System” (NAHMS) de la USDA, la colibacilosis causada por *E. coli* es una de las tres enfermedades más comunes en cerditos. El 45.2 % de las fincas evaluadas en marzo de 2002 en los Estados Unidos presentaban la enfermedad. La bacteria *E. coli* habita en los intestinos previniendo la absorción apropiada de nutrientes y agua causando diarreas y en algunos casos septicemias. A consecuencia tenemos cerditos deshidratados y muertes a causa de esta condición. También es una especie de bacteria que dado a que presenta cepas diferentes y se ha vuelto resistente a muchos antibióticos que se utilizan para tratar de eliminarla. Síntomas como diarrea amarilla y aguada, rabos sucios, animales de mal aspecto y deshidratados pueden iniciar la sospecha a un porcicultor de que hay *E. coli* en su finca. (*Bertschinger et al., 1999*).

A consecuencia de las pérdidas económicas y el bajo rendimiento que producen los hatos contaminados, algunos investigadores se han dado la tarea de buscar nuevas formas de fortalecer el sistema inmunológico de los animales, tales como nuevas vacunas y anticuerpos orales (*Yokoyama et al., 1997, 1992*). Se ha estudiado cómo se puede hacer que el cuerpo produzca más anticuerpos para combatir la bacteria. También se ha enfocado en la suplementación de anticuerpos mediante el calostro que es una forma de adquirir inmunidad pasivamente, (*Reinhard, et al., 1999*).

De acuerdo con Yokohama (1997), el control de la diarrea causada por ETEC ha sido mayormente basado en tratamientos químicos anti-microbiales y la urgencia de combatir estos microbios ha hecho que los científicos vuelvan a poner su atención en la

inmunidad pasiva, (*Lee et al., 1995*), como modo de controlar la infección. Otros han sugerido el desarrollo de líneas porcinas genéticamente resistentes a cepas de *E. coli*, como la K88 (*Edfors-Lilja, 1985*). Estas razas no tienen los receptores de los *pilis* de K88 haciendo que los cerditos sean resistentes a este tipo de cepa y no padezcan de la enfermedad. El problema mayor consiste en que al presente, no hay una vacuna que haga producir los suficientes antígenos para crear una reacción inmunológica adecuada y lograr resistencia a los neonatales por largos periodos y también que no todos los cerditos obtienen calostro de buena calidad para así fortalecer su sistema inmune (*Mee et al., 1996*). Sin embargo, si se vacuna la madre, ella produce inmunoglobulinas que le ayudan a combatir la infección y la transferencia de éstas a las crías, aunque no es lo suficiente para proteger a los cerditos hasta el desarrollo de una inmunidad activa propia, si puede proveer una protección temporera (*Jayappa et al., 1985*).

Este mismo concepto se puede aplicar a otras especies como el ganado vacuno. El hecho de impedir que los becerros fueran infectados con *rotavirus* fue evaluado en un experimento en vacas preñadas (*Lee et al., 1995*). Como los becerros nacían infectados, era casi imposible inmunizarlos activamente antes de la exposición al virus. Por eso se vacunaron las madres durante la gestación y se determinó la concentración de anticuerpos en el calostro y en la leche. Los resultados fueron positivos, dejando entender que sí hubo la protección necesaria para combatir la infección en las crías.

Ha sido conocimiento común por mucho tiempo que los animales enfermos no crecen porque dejan de comer. Según *Kelley et al. (1993)*, el sistema inmune sigue una serie de pasos de activación cuya detección da indicios de enfermedad en los animales. Estos autores señalan un mecanismo inmunológico que contribuye a la causa de la

anorexia de los animales enfermos. Muchos patógenos bacteriales inducen la síntesis y secreción de *citoquinas* inflamatorias las cuales causan una merma en el apetito. No obstante, este efecto puede ser bloqueado por medio de sustancias antagónicas en el sistema nervioso central (SNC) que bloquean la adhesión de las *citoquinas* a sus receptores.

La inmunidad innata es la línea de defensa que siempre está presente en el cuerpo y accesible en momentos de emergencia. Ésta incluye, además componentes superficiales, tales como la piel, las membranas mucosas y el reflejo de expulsión. Influencias químicas como el pH constituyen barreras efectivas contra la invasión de microorganismos en algunas partes del cuerpo. Otro elemento importante lo constituyen las células fagocíticas como los granulocitos, macrófagos y microglías del SNC. La inmunidad adquirida es más específica que la innata y suplementa a la misma. El contacto inicial con un agente extraño al sistema comienza una serie de eventos que lleva a la activación de linfocitos y la síntesis de anticuerpos (*Benjamín y Leskowitz, 1991*). La inmunización induce este proceso. Existen por lo menos tres mecanismos de inmunización: 1) la forma activa o vacunación, 2) la inmunización pasiva y 3) la transferencia de células inmune.

La inmunidad pasiva ha sido uno de los métodos más investigados en años recientes e involucra anticuerpos que son producidos en el cuerpo de otro animal. Los cerditos adquieren inmunidad pasiva al ingerir anticuerpos que son transferidos a través del calostro de la madre. Estos anticuerpos transferidos desaparecen entre las ocho a doce semanas de edad y después de este lapso la exposición a *E. coli* u otros patógenos en el ambiente puedan ocasionar diarrea en especial durante periodos de estrés como el

destete. La inmunidad pasiva también ocurre por medio de la transfusión de sangre, la cual contiene los anticuerpos que fueron formados por otro animal. Dicha inmunidad provee protección inmediata contra un antígeno, pero no provee protección a largo plazo. Las gamaglobulinas son un ejemplo de la inmunidad pasiva. (*Webster, 2002*)

Las gamaglobulinas confieren inmunidad pasiva provista de forma parenteral. La ruta parenteral depende de una respuesta sistémica en la cual los anticuerpos predominantes que son la IgG e IgM por ser abundantes en la sangre, mientras que la ruta oral provoca una respuesta local intestinal donde IgA predomina. La actividad de la IgA está relacionada de forma esencial en la inmunidad de las mucosas donde puede actuar a tres niveles diferentes evitando la penetración de los antígenos en la pared del intestino, neutralizando la actividad de algunos virus, incluso dentro de las células epiteliales y fuera de ellas (*Sánchez, 2004*). Se presume que las respuestas locales son las más efectivas para protección intestinal (*Newby & Stokes, 1984 citado por Edfors et al., 1985*), pero no son fáciles de medir.

La vacunación es otro medio de empezar la respuesta inmunológica. En este caso el sistema inmune activo (linfocitos B activos y linfocitos T sensitizados) se expone a dosis pequeñas de un antígeno, como virus muertos o debilitados. La memoria inmunológica permite al cuerpo reaccionar rápida y eficientemente a exposiciones futuras. Si el sistema está expuesto a un microorganismo, éste será destruido antes de que cause alguna enfermedad (*Benjamíni, 1991*).

Para comprobar si el efecto de la inmunización parenteral sería útil en la lucha contra la colibacilosis en cerdos recién nacidos se necesita estudiar la posibilidad de crear una inmunidad pasiva mediante la vacunación de la madre durante la gestación.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### A. Caracterización de *Escherichia coli*

Muchas de las infecciones intestinales que ocurren en animales y humanos son causadas por bacilos gram-negativos. En el 1939 se determinó que las bacterias asociadas con las infecciones gastrointestinales se agruparan bajo la familia *Enterobacteriaceae*. Esta familia se caracteriza por ser bacilos gram-negativos, por ser parásitos en animales, por crecer bien en medios artificiales, atacar carbohidratos, y convertir nitratos en nitritos; además cuando hay flagelos presente éstos se encuentran en toda la superficie de la célula (*Merchant et al., 1946*). Uno de los géneros perteneciente a esta familia se conoce como *Escherichia*. Los organismos pertenecientes a este género se encuentran normalmente en el tracto intestinal de los animales como en el de los humanos.

La diarrea neonatal asociada con *E. coli* es observada mayormente en cerditos de 0 a 4 días de nacidos. Exotoxinas potentes {STa, (STI), STb (STII) o LT} provocan la secreción de fluido al lumen intestinal en infecciones enterotoxigénicas de *E. coli* (ETEC) y sus apéndices (*pili* o fimbria) ayudan a adherirse en las paredes del intestino delgado. Sistemas de poca higiene y de continua parición, como en los cerdos, proveen un ambiente ideal para el desarrollo de diarrea por *E. coli* (*Bertschinger et al., 1999*).

Mundialmente, la contaminación con *E. coli*, se ha convertido en uno de los temas más discutidos. Estudios como el de El-Khateib (1995), han tratado de demostrar el comportamiento de *E. coli* bajo diferentes temperaturas, pHs y bajo el tratamiento de cloruro de sodio (NaCl). Estos han encontrado que la bacteria se prolifera a temperaturas

altas, en pH alcalino y que concentraciones de 2 y 3 % de NaCl reducen significativamente el conteo de *E. coli*. Además, *E. coli* normalmente se transmite por el agua y alimentos que han sido contaminados por heces fecales.

## **B. Efectos diversos de Colibacilosis**

De acuerdo con Jayappa et al. (1985), la diarrea neonatal es una de las enfermedades más importantes que afecta al ganado porcino mundialmente. Aunque hay varios agentes biológicos que pueden causar la enfermedad, el mayor causante es la *E. coli* enterotoxigénica. Después de la ingestión, *E. coli* coloniza y se prolifera en el intestino delgado y libera enterotoxinas como la ST y LT conocidas en inglés como “heat stable” y “heat labile”, que interfieren en la absorción de nutrientes y agua. Al adherirse a receptores específicos de las paredes celulares, las cepas de *E. coli* K88, K99, F41 y 987P colonizan mayormente el yeyuno y el íleo del intestino delgado.

Los cerditos son más susceptibles a infecciones con K99 durante los primeros días de nacidos y subsiguientemente éstos van desarrollando resistencia. La toxina ST puede actuar afectando la *adenil ciclasa* y la síntesis de AMP cíclico, que promueve la secreción de Na, Cl, HCO<sub>3</sub> y agua hacia el lumen intestinal promoviendo un ambiente más alcalino y la toxina LT afecta la síntesis de guanosina monofosfato (cGMP), que inhibe el contra transporte de Na/Cl y reduce la absorción de electrolitos y agua del intestino (*Bertschinger et al., 1999*).

Las severidades de los signos clínicos que se observan en la colibacilosis son dependientes de los factores virulentos del patógeno, la edad y el estado inmunológico de los cerditos. Signos que dan indicio a esta condición incluyen: diarrea aguada,

deshidratación (no siempre), heces de color blanco o marrón y en casos extremos podríamos ver vómitos y una pérdida de peso corporal de un 30 hasta un 40% debido a la pérdida de líquido hacia el lumen intestinal. La musculatura abdominal se puede poner flácida, ocurre depresión, ojos hundidos y una prominencia esquelética (*Bertschinger et al., 1999*).

El diagnóstico se basa en los signos clínicos, lesiones histopatológicas y la presencia de organismos gram-negativo. También, en pruebas de pH alcalino de las heces puede servir como diagnóstico presuntivo. El diagnóstico final es el aislamiento de *E. coli* o de uno de los factores virulentos que causan infección. (*Bertschinger et al., 1999; Hogg et al., 2004*)

## **C. Prevención y Tratamiento de Colibacilosis (*E. coli*)**

### **1. Prevención**

La prevención de infecciones con *E. coli* debe ser enfocada en la disminución de la carga bacteriana en el ambiente. Una buena higiene, manejo ambiental y un nivel alto de inmunidad son algunos de los factores que contribuyen a este propósito.

Para proteger a los cerditos recién nacidos de la colibacilosis se ha usado la inmunización de cerdas (*Jayappa et al., 1985*). Jayappa y su grupo estudiaron el papel que juega el *pili* tipo I de *E. coli* en la adhesión del organismo al intestino delgado de los cerdos y la eficiencia del *pili* como un antígeno de vacuna en el control de la colibacilosis neonatal. Se compararon dos tratamientos usando 11 cerdas primerizas, cinco fueron vacunadas y seis se utilizaron como control. Los cerditos nacidos de estas cerdas fueron

inoculados con  $2 \times 10^9$  *E. coli* entre las 6 a 12 horas después de nacidos. Muestras de sangre se colectaron de cada cerda antes de la vacunación, en el momento del refuerzo y después del parto. También se colectaron muestras de calostro de 3 cerdas vacunadas y 3 cerdas no – vacunadas. Las cerdas vacunadas demostraron un aumento en la cantidad de anticuerpos ( $P < 0.001$ ). Se encontró que los cerditos de cerdas vacunadas tuvieron menor población microbiana en los intestinos ( $P < 0.05$ ), menos mortalidad ( $P < 0.05$ ) y una mayor razón de crecimiento ( $P < 0.01$ ). Los cerditos de madres vacunadas y no vacunadas desarrollaron diarrea pero de menor severidad y duración (4.2 días para no vacunadas vs. 1.9 días para vacunadas). Concluyeron que cerditos con menos de una semana de edad son altamente susceptibles a la colibacilosis y la vacunación de Cerdas provee una protección pasiva a los cerditos recién nacidos a través del calostro.

Cerditos que maman de cerdas vacunadas con un antígeno muestran ser protegidos cuando se retan con la misma variedad de *E. coli* enterotoxigénica. Runnels et al. (1987) distribuyeron a 9 cerdas entre 3 productos de vacunación distintos: contra la cepa F41<sup>+</sup>, contra la cepa F41<sup>-</sup> y contra la cepa F41<sup>+</sup> más un adyuvante (ADJ). Los cerditos nacidos a estas cerdas fueron retados a las 7 horas de nacidos con las variedades de antígenos K99, F41<sup>+</sup> o ambas de *E. coli*. Los resultados indicaron que las variedades K99 y F41<sup>+</sup> producen antígeno F41 en el intestino delgado durante la enfermedad y que la vacunación contra F41<sup>+</sup> puede producir proteger contra éste. Si el reto bacteriano expresa solo el antígeno F41 la vacunación con F41<sup>+</sup> puede proteger contra éste, pero si expresa más de un antígeno la vacunación no tendría efecto. Por ejemplo cuando ocurre infección con dos antígenos diferentes, K99 y F41, la vacunación contra uno solo de éstos no protegería a los cerditos contra la ocurrencia de diarrea.

Yokohama et al. (1992) utilizaron un tratamiento de inmunidad pasiva inmunizando primero a gallinas mediante una vacuna conteniendo 0.5 mg del antígeno para K88, K99 o 987P, y luego utilizando la yema de los huevos de éstas para inmunizar a los cerditos. A las seis semanas fueron reforzadas con una segunda dosis y dos semanas después fueron colectados los huevos. La prueba incluyó un total de 76 cerditos recién nacidos deprivados de calostro de la raza Large White. Los cerditos fueron divididos en 3 grupos y provistos de anticuerpos en polvo a tres niveles (125, 625 y 2,500 de título) y un cuarto grupo que no fue tratado. Cuatro horas luego de haber nacido, los cerditos fueron infectados oralmente con las cepas K88, K99 y 987P. Al detectar síntomas de diarrea, se les administraba anticuerpos provistos en huevo en polvo titulado a 125, 625 y 2,500. Los resultados indicaron que los anticuerpos preparados de yema de huevos de gallinas inmunizadas con antígenos de ETEC, protegen a los cerditos cuando éstos son infectados con los antígenos homólogos, resultando en una reducción marcada en la severidad de diarrea en cerditos tratados con cantidades altas de anticuerpos (625 y 2,500). Además, hubo una merma significativa en la diarrea de todos los cerditos tratados en comparación con los no tratados ( $P < 0.01$ ).

En otro experimento, Yokohama et al. (1997), investigaron la inmunización pasiva oral contra la cepa F18. Obtuvieron 74 cerditos destetados y libres de la cepa F18 de la raza Large White. Un grupo fue tratado con anticuerpos titulados 1:10 pre - mezclado en la ración, otro fue tratado con anticuerpos titulados 1:50 en la ración y otro grupo no fue tratado. Les infectaron una vez al día, durante tres días consecutivos con *E. coli* F18. Se alimentaron los grupos de cerditos con el régimen alimenticio correspondiente durante 9 días. Se evaluaron los resultados en términos de severidad de

diarrea, pérdida de peso y nivel de F18 en las muestras de excreta. Hubo una ventaja significativa ( $P < 0.01$ ) de 80% de ganancia en peso a favor de cerdos tratados vs. los no tratados. Este estudio concluyó que la suplementación del alimento con anticuerpos procedentes de huevos de gallina específicos para F18 reduce la frecuencia, severidad y duración de diarrea al igual que la intensidad de excreción de *E. coli* infecciosa. Estos efectos dependen de la dosis administrada.

Harms et al. (2002), fijaron como objetivos para este estudio primero, determinar si la presencia de anticuerpos maternos a PCV2 (Circovirus Porcino tipo 2) previene el desarrollo de PMWS (“Postweaning Multisystemic Wasting Síndrome”); segundo, determinar si PCV2 o una coinfección con PCV2 más el virus causante del PRRSV (“Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus”) induce PMWS en cerditos alimentados con calostro seguido de la desaparición de anticuerpos maternos para PCV2; y tercero, determinar si la coinfección con PRRSV aumenta la severidad de PMWS en cerditos alimentados con calostro. Para el experimento escogieron cerdas seropositivas y seronegativas a PCV2. Los cerditos fueron removidos a los 12 días de nacidos y sangrados a los 16 días para verificar el estatus de anticuerpos para PCV2. Luego fueron inoculados con PCV2, PCV2 más PRRSV o un placebo. Los resultados sugieren que una doble infección de antígenos aumenta la probabilidad de contraer PMWS y que una ración de ELISA S/P (ración de la densidad óptica de la muestra por la densidad óptica de un control positivo) de 0.600 de anticuerpos para PCV2 adquiridos de la madre a través de la inmunidad pasiva impide el desarrollo de PMWS. Cuando la concentración baja de 0.600 S/P es más probable encontrar antígenos de PCV2. Esto sugiere que se puede proteger a los cerditos con solo vacunar a la madre.

#### **D. Vacunación y Prevención contra *E. coli*.**

Muchas enfermedades infecciosas son transferidas de madre a hijo después del parto y romper con este ciclo de transferencia forma la base del concepto denominado enfermedad mínima. (*Webster, 2003*).

La diarrea causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es la colibacilosis entérica más común en cerditos recién nacidos (*Yokoyama et al., 1992*). Se ha investigado extensivamente los antígenos de la fimbria de K88, K99 y 987P para ETEC que están asociados a la colonización intestinal. Estos han sido empleados ampliamente con resultados prometedores como antígenos de vacunas para el control de la colibacilosis (*Yokohama et al., 1992*). Los animales vacunados así tienen mayor probabilidad de combatir la enfermedad o resistirla por completo por el aumento en las inmunoglobulinas en su sangre (*Hogan et al., 1999*). Sin embargo no todos los estudios con animales vacunados contra la diarrea han arrojado resultados positivos (*Jones et al., 1962*).

##### **1. Rumiantes**

Reinhardt et al. (1999) evaluaron el añadir un adyuvante conocido como 1,25-dihydroxyvitamina D<sub>3</sub>, al cual se atribuye la estimulación a la diferenciación de linfocitos T, a una vacuna de *Escherichia coli* J5. Diez vacas que se encontraban a mitad de su periodo de lactación recibieron la vacuna J5 para *E. coli* y una revacunación a las 6 semanas luego de la primera. A cinco de éstas además de la primera vacunación se les administraron 200µg del adyuvante y 200µg adicionales una semana después.

Posteriormente no se les proveyó más adyuvante. Se encontró que los niveles de IgM ( $P < 0.05$ ) e IgG ( $P < 0.01$ ) en la leche fueron significativamente mayores en las vacas que recibieron el adyuvante más la vacuna que en aquellas que sólo recibieron la vacuna. En cambio, en el suero sanguíneo de las vacas suplidas con adyuvante la IgM se encontró en menor concentración ( $P < 0.05$ ) y la IgG en mayor concentración ( $P < 0.05$ ). Se concluyó que el añadir 1,25-dihydroxyvitamina D<sub>3</sub> promueve la movilización de ciertos anticuerpos específicos para *E. coli* J5, pero que el potencial de esta práctica necesita más estudio.

Hogan et al. (1997) utilizaron la bacterina J5 de *E. coli* en vacas lecheras para probar el efecto que tendría un programa de vacunación en los niveles de los anticuerpos. Distribuyeron 18 vacas (15 Holstein y 3 Jersey) en 3 programas diferentes de vacunación: 1) inmunización intramamaria antes de secarse, 2) inmunización subcutánea después de secarse y 3) control. Encontraron que una inmunización intramamaria entre dos subcutáneas resultaba en una respuesta mayor de IgG e IgM que un protocolo que incluye 3 vacunaciones parenterales.

Lee et al. (1995) evaluaron la eficacia de prevenir la infección de becerros con *rotavirus* mediante la vacunación con *E. coli* VP8 de sus madres antes del parto. Quedó establecido que la mejor manera de reducir pérdidas económicas a causa de este virus es vacunando las vacas para aumentar los niveles de anticuerpos en el calostro que a su vez son transferidos pasivamente a sus crías (Saif et al., 1983 citado por Lee et al., 1995). En su intento probaron si la vacuna podría producir una respuesta inmunológica en diferentes especies de animales como ratones, conejos y vacas, los niveles de anticuerpos del calostro entre vacas vacunadas y no vacunadas difirieron significativamente ( $P =$

0.0421). Los resultados demostraron que sí se puede generar un aumento en los anticuerpos en la leche y éstos pueden estar en altas concentraciones hasta 10 días post-parto logrando una mejor protección de la cría. Se determinó que la vacuna VP8 de *E. coli* sirve para inducir actividad inmunológica contra *rotavirus* en vacas.

Sikka et al. (2002) quisieron probaron el efecto de la suplementación pre – parto con antioxidantes y minerales en búfalos madres y la adquisición de la inmunidad pasiva en sus becerros. Un total de 30 búfalos reproductores se dividieron en 2 grupos de 15 animales cada uno: 1) grupo experimental y 2) grupo control. El grupo experimental recibió vitaminas Triplex AD<sub>3</sub>E por vía intramuscular. Luego del nacimiento las crías fueron divididas en 3 grupos de 5 becerros cada uno: i) Control ii) Suplementados con una mezcla de minerales y iii) Suplementados con vitaminas además de los minerales. Se colectaron muestras de sangre de los recién nacidos antes de la alimentación con calostro y en los días 1, 15, 45, 60, 75 y 90 post – parto. Se observó que el suministro de vitaminas a madres durante la etapa de preñez facilitaba la secreción de inmunoglobulinas al calostro un 7.5, 3, 31 y 236% sobre el nivel promedio del control; también aumentó significativamente el nivel de inmunoglobulinas en la sangre de las crías durante el periodo de inmunidad pasiva. En los becerros de los subgrupos suplementados con minerales la concentración de inmunoglobulinas fue mayor que en los del grupo control. En cambio, con la suplementación de vitaminas y minerales hubo una supresión de inmunoglobulinas. Se concluyó que la suplementación con antioxidantes promueve niveles altos de inmunidad y resistencia.

Bush et al. (1980) estudiaron la absorción de inmunoglobulinas por medio del calostro en becerros recién nacidos. Encontraron que la absorción ocurre principalmente

en el yeyuno del intestino delgado vía un sistema tubular en las células. Citaron evidencia que también ocurre lo mismo en los cerdos. También informaron que la concentración máxima se manifestó más temprano para IgG que para IgM e IgA. Éstos aparecían en los ganglios linfáticos durante las primeras horas, luego de mamar calostro. Según estos investigadores la absorción de macromoléculas cesa durante las primeras 24 a 30 horas de vida y esto lo atribuyen a la liberación de proteínas de las células que impiden que continúe la absorción. Discutieron además el papel del calostro en la prevención de la colibacilosis y encontraron evidencia que becerros provenientes de vacas vacunadas con cepas de *E. coli* se protegen contra la diarrea mientras aquellas privadas de calostro tuvieron una mayor población de *E. coli* en la mucosa ileal y en los ganglios linfáticos del mesenterio del yeyuno e íleo.

Mee et al. (1996) investigaron el efecto de la sustitución de calostro por una proteína de suero de leche (WPC) en la inmunidad del becerro. Para este estudio utilizaron 4 grupos de 29 becerros cada uno, en 2 experimentos. A los grupos 1 y 2 se les administraron 2 L de calostro y 500g de la proteína del suero a los 30 minutos de haber nacido respectivamente para el experimento #1. Un promedio total de 123.6 y 17.7g de inmunoglobulinas fue administrado a estos becerros. En el experimento #2 el grupo #3 y #4 fueron tratados de igual manera que en el experimento #1 con la única diferencia de que el grupo #4 se le añadió 1 L de calostro. El propósito era determinar la eficiencia de esta WPC (“whey protein concentrate”) cuando se usaba como sustituto de calostro (Exp. #1) o como un suplemento al calostro combinado (Exp. #2) en términos de la reducción de morbilidad y mortalidad. A todos los animales se les midió la respuesta inmunológica contra la cepa de *E. coli*, K99. Los becerros alimentados con la proteína tuvieron una

mayor mortalidad y una mayor incidencia a diarrea, al igual que una concentración menor de IgG en el suero sanguíneo. Los becerros alimentados con calostro mostraron una mayor concentración de inmunoglobulina, mayor ganancia en peso y una mortalidad menor entre el nacimiento y las 3 semanas de edad. Se concluyó que la WPC tiene poca utilidad como suplemento o como sustituto al calostro y su uso como tal resultaría en mayor riesgo de enfermedad.

Arthington et al. (2000), experimentaron con la sustitución y suplementación del calostro con inmunoglobulinas derivadas directamente del suero de la sangre. Para el primer experimento utilizaron 36 becerros Holstein separadas de sus madres al momento del parto. Estos se asignaron en 3 tratamientos diferentes para el experimento #1: 1) calostro (PC), 2) suero bovino (BS) y 3) suero porcino (PS). Se alimentaron durante las primeras 2 horas de vida y otra vez a las 12 horas con uno de los tratamientos. Para asegurarse de que no hubiera inmunoglobulina circulante se colectó sangre antes de administrar el tratamiento experimental y todo becerro que tuviera  $>1$  g de IgG/L fue eliminado de la prueba. Para determinar la inmunidad pasiva conferida se analizó la concentración de IgG en el suero de las crías a las 24 y 72 horas luego de administrar el tratamiento. En el experimento #2 probaron 3 clases de calostro: 1) Alta calidad, 2) Media calidad y 3) Baja calidad. Todas fueron balanceadas para IgG mediante la adición de BS al calostro de media y baja calidad. Se determinó el grado de transferencia pasiva a las 12 y 24 horas después de suministrar el calostro. En el experimento #1 hubo una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) en nivel de IgG a las 24 horas entre los becerros alimentados con BS de los que recibieron PC o PS. También se encontró una diferencia ( $P < 0.01$ ) a las 72 horas entre BS y PS. En el experimento #2 se observó una aparente

diferencia en absorción de IgG a las 24 horas y una mayor concentración de IgG a las 12 y 24 horas en los animales que recibieron calostro de media y baja calidad ( $P < 0.05$ ). Se concluyó que al añadir BS al calostro se aumenta la concentración de IgG y luego al ser ingerido el mismo transfiere la inmunidad pasiva a becerros recién nacidos.

En otros estudios realizados para esa época se había concluido que los productos utilizados como suplementos de calostro no mejoran la inmunidad pasiva, pero los resultados de Arthington y sus colaboradores demostraron que BS puede ser un buen suplemento eficaz para calostro de media y baja calidad para becerros recién nacidos.

## **2. No Rumiantes**

En el 1972, Rutter et al. investigaron el desarrollo de la diarrea neonatal en cerditos después de una administración de una cepa enteropatógena de *E. coli*. Se escogieron doce cerdas primerizas de la raza Large White. Recibieron 5 ml de una vacuna de los grupos O149:K91(B) y K88ac (L) o un placebo subcutáneamente a las 4 y 2 semanas antes del parto. Se encontró que para las crías de cerdas no vacunadas la mortalidad atribuida a la diarrea neonatal fue un 38 % y para las crías de cerdas vacunadas fue un 20 %, pero esto no fue estadísticamente significativo. Sin embargo los cerditos de cerdas vacunadas en comparación con aquellos de cerdas no vacunadas tuvieron: i) menos cerditos con diarrea y el tiempo de duración fue más corto, ii) la cepa enteropatógena proliferó en los intestinos de menos cerditos y iii) 21 por ciento de las muestras de los intestinos de los cerditos de cerdas vacunadas contenían la cepa en comparación a 71 por ciento de cerditos de cerdas no vacunadas. Concluyeron que aunque no se encontró una diferencia significativa en la mortalidad e incidencia de

diarrea entre los cerditos de cerdas vacunadas y no vacunadas existe un factor antimicrobiano proveniente del calostro que ayuda a controlar la diarrea neonatal.

Isaacson et al. (1980) reportaron una correlación entre los niveles de anticuerpos específicos para pilus de cepas de *E. coli* en el suero sanguíneo y calostro de la madre y el grado de protección que brindan tales anticuerpos. Vacunaron cerdas primerizas subcutáneamente contra los pilus de K99, 987P o un placebo. La vacunación con K99 causó un aumento en anticuerpos para K99 en el suero sanguíneo y el calostro de la madre, pero no en anticuerpos para 987P y viceversa. Concluyeron que la vacunación parenteral de cerdas primerizas con pilus de *E. coli* lleva a la producción de anticuerpos específicos para esos pilus en la sangre y el calostro, y proveyeron una mayor protección a los cerditos recién nacidos. El aumento en anticuerpos fue significativo a  $P < 0.05$  para K99 y a  $P < 0.001$ , pero encontraron que este aumento fue debido mayormente a una exposición a este tipo de cepas previo al experimento. Estos autores señalaron que la inmunoglobulina G aparenta ser el anticuerpo principal en el calostro para la protección de la cría.

Ritcher et al. (2004) investigaron en ratones la capacidad de transferir protección inmunológica de madre a hijo mediante la vacunación contra infecciones causadas por bacterias encapsuladas. Vacunaron a madres con pneumococo nativo y observaron que los niveles circulantes de IgG en las crías de 3 semanas de edad fueron significativos. Afirmaron que se trata de un buen método para lograr la transferencia de capacidad inmunológica maternal contra bacterias encapsuladas.

Logan et al. (1981) compararon la respuesta inmunológica del calostro en cerdas vacunadas con diferentes vacunas comerciales y los niveles de anticuerpos alcanzados en

el suero sanguíneo de sus crías. Midieron los niveles de anticuerpos en el calostro al parto y en el suero de los cerditos a las 24 horas y 48 horas post – parto. Encontraron que la vacunación de cerdas preñadas con *E. coli* aumentan anticuerpos en el calostro y consecuentemente el nivel de inmunidad pasiva adquirida por los cerditos. Estos autores postulan que la causa del amplio espectro observado en la concentración de inmunoglobulinas circulantes puede deberse a diferencia en la cantidad de calostro ingerido por los cerditos. Concluyeron que es importante que las cerdas produzcan calostro con una alta concentración de inmunoglobulinas para transferir la protección necesaria y que se debe hacer un esfuerzo para garantizar que todos los cerditos puedan mamar e ingerir el mismo.

Otro método de activar el sistema inmune es mediante vacunas orales. Foster et al. (2003) comprobaron que se puede lograr protección inmunológica para los intestinos inmaduros de los cerditos mediante la inoculación oral con *Salmonella* atenuada por la activación de los neutrófilos polimorfonucleares. Los animales vacunados con *S. entérica* atenuada se mantuvieron perfectamente saludables durante los 14 días del experimento. Hubo una diferencia de ( $P < 0.05$ ) entre el grupo control y el grupo experimental en la concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo. La rapidez de la activación de esta inmunidad sugiere que fue independiente de una respuesta adoptativa.

Chidlow et al. (1979) investigaron el efecto de una inmunización oral e intramuscular combinada de cerdas en sus crías. Se mezcló una vacuna oral en el alimento de las cerdas, a niveles de 1 a 5 partes por mil de antígeno, ofrecido diariamente desde las ocho semanas después de servicio hasta el momento del parto. Además se le

inyectó una vacuna intramuscular del mismo antígeno cuando faltaban por lo menos 18 días para el parto. Hubo un 43% de reducción de mortalidad en la progenie de las cerdas vacunadas cuando se combinó la vacunación oral e intramuscular. Se verificó que para la máxima transferencia se precisan niveles altos de anticuerpos en el calostro. Estos autores concluyeron que la combinación de una inmunización oral con una intramuscular provee al recién nacido tanto una protección local en su sistema gastrointestinal como una mejor inmunidad sistémica por absorción a través del epitelio intestinal.

Kohler et al. (1975) obtuvieron resultados que indicaban que la inmunización oral es más efectiva que la vacunación intramuscular en la prevención de la colibacilosis entérica. En este estudio, los autores aplicaron tres métodos distintos de inmunización a 41 cerdas. Observaron que las cerdas inmunizadas oralmente impartieron protección contra diarrea clínica a sus crías, las cuales sufrieron poca mortalidad. Aquellas reproductoras que fueron inmunizadas intramuscular lograron reducir la mortalidad, pero casi ninguno de los cerditos fueron protegidos contra los efectos de diarrea. Las observaciones clínicas también parecen indicar que la vacunación oral es más efectiva en activar los mecanismos para la inmunización pasiva y su transferencia de anticuerpos protectivos contra la colibacilosis entérica neonatal.

## **OBJETIVOS**

Esta investigación pretende:

- Determinar el efecto de la vacunación en la respuesta inmune (IgM, IgA e IgG) de las madres y su transferencia a las crías.
- Relacionar estos factores con la presencia de diarrea pre-destete y la supervivencia de los cerditos durante las primeras tres semanas de vida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Animales

Se utilizaron 10 cerdas de la raza Yorkshire de la Granja de la Estación Experimental de Lajas, del Departamento de Industria Pecuaria del Colegio de Ciencias Agrícolas, en el Recinto Universitario de Mayagüez. Las cerdas escogidas cumplían con tres requisitos: no haber sido vacunadas contra *E. coli* antes de participar en el experimento, estar en buena condición física y contar con un registro de preñez. Se utilizaron cerdas de un año de edad en adelante, que habían tenido desde 0 hasta 10 pariciones. Las reproductoras escogidas fueron apareadas con verracos de la raza Duroc de 2 a 5 años de edad que también cumplían con los requisitos antes mencionados. Ninguna de las cerdas padecía de enfermedades detectables al comienzo de este experimento.

Para cada cerda utilizada, se recopiló la siguiente información sobre su historial reproductivo: número de partos, número de servicios, y condiciones reproductivas. Las cerdas fueron inyectadas con la vacuna “*Prosystem E*” (*PBS Livestock Health*<sup>®</sup>) contra las cepas de *E. coli*, K88, K99, F41 y 987P, según descrito en la vacuna dos veces; a las 5 y 2 semanas antes de parir. La concentración de anticuerpos en el plasma se determinó utilizando la prueba de ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*), para la detección de las inmunoglobulinas (Ig's): IgG, IgA e IgM. Para calibrar los resultados referentes al nivel de inmunoglobulinas se hizo uso de un suero de referencia elaborado específicamente para cerdos (<sup>®</sup>*Bethyl Laboratories, Inc.*).

## **B. Instalaciones Físicas**

La recolección de datos experimentales se llevó a cabo en la Granja de Cerdos del Departamento de Industria Pecuaria del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico, ubicada en el pueblo de Lajas y tuvo una duración de un año y medio, (mayo 2002 hasta julio 2003). Durante los meses de gestación las cerdas estaban alojadas en jaulas tanto individuales como compartidas, con pisos de cemento y luego, 2 a 3 semanas antes del parto, se transfirieron a la sala de parto en jaulas individuales esterilizadas de 2' x 7'. Estas jaulas tienen piso de acero expandido cubierto con plástico y con espacio suficiente para cerditos de 18" en ambos lados. Cada jaula se equipó con un bebedero tipo niple y un comedero en el cual todas las cerdas recibían la misma ración. La sala de parto es del tipo abierta, con ventilación no controlada y temperatura mayormente cálida. Cuando era necesario, a los cerditos se les proveía calor suplementario y luego de las dos semanas de edad recibían alimento preiniciador en sus propios comederos. Los cerditos se destetaron a los 40 días de nacidos.

## **C. Diseño Experimental**

Se crearon dos grupos de cinco cerdas cada uno, uno experimental (V) y otro grupo control (P). La asignación de las cerdas a cada grupo fue totalmente aleatoria. A las cerdas del grupo experimental se les inyectó la vacuna Prosystem E y las del grupo control se inyectaron con un placebo de solución salina. Una vez tratadas, las cerdas se aparearon con cerdos Duroc. Luego de ser confirmada como preñada se observaba la

cerda hasta que se cumpliera el tiempo de la primera dosis de la vacuna o placebo. Las primeras dos vacunaciones se realizaron con una dosis de 2 ml intramuscular (IM) a las cinco semanas y a las dos semanas antes de la fecha esperada para el parto.

#### **D. Recolección de Sangre**

Antes de administrar el tratamiento a las cerdas, se le tomaron muestras de sangre por punción yugular para determinar la concentración de inmunoglobulinas inicial. Se extrajo el suero en tubos de 3 cc sin aditivo y con gel separador (Vacutainer®). Este se refrigeró a 4.0°C para luego ser utilizado en las pruebas de ELISA. Las cerdas que no quedaron preñadas fueron puestas bajo observación de celo para ser empadronadas por segunda vez. De no haber quedado preñadas luego de la segunda oportunidad, las cerdas fueron reemplazadas por cerdas sustitutas. Se continuó con la rutina corriente en la granja en términos de ambiente, manejo y alimentación de las cerdas en el experimento.

Al nacer los cerditos, estos se trataron según las prácticas de manejo establecidas en la Granja Experimental. Se les administró 1 cc de hierro y 1 cc de vitaminas del complejo B. Se les cortaron los colmillos, se castraron los machos y se identificaron, haciéndoles muescas en las orejas. La sangre de todos los cerditos y de las madres fue analizada a las 24 horas, 48 horas, 7 días y 14 días post-parto, por punción yugular. En los casos en los que se tuvo que intervenir en el parto, se le administraba a la cerda una dosis de 2 cc del antibiótico Polyflex por 5 días consecutivos. De cada camada se tomaron datos sobre el número y peso de los cerditos paridos y destetados, mortalidad pre – destete e incidencia de diarrea en las crías.

## **E. Pruebas Inmunológicas**

Las pruebas inmunológicas se llevaron a cabo durante los meses de agosto a diciembre de 2003. Para este propósito se utilizó un equipo de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay) (<sup>©</sup>*Bethyl Laboratories, Inc.*), localizado en el Laboratorio de Genética e Inmunología del Departamento de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez. Los resultados de las pruebas de ELISA están basados en una dilución de ( $10^{-4}$  ng/ml) por ser la concentración que mejor facilitó la detección de las diferencias en niveles de inmunoglobulinas.

Cada muestra de sangre se diluyó a tres diferentes concentraciones: D1) 1 $\mu$ l de muestra en 999 $\mu$ l de diluyente provisto por el empaque (50 mM Tris buffered saline, pH 8.0, 0.05% Tween 20, Sigma Chemical #T9030), D2) 10 $\mu$ l de la dilución #1 en 90 $\mu$ l de diluyente y D3) 10 $\mu$ l de la dilución #2 en 90 $\mu$ l de diluyente, así se hicieron diluciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ . Luego de varias pruebas, se determinó que las diluciones #2 y #3 eran las mejores para percibir algún cambio en la concentración de inmunoglobulinas en la sangre. Para las pruebas se utilizaron placas estériles de 96 espacios y a cada dilución de cada muestra de sangre se le asignaron dos espacios, quedando incluidas D2: (R1) repetición #1 y (R2) repetición #2 y D3: R1 y R2. Se asignó un espacio en la placa para cada una de las dos diluciones y para sus repeticiones, respectivamente. Se realizaron 6 sangrados de las madres (2 durante la gestación y 4 durante las 2 semanas post-parto). Las crías fueron sangradas 4 veces (24 y 48 horas y a los 7 y 14 días de nacidos). En las muestras obtenidas en cada sangrado de madres e hijos se analizaron las concentraciones sanguíneas de IgG, IgM e IgA utilizando las diluciones antes mencionadas. La sangre era

centrifugada el mismo día de su recolección para separar el plasma. Éste fue refrigerado a 4.0°C.

Se procedió con los pasos determinados por el Laboratorio Bethyl.

1. Los espacios se cubrían con 100µl del anticuerpo de captura, ya sea IgG, IgA o IgM, para proveer la primera capa y se dejaban incubando por 60 minutos. Luego se lavaba con la solución provista para este propósito (50mM Tris, 0.14 m NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0).
2. Se le añadía 200µl de una solución llamada “postcoat” para sellar el anticuerpo de captura. Ésta se dejaba incubando por 30 minutos y luego se pasaba a lavar.
3. Se colocó 100µl de cada muestra en cada uno de los espacios asignados para ella. Se incubaba 60 minutos y se repetía el lavado. Al hacer estos pasos se iba separando el anticuerpo del plasma permitiendo así su detección.
4. Se añadía 100µl del conjugado Anticuerpo/HRP la cual se unía con el anticuerpo del plasma. Se incubaba por 60 minutos y se lavaba nuevamente.
5. 100µl de sustrato (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se añadía para causar una reacción que producía un color azul cuya intensidad variaba de acuerdo a la cantidad de inmunoglobulinas presente.
6. Luego de 15 minutos se añadía una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 M a cada uno de los espacios. Esto causaba que el color azul cambiara a amarillo.

7. Se procedía a hacer lectura de las muestras en un espectrofotómetro empleando luz con una longitud de onda de 450 nm.

De acuerdo a la absorbancia observada y con un ajuste según los resultados obtenidos con el suero de referencia provisto por la misma casa (<sup>®</sup>*Bethyl Laboratories, Inc.*), se calculó la concentración de anticuerpos en la muestra.

## **F. Variables**

### 1. Variables Dependientes

En este estudio se identificaron como variables dependientes los niveles de concentración final de las inmunoglobulinas M, A y G en ng/ml, tanto en las Cerdas como en sus crías.

### 2. Variables Independientes

#### A. Variables Cualitativas

Las variables independientes cualitativas consideradas en este estudio fueron: *tratamientos* a los que fueron sometidas las Cerdas: (vacunadas o no vacunadas); *identidad* de cada cerda madre, *concentración inicial de inmunoglobulinas en la sangre*, *identidad* de cada cerdito nacido de cada cerda madre y *sexo* de cada cerdito nacido.

#### B. Variables Cuantitativas

Las variables independientes cuantitativas fueron: *el número de partos* de las cerdas (0 – 10), *días de sangrado* (100 – 135 días para las Cerdas y 1 – 21 días para los cerditos), *tamaño de la lechigada* y peso inicial de los cerditos nacidos (en libras).

## G. Análisis Estadísticos

### 1. Cerdas

La concentración de las inmunoglobulinas M, A y G a los 100 días de gestación (2 semanas antes del parto) y a las 24 horas (115 días), 48 horas (116 días), 7 días (121 días) y 21 días (135 días) post-parto en las cerdas se analizaron utilizando un diseño completamente aleatorizado de acuerdo al modelo lineal general (GLM) utilizando el programa SAS (1990). El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \zeta_j + \delta_l + \omega_{il} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:

$Y_{ijkl}$  = Concentración de inmunoglobulina en la sangre de las cerdas (M, A y G ng/ml)

$\mu$  = Media poblacional estimada

$\alpha_i$  = Efecto del tratamiento (cerdas vacunadas o no vacunadas)

$\zeta_j$  = Efecto de la covariable (concentración inicial de inmunoglobulina M, A o G en la cerda)

$\delta_l$  = Efecto del día de sangrado (100 días, 115 días, 116 días, 121 días y 135 días)

$\omega_{il}$  = Efecto de la interacción de tratamiento y día de sangrado

$\varepsilon_{ijkl}$  = Error experimental asociado a los tratamientos, la concentración inicial de inmunoglobulinas en la madre, la interacción y día de sangrado)

Para estimar la relación entre las variables independientes, número de parto y concentración inicial de inmunoglobulinas en la sangre de las cerdas, se realizó un análisis de correlación (Bobko, 1995).

## 2. Cerditos

Se analizaron las variables de tratamiento en la madre, sexo y día de sangrado para evaluar la concentración de las inmunoglobulinas M, A y G en la sangre de los cerditos. La concentración inicial de inmunoglobulinas en cada cerda, el peso al nacer y el tamaño de lechigada fueron evaluados como covariables para este mismo propósito. La covariable lechigada se dividió en dos categorías; 8 ó menos cerditos ó 9 cerditos o más. El factor cerda se utilizó como aleatorización en un modelo Mixto que se utilizó para analizar los datos con el programa de SAS (1990). La concentración de las inmunoglobulinas M, A y G se evaluaron para los sangrados durante los días 1, 2, 7 y 21 en cerditos. El modelo utilizado fue:

$$Y_{ijklmn} = \mu + \alpha_i + \zeta_j + \gamma_k + \delta_l + \lambda_m + \pi_n + \omega_{il} + \varepsilon_{ijklmn}$$

donde:

$Y_{ijklmn}$  = Concentración final de inmunoglobulina en la sangre de los cerditos (M, A y G ng/ml)

$\mu$  = Media poblacional estimada

$\alpha_i$  = Efecto del tratamiento (cerdas vacunadas o no vacunadas)

$\zeta_j$  = Efecto de la covariable (concentración inicial de

		inmunoglobulina M, A o G en la cerda)
$\gamma_k$	=	Efecto de la covariable (peso al nacer de los cerditos)
$\delta_l$	=	Efecto del día de sangrado (1, 2, 7 y 21 días)
$\lambda_m$	=	Efecto del sexo
$\pi_n$	=	Efecto de la covariables (tamaño de la lechigada grande o pequeña)
$\omega_{il}$	=	Efecto de la interacción de tratamiento y día de sangrado
$\varepsilon_{ijklmn}$	=	Error experimental asociado a los tratamientos y la concentración inicial de inmunoglobulinas, peso al nacer, días de sangrado, sexo, tamaño de lechigada, la interacción y el factor cerda como aleatorización)

Para estimar la relación entre las variables, peso al nacer y concentración de inmunoglobulinas en la sangre de los cerditos, se realizó un análisis de correlación (Bobko, 1995).

La incidencia de diarrea fue evaluada en la prueba de *Ji Cuadrada* (Steel et al., 1953) para determinar si existía diferencia significativa entre los cerditos de cerdas vacunadas y no vacunadas.

### 1. Hipótesis

$H_0$ : Vacunados = No Vacunados

$H_a$ : Vacunados < No Vacunados

## 2. Fórmula

$$\chi^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma^2}$$

donde:

$\chi^2$  = incidencia de diarrea por lechigada

$n - 1$  = grados de libertad

$s^2$  = desviación estándar

$\sigma^2$  = varianza de la población

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Cerdas

#### 1. Inmunoglobulina M

**Tabla 1. Promedio de IgM para cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).**

Tratamiento*	Día de Sangrado* (ng/ml)				
	100 <sup>v</sup>	115 <sup>w</sup>	116 <sup>x</sup>	121 <sup>y</sup>	135 <sup>z</sup>
Vacunadas	0.82 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.07 <sup>ad</sup>	0.75 ± 0.07 <sup>ac</sup>
No Vacunadas	0.80 ± 0.07 <sup>af</sup>	0.56 ± 0.08 <sup>bg</sup>	0.56 ± 0.07 <sup>cg</sup>	0.61 ± 0.07 <sup>dg</sup>	0.63 ± 0.07 <sup>efg</sup>

\*Letras distintas en una misma fila representan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05)

<sup>v</sup> 2 semanas antes del parto

<sup>w</sup> 24 horas post – parto

<sup>x</sup> 48 horas post – parto

<sup>y</sup> 7 días post – parto

<sup>z</sup> 21 días post – parto

Los resultados obtenidos durante los periodos de sangrado para tratamiento están presentados en la *Tabla 1* con un  $r^2 = 0.90$ . No hubo diferencia significativa entre los días de sangrado (P > 0.05), excepto en el día 115 (24 horas post – parto) y en el día 116 (48 horas post – parto) para las cerdas vacunadas. Si hubo diferencias significativas entre las cerdas vacunadas y no vacunadas durante el mismo periodo (P < 0.05). Las cerdas no vacunadas demostraron una concentración significativamente mayor de IgM en el día 100 (2 semanas antes del parto) que en los días 115, 116 y 121 (7 días post – parto), (P < 0.05), pero no al comparar con la concentración de IgM en el día 135 (21 días post – parto) (P > 0.05). No hubo diferencia significativa en la concentración de IgM en las cerdas no vacunadas entre los días 115, 116, 121 y 135 (P < 0.05). La concentración

de IgM en las cerdas vacunadas fue significativamente mayor que en las cerdas no vacunadas. La IgM se encuentra usualmente en un 10 – 12% en la sangre y es la primera inmunoglobulina en formarse en la respuesta primaria a una infección. Al ser un pentámero no se necesita muchas para poder inducir a una respuesta inmunológica. La IgM es un pentámero y puede hacer la misma función protectora que IgA (*Carpenter, 1975*). Su transferencia por el calostro sirve para impedir la invasión intracelular de antígenos bacterianos en el animal neonato. Normalmente esta inmunoglobulina se encuentra fuera de la célula y por ésta razón la podemos encontrar en concentraciones altas al comienzo de la vida. La IgM, al ser una de las más eficientes puede actuar en concentraciones mínimas y al ser posible la conversión de ésta a otra inmunoglobulina por el intercambio de isótopo en las células B, podría explicar el aumento visto en las cerdas (*Janeway, 1999*).

## 2. Inmunoglobulina A

Los resultados obtenidos al determinar la concentración de IgA en la sangre de las cerdas experimentales están tabulados en la *Tabla 2* con un  $r^2 = 0.85$ . El tipo de tratamiento y la concentración inicial de IgA en la sangre resultaron ser las variables que más afectaron la concentración y al igual que en la IgM, si se encontró diferencia significativa entre los dos grupos de cerdas ( $P < 0.05$ ) (*Tabla 2*).

**Tabla 2. Promedio de IgA para cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).**

	Día de Sangrado* (ng/ml)				
	100 <sup>v</sup>	115 <sup>w</sup>	116 <sup>x</sup>	121 <sup>y</sup>	135 <sup>z</sup>
<b>Tratamiento*</b>					
<b>Vacunadas</b>	0.27 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>ad</sup>	0.27 ± 0.02 <sup>ac</sup>
<b>No Vacunados</b>	0.27 ± 0.02 <sup>af</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>bf</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>cf</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>df</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>aef</sup>

\*Letras distintas en una misma fila representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )

<sup>v</sup> 2 semanas antes del parto

<sup>w</sup> 24 horas post – parto

<sup>x</sup> 48 horas post – parto

<sup>y</sup> 7 días post – parto

<sup>z</sup> 21 días post – parto

No hubo diferencia significativa entre los días de sangrado dentro de un mismo grupo (vacunados o no vacunados). Sí hubo diferencia significativa entre los días 116 de las cerdas vacunadas y no vacunadas ( $P < 0.05$ ). La concentración inicial de IgA significativa sí afectó los niveles posteriores de IgA ( $P < 0.05$ ) y ésta resultó estar positivamente correlacionada con el número de partos de la cerda. Mientras más partos habían tenido las cerdas, más IgA se encontraba en su sangre. Se puede inferir que al haber un número mayor de partos y por ende más edad, las cerdas pudieron estar expuestas a una variedad mayor de patógenos manifestando una concentración mayor de

IgA. Según los resultados obtenidos se puede inferir además que la vacunación promueve un aumento estable en la concentración de IgA en cerdas. La IgA es la inmunoglobulina más importante en el calostro de las cerdas (*Sánchez, 2004*). Ésta se encarga de la neutralización bacteriana en las mucosas corporales. Al aumentar la concentración en el calostro de la cerda podemos concluir que la vacunación promueve a la protección inmediata de los intestinos de las crías (*Benjamini et al., 1991* y *Janeway et al., 1999*).

### **3. Inmunoglobulina G**

Los resultados obtenidos durante los periodos de sangrado de la cerda están presentados en la *Tabla 3* con un  $r^2 = 0.98$ . No se encontró diferencia significativa entre tratamientos ni entre días de sangrado. En la *Tabla 3* se refleja que sólo hubo diferencia significativa entre el día 115 y el día 135 en el grupo de cerdas vacunadas.

La IgG es la inmunoglobulina más abundante en la sangre. Representa la segunda línea de defensa y aumenta en reacciones secundarias. Al estar en altas concentraciones en la sangre de las cerdas, el tratamiento con la vacuna no causó ningún efecto en sus niveles de la sangre.

**Tabla 3. Promedio de IgG para cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).**

	Día de Sangrado*				
	100 <sup>v</sup>	115 <sup>w</sup>	116 <sup>x</sup>	121 <sup>y</sup>	135 <sup>z</sup>
<b>Tratamiento*</b>					
<b>Vacunadas</b>	0.77 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.76 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.81 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.74 ± 0.03 <sup>ac</sup>
<b>No Vacunadas</b>	0.83 ± 0.03 <sup>af</sup>	0.77 ± 0.03 <sup>bf</sup>	0.78 ± 0.03 <sup>bf</sup>	0.80 ± 0.03 <sup>bf</sup>	0.78 ± 0.03 <sup>cf</sup>

\*Letras distintas en una misma fila representan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05)

<sup>v</sup> 2 semanas antes del parto

<sup>w</sup> 24 horas post – parto

<sup>x</sup> 48 horas post – parto

<sup>y</sup> 7 días post – parto

<sup>z</sup> 21 días post – parto

Para la inmunoglobulina G se encontró que la variable más significativa fue la concentración inicial de IgG en la sangre de las cerdas. Ésta, al igual que la IgA, tuvo una correlación positiva con el número de partos de las cerdas.

El promedio de las concentraciones de las tres inmunoglobulinas en las madres está presentado en la *Tabla 4*. Hubo un aumento significativo en los niveles de las concentraciones de IgM e IgA en las cerdas vacunadas, pero no así en la concentración de IgG. Según estos resultados hubo un efecto positivo de la vacunación en los niveles de IgM e IgA promoviendo una posible protección maternal a los cerditos.

**Tabla 4. Promedio de inmunoglobulinas M, A y G para cerdas vacunadas y no vacunadas desde los 100 días de gestación hasta los 21 días post -parto. (ng/ml)**

	Tratamiento	
	Vacunadas	No Vacunadas
IgM ng/ml*	0.77551 ± 0.0350	0.63309 ± 0.0364
IgA ng/ ml*	0.28994 ± 0.0129	0.22304 ± 0.0135
IgG ng/ml	0.78071 ± 0.0150	0.79280 ± 0.0154

\* Diferencia significativa de P < 0.05

## A. Cerditos

### 1. Inmunoglobulina M

Los niveles de IgM obtenidos durante el sangrado de los cerditos están presentados en la *Tabla 5*. Hubo un aumento significativo en los niveles de IgM en los cerditos de madres vacunadas en comparación con aquellos de madres no vacunadas.

**Tabla 5. Promedio de IgM para cerditos de cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).**

Tratamiento	Día de Sangrado (ng/ml)			
	1	2	7	21
Vacunados*	0.5036 ± 0.0211 <sup>a</sup>	0.3193 ± 0.0214 <sup>b</sup>	0.2194 ± 0.0221 <sup>c</sup>	0.2234 ± 0.0224 <sup>c</sup>
No Vacunados	0.2029 ± 0.0264 <sup>d</sup>	0.1785 ± 0.0227 <sup>bd</sup>	0.1511 ± 0.0227 <sup>cd</sup>	0.1477 ± 0.0235 <sup>cd</sup>

\*Letras distintas en una misma fila representan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05)

En los cerditos nacidos de todas las cerdas se encontró que tanto la concentración inicial de inmunoglobulina M de la madre como la interacción de tratamiento por día de sangrado tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de IgM en la sangre ( $P < 0.05$ ). Se puede observar que la concentración de IgM va disminuyendo mientras pasan los días, pero aún con este efecto de disminución en la concentración de IgM, la diferencia entre los dos grupos se mantuvo significativa ( $P < 0.05$ ).

Dentro del grupo de cerditos de madres vacunadas se encontró que al primer día de sangrado la concentración de IgM fue significativamente mayor al resto de los días y significativamente mayor al primer día de sangrado de los cerditos de madres no vacunadas. El segundo día del grupo de los vacunados fue significativamente mayor al día 7 y 21 de este mismo grupo ( $P < 0.05$ ), pero no al día 2 del grupo de no vacunados ( $P > 0.05$ ). El día 7 del grupo de madres vacunadas no fue significativamente mayor del día 21 de su mismo grupo ni del día 7 del grupo de cerditos de madres no vacunadas ( $P > 0.05$ ). No hubo diferencia significativa entre los tratamientos en el día 21 ( $P > 0.05$ ). Los datos también representan que no hubo diferencia significativa entre los días de sangrado de los cerditos de madres no vacunadas.

Se pudo observar que los cerditos de madres vacunadas tuvieron siete días en los cuales los niveles de IgM se mantuvieron significativamente mayores a la de los cerditos de madres no vacunadas. Aunque las madres vacunadas comenzaron con una concentración inicial de IgM más alto que el que tenían las cerdas no vacunadas, ésta no afectó la diferencia entre los dos grupos. Esto nos lleva a inferir que la vacuna aumentó la concentración de IgM en la sangre de las cerdas vacunadas contra *E. coli* causando así

una mayor transferencia a pesar de la alta concentración que poseían (*Logan y Meneely, 1981*).

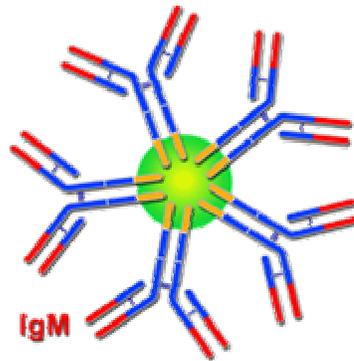


Figura 1. Esquema de la IgM en forma de pentámero

## 2. Inmunoglobulina A

Los resultados de los sangrados para los niveles de IgA en el suero de los cerditos se presentan en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Promedio de IgA para cerditos de cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).

	Día de Sangrado* (ng/ml)			
	1	2	7	21
<b>Tratamiento*</b>				
<b>Vacunados</b>	0.5822 ± 0.0183 <sup>a</sup>	0.4791 ± 0.0187 <sup>b</sup>	0.2431 ± 0.0190 <sup>c</sup>	0.1282 ± 0.0194 <sup>d</sup>
<b>No Vacunados</b>	0.2600 ± 0.0230 <sup>c</sup>	0.1863 ± 0.0193 <sup>cf</sup>	0.1298 ± 0.0193 <sup>cefg</sup>	0.1059 ± 0.0203 <sup>degh</sup>

\*Letras distintas en una misma fila representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )

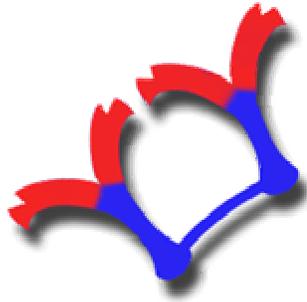
Al igual que en la IgM, en la *Tabla 6* podemos ver que mientras iban pasando los días de experimentación la concentración de IgA iba disminuyendo, aunque ésta fue mayor en los cerditos nacidos de cerdas vacunadas ( $P < 0.05$ ). En el grupo de cerditos de madres vacunadas existe diferencia significativa entre todos los periodos de sangrado ( $P < 0.05$ ). Hubo diferencia significativa entre los días 1 y 2 de los cerditos de madres vacunadas y no vacunadas. El resto del tiempo no difirieron entre los días los dos grupos.

Para el grupo de cerditos de madres no vacunadas se encontró que el día 1 de este grupo no es significativamente mayor en comparación al resto de los días en el experimento ( $P > 0.05$ ). El día 2 de este grupo no fue significativamente mayor al día 7 de estos ( $P > 0.05$ ), pero si fue significativamente mayor al día 21 ( $P < 0.05$ ). Desde el día 7 en adelante no existe diferencia significativa ( $P > 0.05$ ).

Para la inmunoglobulina A la covariable de sexo tuvo una significación de  $P = 0.05$  dejando saber que existe diferencia entre la concentración de esta inmunoglobulina en los machos y las hembras. Hubo un efecto significativo entre el tipo de tratamiento y el día de sangrado ( $P < 0.05$ ). Ni la concentración inicial de IgA en las madres, ni el tamaño de lechigada, ni el peso al nacer reflejaron resultados significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ).

La inmunoglobulina A es en la cual se puede apreciar la mayoría de los cambios ya que hay diferencia significativa entre los tratamientos y entre los días. Ésta es la más importante para el cerdo en la inmunidad de las mucosas y la principal en la lactancia del animal (*Sánchez, 2004*). Podemos inferir que la vacunación de las cerdas tuvo su mayor efecto en la IgA dado el hecho que la interacción entre el tratamiento y los días fue el

factor de más significación. Como la concentración inicial de IgA de las cerdas no influyó en la concentración de IgA en los cerditos podemos concluir que el factor de vacunación promovió un aumento de esta inmunoglobulina en la transferencia maternal.



**Figura 2. Esquema de la IgA en forma de dímero**

### 3. Inmunoglobulina G

Los resultados de las pruebas para la detección de IgG en cerditos se demuestran en la *Tabla 7*.

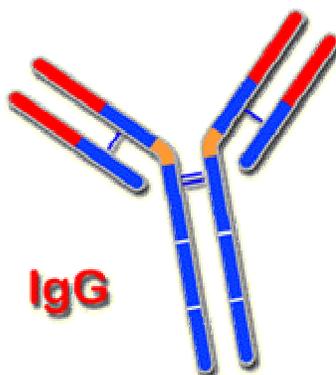
**Tabla 7. Promedio de IgG para cerditos de cerdas vacunadas y no vacunadas (ng/ml).**

	Día de Sangrado (ng/ml)			
	1	2	7	21
<b>Tratamiento</b>				
<b>Vacunados*</b>	1.61253 ± 0.2112 <sup>a</sup>	1.53002 ± 0.2108 <sup>b</sup>	1.59056 ± 0.2109 <sup>ab</sup>	1.48782 ± 0.2108 <sup>b</sup>
<b>No Vacunados</b>	0.74251 ± 0.0302 <sup>a</sup>	0.71922 ± 0.0271 <sup>a</sup>	0.68114 ± 0.0271 <sup>a</sup>	0.68446 ± 0.0283 <sup>ab</sup>

\*Letras distintas en una misma fila representan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05)

La concentración de IgG en los cerditos nacidos a madres vacunadas fue significativamente mayor entre los días 1 y 2 del mismo tratamientos ( $P < 0.05$ ). No hubo diferencia significativa entre los días 2, 7 y 21 del grupo de vacunados. El único día en que difirieron significativamente los tratamientos fue en el día 2 ( $P < 0.05$ ). Ninguno de los días de los cerditos de cerdas no vacunadas resultó significativamente diferente entre ellos mismos, ni entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). En el nivel de IgG fue afectado significativamente por los factores del sexo del cerdito, la interacción con el tratamiento y los días de sangrado al igual que la concentración inicial de IgG de la madre. La disminución a la concentración de IgG en cerditos a través del tiempo no es tan lineal como para IgM e IgA, sino que varía a través de los días de sangrado. No se encontró efecto significativo por el tratamiento de las madres, tamaño de la lechigada ni el peso al nacer.

Podemos concluir que al tener las madres una concentración alta de IgG la vacunación no tuvo efecto en el aumento subsiguiente en sus crías. La inmunoglobulina G es la principal en el cerdo, representando entre el 80 y el 85% de las inmunoglobulinas porcinas en el suero y calostro, siendo además el anticuerpo más importante en la [respuesta secundaria](#) (Sánchez, 2004). La IgG posee actividad antibacterial, antiviral y antitóxica y es la inmunoglobulina más abundante en el suero sanguíneo (Carpenter, 1975). Al haber una concentración alta de esta en el cuerpo aparentemente la vacunación no tuvo la necesidad de aumentarla.



**Figura 3. Esquema de la estructura de la IgG**

Se encontró una correlación o asociación negativa entre el peso de los cerditos al nacer y las concentraciones de IgM, IgA e IgG, pero ésta no se puede interpretar en este momento como significativa debido a que los cerditos no fueron pesados todos al momento de nacer y algunos fueron pesados días después, alterando el valor de esta correlación.

De todos estos datos podemos inferir que el tratamiento, ya sea de vacunación o ausencia de vacunación de las cerdas, tiene efecto en la concentración de inmunoglobulinas M y A en la sangre de cerditos recién nacidos, pero no en la de IgG y que el nivel inicial de inmunoglobulinas en la sangre de las madres tiene un efecto significativo en la concentración de éstas en las crías. La *Tabla 8* presenta las diferencias significativas entre IgM e IgA para cerditos.

**Tabla 8. Promedio de inmunoglobulina M, A y G para cerditos de madres vacunadas y no vacunadas.**

	Tratamiento	
	<i>Vacunados</i>	<i>No Vacunados</i>
IgM ng/ml*	0.31642 ± 0.0133	0.17006 ± 0.0151
IgA ng/ml*	0.35814 ± 0.0111	0.17053 ± 0.0124
IgG ng/ml	1.55524 ± 0.21025	0.70683 ± 0.0214

\* Diferencia significativa de  $P < 0.05$

Estos resultados no concuerdan con los de otras investigaciones que han encontrado que la respuesta inicial en las concentraciones de IgM e IgG es mayor, mientras que la IgA comienza a bajo nivel y luego sube más lentamente (*Bertschinger et al., 1999*). Aunque la IgM se encontró en menor concentración que la IgA e IgG, éste concuerda con estudios donde se demuestra que la vacunación promueve un aumento de esta inmunoglobulina (*Logan et al., 1981*).

### C. Otros Factores

Hubo un 5.26% (2 cerditos) y un 15.56% (7 cerditos) de muertes antes del destete dentro de las camadas producidas por cerdas en los tratamientos (P) y (V) respectivamente. Estas muertes fueron el resultado de aplastamientos o de competencia entre crías. La incidencia de diarrea observada en las camadas de cerdos sin vacunar fue de 25.64% vs. 13.33% en las camadas de cerdos vacunados. El efecto de la transferencia de inmunidad pasiva específica con la *E. coli* a los cerditos no pudo ser probado ya que los cerditos no fueron retados biológicamente con cepas de este organismo. La

incidencia de diarrea fue mínima para ambos grupos, con una sola camada afectada en cada grupo representando un 13.33% para el tratamiento con vacuna y un 25.64% para el grupo control. Esto no se puede atribuir específicamente a una infección de las cepas K88, K99, F41 o 987P ya que no se hizo análisis de heces fecales para la identificación de estas cepas, pero los signos clínicos observados tales como diarrea amarilla y líquida, pueden sugerir la presencia de *E. coli*. Al utilizar la prueba de *Ji cuadrada* para analizar estos datos, no se encontró evidencia estadística para concluir que los cerditos nacidos de cerdas vacunadas están en menor riesgo de incidencia de diarrea durante las primeras semanas de nacidos.

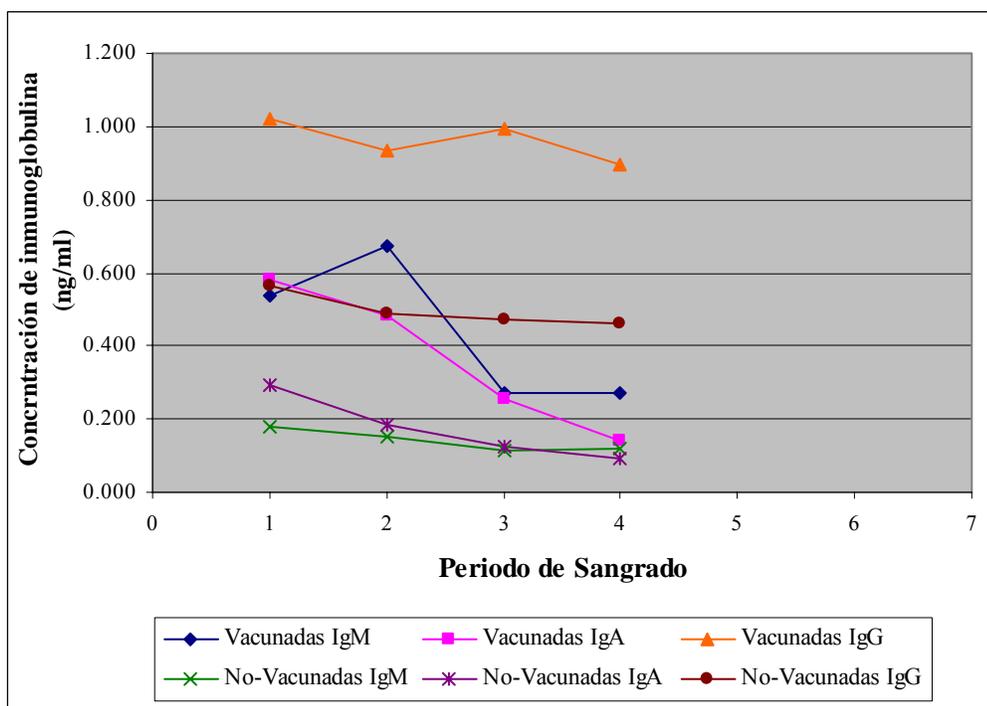
La tendencia generalizada fue el aumento en los niveles de inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG en cerdas vacunadas sobre las que no recibieron la vacuna. Sin embargo, es importante señalar que el aumento significativo de las concentraciones de IgM e IgA en las cerdas fueron mayormente influenciadas por las concentraciones iniciales de estas inmunoglobulinas en las cerdas. Según *Carpenter et al. (1975)* en el suero sanguíneo primero suele aparecer un alza de la IgM y luego de la IgG. Según estos investigadores estas concentraciones elevadas pueden ser medidas hasta 30 días luego de la inmunización dependiendo de la especie animal. La tendencia a una mayor concentración de las inmunoglobulinas M, A, y G en los cerditos vacunados fue consistente durante todo el estudio, y se pudo notar una persistencia a este aumento la cual fue descrita por *Mee et al. (1996)*.

La Inmunoglobulina A se mantuvo durante todo el experimento en concentraciones relativamente altas y de acuerdo con *Bertschinger et al. (1999)*, ésta se convierte en la inmunoglobulina principal luego que la IgG disminuye en concentración.

La IgA se encarga de proveer protección local contra las infecciones en los intestinos y su trabajo principal suele ser allí aunque se puede encontrar en otras partes del cuerpo (*Benjamini et al., 1991*). La IgA, según *Carpenter (1975)*, suele no estar presente en animales libres de antígenos, pero aparece después que una flora bacterial ha sido permitida florecer.

Otros estudios, por ejemplo el de *Logan y Meneely (1981)*, también demostraron que vacunaciones a Cerdas antes del parto pueden promover una mayor protección contra enfermedades en los recién nacidos, pero es pertinente señalar algunas diferencias entre los estudios anteriores y el presente. El uso de facilidades donde se alojaron los animales fueron de tipo abierta en lugar de cerrada, la variabilidad de partos en los animales fue heterogénea, desde cerdas primerizas hasta cerdas con 10 partos, la ventilación fue abierta, la temperatura del aire durante el periodo de experimentación fue mayormente cálida, no controlada y húmeda. La granja experimental en donde se realizó el experimento es una granja con mínima incidencia de patógenos y la ausencia de un reto biológico con *E. coli* no permitió analizar la acción protectora de la vacuna. Pero, aún con estas diferencias vigentes los resultados demuestran que la vacunación de madres antes del parto influencia un aumento de inmunoglobulinas protectoras a sus crías.

Los niveles promedios de inmunoglobulinas de los cerditos de cada tratamiento se muestran en la *Tabla 8*. Al analizar los datos por días de sangrado se observa que consistentemente, los niveles de las tres inmunoglobulinas resultaron ser significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) en comparación con los de los cerditos de madres no vacunadas para la IgM e IgA. Sin embargo, es notable cómo estos niveles fueron disminuyendo según pasaban los días de sangrado.



**Figura 4. Niveles Promedio de IgM, IgA e IgG en Cerditos de Madres Vacunadas vs. No Vacunadas**

Una explicación para las diferencias observadas en los niveles de inmunoglobulinas en el suero entre los cerditos de madres vacunas y no vacunadas puede ser que durante el parto una porción de linfocitos estimulados por antígenos en los intestinos emigran a la glándula mamaria y producen anticuerpos específicos contra los patógenos entéricos (*Bertschinger et al., 1999*). Estos son transferidos a través del calostro. La vacunación pudo haber actuado en esta ruta de transferencia estimulando un aumento en la producción de anticuerpos.

Se observó la tendencia esperada de una merma gradual en los niveles de inmunoglobulinas luego del parto pero las diferencias entre los tratamientos se mantuvieron constantes. Ésta tendencia se puede observar al ver los niveles de IgM e

IgA, las cuales empezaron en concentraciones altas y luego disminuyeron al pasar el tiempo. Los cerditos de madres vacunadas mostraron concentraciones mayores de IgA, pero ésta disminuyó hasta llegar a un nivel cercano al de los cerditos provenientes de madres no vacunadas (*Figura 4*). Aún así la diferencias entre los promedios de cada grupo fue significativa ( $P < 0.05$ ). Los datos presentes sustentan la hipótesis de que la vacunación de las madres y de sus crías es efectiva para la prevención de colibacilosis en cerditos recién nacidos.

El por ciento de ganancia en peso corporal de los cerditos se puede definir como el peso al destete – peso al nacimiento/peso al destete x 100. Este criterio de crecimiento fue mayor en cerditos que nacieron de madres vacunadas. Pero, al analizar estadísticamente, la diferencia no fue significativa ( $P > 0.05$ ) entre ambos grupos (*Tabla 9*). Se llegó a destetar un número mayor de cerditos en las camadas de cerdas vacunadas pero tampoco esto causó una diferencia estadísticamente significativa, 84.44% (38 cerditos de 45 cerditos nacidos) de destetes para cerdas vacunadas y 94.74% (36 cerditos de 38 cerditos nacidos) de destetes para cerdas no vacunadas. Posiblemente, la diferencia no fue estadísticamente significativa debido a que la cantidad de cerditos nacidos de las cerdas vacunadas fue mayor y subsiguientemente el número de muertes también, ( $n_v = 7$  muertes de 45 cerditos vs.  $n_p = 2$  muertes de 38 cerditos).

Todas las muertes ocurridas en este experimento fueron causadas por aplastamiento o desnutrición. Los cerditos más pequeños y débiles no podían mamar lo suficiente y eran más propensos a ser aplastados.

**Tabla 9. Promedio de ganancia en peso corporal y mortalidad de los cerditos**

	<b>% de Ganancia en Peso</b>	<b>Destetes</b>	<b>Muertos</b>
Vacunadas	74.42 ± 6.85	38	7
No-Vacunadas	68.92 ± 6.15	36	2

La vacunación de las cerdas a los 78 y 100 días de gestación con la vacuna contra las cepas K88, K99, F41 y 987P ayudó a aumentar los niveles de IgM e IgA específicos de las madres y la transferencia pasiva de anticuerpos a los cerditos. Esta inmunidad debe ser conducente a una protección contra infección de *E. coli* aunque con estos datos limitados no se puede afirmar categóricamente. La vacuna no tuvo efectos significativos en la incidencia de mortalidad de las crías ni en su ganancia en peso corporal. Tampoco mejoró el porcentaje de destetes. Puesto que no hubo mucho problema de diarreas durante el periodo experimental, no fue posible evaluar el efecto de la vacunación en estas condiciones.

## CONCLUSIÓN

La vacunación de las cerdas a los 78 y 100 días de gestación con la vacuna *Prosystem E* contra las cepas K88, K99, F41 y 987P ayudó a aumentar la transferencia de inmunidad pasiva no específica de las madres a los cerditos. Esta inmunidad es conducente a una posible protección contra infección de *E. coli*. No se pudo notar una reducción en la incidencia de colibacilosis debido a la baja incidencia natural en esta finca. Se puede concluir con la presente investigación que el aumento de inmunoglobulinas que obtuvieron en los cerditos vacunados tiene un efecto positivo en la prevención de colibacilosis si se utiliza en fincas más propensas a enfermedad o que no tuvieran un buen manejo. La vacuna no tuvo efecto en la ganancia en peso corporal, muertes pre-destete, ni en la incidencia de diarrea en cerditos recién nacidos.

A veces las reacciones adversas contrarrestan la vacunación. La recomendación sobre el uso de la vacunación se debe considerar en cada situación particular (*Larson, 1999*). Una vacuna puede tener un efecto positivo o negativo por lo tanto hay que evaluar su efecto en los animales. La vacuna utilizada en este experimento es una donde se encuentra la bacteria muerta, ya que es segura para animales preñados y por ende la protección adquirida de ésta es temporera, se requieren dosis múltiples y sólo induce inmunidad humoral y no celular.

Se requiere más investigaciones donde haya un reto biológico ya que la vacuna no tuvo ningún efecto en la incidencia de muertes, ganancia en peso corporal, ni en el número de destetes producidos. Se debiera medir la protección específica de la vacuna contra las cepas que se utilizaron para vacunar y la prevención de estas cepas en la población general de cerdos en Puerto Rico. Sólo de esta manera podríamos determinar la efectividad de vacunar contra *E. coli* en los hatos de Puerto Rico con las vacunas comerciales disponibles.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arthington, J. D., M. B. Cattell, J. D. Quigley, G. C. McCoy, and W. L. Hurley. 2000. Passive Immunoglobulin Transfer in Newborn Calves Fed Colostrum or Spray-Dried Serum Protein Alone or as a Supplement to Colostrum of Varying Quality. J Dairy Sci 83: 2834 – 2838.
- Benjamini, Eli, and Sidney Leskowitz. 1991. Immunology, A Short Course, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc., Publication. New York, NY.
- Berenson, Mark L. & David M. Levine. 1996. Basic Business Statistics, Concepts and Applications, 6<sup>th</sup> ed. Prentice hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Bertschinger, H. U., J. M. Fairbrother, N. O. Nielsen, and J. F. Pohlenz. 1999. *Escherichia coli*. Infections. Diseases of Swine, 8<sup>th</sup> ed. p:487 – 521.
- Bobko, Philip. 1995. Correlation and Regression. McGraw-Hill, Inc. New York.
- Bosworth, Brad. 1998. Hemolytic *E. coli* and Edema Disease. Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar.
- Bush, L. J. and T. E. Staley. 1980. Absorption of Colostral Immunoglobulins in Newborn Calves. J Dairy Sci 63 (4):672 – 680.
- Carpenter, Philip L. 1975. Immunology and Serology, 3<sup>rd</sup> ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
- Chase, Chris. 2003. Building Immunity is a Balancing Act. (Artículo) National Hog Farmer. [www.nationalhogfarmer.com](http://www.nationalhogfarmer.com)
- Chidlow, J. W., J. A. Blades, and P. Porter. 1979. Sow vaccination by combined oral and intramuscular antigen: A field study of maternal protection against neonatal *Escherichia coli* enteritis. Veterinary Record 105: 437 – 440.
- Dea, S., L. Wilson, D. Therrien, E. Cornaglia. 2000. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli* – expressed nucleocapsid protein as antigen. J of Virological Methods 87: 109-122.
- Edfors-Lilja, Inger. 1985. Marker Traits of Disease Resistance in the Pig. Genetic studies of immune responsiveness and the intestinal receptor for *E. coli* K88. Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. of Animal Sci. Report 65
- Edfors – Lilja, I., B. Gahne, C. Johnsson and B. Morein. 1984. Genetic influence on antibody response to two *Escherichia coli* antigens in pigs. I. Standardization of

- immunization schedule. Swedish University of Agricultural Science, Dept. of Animal Sci.
- Edfors – Lilja, Inger, B. Gahne and H. Petersson. 1985. Genetic influence on antibody response to two *Escherichia coli* antigens in pigs. II. Difference in response between paternal half – sibs. Swedish University of Agricultural Science. Dept. of Animal Breeding and Genetics.
- Edfors – Lilja, Inger, H. Petersson, and B. Gahne. 1988. Performance of Pigs with or without the Intestinal Receptor for *Escherichia coli* K88. Swedish University of Agricultural Sciences. Dept. of Animal Breeding and Genetics
- El, Khateib T. 1995. Behaviour of *E. coli* in Egyptian fresh sausage emulsion. Influence and interaction of temperature, pH and sodium chloride. (Abstract) *Fleischwirtschaft* 75 (2): 191 – 192, 195. *Escherichia coli* 0157 Jan 1994 – July 1995. SRB 95-05 Special Reference Briefs.
- Foster, N. M. a. Lovell, K. L. marston, S. D. Hulme, A. J. Frost, P. Bland, and P. A. Barrow. 2003. Rapid Protection of Gnotobiotic Pigs against Experimental Salmonellosis following Induction O Polymorphonuclear leukocytes by Avirulent *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity* 71 (4): 2182 – 2191.
- Ganong, William F. 1999. Review of Medical Physiology, 19<sup>th</sup> ed. p:455
- Harms, Perry A., Steven D. Sorden, Patrick G. Halbur, Porntippa Nawagitgal, Kelly Lager, Steven Bolin and Prem S. Paul. 2002. Role of Maternal Immunity to PCV2 and PRRSV co-infection in the pathogenesis of PMWS. *American Ass of Swine Veterinarians*, p: 307 – 312.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. 1992. Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 Mastitis Vaccine. *J Dairy Sci* 75: 78 – 84.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, P. Schoenberger, S. Romig, and L. Thompson. 1997. Responses of Antibody Titers to Intramammary Immunization with *Escherichia coli* J5 Bacterin. *J Dairy Sci* 80:2398-2402.
- Hogan, J. S., V. L. Bogacz, m. Islam, and K. L. Smith. 1999. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 Bacterin Administered to Primigravid Heifers. *J Dairy Sci* 82:939 – 943.
- Hogg, Alex, and Alfonso Torres. 1985. Enteric Diseases (Scours) of Swine. G747 under Animal Diseases, B-6 Swine. Univ. of Nebraska.
- Isaacson, Richard E., Evelyn A. Dean, Ronald I. Morgan, and harley W. Moon. 1980. Immunization of Suckling Pigs Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* –

- Induced Diarrheal Disease by Vaccinating Dams with Purified K99 or 987P Pili: Antibody Production in Response to Vaccination. *Infection and Immunity* 29 (2): 824 – 826.
- Janeway, Charles A, Paul Travers, mark Walport & J. Donald Capra. 1999. Immunobiology, 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York, NY.
- Jayappa, Huchappa G., Robert A. Goodnow, and Steven J. Geary. 1985. Role of *Escherichia coli* Type 1 Pilus in Colonization of Porcine Ileum and its Protective Nature as a Vaccine Antigen in Controlling Colibacillosis. *Infection and Immunity* 48 (2): 350 – 354.
- Jones, J.E.T., et. al. 1962. Vaccines for Scouring in Piglets. *Vet. Rec.* 74 (7):202 – 203.  
[Nota: No se informaron los nombres de los coautores de este artículo]
- Kelley, K.W., S. Kent, and R. Dantzer. 1993. Why Sick Animals Don't Grow: An Immunological Explantion. *Growth of the Pig*, Cab International, Oxon, UK. p:119 – 132.
- Keller, Gerald & Brian Warrack. 2000. Statistics for Management and Economics, 5<sup>th</sup> ed. Duxbury Thomson Learning, California.
- Kohler, E. M, R. F. Cross, and E. H. Bohl. 1975. Protection Against Neonatal Enteric Colibacillosis in Pigs Suckling Orally Vaccinated Sows. *Am J Vet Res* 36 (6): 757 – 764.
- Larson, Laurie J. DVM. 1999. Immunology. Harcourt Learning Direct Publications, Inc. Pennsylvania.
- Lee, Joongbok, Lorne A. Babiuk, Richard Harland, Elaine Gibbons, Youssef Elazhary, and Dongwan Yoo. 1995. Immunological response to recombinant VP8\* subunit protein of bovine rotavirus in pregnant cattle. *Journal of General Virology* 76:2477-2483.
- Lemke, H. and H. Lange. 1999. Is There a maternally Induced Immunological Imprinting? *Scand J Immunol* 50:348 – 354.
- Lin, J., J. S. Hogan, M. Aslam, and K. L. Smith. 1998. Immunization of Cows with Ferric Enterobactin Receptor from Coliform Bacteria. *J Dairy Sci* 81: 2151-2158.
- Logan, E. F., and J. D. Meneely. 1981. Effect of immunising pregnant sows with different *Escherichia coli* vaccines on the antibody levels in the piglet sera. *Veterinary Record* 109: 513 – 514.

- Lyman Ott, R. 1993. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, 4<sup>th</sup> ed. Duxbury Press, Wadsworth, Inc. Belmont, California
- Martin, Larry, George Morris Centre, and Guelph Ontario. 2001. Role of Knowledge, Costs of Swine Production and Outlook for Production: January 1999. [www.gov.mb.ca/agriculture/livestock/pork/swine](http://www.gov.mb.ca/agriculture/livestock/pork/swine).
- Mee, John F., Kevin J. O'Farrell, Pieter Reitsma, and Raj Mehra. 1996. Effect of a Whey Protein Concentrate Used as a Colostrum Substitute or Supplement on Calf Immunity, Weight Gain, and Health. J Dairy Sci 79:884-894.
- Merchant, Ival A., 1946. Veterinary Bacteriology, 3<sup>rd</sup> ed. The Iowa State College Press, Ames, Iowa. p:307
- Neustaedter, O.M.D., L. Ac. 2004. Do Vaccines Impair Immune Function? (Artículo) [www.lightparty.com](http://www.lightparty.com)
- Quigley, III, J.D., and J. J. Drewry. 1998. Symposium: Practical considerations of Transition Cow and Calf Management. Nutrient and Immunity Transfer from Cow to Calf Pre- and Postcalving. J Dairy Sci 81:2779 – 2790.
- Reinhardt, T.A., J.R. Stabel, and J.P. Goff. 1999. 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Enhances Mik Antibody Titers to *Escherichia coli* J5 Vaccine. J Dairy Sci 82:1904-1909.
- Richter, Margret Y., Havard Jakobsen, alda Birgisdottir, Jean-Francois Haeuw, Ultan F. Power, Giuseppe Del Giudice, Antonella Bartoloni, and Ingileif Jonsdottir. 2004. Immunization of Female Mice with Glycoconjugates Protects Their Offspring against Encapsulated Bacteria. Infection and Immunity 72 (1):187 – 195. (Abstract)
- Runnels, Paul L., Steve L. Moseley, and Harley W. Moon. 1987. F41 Pili as Protective Antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* that produce F41, K99, or Both Pilus Antigens. Infection and Immunity 55 (3): 555 – 558.
- Rutter, J. M., and J. C. Anderson. 1972. Experimental Neonatal Diarrhea caused by and Enteropathogenic Strain of *Escherichia coli* in Piglets: A study of the disease and the effect of vaccinating the Dam. J Med Microbio 5 (2): 197 – 210.
- Sánchez Vizcaino, J. M. 2004. Curso de introducción a la inmunología porcina. <http://www.revista-anaporc.com/curso/cuarto3.htm>
- SAS/STAT. 1990. SAS User's Guide. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Sikka, P., D. Lall, U. Arora, R. K. Sethi. 2002. Growth and Passive Immunity in Response to Micronutrient Supplementation in New – Born calves of Murrah

- Buffaloes given fat soluble vitamins during late pregnancy. *Livestock Production Science* 75:302-311.
- Steel & Torrie. 1988. Bioestadística, Principios y Procedimientos, 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, Inc., U.S.A.
- Tomita, g. M., D. A. todhunter, J. S. hogan, and K. L. Smith. 1995. Immunization of dairy cows with and *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide vaccine. *J Dairy Sci* 78:2178.
- Webster, W. R., and M. J. Moore. 2002. Minimal Disease Pigs. (Artículo). Department of Primary Industries Queensland. File No: P0072.
- Yokoyama, Hideaki, Robert C. Peralta, Roger Díaz, Sadako Sendo, Yutaka Ikemori, and Yoshikatsu Kodama. 1992. Passive Protective Effect of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins against Experimental Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection in Neonatal Piglets. *Infection and Immunity*, p. 998-1007.
- Yokoyama, Hideaki, Tomomi Hashi, Kouji Umeda, Faustino C. Icatlo, Jr., Masahiko Kuroki, Yutaka Ikemori, and Yoshikatsu Kodama. 1997. Effect of Oral Egg Antibody in Experimental F18+ *Escharichia coli* Infection in Weaned Pigs. *J Vet Med Sci* 59(10):917-921.

