



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 El sector porcino en España	4
2.2 La importancia del calostro en la lactación	4
2.3 Composición del calostro	5
2.4 Evaluación de la calidad inmunógena del calostro.....	8
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1 Localización de las explotaciones porcinas y recolección de muestras	15
4.2 Análisis del calostro por refractometría	15
4.3 Aislamiento de inmunoglobulinas G porcinas	16
4.4 Obtención de anticuerpos policlonales frente a IgG porcinas	21
4.5 Inmunodifusión doble.....	22
4.6 Inmunodifusión radial	22
4.7 Análisis estadísticos	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1 Aislamiento de inmunoglobulinas G porcinas	25
5.2 Obtención de anticuerpos policlonales frente a IgG porcinas	27
5.3 Inmunodifusión doble.....	27
5.4 Inmunodifusión radial	28
5.5 Evaluación de los resultados por IDR	29
5.6 Evaluación de los resultados por refractometría	30
5.7 Relación entre resultados de refractometría y de IDR.....	33
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	36
7. VALORACIÓN PERSONAL	37
8. BIBLIOGRAFÍA.....	38
9. ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

1. RESUMEN

El calostro es indispensable para el buen desarrollo del lechón, ya que le aporta inmunidad pasiva en forma anticuerpos (mayoritariamente IgG), que ayudan en la prevención de enfermedades infecciosas. Sin embargo, el contenido de IgG del calostro y la composición nutricional pueden variar considerablemente entre las cerdas debido a la edad, paridad, régimen de alimentación y antecedentes inmunológicos. Actualmente, no existe una forma práctica y estandarizada de estimar la concentración de IgG en el calostro porcino. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la utilidad del refractómetro digital portátil para la evaluación rápida y en granja de la calidad inmunogénica del calostro (concentración de IgG) durante las primeras horas tras el parto. Se recogieron muestras de calostro de 28 cerdas y se congelaron a -20°C hasta su análisis por refractometría digital. El contenido de IgG de las muestras congeladas se analizó utilizando un refractómetro Brix y posteriormente, fueron analizadas por inmunodifusión radial (IDR). El porcentaje de Brix varió de 17,2% a 31,55%. Se observó una alta correlación (coeficiente de Spearman (ρ) = 0,97; $P < 0,001$) entre el porcentaje Brix y la IDR. El coeficiente de variación (CV%) estimado, fue muy bajo (0,84) sugiriendo una elevada repetibilidad de este método. La concentración de inmunoglobulinas G medida por IDR varió de 4,603 a 103,142 mg/ml. La variabilidad observada con esta técnica fue moderada (CV%=15,42%). El coeficiente de correlación de Pearson reveló que el porcentaje de Brix se correlacionó positivamente ($r = 0,84$, $P < 0,001$) con los resultados de IDR (ecuación de regresión: $IDR \text{ (mg/ml)} = -66,446 + 5,184 \cdot Bx$). Los resultados de este estudio indican que el refractómetro digital portátil proporciona una estimación simple, rápida y económica de las IgG de calostro de cerda.

ABSTRACT

Colostrum is essential for the proper development of the piglet, since it provides passive immunity in the form of antibodies (mostly IgG), which help in the prevention of infectious diseases. However, colostrum IgG content and nutritional composition can vary considerably between sows due to age, parity, feeding regime and immunological history. Currently, there is no a practical and standardized method to estimate the concentration of colostrum IgG. Therefore, the objective of this work was to determine the usefulness of the portable digital refractometer for the rapid and on-farm evaluation of the immunogenic quality of colostrum (IgG concentration) during the first hours after farrowing. Colostrum samples from 28 sows were collected and frozen at -20 ° C until analysis by digital refractometry. The IgG content of

the frozen samples was analyzed using a Brix refractometer and subsequently, they were analyzed by radial immunodiffusion (RID). The percentage of Brix varied from 17.2% to 31.55%. A high correlation (Spearman coefficient (ρ) = 0,97; $P < 0.001$) was observed between the percentage Brix and the IDR. The coefficient of variation (CV%) was very low (0,84), suggesting a high repeatability of this method. All these data suggests that this technique is reproducible. The immunoglobulin G concentration measured by RID ranged from 4.603 to 103.142 mg / ml. The variability observed with this technique was moderate (CV%=15.42%). Pearson's correlation coefficient revealed that the Brix percentage correlated positively ($r = 0.84$, $P < 0.001$) with the results of RID (regression equation: $\text{RID (mg/ml)} = -66,446 + 5,184 * ^\circ \text{Bx}$). The results of this study indicate that the portable digital refractometer provides a simple, fast and economical estimate of colostrum IgG in sows.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El sector porcino en España

El porcino español es un sector clave para la economía del país ya que factura más de 15.000 millones de euros al año, que supone el 1,4% del Producto Interior Bruto nacional y el 14% del PIB industrial. Asimismo, representa el 36,4% de la Producción Final Ganadera española y el 17,4% de la Producción Final Agraria (Interporc, 2018).

A nivel mundial, la UE-28 es el segundo productor de carne de porcino, después de China, siendo España la cuarta potencia productora (después de China, EEUU, y Alemania). España ocupa el segundo puesto en producción porcina en Europa con un 19% del total de toneladas de carne de cerdo producidas (4,52 millones de toneladas), por detrás de Alemania, pero es el primer país de la UE en censo con 30,8 millones de cabezas (19% del censo comunitario) (MAPA, 2019a).

Se estima que el sector emplea más de 300.000 personas de manera directa y más de 1 millón de forma indirecta, y se circunscribe fundamentalmente al área rural, convirtiéndose en un motor de la economía y el empleo en estas zonas (Anónimo, 2018). En la actualidad, el sector sigue creciendo y aumentando su producción, un aumento evidenciado en todas las categorías de animales (madres, lechones y cebo), pero especialmente en lechones, el cual está ligado, en buena medida, al incremento de la productividad de las hembras que se ha producido durante los últimos años (MAPA, 2019b). Debido al incremento del número de lechones por parto, actualmente en una media de 15-16 totales y 14-15 nacidos vivos (3tres3.com, 2019) es necesario una mejora del manejo durante la fase de lactación que garantice la viabilidad de la mayoría de los lechones.

2.2 La importancia del calostro en la lactación

En todos los mamíferos existe una transición fundamental en las condiciones alimenticias en el momento del nacimiento. Mientras que el feto recibe un suministro continuo de sustancias nutritivas a través de la placenta, el recién nacido debe adaptarse a una absorción independiente de sustancias nutritivas proporcionadas por el calostro y la leche a través del tracto gastrointestinal que ocurre durante el periodo de lactación (Jensen et al., 2001). Este periodo es especialmente crítico en producción porcina pues, además de una serie de causas no infecciosas que pueden determinar la viabilidad del lechón (traumas, baja viabilidad-inanición, bajo peso al nacimiento, anomalías congénitas, etc.), existen un gran número de procesos de tipo infeccioso. La principal causa infecciosa de mortalidad perinatal en los lechones suele ser la diarrea por diferentes agentes etiológicos, entre los que predominan *Escherichia coli*

(colibacilosis), *Isospora suis* (coccidiosis), *Clostridium perfringens* tipo C y tipo A (clostridiosis) y cierto tipo de virus entéricos como los rotavirus (Blanco y Criollo, 2009).

Debido al tipo de placenta (epiteliocorial) de la cerda, que impide el paso directo de inmunoglobulinas de la sangre de la madre a la del lechón, este nace desprovisto de cualquier defensa que le proteja frente a infecciones. Además, teniendo en cuenta que los lechones no son inmunocompetentes hasta aproximadamente las cuatro semanas de vida, su capacidad para responder a los agentes infecciosos durante este periodo debe complementarse con componentes inmunitarios maternos, como los anticuerpos presentes en el calostro y la leche, y las células inmunes proporcionadas por las secreciones mamarias (Poonsuk y Zimmerman, 2017). Por ello, la producción de calostro de calidad durante las primeras 24 horas y la subsiguiente producción láctea de las hembras, son de vital importancia para que el lechón pueda obtener en un primer momento la protección y energía necesarias, y unos consiguientes buenos resultados productivos posteriormente.

2.3 Composición del calostro

La leche segregada por la cerda en las horas que siguen al parto es diferente de su leche definitiva o madura, y se denomina calostro (Machin, 1998). El calostro es indispensable para un buen desarrollo de las camadas, ya que les aporta inmunidad en forma de defensas (principalmente lactoferrina) y anticuerpos (mayoritariamente IgG), que ayudan en la prevención de enfermedades infecciosas. Este tipo de protección se denomina inmunidad pasiva. La inmunidad del lechón neonato está, en principio, limitada por la cantidad y calidad de anticuerpos en el calostro y por la cantidad que el neonato es capaz de consumir y absorber (Varley, 1995). Además, la toma de calostro permite también la transferencia de células mononucleares de sangre periférica de la cerda adulta a los neonatos, lo que parece que permite retrasar la aparición de ciertas infecciones como la producida por el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) (Cepica y Derbyshire, 1984). Por lo tanto, un consumo insuficiente de calostro por parte del lechón puede ser, en muchos casos, la principal causa de mortalidad infecciosa después del nacimiento (Casanovas, 2007).

El calostro ejerce un efecto laxante que acelera la eliminación del meconio (primeras heces del recién nacido compuestas por contenido intestinal fetal) y presenta un factor que bloquea la tripsina digestiva del lechón, impidiendo la degradación de las inmunoglobulinas y asegurando su absorción completa, ejerciendo estas su efecto de bloqueo de la colonización por microorganismos o de neutralización de toxinas en la luz intestinal (Tortora, 1998). El calostro también tiene un efecto de estimulación marcado sobre el crecimiento y la maduración del tracto gastrointestinal (Jensen et al., 2001). Además, es una fuente fundamental de energía

durante el primer día de vida, debido a las escasas reservas energéticas con las que nacen los lechones, por lo que es igual de importante la cantidad de calostro ingerido como el grado de rendimiento metabólico que es capaz de obtener de él (Quílez, 2019). La composición química del calostro se muestra en la Tabla 1.

El tránsito de calostro a leche en la cerda ocurre en las primeras 24-36 horas post-parto. El calostro se caracteriza por ser, con respecto a la leche, muy rico en proteínas (hasta 3 veces más), sobre todo en inmunoglobulinas, vitaminas y minerales, y pobre en grasa y en lactosa. A pesar de ello, la grasa constituye la principal fuente energética del lechón en las primeras horas, constituyendo el 35 y el 50% en el momento del nacimiento y en el primer día, respectivamente.

El contenido graso del calostro varía entre un 5% en el momento del nacimiento y el 10% en el tercer día, posteriormente desciende hasta un 8%, e incluso menos. El contenido graso está influenciado, principalmente, por la composición de la dieta de la cerda, aunque también existe un cierto grado de influencia racial. Por el contrario, el contenido en lactosa y en aminoácidos está menos influenciado por la dieta de la cerda (Quílez, 2019). Por lo tanto, el calostro es el alimento fundamental para establecer las reservas necesarias en el lechón para su desarrollo acelerado en las primeras semanas de vida (Blanco y Criollo, 2009).

Tabla 1. Evolución detallada de la composición química del calostro (Anónimo, 2010) y la leche de cerda (Burrin, 2001).

	CALOSTRO						LECHE
	4 h antes del parto	Durante el parto	3 h	6 h	12 h	24 h	15 días de lactación
			Tras el parto				
Materia seca (%)	30,30	28,05	26,65	26,08	24,06	23,29	19,20
Proteína bruta (%)	21,05	18,05	16,95	15,96	13,29	9,42	5,50
Grasa (%)	4,92	5,30	5,14	6,5	6,07	9,07	8,10
Lactosa (%)	2,00	2,42	2,44	2,5	2,89	3,24	4,80
Agua (%)	69,70	71,90	73,02	73,03	75,60	75,60	80,80
Energía (KJ/g)	-	5,93	-	-	-	5,89	5,23

Existen tres razones principales de la falta de transferencia adecuada de calostro: 1) fallo en la producción por parte de la madre, que lo produce en cantidades insuficientes o de mala

calidad; 2) fallo en la ingesta por parte del neonato por una posible mala conformación de la ubre y obstrucción física de los pezones y/o a un número excesivo de lechones en relación con el número de pezones funcionales y a lechones rechazados por la cerda (Varley, 1995); 3) un defecto en la absorción intestinal del lechón, aun existiendo una ingesta adecuada (Tizard, 2002).

Diferentes estudios han identificado y establecido el porcentaje y la concentración de proteínas en general, y las de las IgG en particular, tanto en calostro como en leche de cerda (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Contenido proteico del calostro y de la leche de cerda (Bland et al., 2003; Curtis y Bourne, 1971; Darragh y Moughan, 1998 y Klobasa et al., 1987).

PROTEÍNA	CALOSTRO (inmediatamente después del parto)	CALOSTRO (a las 12 horas de lactación)	LECHE (a las 72 h de lactancia)	LECHE (entre el día 14 y 21 de lactación)
Proteínas totales (g/100 g)	15,14	-	-	5,47
Caseínas (g/100 g)	1,48	-	-	2,74
Proteínas séricas (g/100 g)	14,75	-	-	2,22
Seroalbúmina (mg/ml)	15,79	-	-	4,61
Inmunoglobulina G (mg/ml)	95,60	32,1	3,2	0,90
Inmunoglobulina A (mg/ml)	21,20	10,1	3,4	5,30
Inmunoglobulina M (mg/ml)	9,10	4,2	1,2	1,40
Lactoferrina (mg/100 g)	1200	-	-	<100

Tabla 3. Distribución (en porcentaje) de los distintos tipos de inmunoglobulinas en calostro y leche de cerda a distintos tiempos (Machin, 1998 y Porter, 1969).

INMUNOGLOBULINA	CALOSTRO (hasta las 24h post-parto)	LECHE (24 hr)	LECHE (7 días)
IgG	79,70 ± 16,90%	46,40%	22,20%
IgA	14,05 ± 7,35%	75%	47,60%
IgM	6,27 ± 2,35%	7,10%	14,30%

La composición en inmunoglobulinas (Igs) del calostro de cerda contiene varios isotipos: IgA, IgG e IgM. Las IgA se caracterizan por encontrarse principalmente en la mucosa del intestino y se encargan de destruir a los patógenos antes de ingresar al organismo del lechón (Mota-Rojas et al., 2014). Las IgG son predominantes en el calostro de la mayor parte de los mamíferos, ya que representan el 65-90% del contenido total de anticuerpos (Tizard, 2002), tiene un peso molecular de 160 kDa y son las responsables de la respuesta secundaria (Blanco y Criollo, 2009). En el lechón se localizan fundamentalmente en la sangre y algunos fluidos (Mota-Rojas et al., 2014), teniendo como principal función biológica la eliminación de los microorganismos y la neutralización de las toxinas. Estas IgG tienen cinco subclases: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4. Sin embargo, el contenido de IgG en calostro y la composición nutricional pueden variar considerablemente entre las cerdas debido a diversos factores como la edad, el número de partos (Klobasa et al., 1986), la alimentación y los antecedentes inmunológicos (Hasan et al., 2016). Por ejemplo, en el día del parto, la concentración de IgG en el calostro es hasta tres veces mayor que la del suero de la cerda (sangre), por esta razón, los niveles de IgG en el suero sanguíneo de los lechones durante el periodo de ingesta de calostro son a menudo más altos que los que se encuentran en el suero de la madre (Newby et al., 1982; Porter et al., 1988 y Simpson-Morgan y Smeaton, 1972).

Respecto a las IgM, también se encuentran en la sangre, y aunque son menos efectivas que las IgG, se producen más rápidamente para reaccionar frente a los agentes patógenos en las primeras etapas de la infección (Mota-Rojas et al., 2014).

2.4 Evaluación de la calidad inmunógena del calostro

Se han descrito varias técnicas que permiten evaluar la calidad inmunógena del calostro en los animales domésticos, desde la más sencilla que se basaría en una simple inspección visual, a técnicas laborales más complejas como la inmunodifusión radial (IDR), la inmunolectroforesis, el ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: ‘ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas’), así como otras técnicas que no requerirían de gran especialización y podrían utilizarse en el campo como son la calostrometría y refractometría.

La **valoración visual** es, en general, una técnica poco válida para la evaluación de la calidad del calostro, dado que un calostro denso y cremoso puede simplemente ser indicativo de su alto contenido de grasa, sin relación con su contenido en inmunoglobulinas (Casas y Canto, 2015).

La **inmunodifusión radial (IDR)**, es una técnica de análisis inmunológico de tipo cuantitativa puesta a punto por Mancini et al. (1965) y utilizada para conocer la cantidad de

IgG que hay en el suero. En esta técnica, el antisuero frente a las IgG que se quieren medir, se mezcla con agar fundido, que se vierte en una placa y se deja solidificar. Se realizan pequeños pocillos en el agar y se rellenan con las muestras problema (contienen una concentración desconocida de IgG). Es entonces cuando se produce la difusión de las IgG desde el pocillo de forma radial y ocurre la inmunoprecipitación al reaccionar con los anticuerpos que se encuentran dispersos en el gel, formándose un anillo de precipitación bien definido alrededor del pocillo. El diámetro del anillo es proporcional a la concentración de IgG en la muestra problema y puede cuantificarse por comparación de éste con una serie de concentraciones de IgG conocidas (Blanco y Criollo, 2009).

Para cuantificar la cantidad exacta de antígenos (IgG) es preciso disponer de una recta estándar o patrón creada previamente. Esta recta se hace a partir de soluciones de antígeno de concentraciones conocidas en cada placa, que reaccionan con el anticuerpo. Una vez obtenidos los valores de las muestras problema, se comparan con los valores de la recta patrón y se obtiene el valor de la concentración de antígeno de cada muestra. Aunque el desarrollo de la reacción es muy lento, esta técnica se utiliza como método de referencia para la determinación de IgG en calostro (Monzalvo, 2016).

La técnica **ELISA** permite determinar de forma cuantitativa la concentración de anticuerpos o antígenos, mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución (Blanco y Criollo, 2009). Su procedimiento involucra a un gran número de variables (selección de reactivo, temperatura, dilución de la muestra y tiempo) que requieren ser ajustadas correctamente para que no afecten a los sucesivos pasos y al resultado de la prueba (Hnasko, 2015).

En cuanto a las técnicas que se podrían utilizar para evaluar las concentraciones de IgG en campo, las principales serían las basadas en el uso del calostrómetro o refractómetro, aunque se han utilizado casi siempre aplicadas a las especies de rumiantes.

El **calostrómetro** es un instrumento que mide la concentración de IgG presente en el calostro en base a su densidad, es en realidad, un tipo de lactodensímetro. Los fabricantes recomiendan su uso a una temperatura estándar de 22°C. No es un instrumento de elevada precisión, pero permite obtener una estimación de la calidad del calostro. Se coloca una cantidad suficiente de calostro atemperado en el cilindro medidor y se sumerge el calostrómetro lentamente en él hasta conseguir que el instrumento flote libremente. Una vez se encuentra flotando, se determina la calidad del calostro leyendo la escala codificada de colores que se encuentra en la parte superior del aparato (Figura 1) (Casas y Canto, 2015).

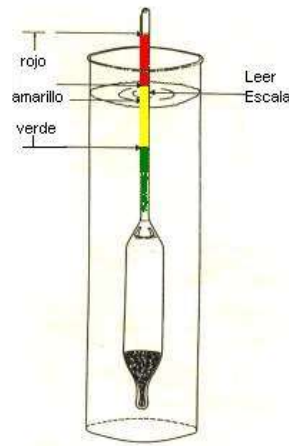


Figura 1. Calostrómetro y su escala de colores. Fuente:
(http://www.geocities.ws/raydelpino_2000/calostrometro.html)

Los diferentes colores se asocian con un determinado rango de concentración de IgG (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación en diferentes categorías de la calidad de calostro bovino en función de la concentración de IgG (Casas y Canto, 2015).

COLOR	Concentración de IgG (g/L)	Categorías
Verde	101 -125	Superior
Amarillo	50 -100	Moderada
Rojo	25 -50	Inferior

Esta técnica permite hacer una estimación inmediata de la calidad del calostro antes de que el neonato la ingiera y poder así disminuir el riesgo de un fracaso en la transferencia de inmunidad, la cual ayuda a prevenir enfermedades. Su precio no es elevado y se puede utilizar en condiciones de campo ya que es fácil de usar y no necesita personal altamente especializado. Sin embargo, está sujeto a la variación de la temperatura ya que si varía esta, también lo hacen los resultados.

El **refractómetro** permite estimar la proteína total (que se correlaciona con la concentración de IgGs) en el suero sanguíneo (determina el estado inmune del animal recién nacido) o en el calostro (valora su calidad). Es un método de determinación muy rápido que fundamentalmente se ha utilizado en ganado bovino y que se basa en utilizar la refracción de la luz, propiedad física de cualquier sustancia, ya que se relaciona con algunas propiedades

químicas como la densidad. Se puede medir en diferentes escalas, aunque la más común es en grados Brix ($^{\circ}\text{Brix}$) que indicarían la proporción de un soluto en una disolución (Figura2).

Su aplicación en suero sanguíneo tiene como principal desventaja su incapacidad para detectar o predecir tempranamente un fallo en la transferencia de la inmunidad pasiva a causa de la insuficiente ingesta de inmunoglobulinas. Esto es debido, principalmente, a que la muestra de sangre se debe sacar entre las 24 y 48 horas de vida del ternero, por lo cual a esa hora ya ha ocurrido el cierre de las células del epitelio intestinal. Este instrumento permite, por tanto, conocer si el ternero recibió calostro y qué grado de inmunidad tiene. Es fácil de utilizar y de fácil acceso, sin embargo, su coste es más elevado que el del calostrómetro (Casas y Canto, 2015). Su uso para la evaluación del calostro es más reducido.



Figura 2. Refractómetro con la identificación de las partes que lo constituye. Fuente: (<https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/refractometro.html>).

Existen dos tipos de refractómetros en función del sistema utilizado para la detección del índice de refracción: sistemas transparentes y sistemas de reflexión. Los refractómetros ópticos y los refractómetros Abbe usan el primer sistema, mientras que los refractómetros digitales usan el segundo sistema (Figuras 3 y 4).

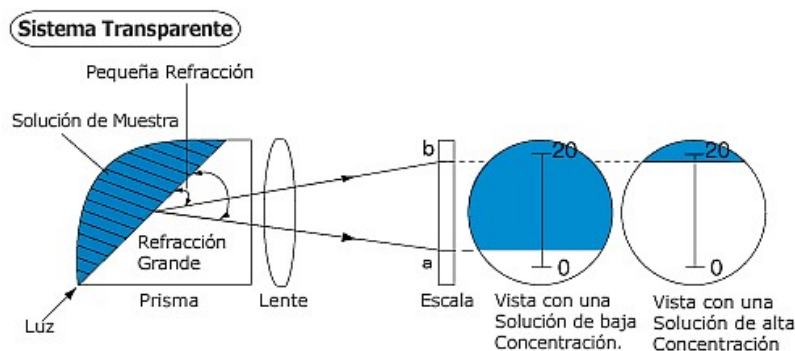


Figura 3. Medidas de soluciones de diferente concentración con un refractómetro óptico (Infoagro, 2019).

En el refractómetro óptico, la medida se obtiene tras seguir una serie de pasos simples. Primero, se coloca una gota de agua destilada en el prisma y se cubre con la parte superior, a continuación, se mira a través del refractómetro (hacia una fuente de luz) y se pone la línea a cero con ayuda de un destornillador. Una vez calibrado el equipo, se retira el agua y se añade una gota de muestra, se mira a través del refractómetro (hacia una fuente de luz) y se obtiene el valor, ya que la línea cruzará ese valor en la escala. Si la muestra es de baja concentración, el ángulo de refracción es grande (vease "a") y el valor obtenido será pequeño. Por el contrario, si la muestra es concentrada, el ángulo de refracción es pequeño (vease "b") y el valor obtenido será elevado (Infoagro, 2019).

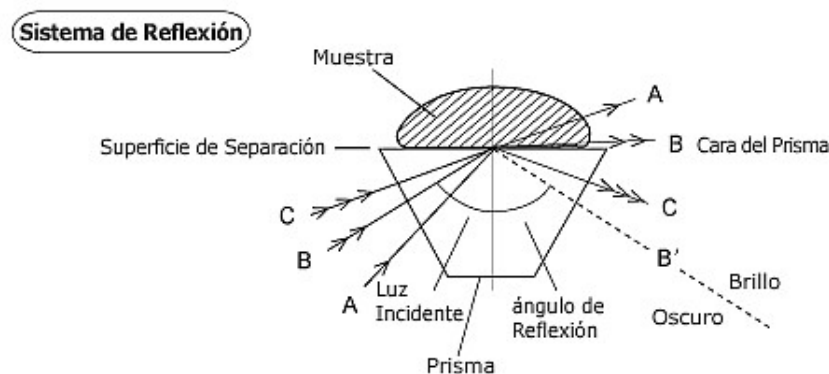


Figura 4. Esquema representativo del sistema de reflexión en el que se basan los refractómetros digitales (Infoagro, 2019).

En el refractómetro digital, la medida se obtiene de forma más sencilla ya que es el sensor que incorpora el equipo el que capta la luz y los campos oscuros y lo convierte en índices refractivos, que se muestran en la pantalla digital. Sólo hace falta calibrarlo añadiendo agua destilada y pulsando el botón de calibración.

El refractómetro digital tiene la ventaja de tener incorporada una compensación de temperatura automática entre 10°C y 40°C que evita que sea necesario mantener las muestras en un baño de temperatura constante, como es necesario en el refractómetro manual, ya que sus resultados están condicionados por factores como la temperatura, provocando cierta incertidumbre en las mediciones. El refractómetro digital también tiene la ventaja de tener un tiempo de medición casi inmediato (aproximadamente 1,5 segundos), lo que no ocurre con el refractómetro manual.

En estudios recientes, se ha propuesto la utilización de la refractometría con un refractómetro digital Brix como medio para estimar la concentración de IgG en el calostro

bovino, ya que tiene ventajas sobre otros métodos como son su coste, su accesibilidad, su facilidad de manejo y su baja sensibilidad a la variación de la temperatura del calostro, la estación del año y otros factores.

Entre los estudios realizados con calostro bovino para determinar la concentración de IgG y su relación con los grados Brix se encuentra el elaborado por Quingley et al. (2012) donde utilizaron un refractómetro óptico y las técnicas de análisis de inmunodifusión radial (IDR) e inmunoensayo turbidimétrico (TIA). En otro estudio (Morrill et al., 2015) utilizaron un refractómetro digital y la técnica IDR, y además evaluaron la repercusión en las medidas de IgG de los ciclos de congelación-descongelación. Ambos estudios concluyen con una buena relación entre las técnicas y por tanto, la viabilidad de la refractometría como método satisfactorio para estimar las concentraciones de IgG.

Existen otros estudios con calostro ovino, como el de Torres-Rovira et al. (2017), en el que también se evaluó la calidad utilizando un refractómetro digital. Ese estudio, sin embargo, no es concluyente en cuanto a la viabilidad de la refractometría como método de estimación de la calidad del calostro.

A diferencia de los rumiantes, en el porcino, son escasos los estudios realizados a nivel de campo para comprobar la calidad del calostro. Sin embargo, su evaluación podría ser de gran utilidad, ya que como se ha comentado anteriormente, los lechones tienen una elevada mortalidad durante la primera semana de vida hasta que son inmunocompetentes. Una valoración rápida y exacta a nivel de campo de la calidad y cantidad de inmunoglobulinas en el calostro podría ayudar a evitar pérdidas en las camadas y mejorar el índice de productividad.

Con este objetivo, Balzani et al (2016) investigaron la eficacia del refractómetro digital Brix para la evaluación de la concentración de IgG en calostro porcino comparándola con la técnica de IDR. Otro estudio (Hasan et al., 2016) evaluó el contenido de IgG en calostro porcino en la granja utilizando un refractómetro digital Brix y compararon su rendimiento con el de un ELISA. Ambos estudios concluyeron que, aun siendo la concentración de IgG en el calostro muy variable entre las cerdas, la medición de Brix era un método económico, rápido y satisfactoriamente exacto para estimar la concentración de IgG.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Debido a que los cerdos se caracterizan por presentar un porcentaje de mortalidad neonatal elevada, aproximadamente un 19%, es de gran importancia su adaptación post-natal durante las 48 primeras horas de vida. Esta adaptación incluye el consumo adecuado de calostro, tanto en cantidad como en calidad, ya que un bajo consumo incrementa la susceptibilidad de enfermar y morir en la primera semana de vida. Por esta razón, evaluar la calidad del calostro porcino, sobre todo a nivel inmunogénico, puede resultar útil para predecir el consiguiente nivel de salud del lechón en sus primeras semanas de vida, asumiendo una ingesta adecuada del mismo. Actualmente, no hay una forma establecida, práctica y rápida, de obtener información sobre la concentración de IgG en el calostro a nivel de rebaño (Hasan et al., 2016). En estudios previos la medición de inmunoglobulinas se ha realizado principalmente en suero y en menor proporción en calostro y han sido, en su mayoría, en las especies bovina y equina.

A pesar de los trabajos previos, que sugieren la utilidad de la refractometría mediante el refractómetro digital Brix para la evaluación del calostro porcino, hacen falta más estudios que corroboren sus resultados bajo condiciones de campo diferentes. Por ello, en este trabajo se ha propuesto evaluar la calidad del calostro porcino a través de dos métodos, uno rápido y con posibilidad de ser usado en campo (refractómetro digital Brix), y otro lento y considerado de referencia (Inmunodifusión Radial, IDR), para comprobar si presentan una buena correlación, con el fin de poder demostrar la utilidad del refractómetro digital Brix como técnica rápida y eficaz para evaluar la calidad del calostro directamente en la granja.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad del refractómetro digital portátil para la evaluación rápida y en granja de la calidad inmunogénica del calostro (concentración de inmunoglobulinas) durante las primeras horas tras el parto.

Objetivos específicos

1. Poner a punto la técnica de inmunodifusión radial como método cuantitativo para la medición de IgG en calostro de cerda.
2. Determinar la correlación entre los resultados del refractómetro digital y los obtenidos mediante la inmunodifusión radial.
3. Establecer si el refractómetro digital podría ser un método práctico para determinar la calidad inmunógena del calostro porcino.

4. METODOLOGÍA

4.1 Localización de las explotaciones porcinas y recolección de muestras

La recolección de las muestras de calostro se llevó a cabo en dos granjas diferentes, la primera se hizo en una granja de 300 madres en Rañín, Huesca, y la segunda en una granja de 1000 madres en Ejea de los Caballeros, Zaragoza.

Las muestras de calostro se recogieron de diferentes partos, entre diciembre de 2016 y marzo de 2017 (15 muestras), y enero de 2019 (14 muestras). En total, se recogieron muestras de 29 cerdas de diferentes números de partos (desde cerdas primíparas hasta de séptimo parto). La recogida de las muestras fue a cargo de los dueños de las granjas en el momento del parto y hasta las 6 horas después, de forma aleatoria entre todas las cerdas. Las muestras se recolectaron en recipientes de 50 ml, todas etiquetadas con la identidad de la cerda y día de recolección, y se congelaron a -20°C hasta su análisis.

4.2 Análisis del calostro por refractometría

En un primer análisis, se realizó la medición de la calidad de cada uno de los calostros recolectados mediante un refractómetro digital (Obione Calf, Obione, Mâcon, Francia). Para obtener la medición con el refractómetro se siguieron estrictamente las instrucciones del fabricante, realizando una calibración previa con agua destilada. Una vez calibrado el aparato, se procedió a medir las muestras de calostro. Para ello, se tomaba un pequeño volumen de calostro atemperado a temperatura ambiente y se colocaba en la célula de medición lentamente para no formar burbujas y asegurar que quedaba totalmente cubierto. A continuación, se cubría la célula con la mano o con un tapón negro para crear sombra y se procedía a la medición, obteniéndose la medida de la muestra de calostro en grados Brix (°Bx) (Figura 5). Los grados Brix son una unidad de medida que sirve para determinar el cociente total de materia seca disuelta en un líquido. Cada muestra de calostro se analizó tres veces y se consideró como resultado final la media de los tres resultados.

Posteriormente, se realizaron diluciones desde la 1/2 hasta la 1/64 a partir de 14 muestras de calostro recolectadas y se midieron en el refractómetro para evaluar la correlación entre la dilución y los valores de °Bx resultantes. Tras este análisis, se guardó una alícuota de cada una de las diluciones en un eppendorf de 2 ml a -20°C para la determinación posterior de la concentración de IgG por inmunodifusión radial.

Una vez analizados los calostros mediante el refractómetro, se preparó un *pool* de calostro a partir de 3 ml de cada una de las 14 muestras de calostro recolectadas en la primera

explotación (3 ml x 14 muestras = 42 ml en total) con el fin de utilizarlo para el desarrollo de la técnica de IDR



Figura 5. Refractómetro digital Obione calf con una muestra de calostro en el sensor y su respectiva medida en Brix.

4.3 Aislamiento de inmunoglobulinas G porcinas

a. PRECIPITACIÓN CON SULFATO AMÓNICO

Para aislar las IgG del calostro porcino, se realizó una etapa previa de precipitación con sulfato amónico. El *pool* de calostro previamente preparado se descongeló y se desnató por centrifugación en la centrífuga Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory Products, New York, NY, EE.UU) a 2500 xg durante 15 minutos a 4°C. La grasa superficial (nata) fue retirada.

Al *pool* de calostro desnatado se le añadieron 140 µl de una solución de CaCl₂ (1 L/7000 L) (Abiasa, Pontevedra, España) y 120 µl de cuajo natural bovino (1:15.000) (Abiasa), manteniendo la mezcla en un baño termostático a una temperatura de 40°C durante 1 hora, para la coagulación de las caseínas. A continuación, se centrifugó a 3000 xg durante 15 minutos a 4°C, consiguiéndose la separación del coágulo de caseínas y del suero, como se muestra en la Figura 6.

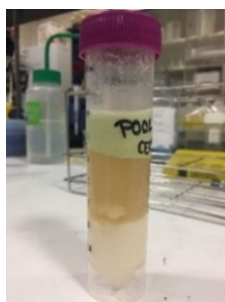


Figura 6. Pool de calostro desnatado y coagulado enzimáticamente.

Se añadieron 6,75 ml de sulfato amónico 4,1 M al lactosuero obtenido agitando la mezcla toda la noche a 4°C para lograr la precipitación selectiva de las IgG. Tras la incubación, el lactosuero se dividió en dos tubos de 15 ml cada uno que se centrifugaron a 2500 xg durante

15 minutos a 4°C, obteniéndose la separación de las dos fases, como se muestra en la Figura 7. El sobrenadante se separó y el precipitado, que contenía las IgG, se resuspendió en 2 ml de agua destilada y se dializó para eliminar el sulfato amónico.

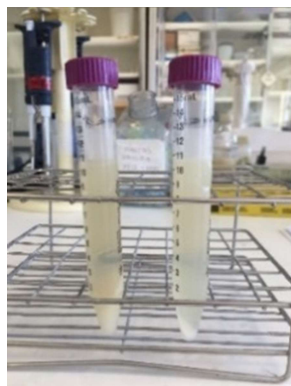


Figura 7. Separación de las dos fases tras la precipitación del lactosuero con sulfato amónico.

b. ELIMINACIÓN DEL SULFATO AMÓNICO POR DIÁLISIS

Para la eliminación del sulfato amónico de las IgG se llevó a cabo una diálisis frente a tampón fosfato potásico 0,01 M, pH 7,4, utilizando 2 membranas tubulares de celulosa Cellu-Sep T2/Nominal MWCO: 6,000 - 8,000 (Membrane Filtration Products, Seguin, TX, EE.UU.) de 12 cm de largo, previamente activadas mediante sucesivos lavados con agua destilada. Los 4 ml de precipitado disuelto en agua destilada se añadieron a cada una de las membranas que se cerraron herméticamente, y se introdujeron en un vaso de precipitados de 2 litros con el tampón de diálisis, en agitación, a 4°C, realizando un cambio de tampón cada 12 horas durante dos días. Después se extrajo la solución de proteína de la membrana de diálisis y se caracterizó por electroforesis con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y mercaptoetanol.

c. ELECTROFORESIS CON SDS

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)) separa las proteínas en función de su peso molecular, pues confiere a las proteínas carga negativa con una misma densidad de carga. Además, el SDS provoca la desnaturalización de las proteínas, perdiendo así su conformación tridimensional. Se obtiene una separación de las proteínas que obedece a la diferencia de peso molecular, la longitud de la cadena (tamaño) y la forma de la proteína.

Las muestras a analizar se diluyeron 1:1, añadiendo en un vial eppendorf 20 µl de la solución de IgG dializadas y 20 µl del tampón Tris-HCl 0,12 M, pH 6,8, que contenía una concentración final de glicerol del 20% (v/v), SDS al 4% (p/v) y azul de bromofenol al 0,02%

(p/v). En el caso de las electroforesis que se realizaron en condiciones reductoras, al tampón se le añadió β -mercaptoetanol a una concentración final del 10% (v/v). Los viales eppendorf con la mezcla se llevaron a hervir en baño María durante 5 minutos y finalmente se agitaron en un vórtex. Paralelamente, se preparó el tampón de electroforesis o *running buffer* diluyendo el tampón concentrado x10 (Tris base 250 mM, glicerina 1,2 M y SDS 1%). Una vez preparada la cubeta del equipo Mini-PROTEAN® Treta Cell con el gel Mini-PROTEAN® TGX™ (BIO-RAD, Hércules, CA, EE. UU.) (Figura 8), se añadió el *running buffer* hasta desbordar la cubeta y se retiró el peine del gel, formándose así los pocillos. Se pipeteó un volumen de 15 μ l de las muestras de IgG en los pocillos y 5 μ l de magic marker (marcador de peso molecular, con proteínas de peso molecular conocido utilizadas como referencia) (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Se cerró la tapa, se conectaron los cables a la fuente de electroforesis GENE POWER SUPPLY GPS 200/400 (Pharmacia, Lisboa, Portugal) y se aplicó una diferencia de potencial de 180 V durante 30 minutos. La corriente recorre el gel provocando que las proteínas con carga negativa migren a través de él hacia el ánodo.

Tras la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de Azul de Coomassie R a una concentración de 650 mg/L en metanol, agua destilada, ácido acético y glicerol 30:50:10:10 (v:v:v:v) durante 1 hora y finalmente, se decoloraron con una mezcla de metanol, ácido acético, glicerina y agua destilada 25:8:2:65 (v:v:v:v), para eliminar los restos de colorante que no se habían unido a las bandas de proteína.

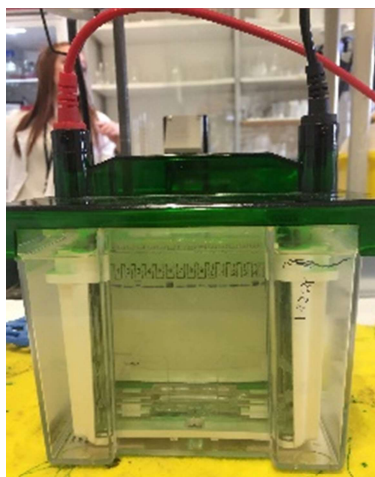


Figura 8. Equipo de electroforesis Mini-PROTEAN® TGX™ de BIO-RAD.

d. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO EN DEAE-SEPHADEX

Una vez comprobada la presencia de IgG en la fracción procedente de la diálisis, se procedió a aplicarla a una columna de intercambio aniónico de DEAE-Sephadex (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EE. UU) para su aislamiento. La matriz del intercambiador se preparó

añadiendo 2 g de gel en 300 ml de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4, e introduciendo la mezcla en un baño María durante 2 horas para que se hinchara el gel. En el extremo inferior de la columna de metacrilato (3 x 23 cm), se colocaron dos filtros de fibra de vidrio de 2 μ m de poro (Millipore Corporation, Burlington, MA, EE. UU) y se añadió el gel lentamente para proceder a un empaquetado homogéneo. Por último, se añadió 1 ml de la solución de IgG procedente de la diálisis sobre el gel. Tras el lavado de la columna con el tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4 y cuando la absorbancia a 280 nm del eluido fue menor de 0,02 se procedió a la elución de las proteínas retenidas. La elución se llevó a cabo en un gradiente escalonado de tampón fosfato 0,01; 0,02 y 0,06 M, a pH 7,4; 7,2 y 7, respectivamente.

Para la cromatografía, se utilizó un colector de fracciones RediFrac y una bomba peristáltica P-1 (Pharmacia Biotech, Estocolmo, Suecia) (Figura 9). Las fracciones recogidas fueron de 2 ml y la velocidad del flujo media fue de 0,5 ml/min. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro 6505 UV/Vis (Jenway, Staffordshire, OSA, Reino Unido).

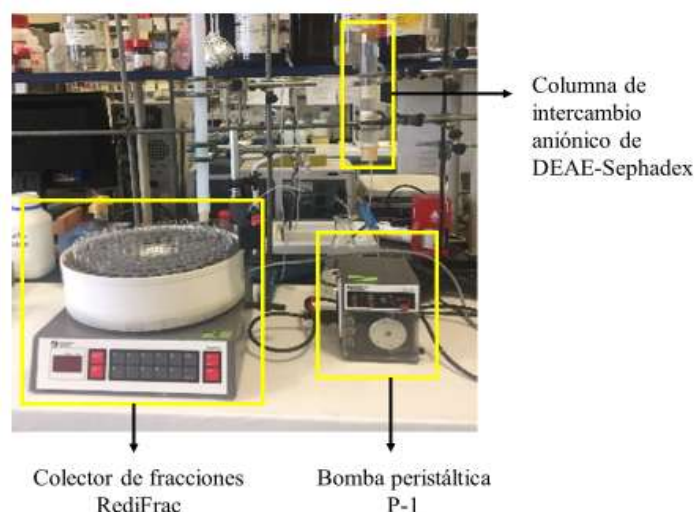


Figura 9. Equipo de cromatografía (columna, bomba y colector).

Con los resultados de la absorbancia a 280 nm de las fracciones recogidas en la elución, se seleccionaron las fracciones del último pico que habían dado mayor valor de absorbancia y se juntaron, obteniendo un volumen final de 21 ml. Este volumen se concentró en un tubo de ultrafiltración de 15 ml y 10 kDa de punto de corte (Millipore Corporation, Burlington, MA, EE. UU), centrifugando a 3000 xg durante 35 minutos varias veces, con el fin de concentrar la solución de IgG a un volumen de 2 ml. Se determinó la absorbancia a 280 nm del excludo de la ultrafiltración para descartar que no hubiera pérdida de proteína a través de la membrana. Se prepararon dos diluciones (1/10 y 1/100) a partir de la solución concentrada de IgG para caracterizarlas por SDS-PAGE.

Esta cromatografía se repitió dos veces para poder obtener suficiente cantidad de IgG para los posteriores análisis.

e. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD MEDIANTE COLUMNA HITRAP™ DE PROTEÍNA A

Para purificar las IgG obtenidas en la cromatografía en DEAE-Sephadex se utilizó una columna de afinidad HiTrap™ de proteína A de 1 ml (Fisher Scientific S.L., Madrid, España) (Figura 10).

Con el fin de retener las partículas presentes en la solución de IgG que pudieran interferir en la columna de afinidad, 1 ml de la fracción concentrada del último pico de la cromatografía en DEAE-Sephadex, se diluyó en 2 ml de fosfato de sodio 0,02 M, pH 7, y se pasó por un filtro Millex-GV 0,22 μ m *low protein binding* (Millipore Corporation, Burlington, MA, EE.UU).

La columna se lavó con 10 ml de un tampón compuesto por fosfato de sodio 0,02 M, pH 7. Se aplicaron los 3 ml de la muestra con una jeringuilla en la columna, y a continuación, se pasaron por la columna 10 ml del tampón para eliminar las proteínas no retenidas. Finalmente, se eluyeron las proteínas retenidas con 5 ml del tampón de elución compuesto por ácido cítrico 0,1 M, pH 4,5 y a continuación, con 5 ml del tampón de elución compuesto por ácido cítrico 0,1 M, pH 3,5. Los volúmenes eluidos con cada uno de los tampones se recogieron de forma independiente. Tras la elución, se lavó la columna con 5 ml de tampón fosfato inicial y se repitió el lavado con 10 ml para asegurar que la columna quedaba completamente limpia.



Figura 10. Columna de Proteína A HP.

Los tubos donde se recogían las eluciones con los tampones ácidos contenían tampón Tris 1 M, pH 9, para neutralizar inmediatamente las IgG eluidas y evitar su desnaturalización. Para comprobar que la neutralización se había hecho correctamente, se utilizó una tira indicadora de pH (LLG Labware, Meckenheim, Alemania).

Las fracciones eluidas se juntaron y se concentraron en un dispositivo de ultrafiltración de 10 kDa de punto de corte (Millipore Corporation, Burlington, MA, EE.UU), que se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos. La solución de IgG concentradas se caracterizó por SDS-PAGE. Todo el procedimiento se repitió varias veces para obtener una mayor cantidad de IgG purificadas.

4.4 Obtención de anticuerpos policlonales frente a IgG porcinas

Las IgG concentradas tras la cromatografía de afinidad se dializaron frente a tampón fosfato salino (PBS) compuesto por NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4, utilizando un tubo de ultrafiltración de 15 ml y 10 kDa (Millipore Corporation, Burlington, MA, EE.UU.) mediante varias centrifugaciones a 3000 g durante 10 minutos, obteniéndose 3 ml de IgG a una concentración de 2,2 mg/ml. Este paso es necesario para eliminar los reactivos en los que se encontraban las IgG tras la cromatografía de afinidad y sustituirlos por un tampón fisiológico con el cual inmunizar al conejo. Para que la inmunización sea efectiva se necesita inocular 1 mg de proteína en cada inmunización. Para conocer la cantidad de IgG contenidas en la solución concentrada y dializada se utilizó su coeficiente de extinción $A^{1\%}_{280\text{ nm}}$ que es de 1,4.

La solución utilizada para la inmunización de una coneja de raza Nueva Zelanda blanco (Figura 11) contenía 0,5 ml de IgG a una concentración de 2,2 mg/ml y 0,5 ml de adyuvante de Freund completo (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EE.UU). Se agitó en el vórtex hasta conseguir una emulsión, puesto que el adyuvante contiene un aceite mineral.



Figura 11. Coneja de raza Nueva Zelanda blanco inmunizada con IgG porcina.

Antes de inmunizar a la coneja, se le extrajeron 5 ml de sangre, que se dejaron coagular para obtener un suero control preinmune, que se conservó a -20 °C. Tras la extracción de la sangre, se realizó la primera inmunización mediante 5 inoculaciones subcutáneas a lo largo del lomo para tener una mayor respuesta del sistema inmune. Se realizó una segunda inmunización pasados 20 días de la primera inmunización con la misma cantidad de IgG y con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EE. UU). A los 10 días de la segunda inmunización se realizó la extracción de sangre. Se recogieron 6 tubos con 5 ml de sangre en cada uno, que se dejó coagular a temperatura ambiente. El suero obtenido se distribuyó en volúmenes de 1,5 ml en viales eppendorf que se llevaron a -20 °C. Todos los procedimientos que suponían el manejo de la coneja fueron llevados a cabo por personal homologado por el Gobierno de Aragón para el ejercicio profesional en centros de experimentación animal y otros

finés científicos en las categorías B y C, y bajo el proyecto nº PI48-10 aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

4.5 Inmunodifusión doble

Para comprobar la presencia de anticuerpos anti-IgG en el suero sanguíneo obtenido se realizó una inmunodifusión doble. Para ello, primero se preparó una capa de agarosa al 0,8% en agua destilada sobre un portaobjetos, que se dejó secar. El objetivo de esta primera capa es mejorar la adhesión de la segunda capa de agarosa que se deposita sobre ella. Se añadieron 8 ml de gel de agarosa al 1,5% en tampón 5,5-dietil barbitol sódico (veronal) 0,025 M, pH 8,4. El gel se dejó solidificar y después se realizó un pocillo central y seis pocillos alrededor del central. Se colocaron 10 µl de IgG purificadas a una concentración de 2,2 mg/ml en 3 pocillos alternos y en el pocillo central se colocaron 10 µl del antisuero anti-IgG obtenido en conejo.

La muestra se dejó difundir 24 horas en una cámara húmeda con timol como conservante. El gel fue posteriormente lavado con suero salino fisiológico (SSF) compuesto por NaCl 150 mM, K₂HPO₄ 8,38 mM, KH₂PO₄ 1,54 mM, pH 7,4, durante 48 horas con varios cambios de tampón y finalmente con agua destilada durante 1 hora. El gel se secó en estufa a 80°C y los inmunoprecipitados se tiñeron con una solución de Azul de Coomassie tipo G a una concentración de 250 mg/L en metanol, agua destilada y ácido acético 45:49:6 (v:v:v) durante 1 hora. Finalmente, el gel se decoloró con una mezcla de metanol, ácido cítrico, glicerina y agua destilada 25:8:2:65 (v:v:v:v), con la finalidad de eliminar los restos de colorante que no se habían unido a los inmunoprecipitados.

4.6 Inmunodifusión radial

Una vez comprobada la presencia de anti-IgG en el antisuero se prepararon diversas placas de inmunodifusión radial para determinar las cantidades de antisuero e IgG necesarias para obtener un halo de precipitación visible para poder realizar la valoración cuantitativa de las IgG presentes en las muestras de calostro de cerda. Los geles de agarosa se prepararon al 1,5% en tampón veronal 0,025 M, pH 8,4. Todas las placas contenían una primera capa de gel como se ha indicado en el apartado anterior.

Los estándares elegidos para las sucesivas pruebas fueron 0,5; 0,25; 0,125 y 0,06 mg/ml. Estos se prepararon a partir de las IgG porcinas purificadas (2,2 mg/ml) obtenidas en la columna de Proteína A. Para obtener el primer estándar se realizó una dilución 10/32 y a continuación se realizaron diluciones a la mitad hasta llegar a la concentración del estándar de concentración 0,06 mg/ml.

Para ajustar los estándares de IgG con el antisuero específico anti-IgG obtenido en conejo se prepararon 3 placas con diferentes concentraciones de antisuero. Todas las placas contenían 10 ml de agarosa con 40 μ l, 50 μ l y 60 μ l de antisuero, respectivamente. Cada placa tenía tres pocillos que se llenaron con tres estándares de IgG porcinas de 0,25; 0,125 y 0,06 mg/ml.

Las placas se dejaron difundir durante 48 horas en una cámara húmeda con timol como conservante y, posteriormente fueron lavadas, secadas, teñidas y decoloradas siguiendo el procedimiento indicado en la técnica anterior. Finalmente se eligió la concentración de 50 μ l de antisuero por dar mejores resultados.

La prueba se realizó tanto con el antisuero de la primera extracción de sangre de la coneja como con el antisuero de la segunda extracción. Se eligió el antisuero de la segunda extracción por presentar una mejor interacción con las IgG porcinas y dar halos más marcados.

Para intentar mejorar la unión del antisuero y obtener halos más definidos se realizó otra prueba preparando 3 placas con la misma concentración de antisuero (50 μ l en 10 ml de agar) pero añadiendo a una de ellas Tween 20 (Fisher Scientific S.L., Madrid, España) al 0,10% (v:v), a otra placa Triton X-100 (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EE.UU) al 0,10% (v:v) y a la tercera una concentración de 0,9% de NaCl. El detergente Tween 20 y el Triton X-100 contribuyen a romper la interacción de la grasa presente en el calostro con las IgG. El NaCl también puede reducir las interacciones iónicas entre proteínas del calostro. Tras la prueba se eligió el Tween 20 por dar lugar a unos halos más marcados que los obtenidos con las otras sustancias ensayadas.

Una vez establecidas las concentraciones de antisuero y de detergente para los geles de agarosa, se realizó la valoración cuantitativa de las IgG presentes en las muestras de calostro de cerda. Los geles de agarosa se prepararon al 1,5% en tampón veronal 0,025 M, pH 8,4. Todas las placas contenían una primera capa de gel como se ha descrito anteriormente para la inmudifusión doble. Por cada 28 ml de agarosa, se agregaron 150 μ l de antisuero específico anti-IgG porcina obtenido en coneja. El gel con el antisuero se colocó sobre placas de vidrio de 9 x 12 cm y se dejó gelificar, obteniéndose un gel con 2 mm de espesor. En cada placa se hicieron 20 pocillos de 4 mm de diámetro en cada uno de los cuales se colocaron 10 μ l de las muestras y de los estándares de IgG porcina. Las muestras se dejaron difundir 48 horas en una cámara húmeda con timol, a temperatura ambiente. Los geles fueron posteriormente lavados, teñidos y decolorados como se ha indicado anteriormente. Se midió el área de los halos de los estándares con ayuda del programa informático ImageJ, representándose los valores en una curva patrón y determinando, la concentración de proteína en las muestras problema por interpolación de los valores de los halos en la curva patrón.

4.7 Análisis estadísticos

Para cada técnica utilizada, refractometría e IDR, se estimó el valor medio en °Brix o mg/ml, respectivamente, y sus correspondientes intervalos de confianza del 95%. Para estimar la repetibilidad de cada una de ellas se evaluó su correspondiente coeficiente de variación (CV%). El CV% se definió como el cociente entre la desviación estándar de un conjunto de mediciones y la media del conjunto.

En el caso de la técnica de refractometría, se analizó además la relación entre los resultados obtenidos y las diluciones utilizadas. Para ello se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman (r_s), que permite estudiar la correlación entre una variable continua (°Brix) y una variable cualitativa ordinal (dilución) (Petrie y Watson, 1999).

Dado que tanto los resultados de refractometría como los de IDR seguían una distribución normal, el estudio de la correlación entre ambas técnicas se realizó mediante regresión lineal simple, estimando tanto el coeficiente de correlación de Pearson (r), que evalúa el grado de correlación entre las dos variables cuantitativas, como la recta de regresión que permite transformar los valores de °Brix en mg/ml de IgG en el calostro (Petrie y Watson, 1999). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2013) y MedCalc (MedCalc versión 18.10.2, <https://www.medcalc.org/>).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento de inmunoglobulinas G porcinas

Tras la precipitación con sulfato amónico y diálisis frente a tampón fosfato, la solución de proteína se extrajo de la membrana de diálisis y se caracterizó por SDS-PAGE con mercaptoetanol. Las IgG de cerda tienen cuatro cadenas, dos cadenas pesadas de unos 55 kDa y dos cadenas ligeras de unos 25-35 kDa, la pesada migrará menos que la ligera, por lo que se deberían de obtener dos bandas.

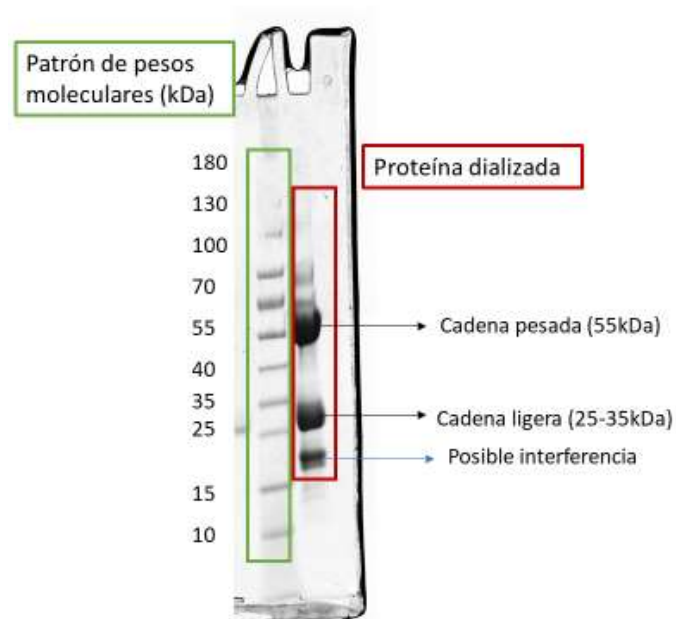


Figura 12. Fracción de IgG de calostro de cerda tras precipitación con sulfato amónico. SDS-PAGE con mercaptoetanol.

Como se puede comprobar en la Figura 12, se observó la presencia de IgG en la fracción procedente de la diálisis. A continuación, la fracción de proteína dializada se aplicó a una columna de intercambio aniónico con el fin de obtener una proteína más pura eliminando las interferencias de otras proteínas.

Las fracciones que tuvieron los mayores valores de absorbancia fueron seleccionadas para continuar el proceso de purificación de las IgG (Figura 13). Los tubos que contenían estas fracciones se juntaron y se concentraron la solución para obtener un volumen menor. Este volumen se midió a 280 nm y se obtuvo un valor de 2,680.

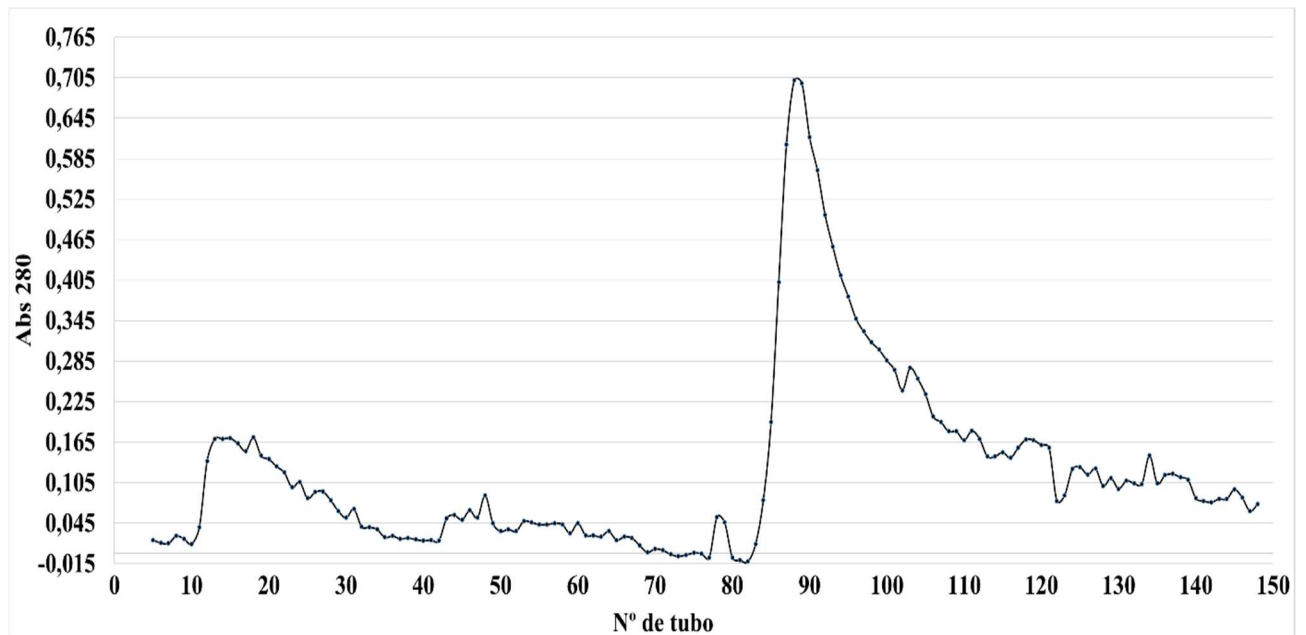


Figura 13. Perfil de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE- Sephadex. Se representan los valores de las absorbancias a 280nm de las fracciones eluidas de la cromatografía.

Tras la cromatografía se prepararon dos diluciones (1/10 y 1/100) a partir de la solución concentrada de IgG para caracterizarlas por SDS-PAGE (Figura 14).

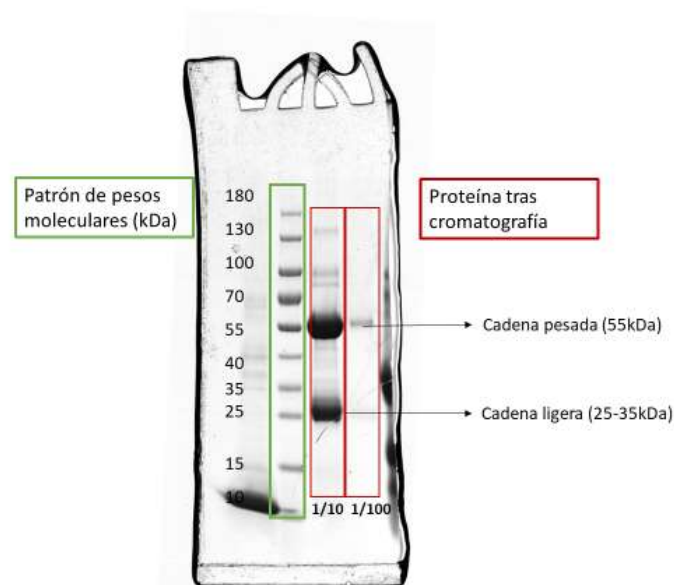


Figura 14. IgG tras cromatografía DEAE- Sephadex. SDS-PAGE con mercaptoetanol.

Como se puede observar, la interferencia obtenida tras la caracterización por SDS-PAGE posterior a la diálisis no se observa en esta electroforesis, por lo que se consiguió el objetivo de aislar la proteína.

Sin embargo, seguían apareciendo algunas bandas entre las dos cadenas de la proteína, por lo que se aplicó la proteína a una columna HITRAP™ DE PROTEÍNA A con el fin de purificar las IgG obtenidas en la cromatografía anterior. Se determinó la absorbancia de los eluidos obtenidos, 0,461 con el tampón pH 4,5 y 0,585 con el tampón pH 3,5; y posteriormente, se concentraron a un volumen menor, obteniendo una absorbancia de 2,690, y se analizaron por SDS-PAGE (Figura 15).

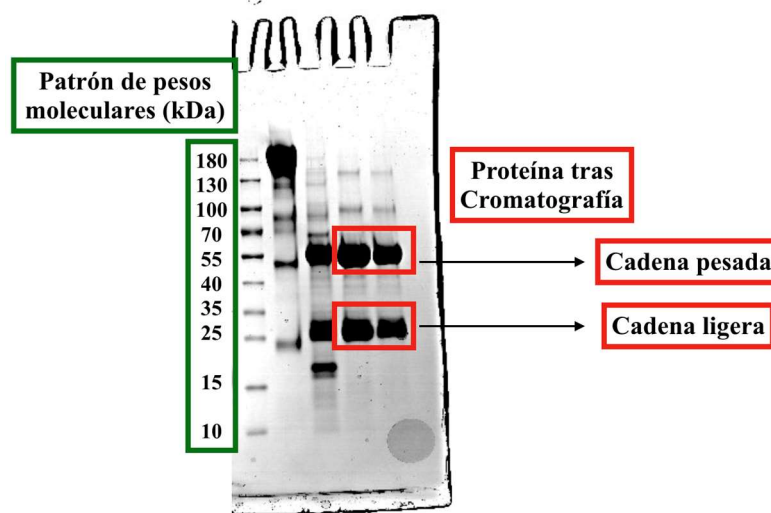


Figura 15. IgG tras cromatografía de afinidad con HiTrap-Protein A.

5.2 Obtención de anticuerpos policlonales frente a IgG porcinas

Se realizaron 2 inmunizaciones separadas 20 días en el tiempo. Tras completar este periodo se extrajo sangre a la coneja y se analizó el suero para determinar si contenía anticuerpos anti-IgG porcina.

5.3 Inmunodifusión doble

Para ello, se llevó a cabo una inmunodifusión doble, técnica que detecta la presencia de anticuerpos en el suero sanguíneo de un conejo enfrentándolo, en nuestro caso, a las IgG porcinas con las que se había inmunizado. El resultado fue satisfactorio ya que se formó un precipitado marcado que hace referencia a la interacción entre el antisuero anti-IgG colocado en el pocillo central y las IgG purificadas colocadas en 3 de los 6 pocillos circundantes al central (Figura 16).

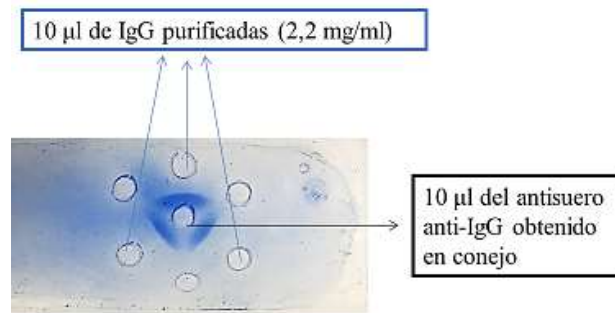


Figura 16. Resultado de la Inmunodifusión doble entre IgG porcina y antisuero anti-IgG obtenido en conejo.

5.4 Inmunodifusión radial

Tras obtener unos resultados satisfactorios en la prueba anterior, se continuó estableciendo los estándares de IgG porcina purificada para poder cuantificar la cantidad de IgG en las muestras de calostro porcino.

Tras las sucesivas pruebas, explicadas en la metodología, se concluyó que la concentración idónea de antisuero en el gel de agarosa para la cuantificación de los estándares era aquella que contenía 50 µl de antisuero ya que presentaba los halos más definidos.

Además, se observó que con la adición de una cantidad de Tween 20 en el gel de agarosa, los halos de precipitación quedaban más definidos comparándolos tanto con las placas que no llevaban este detergente, como con las otras dos placas de la prueba que contenían Triton X-100 y NaCl.

Una vez decididas las cantidades de IgG porcina para los estándares, de antisuero y de detergente, todas las muestras de calostro recogidas se sometieron a la inmudifusion radial. En la parte superior e inferior izquierda se colocaron los estándares, en gradiente descendente, y en los demás pocillos se colocaron dos diluciones a partir de la dilución 1/64 de las muestras de calostro, la 1/6 y la 1/12. Transcurrido el tiempo de difusión, lavado, teñido, secado y decolorado, se obtuvieron los geles con los halos de precipitación marcados (Figura 17).

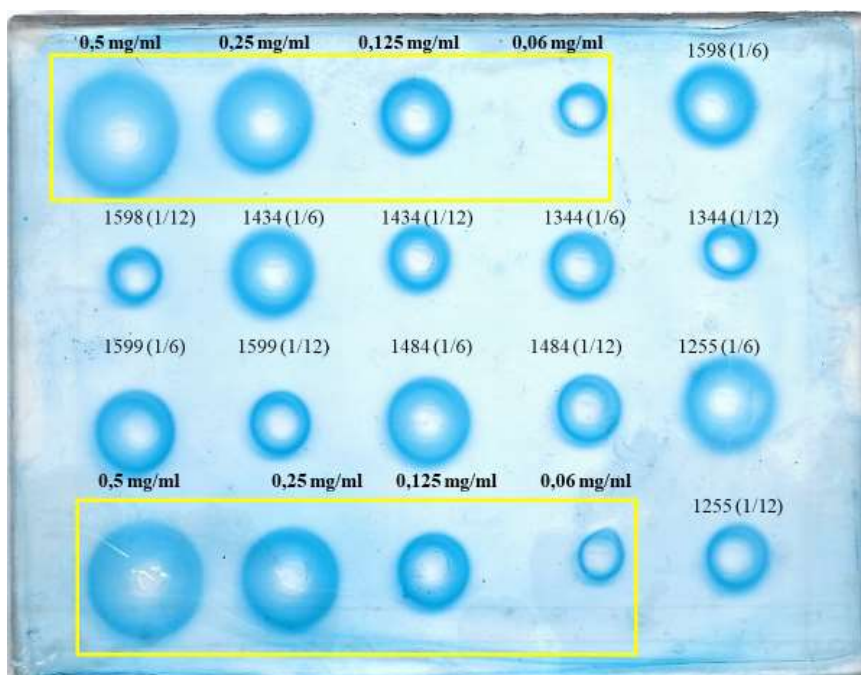


Figura 17. Resultado de la inmunodifusión radial de varias muestras de calostro porcino.

5.5 Evaluación de los resultados por IDR

En este estudio la IDR se realizó por duplicado a partir de las diluciones 1/6 y 1/12 obtenidas de la dilución 1/64 realizada para el análisis de la refractometría. Los resultados de la IDR para las 28 muestras de calostro analizadas se presentan en los Anexos 1 y 2.

El rango de concentraciones de IgG obtenido en nuestro estudio osciló entre 4,603 y 103,142 mg/ml, un rango de valores bastante más amplio que el descrito con la misma técnica en el estudio realizado por Balzani et al. (2016) (13,27 a 35,08 mg/ml). Este amplio rango de valores podría estar relacionado con el momento de recogida del calostro. Bland et al. (2003); Klobasa et al. (1987); Machin (1998) y Porter (1969), entre otros, demostraron que la concentración de las diferentes inmunoglobulinas, muy elevadas en el momento previo al parto, cambia rápidamente después del nacimiento del primer lechón y disminuye a la mitad en las primeras 12 h postparto. En nuestro estudio, conocíamos el momento de la recogida del calostro en 11 cerdas. El intervalo de concentraciones de IgG para las 8 cerdas cuyo calostro se recogió en el momento del parto fue de entre 59,895 y 103,142 mg/ml, obteniendo una media de 77,80 mg/ml (IC95%: 65,37 - 90,22), resultado muy similar al correspondiente a la cerda cuya recogida de calostro se había hecho una hora antes del parto (92,160 mg/ml). Este rango de concentraciones coincide con el valor obtenido en los estudios citados (95,60 mg/ml de IgG inmediatamente después del parto).

En otras dos cerdas el calostro se recogió al menos 8 horas tras el parto y las concentraciones obtenidas fueron mucho menores que las anteriores (25,40 y 29,12 mg/ml), valores cercanos al obtenido en los estudios anteriores (32,1 mg/ml de IgG tras 12 horas de lactación), lo que explicaría el rango de valores observado y demostraría que la técnica de la IDR es muy sensible a la variación fisiológica en la concentración de inmunoglobulinas, justificando que esta técnica se considere de referencia para la evaluación de la calidad inmunógena del calostro (Mancini et al., 1965).

Hasta donde sabemos, no está descrito cuál debería ser la concentración óptima de IgG en el calostro porcino. En un estudio para determinar el efecto del calostro y de la suplementación proteica y energética en la supervivencia y el rendimiento de los lechones de bajo peso al nacer (Moreira et al., 2017), el calostro elegido para ser administrado a los lechones recién nacidos durante la prueba contenía $50,5 \pm 3,0$ mg/mL de IgG, asumiendo que esta concentración sería adecuada. Este valor es muy superior a los valores referidos por Balzani et al. (2016) pero dentro del rango obtenido en nuestro estudio para las cerdas recién paridas. Es posible que variaciones en el desarrollo de la técnica de IDR sean responsables de las diferencias observadas entre los estudios.

Variabilidad de los resultados de la técnica de IDR

La variabilidad observada con esta técnica, medida como el CV% medio a partir de las dos repeticiones realizadas para cada calostro fue moderada, del 15,42%. En cualquier caso, se esperaba que el nivel de imprecisión de este estimado fuera relativamente alto al realizar solo dos repeticiones, dada la dificultad asociada al desarrollo de la IDR, puesto que en este estudio ha habido que aislar las IgG porcinas, obtener los anticuerpos frente a ellas y poner a punto la técnica.

5.6 Evaluación de los resultados por refractometría

Se valoraron un total de 28 muestras de calostro porcino con el refractómetro digital (Obione Calf, Obione, Mâcon, Francia), así como sus respectivas diluciones desde la 1/2 hasta la 1/64. Los resultados en °Brix para cada una de las diluciones de las muestras, así como su media, se presentan en los Anexos 1 y 2.

De la muestra número 93 no se pudo obtener las medidas de °Brix de las diluciones debido a la escasez de calostro. La cantidad disponible de esta muestra de calostro se utilizó para obtener su medida en °Brix sin diluir y para la preparación del *pool*.

De todas las demás muestras se consiguió la medida en °Brix, tanto de la muestra diluida como sin diluir, excepto en tres de ellas (números 85, 1255 y 1599). Para estas tres muestras el

aparato daba error en las muestras sin diluir. Este error podría deberse posiblemente a la densidad del calostro, ya que sí se pudieron obtener medidas de las respectivas diluciones.

En algunos casos, hubo cierta dificultad para medir las muestras, asociada normalmente a problemas de luz, lo que requería cubrir la muestra dispensada en el aparato para poder realizar la lectura, lo que limitaba de alguna manera el uso práctico y rápido del aparato, al tener que realizar la medición varias veces.

El rango de valores en °Brix observado en nuestro estudio osciló entre el 17,2 y el 31,5, unos valores muy similares a los obtenidos por la misma técnica en otro estudio previo realizado (rango entre 18,3-33,2; Balzani et al., 2016). Es interesante destacar que a pesar de haber encontrado diferencias importantes en los valores de IDR entre el estudio de Balzani y el nuestro, con el refractómetro los valores fueron similares. A diferencia de la IDR, la refractometría digital es una técnica muy simple con pocos factores de variación, lo que podría explicar este hecho. Es por lo tanto muy posible que el rango de valores obtenido con el refractómetro sea el normal para el calostro porcino. Al igual que con la IDR, las variaciones observadas podrían deberse a factores como el momento de recogida del calostro. Balzani et al. (2016), observaron un efecto significativo del tiempo de muestreo en la concentración de inmunoglobulina del calostro, siendo los calostros recogidos en los primeros momentos tras el parto los de mayores valores de °Brix. Esta afirmación coincide con lo expuesto anteriormente respecto a la disminución de las concentraciones de inmunoglobulinas a lo largo del tiempo tras el parto, según los estudios de Bland et al. (2003); Klobasa et al. (1987); Machin (1998) y Porter (1969). En nuestro estudio conocíamos el momento de la recogida del calostro y el valor en °Brix del calostro entero en 10 cerdas. En siete cerdas, el calostro se recogió en el momento del parto, presentando un valor medio de 26,35°Brix (IC95%: 25-27,69). En las otras dos cerdas el calostro se recogió al menos 8 horas tras el parto y el resultado de los dos calostros analizados fue mucho menor que la media anterior en los dos casos (21,2°Brix y 19,6°Brix, respectivamente), sugiriendo que en nuestro caso también el refractómetro era sensible a la variación fisiológica en la concentración de inmunoglobulinas. Por lo tanto, es de gran importancia registrar el momento de recogida del calostro con respecto al parto para poder hacer una adecuada interpretación de los resultados obtenidos.

Variabilidad de los resultados de la técnica de refractometría

La Figura 18 muestra la relación entre °Brix y las distintas diluciones realizadas. Se observó una alta correlación (coeficiente de Spearman (ρ)=0,97; $P<0,001$) entre ambas variables. Como era de esperar, a mayor dilución de la muestra menor era el valor de °Brix.

Considerando que los °Brix evalúan la concentración de sólido disuelto (en este caso inmunoglobulinas, mayoritariamente de tipo G) en una solución, estos resultados sugerían que el refractómetro medía adecuadamente la reducción de la concentración de IgGs conforme se aumentaba la dilución de la muestra. De hecho, los valores de °Brix correspondían bastante bien con las diluciones, reduciéndose los mismos aproximadamente a la mitad en cada dilución (Figura 18).

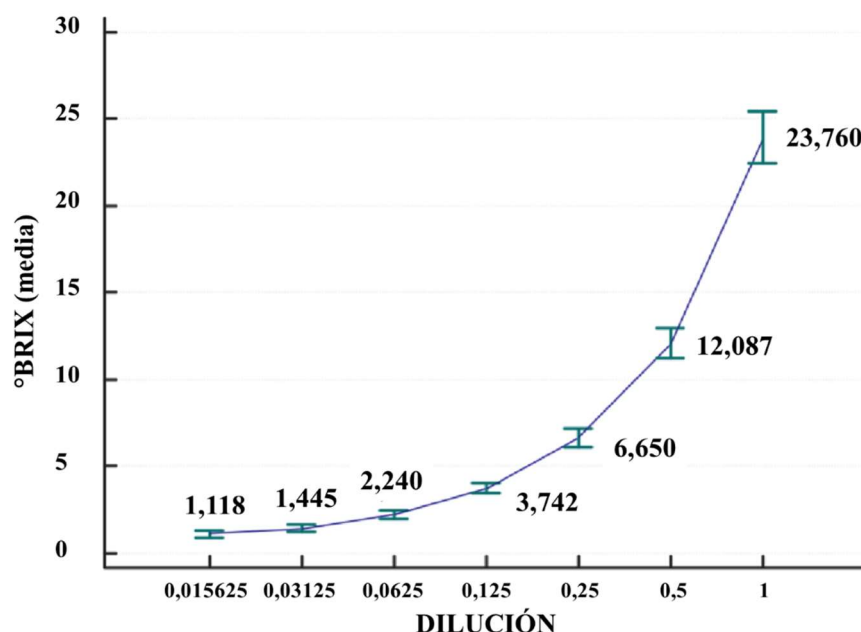


Figura 18. Relación entre la medida en °Brix de las muestras de calostros y sus respectivas diluciones.

Se estimó el coeficiente de variación (CV%) de los resultados para cada dilución a partir de las tres repeticiones realizadas de cada muestra. Los resultados indicaban que los valores de CV% eran muy bajos entre repeticiones, siendo incluso algo menores cuando se trabajaba con la muestra sin diluir (Tabla 5).

La repetibilidad de esta técnica también fue evaluada en un estudio previo, demostrando un alto grado de la misma, que no se veía afectada en función del tipo de calostro utilizado (fresco, refrigerado o congelado) (Balzani et al., 2016). Todo ello sugiere que esta técnica es repetible, pero, tal como se demuestra con nuestros resultados, trabajar con calostro sin diluir o escasamente diluido produciría resultados más precisos.

Tabla 5. Coeficiente de variación (CV%) según las diluciones y basado en tres repeticiones de la medida.

Dilución	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
CV% °Brix	0,83	0,94	1,42	2,24	1,54	1,81	1,71

5.7 Relación entre resultados de refractometría y de IDR

Existen varios estudios en los que ha evaluado la relación entre refractometría e IDR. Un estudio en calostro bovino (Quingley et al., 2012) concluyó que la medición en °Brix de sólidos totales en calostro bovino era un método barato, rápido y satisfactoriamente exacto para estimar la concentración de IgG. Posteriormente, un segundo estudio en este tipo de calostro evaluó si los ciclos de congelación-descongelación afectaban a las IgG (Morrill et al., 2015), llegando a la conclusión de que los ciclos múltiples de congelación afectaban a los valores de concentración de IgG cuando se determinaba por IDR, siendo mayores las concentraciones de IgG en las muestras frescas. Sin embargo, las estimaciones obtenidas con el refractómetro no se vieron afectadas por múltiples ciclos de congelación, sugiriendo la utilidad del refractómetro digital para determinar la concentración de IgG tanto en calostro fresco como en congelado. Cuando el estudio se realizó sobre calostro de oveja (Torres-Rovira et al., 2017), los resultados obtenidos también demostraron la utilidad del instrumento para proporcionar una estimación aproximada de la calidad del calostro en la granja. Sin embargo, concluyeron que se necesitan más estudios para determinar un valor de corte de °Brix validado para identificar un calostro de buena calidad en diferentes especies.

En nuestro estudio, se observó una correlación positiva y muy significativa entre los resultados del refractómetro y los de la IDR para todas las diluciones ensayadas. Las correlaciones eran mucho más altas cuando se utilizaban las muestras sin diluir o escasamente diluidas, lo que permitía establecer una recta de regresión que estimara con bastante precisión las concentraciones de IgGs (mg/ml) en el calostro, en función del valor en °Brix (Tabla 6). Este estudio obtuvo mejores resultados que el estudio realizado por Balzani et al. (2016) quienes también concluyeron que, al evaluar el coeficiente de correlación de Pearson, el porcentaje de Brix se correlacionaba positivamente con los resultados de IDR ($r = 0,56$, $P < 0,001$).

Tabla 6. Relación entre °Brix e IDR (IgG en mg/ml)

DILUCIÓN	r	ECUACIÓN	P
1	0,84	IDR = -66,446 + 5,184*°Bx	P<0,001
1/2	0,84	IDR = -56,9886 + 9,3917*°Bx	P<0,001
1/4	0,80	IDR = -43,4273 + 15,0179*°Bx	P<0,001
1/8	0,61	IDR = -20,8948 + 20,6093*°Bx	P=0,001
1/16	0,56	IDR = 1,9431 + 24,5053*°Bx	P=0,003
1/32	0,55	IDR = 22,9914 + 23,2543*°Bx	P=0,003
1/64	0,55	IDR = 31,9391 + 21,9581*°Bx	P=0,003

Hasan et al. (2016) realizaron un estudio sobre calostro de cerda y determinaron que las lecturas de °Brix por debajo de 20 se correspondían con niveles bajos de IgG ($14,5 \pm 1,8$ mg/ml). Las muestras con lecturas de °Brix de 20-24 correspondían al contenido límite de IgG ($43,8 \pm 2,3$ mg/ml), aquellas con lecturas de °Brix entre 25 y 29 correspondían al contenido adecuado de IgG ($50,7 \pm 2,1$ mg/ml) y las muestras que tuvieron lecturas de °Brix >30 se relacionaron con unos muy buenos niveles de IgG en calostro ($78,6 \pm 8,4$ mg/ml). De este estudio se podría inferir que un calostro aceptable en cuanto a contenido de IgG es aquel que presenta una concentración superior a 47,5 mg/ml, que correspondería con una lectura de °Brix superior a 25. En nuestro estudio, y de acuerdo con la Figura 19, serían valores de °Brix superiores a 22,46 los que indicarían que es un calostro de buena calidad (>50 mg/ml).

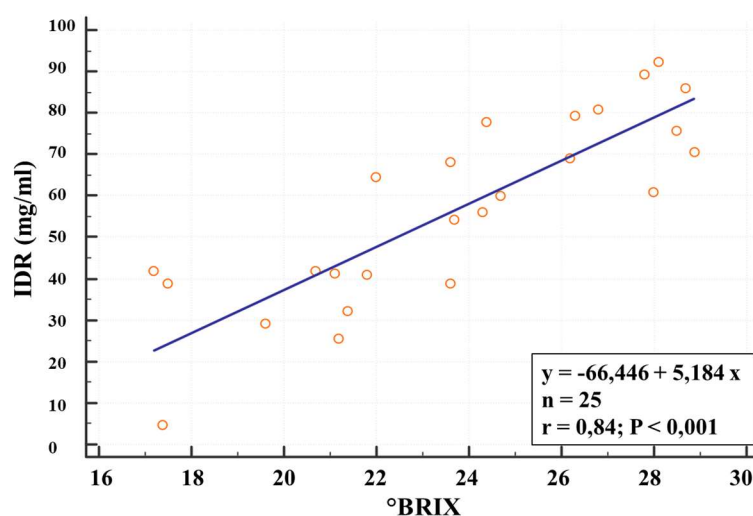


Figura 19. Relación entre la medida en °Brix de las 25 muestras de calostros sin diluir y sus respectivas concentraciones de inmunoglobulinas G en mg/ml.

5.7.1 Relación entre el número de partos de la cerda y la concentración de IgG.

Las cerdas multíparas presentan niveles de inmunoglobulinas séricas superiores a los de las cerdas primíparas (Tabla 7; Klobasa et al, 1986). Esto podría suponer que la concentración de IgG en el calostro de cerdas multíparas podría ser también superior al de cerdas de primer parto. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró tal relación, ni mediante IDR, ni mediante refractometría, cuando se compararon los valores obtenidos para los calostros de este tipo de cerdas. Esta falta de relación podría ser debida al limitado número de cerdas utilizadas en este estudio. Además, sólo teníamos información acerca del número de partos de la mitad de las cerdas (3 cerdas primíparas, 2 cerdas de 2 partos, 3 cerdas de 3 partos, 1 cerda de 4 partos, 2 cerdas de 5 partos, 2 cerdas de 6 partos y una cerda de 7 partos). La información está reflejada en los Anexos 1 y 2.

Tabla 7. Relación entre el número de partos de la cerda y la concentración de las diferentes inmunoglobulinas en el calostro en mg/ml (Klobasa et al., 1986).

Nº DE PARTO	IgG	IgA	IgM
1	86,9 ± 24,9	7,8 ± 2,9	8,6 ± 3,6
2	94,0 ± 29,6	7,6 ± 3,1	12,1 ± 3,5
3	98,8 ± 25,2	7,5 ± 2,4	12,9 ± 3,4
4	82,3 ± 26,8	6,1 ± 2,6	12,6 ± 3,9
5	100,6 ± 22,7	6,7 ± 2,3	13,5 ± 2,7
6	97,5 ± 24,1	7,1 ± 4,2	13,9 ± 3,7

6. CONCLUSIONES

1. Se observó una correlación altamente positiva y significativa entre los valores obtenidos por refractometría (°Brix) y las concentraciones de IgG (mg/ml) obtenidas por IDR en muestras de calostro de cerda.
2. El refractómetro resultaría una técnica práctica, barata y fiable para estimar de manera rápida la calidad del calostro porcino.
3. La dilución del calostro aumentó ligeramente la variabilidad en los resultados de la medida en °Brix, por lo que se recomienda la medición directa del calostro sin diluir.
4. El momento de la recogida del calostro parecía afectar a la medida en °Brix, y por lo tanto, a la estimación de la concentración de IgG. Para una adecuada interpretación de la calidad del calostro se recomienda su recogida en el momento de parto.
5. Si consideramos que un calostro de cerda de buena calidad debe presentar al menos una concentración de IgG de 50 mg/ml, entonces debería presentar un resultado en °Brix >22,5.

CONCLUSIONS

1. A highly positive and significant correlation between refractometry (° Brix) and IDR (mg/ml IgG) in sow's colostrum samples was observed.
2. The refractometer was a practical, cheap and reliable technique to quickly estimate the quality of pig colostrum.
3. The dilution of the colostrum slightly modified the variability in the results of measurement in °Brix; therefore, direct measurement of the undiluted colostrum is recommended.
4. The time of colostrum sampling affected the measurement in °Brix, and therefore, the estimation of IgG concentration. For an adequate interpretation of colostrum quality it should be collected around farrowing.
5. If we consider that a good quality scolostrum should have at least a concentration of IgG of 50 mg / ml, then it should have a result in °Brix> 22.5.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Desde mi experiencia, el Trabajo de Final de Grado es y ha sido mucho más que una asignatura de 6 créditos en la que hay que invertir, al menos, 150 horas, ya que, durante estos 9 meses he aprendido que la investigación, por muy simple que parezca, es un arte que no se puede medir ni en horas ni en créditos.

Para iniciarme en esta investigación primero tuve que aprender a gestionar la información, tanto en inglés como en castellano, buscar en diferentes fuentes y saber filtrarla para quedarme solo con lo más relevante, por lo que también tuve que aprender a pensar y razonar de forma crítica. Una vez recabada toda la información y con una idea amplia acerca del objetivo de la investigación, tuve que aprender y acostumbrarme a trabajar de forma autónoma y a autoevaluarme de forma continua ya que, aunque mis tutores siempre han intentado estar a mi lado, ha habido veces que he tenido que saber resolver situaciones nuevas y problemas que se me planteaban durante el día a día en el laboratorio, fuese día laboral o festivo. Además, el hecho de haber tenido dos tutores, cada uno de un departamento diferente, ha provocado una continua lluvia de ideas de gran diversidad y pluralidad, que he sabido fusionar en esta investigación. Por todo esto considero que este TFG debe de medirse por el empeño y el trabajo continuo, pero también por la paciencia, orden y bien hacer. Este TFG no ha sido sencillo de realizar ya que involucraban gran número de técnicas y de conocimientos que he tenido que ir aplicando, algunas de ellas, por primera vez. Tampoco me asustó el hecho de ser un trabajo enfocado al mundo veterinario ya que, al final, todo está conectado y todo depende de todo para funcionar. Por lo tanto, lo que me llevo de este trabajo son todas las técnicas y conocimientos de laboratorio que he sido capaz de aprender y saber aplicar en cada momento de la investigación, sabiendo desenvolverse dentro de un laboratorio sola, sin ayuda, como una verdadera investigadora.

Pero todo esto no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo continuo de mis dos tutores: Raúl Carlos Mainar Jaime, del Departamento de Microbiología y M^a Lourdes Sánchez Paniagua, del Área de Tecnología de Alimentos; por ello, quiero darles las gracias. Pero sobre todo quiere darle las gracias a Lourdes ya que es con la que más tiempo he pasado y la que más me ha enseñado, se podría decir que ha sido como mi "madre de laboratorio" ya que me ha enseñado todo lo que ha estado en sus manos y siempre con la mejor de sus sonrisas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 3tres3.com. (2019). Comparador de datos reproductivos. Disponible en: https://www.3tres3.com/comparador-datos-reproductivos/?utm_source=newsletters333&utm_medium=email&utm_campaign=La+web+en+3+minutos&xemail=aWRtPTg3OTkmaWR1PTE0NDIxJnQ9ZGExOWNhZjYxM2FiYmU2MDVjYTA2YzJjM2I0Y2I2YTY%3D. [consultado: 13/8/2019]
- Anónimo (2001). Calostrómetro. Disponible en: http://www.geocities.ws/raydelpino_2000/calostrometro.html [consultado: 17/7/2019]
- Anónimo (2018). Magapor. *El sector porcino español*. Disponible en: <https://www.magapor.com/el-sector-porcino-espanol/> [consultado: 04/07/2019]
- Anónimo. (2010). *Zoom sobre: Composición y fisiología del calostro*. Fichas informativas de Lallemand Animal Nutrition.
- Balzani, A., Cordell, H. J. y Edwards, S. A. (2016). "Evaluation of an on-farm method to assess colostrum IgG content in sows". *Animal*. Cambridge University Press, 10(4), pp. 643–648. DOI: 10.1017/S1751731115002451.
- Blanco Camacho, L. A. y Criollo Ortega, D. C. (2009). *Análisis cuantitativo de IGG en el calostro de cerdas de primer a quinto parto mediante prueba Elisa en una granja Porcícola en Cundinamarca*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de la Salle. Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/5993> [consultado: 8/7/2019]
- Bland, I. M., Rooke, J. A., Bland, V. C., Sinclair, A. G. y Edwards, S. A. (2003). "Appearance of immunoglobulin G in the plasma of piglets following intake of colostrum, with or without a delay in sucking". *Animal Science*. Cambridge University Press, 77(2), pp. 277–286. DOI: 10.1017/S1357729800059014.
- Burrin, D.G. (2001). "Nutrient Requirements and Metabolism". *Biology of the Domestic Pig*. (Eds: Pond W.G. y Mersmann H.J.). Ithaca, Nueva York: Comstock Pub. Associates, Cornell University Press. ISBN: 9780801434686.
- Casanovas, C. (2007). *Encalostramiento de los lechones*. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/encalostramiento-de-lechones_4118/ [consultado: 08-07-2019]
- Casas, M. y Canto, F. (2015). *¿Cómo evaluar la calidad del calostro y la inmunidad de las terneras?* Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/como-evaluar-calidad-calostro-t31644.htm> [consultado: 07/07/2019]
- Cepica, A. Y Derbyshire, J. B. (1984). "Antibody-dependent and spontaneous cell-mediated cytotoxicity against transmissible gastroenteritis virus infected cells by lymphocytes from sows, fetuses and neonatal piglets". *Canadian Journal Of Comparative Medicine: Revue Canadienne De Medecine Comparee*, 48(3), pp. 258–261.
- Curtis, J. y Bourne, F. J. (1971). "Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 236(1), pp. 319–332. DOI: 10.1016/0005-2795(71)90181-4.

- Darragh A.J. y Moughan P.J. (1998) The Composition of Colostrum and Milk. In: The Lactating Sow (Eds: Verstegen, M. W. A., Moughan, P. J., y Schrama, J. W.). Países Bajos: Wageningen Press. pp. 3–21.
- Hasan, S. M. K., Junnikkala, S., Valros, A., Peltoniemi, O. y Oliviero, C. (2016). "Validation of Brix refractometer to estimate colostrum immunoglobulin G content and composition in the sow". *Animal*. Cambridge University Press, 10(10), pp. 1728–1733. DOI: 10.1017/S1751731116000896.
- Hnasko, R. (2015). *Elisa*. Nueva York: Springer. ISBN 978-1-4939-2742-5.
- Infoagro.com (2019) *Que es la refracción*. Disponible en: http://www.infoagro.com/instrumentos_medida/doc_refractometria_refraccion.asp?k=20 [consultado: 18/7/2019].
- INTERPORC SPAIN (2018). *El papel del sector porcino en la economía de España. El ayer y hoy del cerdo*. Disponible en: <https://interporc.com/2018/11/14/papel-sector-porcino-en-economia-espanola?cat=blog/el-ayer-y-hoy-del-cerdo> [consultado: 04/07/2019].
- Jensen, A. R., Elnif, J., Burrin, D. G., y Sangild, P. T. (2001). "Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent". *The Journal of Nutrition*, 131(12), pp. 3259–3265. DOI: 10.1093/jn/131.12.3259.
- Klobasa F., Butler J.E., E. Werhahn E. y Habe F. (1986). "Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 11(2). pp 149-159. ISSN 0165-2427. DOI: 10.1016/0165-2427(86)90094-2.
- Klobasa F., Werhahn E. y Butler J.E. (1987). "Composition of sow milk during lactation". *Journal of Animal Science*, 64(5), pp.1458–1466. DOI: 10.2527/jas1987.6451458x.
- Machin, P. (1998) "Efecto de la administración vía oral de inmunoglobulinas porcinas en lechones al nacimiento". *Porcicultura Colombiana*. 6(40), pp. 8 – 12.
- Mancini, G. A., Carbonara, A. T. y Heremans, J. F. (1965). "Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion". *Immunochemistry*, 2(3), pp. 235-254. DOI: 10.1016/0165-2427(86)90094-2.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2019a). *Sector porcino en España*. Madrid: MAPA. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/va/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/> [consultado: 04/07/2019].
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2019b). *“El sector de la carne de cerdo en cifras: principales indicadores económicos 2018”*. Madrid: MAPA.
- Monzalvo Meza, L. D. (2016). Curso teórico de Inmunología. Métodos inmunológicos 6QM2. Instituto Politécnico nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Disponible en: https://www.academia.edu/32109152/Metodos_inmunologicos [consultado: 5-7-2019].
- Moreira, L. P., Menegat, M. B., Barros, G. P., Bernardi, M. L., Wentz, I. y Bortolozzo, F. P. (2017). "Effects of colostrum, and protein and energy supplementation on survival and performance of low-birth-weight piglets". *Livestock Science*, 202, pp.188-193. DOI: 10.1016/J.LIVSCI.2017.06.006.
- Morrill, K. M., Robertson, K. E., Spring, M. M., Robinson A. L. y Tyler, H. D. (2015). "Validating a refractometer to evaluate immunoglobulin G concentration in Jersey colostrum

- and the effect of multiple freeze–thaw cycles on evaluating colostrum quality". *Journal of Dairy Science*, 98(1), pp. 595–601. DOI: 10.3168/JDS.2014-8730.
- Mota Rojas, D., Ramirez Necoechea, R., Roldan Santiago, P. y Martinez Rodriguez, R. (2018). "La importancia del calostro porcino". *BM EDITORES*. Disponible en: <https://bmeditores.mx/porcicultura/articulos/nutricion-del-cerdo/alimentacion-del-lechon/la-importancia-del-calostro-1805> [consultado: 5-7-2019].
 - Newby T.J, Stokes C.R y Bourne F.J. (1982). "Immunological activities of milk" .*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 3(1), p. 67-94. DOI: 10.1016/0165-2427(82)90032-0.
 - Petrie A y Watson P. (1999). *Statistics for Veterinary and Animal Science*. Rino Unido: Blackwell Science Ltd. Oxford. 243 pp.
 - Poonsuk, K y Zimmerman, J. (2017). "Historical and contemporary aspects of maternal immunity in swine". *Animal health research reviews*, 19(1), pp. 31-45. DOI: 10.1017/S1466252317000123.
 - Porter, P. (1969). "Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal piglet" .*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 181(2), pp. 381–392. DOI: 10.1016/0005-2795(69)90271-2.
 - Porter, P., Coley, J. y Gani, M. (1988) "Immunochemical criteria for successful matching of monoclonal antibodies to immunoassays of peptide hormones for assessment of pregnancy and ovulation". *Progress in Clinical And Biological Research*, (285), pp. 181–200.
 - Quigley, J. D., Lago A., Chapman C., Erickson P., y Polo J. (2013) "Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum". *Journal of Dairy Science*, 96(2), pp. 1148–1155. DOI: 10.3168/jds.2012-5823.
 - Quiles, A. (2019). Importancia del calostro en la termorregulación del lechón. Disponible en: http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/19/cys_19_Importancia_del_calostro.pdf [consultado: 19/07/2019]
 - Simpson-Morgan M.W. y Smeaton T.C. (1972). "The transfer of antibodies by neonates and adults". *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, (16), pp. 355–386.
 - Tizard, I. (2002) *Inmunología veterinaria*. (6ª edición). México D.F.: Mc Graw Hill. ISBN: 978-970-10-3562-7.
 - Torres-Rovira, L., Pesantez-Pacheco, J., Hernández, F., Elvira-Partida, L., Pérez-Solana, M., González-Martin, J. y Astiz, S. (2017). "Identification of factors affecting colostrum quality of dairy laeune ewes assessed with the brix refractometer". *The Journal of Dairy Research*, 84(4), 440-443. DOI: 10.1017/S002202991700070X.
 - Tórtora Pérez, J.L. (1998). "Enfermedades entéricas del cerdo, control y profilaxis". *Porcicultura colombiana*, 5(28), p. 14 – 22.
 - TP Laboratorio químico (2019). Refractómetro. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/refractometro.html> [consultado: 17/7/2019].
 - Varley, M. A. (1998). *El lechón recién nacido: desarrollo y supervivencia*. Zaragoza: Acribia. ISBN: 978-84-200-0864-6.