

**Evaluación de la integridad de anticuerpos IgY dirigidos contra las cepas
vacunales *E. coli* K99 y *Parvovirus canino* aislados a partir de yema de huevo de
gallina - Posible uso terapéutico.**



Presentado Por:

Anggi Carolina Aranda Verano y Leidy Juliana Martín Ramírez

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina Veterinaria

Tutores

Orlando Alfredo Torres García y Jaime Fabián Cruz Uribe

Medicina Veterinaria

Bogotá D.C.

2022

INTRODUCCIÓN

Un huevo de gallina es la célula biológica más grande conocida y está compuesta de varias sustancias químicas importantes. Es un depósito de nutrientes variables, proteínas, lípidos, carbohidratos y otras sustancias biológicamente activas incluidos factores promotores de crecimiento que se necesitan para producir un pollo (Kim et al., 2000).

Dentro del grupo de las proteínas de huevo, se encuentran las inmunoglobulinas que predominan en la yema del huevo y que son las encargadas de la inmunidad pasiva en las aves. Estas inmunoglobulinas son proteínas que están presentes en el suero y en los tejidos de los vertebrados y se unen específicamente a moléculas extrañas (antígenos), generando una respuesta inmune (Alarcón et al., 2000).

En cuanto a las inmunoglobulinas de procedencia aviar, la Inmunoglobulina Y (IgY) es predominante en la yema. Es secretada por el ovario en el interior del huevo en desarrollo. El pase de la IgY es regulado por el epitelio folicular, el cual sufre diferentes cambios morfológicos durante el crecimiento del huevo. El epitelio se va haciendo plano y delgado, permitiendo el paso de una gran cantidad de IgY. La transferencia de IgY a través del epitelio folicular del ovario alcanza su máximo 3 ó 4 días antes de la ovulación y empieza a decrecer debido al desarrollo de la membrana vitelina entre el huevo y el epitelio folicular del ovario como preparación a la ovulación (Balaguer, 2008).

Las IgY, son excelente modelo de investigación, ya que presentan muchas similitudes entre el sistema inmune de los mamíferos y las aves debido a que estas tienen un buen desarrollo del sistema inmune tanto humoral como celular y normalmente tienen grandes concentraciones de anticuerpos (Ac) en el suero y aún más en la yema de huevo (Alarcón, et al., 2000). la IgY se encuentra principalmente en la sangre y en la

fracción líquida del huevo que brinda protección al pollito recién nacido (Munhoz, et al., 2014).

En los mamíferos, como el humano, caballos, ganado vacuno, ovejas y cabras, los anticuerpos maternos se transfieren a través calostro. La producción de anticuerpos específicos en gallinas varía mucho dependiendo de la respuesta generada por los antígenos a los que se ve expuesto el animal, partiendo desde 15 hasta 120 equivalentes de IgY por año respecto a la producción de anticuerpos en conejos (Murcia, 2009). Las IgY tienen aplicación potencial en medicina preventiva lo cual puede incrementar su uso, también se han aplicado en estudios biológicos, como suplemento alimenticio. (Murcia, 2009).

Debido a la distancia filogenética entre aves y mamíferos, las aves han sido una alternativa al uso de anticuerpos mamíferos para la prevención de enfermedades, a partir de la producción de inmunoglobulinas provenientes del huevo (IgY) mediante la inoculación de diferentes virus y bacterias, desencadenando la formación de anticuerpos específicos utilizados en diferentes áreas como la medicina veterinaria y la humana (Duque, et al., 2016).

PROBLEMA

Las inmunoglobulinas (Igs) disponibles comercialmente juegan papeles críticos en ensayos de diagnóstico, terapia y purificación de compuestos objetivo específicos a través

de cromatografía. Se han estudiado las inmunoglobulinas de yema de huevo de gallina IgY intensamente debido a su importancia en biotecnología, diagnóstico y terapéutica.

La inmunoglobulina G (IgY) sérica de la gallina se transfiere de la gallina madre a la yema de la descendencia para adquirir inmunidad (Amro et al., 2018).

Por lo general, los anticuerpos empleados en las pruebas de diagnóstico se producen a partir de mamíferos, y éstas pueden ser policlonales o monoclonales. El procedimiento para obtener dichos anticuerpos implica un esquema de inmunización con el antígeno blanco, y posterior a esto se realizan recolecciones repetidas de sangre por punción venosa o por eutanasia de los animales (Da Silva et al., 2018).

El método para la producción de anticuerpos a gran escala y de manera no invasiva, es el uso de aves de corral. Las gallinas ponedoras producen anticuerpos IgY, estas inmunoglobulinas son transferidas desde el sistema circulatorio de la gallina a través del oolema hacia el ovocito en desarrollo en el folículo ovárico. Se producen entre 70 y 100 mg de IgY de acuerdo al tamaño de la yema, siendo una fuente abundante de anticuerpos policlonales que pueden ser adquiridos a partir de gallinas inmunizadas sin involucrar la muerte del animal (Moreno et al., 2013).

Basándonos en estudios previos, se puede llegar a la conclusión de que por medio del uso de inmunoglobulinas Y, se puede sustituir el uso de inmunoglobulinas de mamífero (IgG), brindando mayores ventajas que nos llevan a explorar sobre sus usos potenciales.

Las gallinas producen una mayor cantidad de anticuerpos en comparación con animales mamíferos, como los roedores, por ejemplo; reduciéndose considerablemente el número de animales necesarios para la producción de anticuerpos. Este método presenta varias ventajas económicas sobre el uso de animales mamíferos, como productores de anticuerpos (Pereira et al., 2019). De igual manera al comparar la cantidad de anticuerpos

que se obtienen en las yemas de huevos, que es aproximadamente 30 veces mayor que las obtenidas en un conejo, (1 ml de yema contiene alrededor de 10 mg de IgY, y el volumen promedio de yema por huevo es de 15 ml), mientras que una gallina produce unos 250 huevos al año, lo que se traduce en 4 litros de yema que rinden 40 gr de IgY, un conejo que se sangra generalmente una vez produce unos 40 mL de suero con una concentración de 35 mg/mL de IgG representando 1,4 g de inmunoglobulinas (Gutiérrez, 2000).

El costo de mantener gallinas es mucho menor que el de mantener animales como ratones o conejos; y la relación coste beneficio es mucho mayor (40 gr de IgY/gallina/año Vs 1,4 gr IgG/conejo/sangrado) la cantidad de anticuerpos producidos por gallinas también corresponde a la de animales más grandes, como cabras y ovejas en donde el mantenimiento de estos animales es mucho mayor. No obstante, la cantidad de anticuerpos producidos está correlacionada con la cantidad de antígeno aplicado a la gallina y su inmunogenicidad; por tanto, la obtención de IgY sigue siendo una técnica más productiva, así como más refinada desde el punto de vista del bienestar animal, y su aplicación tecnológica se ha utilizado para varios fines en salud humana y veterinaria, como en inmunodiagnóstico, inmunoterapia, neutralización de toxinas de animales venenosos, bacterias y además como suplemento nutricional (Pereira et al., 2019).

El *Parvovirus canino* (CPV), es uno de los principales agentes virales que afecta a los caninos sin importar la edad, siendo los cachorros los más propensos a sufrirla. Actualmente la situación epidemiológica mundial de la enfermedad es de tipo enzoótico, a pesar de que existe vacunación, su difusión va en aumento (Hurtado y Báez, 2012).

Los mecanismos de evolución del CPV aún no son claros; desde su descubrimiento el parvovirus canino tipo II CPV2 (1978), distinto del virus diminuto canino CPV-1, ha presentado modificaciones en su genoma y por tanto variación antigénica, haciendo que la patología se manifieste de forma diferente (Castillo et al., 2001). El CPV – 2, se expandió rápidamente en el mundo a finales de la década del 70, consecutivamente en la década del 80, surgió el CPV- 2a y CPV- 2b. En el 2000 se detectó una nueva variante antigénica llamada CPV- 2c; reportándose con frecuencia en comunidades caninas de varios países del mundo. Todavía no existe una vacuna contra la variante CPV- 2c, siendo la más agresiva que las variantes anteriores. En Colombia no se ha confirmado la presencia de CPV-2c en caninos, pero se discute la rápida presentación de la enfermedad y el aumento de mortalidad de los casos positivos a parvovirus canino en los últimos años (Hurtado et al., 2012).

El CPV fue reportado en Colombia en 1984 y desde entonces es considerado uno de los principales patógenos de las poblaciones caninas. Su alta tasa de mutación ha llevado a la emergencia del nuevo subtipo CPV-2c, hasta ahora reportado en al menos 15 países. La aparición y propagación de esta variante con diferentes propiedades epidemiológicas, antigénicas y patógenas, supone una amenaza sanitaria mundial. En Colombia se han reportado los subtipos CPV-2a y CPV-2b. Sin embargo, no se han realizado estudios recientes que permitan identificar las variantes virales circulantes. Adicionalmente, el aumento de cuadros diarreicos hemorrágicos en individuos adultos y con esquema de vacunación completo, plantea la posibilidad de que la nueva variante 2c esté presente en el país (Echeverri et al., 2013).

Respecto al diagnóstico de la enfermedad, si bien la anamnesis y los síntomas clínicos son fundamentales para realizar el diagnóstico, existen distintos patógenos que

pueden causar cuadros similares en perros. Por lo tanto es conveniente la realización del diagnóstico definitivo utilizando una técnica de laboratorio. Varios métodos han sido desarrollados para el diagnóstico de CPV-2: aislamiento viral, Hemoaglutinación, SAT (Slide agglutination test), ELISA y SNAP (test comercial basado en el método de ELISA), son métodos muy utilizados para el diagnóstico a partir de materia fecal de animales enfermos, sin embargo, la sensibilidad de algunas de estas técnicas es relativamente baja, demostraron que los tests rápidos para el diagnóstico en material fecal, tienen una alta especificidad pero pobre sensibilidad, al comparar con técnicas más sensibles. (Esfandiari y Klingeborn, 2000; Puentes, 2012).

E. coli K99 es uno de los principales antígenos presentes en diferentes patologías que afectan terneros el riesgo de mortalidad en terneros menores de 1 mes varía entre el 15% - 30%, la mayoría de las muertes se atribuyen a enfermedades como diarrea y septicemia. En Colombia se ha encontrado que durante el período neonatal y como consecuencia de las características de su sistema inmune los terneros son muy susceptibles a sufrir enfermedades que pueden afectar diferentes sistemas (Pardo, 2012).

La septicemia neonatal es una enfermedad polimicrobiana (13% y 28%), con baja tasa de supervivencia (< 12%) siendo la *Escherichia coli* el microorganismo aislado más común (Baquero, 2012).

En diferentes regiones de Colombia encuentran para DNB una prevalencia instantánea de 13%, Antioquia encontró la tasa más alta de morbilidad 37.5 % con terneros de 0 a 3 meses de vida. En un estudio realizado en hatos lecheros, la principal entidad clínica fue diarrea, con un porcentaje de presentación del 44.9%. Dentro de la prevalencia de *E coli K99* varía según la región: En España un 16%, Francia 14.3% y en un estudio reciente realizado en Canadá la prevalencia fue de 51% (Pardo, 2012).

El diagnóstico de *E. coli* se basa en cultivo fecal y serotipificación del antígeno F5 (K99). Ocasionalmente la bacteria no expresa el antígeno en el cultivo, por eso no puede ser descartada si resulta K99 negativo. La evidencia histológica de la colonización puede apoyar el diagnóstico, también se ha encontrado que la sensibilidad del test de ELISA fue de tan solo 28,6% y la especificidad fue de 97,4%, por lo que se deberían tener en cuenta otras pruebas (Pardo, 2012).

Teniendo en cuenta el rápido desarrollo de la tecnología IgY, y las ventajas costo/beneficio de la producción a escala, así como las amplias aplicaciones biológicas de las inmunoglobulinas IgY, nos preguntamos si **¿La determinación de la presencia e integridad in vitro de anticuerpos IgY dirigidos contra las cepas vacunales *E. coli* K99 y *Parvovirus canino*, servirán de pauta para el inicio de estudios encaminados al desarrollo de técnicas diagnósticas contra las infecciones causadas por *E. coli* K99 y parvovirus canina respectivamente?**

JUSTIFICACIÓN

Este estudio se enfoca en buscar alternativas diagnósticas para enfermedades como *E. coli k99* y *Parvovirus canino* basados en el uso de anticuerpos policlonales específicos IgY obtenidos de huevo de gallina. Según Amro et al., (2018) “las Igs disponibles comercialmente juegan papeles críticos en ensayos de diagnóstico, terapia y purificación de objetivos específicos”. Como afirman Vega et al. (2008) “Las IgY atraen la atención como una fuente alternativa de anticuerpos, ya que se depositan en la yema de huevo en grandes cantidades, haciendo que las gallinas sean fuente ideal para anticuerpos policlonales específicos”. Los huevos de gallina no solo son una buena fuente de alimento sino también contienen un alto nivel de anticuerpos de yema de huevo. El procedimiento para el aislamiento de IgY es simple y rápido, y también garantiza el rendimiento de altos títulos de anticuerpos. Los anticuerpos son sostenidos durante largos períodos de tiempo en la yema de huevo de gallinas inmunizadas (Hadimli et al., 2017).

Según Hasan et al. (2016) “El uso de anticuerpos de gallina es más higiénico, rentable y conveniente, pues se pueden obtener en mayores volúmenes en comparación con los anticuerpos de mamíferos. La afinidad de los anticuerpos IgY es de 3 a 5 veces mayor que la de los anticuerpos IgG. Las IgY mantiene su actividad dentro de un amplio rango de temperatura (0 – 70°C) y rangos de pH (3.5 – 11) y también es resistente a degradación de la pepsina y quimotripsina”. Los anticuerpos de la yema de huevo de gallina se han aplicado con éxito con fines científicos, terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico. El anticuerpo en la yema de huevo de gallinas inmunizadas proporciona inmunidad pasiva a quienes toman el anticuerpo por vía oral (Barati et al., 2016). El método terapéutico y eficacia profiláctica de las IgY de gallinas inmunizadas contra varios patógenos ha sido investigado en humanos, ellos utilizaron IgY anti-V del vibrio cholerae para prevenir la infección en ratones desafiados con *Vibrio cholerae* cepas O1 y O139, y contra las subunidades B recombinantes de la toxina del cólera, en ratones inmunizados contra ésta (Hadimli et al., 2017). Adicionalmente, las inmunoglobulinas IgY son estables y puede almacenarse a 4°C hasta por 6 meses. Por otro lado, estas no activan el sistema de complemento y no se unen a factores reumatoides de mamíferos (proteínas A o G) como sí ocurre con las inmunoglobulinas mamíferas (Yu-Chun et al., 2012). Un beneficio adicional, es que la mayoría de los anticuerpos de aves (IgY) se unen fuertemente al antígeno y pueden ser utilizados en: a) Inmunoterapia pasiva. b) Sistemas de inmunopurificación de uso industrial. c) Sistemas inmunoanalíticos, ya que son resistentes a medios ácidos y al calor, debido a que como el daño de sus estructuras moleculares resulta moderado a la digestión de tripsina y quimiotripsina respectivamente (Gutiérrez, 2000).

Se pueden evidenciar algunas ventajas del uso de las inmunoglobulinas IgY con respecto a las inmunoglobulinas IgG de mamífero:

- Desde el punto de vista del bienestar animal, el objetivo más importante es la reducción de las manipulaciones dolorosas. La tecnología IgY cumple completamente con este requisito puesto que los anticuerpos de gallina se pueden obtener con facilidad mediante un simple método no invasivo, que se basa en la acción de recolectar huevos, en vez del doloroso sangrado que debe efectuarse para la obtención del suero en mamíferos. Además, la cantidad de anticuerpos que se obtiene de una sola gallina multiplica considerablemente la cifra del que puede alcanzarse cuando se inmuniza un mamífero de tamaño similar (Chacana et al., 2004).
- Desde el punto de vista económico, la tecnología IgY también presenta ventajas incomparables. El costo de criar una gallina no es muy diferente al de un conejo, a pesar de que la producción de anticuerpos de una gallina más o menos se corresponde con la de un animal grande, como por ejemplo una oveja o una cabra. De modo que una cantidad formidable de anticuerpos puede ser producida a partir de una sola gallina (aproximadamente entre 17 y 35 g de IgY/ave/año). Ésta inmensa producción de anticuerpos con costos relativamente bajos posibilita nuevos campos de aplicación, como por ejemplo la inmunoterapia y la inmunoprolaxis de infecciones virales y bacterianas, tanto en medicina humana como veterinaria. Para alcanzar semejante producción de anticuerpos utilizando mamíferos, hace que los costos sean mucho más elevados (Chacana et al., 2004).
- La IgY puede activar el sistema del complemento de las aves, pero en contraposición no puede iniciar la cascada de reacciones del complemento de los mamíferos. Hasta ahora han sido subestimadas las interferencias de las pruebas de ELISA debido a la activación del complemento. Este tipo de interferencias constituye un

problema significativo, particularmente cuando se utiliza suero recientemente extraído y sin diluir. Si bien la dilución y el congelamiento de las muestras de suero provocan una progresiva inactivación del sistema de complemento, estas dificultades podrían ser simplemente evitadas si se reemplazan los anticuerpos de mamífero por anticuerpos de la gallina (Chacana et al., 2004).

En coherencia con estas razones, se hace importante adelantar el presente estudio con el fin de probar la especificidad y sensibilidad de anticuerpos IgY obtenidos a partir de huevos de gallinas inmunizadas con las cepas vacunales *E. coli K99* y *Parvovirus canino* respectivamente, con el objeto posterior de estudiar su uso en el desarrollo de métodos diagnósticos para infecciones causadas por estos antígenos.

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes.

En el año 2016, Ana María Duque Restrepo et al., en su trabajo de investigación denominado “Tecnología IgY para el control de enfermedades infecciosas como la caries dental” concluyen que en las gallinas se puede obtener una buena cantidad de anticuerpos que multiplica la cifra que podría alcanzarse si se hubiera inmunizado de manera idéntica, por ejemplo, a un conejo, dejando en claro que la utilización de gallinas como fuente de anticuerpos, permite contar con un animal relativamente pequeño capaz de producir una cantidad de anticuerpos, mejor a la obtenida a partir de un animal grande, siendo entonces el costo efectividad y la producción de IgY en grandes cantidades una de sus más valiosas ventajas. Además, al permanecer el animal vivo durante un largo período de vida (dos años productivos), debido a que no se requiere su sacrificio para la obtención de suero sanguíneo, es posible realizar más inoculaciones y paulatinamente mejorar la calidad y especificidad del anticuerpo que se busca. Estos hechos sumados al desarrollo de líneas genéticas de gallinas ponedoras capaces de producir más de 300 huevos al año, hacen que la utilización de estos animales atraiga considerablemente la atención como una fuente alternativa de obtención anticuerpos con fines industriales.

Por su parte Mujo Kim et al., (2000) en su publicación “Egg Yolk Antibody and Its Application” habla sobre sobre la especificidad de los anticuerpos frente al antígeno objeto de estudio, indicando que se puede obtener grandes cantidades de oviposturas por gallina hiperinmunizada después del día 28, debido a que la inyección de antígeno por vía intramuscular con frecuencia resulta en mayores niveles de anticuerpos.

Las gallinas inmunizadas por vía intramuscular continúan produciendo anticuerpos específicos durante más de 200 días, y por tanto, pueden usarse durante todo el período de vida productiva (Munhoz, 2014).

Según Schade et al., (2005), “La tecnología IgY es un campo en rápido desarrollo”. Es evidente que, una vez aceptada y ampliamente utilizada la tecnología de producción de IgY, ofrecerá alternativas y soluciones a la ciencia, a la medicina y a la sociedad en general” ya que los últimos hallazgos con IgY han demostrado claramente la versatilidad de la misma.

La obtención de IgY de aves presenta varias ventajas técnicas y económicas sobre la IgG de mamíferos, y como se describe en esta revisión, la tecnología de IgY tiene un amplio espectro de aplicaciones en la salud humana y veterinaria. Entre las ventajas de esta tecnología, el reemplazo de métodos invasivos para la obtención de Acs. por la de recolección de anticuerpos (huevos) es uno de los más interesantes, considerando beneficios para el bienestar animal. Con esta tecnología es posible lograr grandes cantidades de anticuerpos con un menor costo de producción y menos estrés animal.

Debido a sus diferencias estructurales y la distancia filogenética, las IgY son más específicas para el uso de diagnóstico, y muestran una mayor avidez por las proteínas conservadas de mamíferos que las IgGs, siendo, una alternativa importante en el diagnóstico, y su uso en las terapias más efectiva. Además, en vista de su capacidad comprobada para neutralizar microorganismos, la IgY representa un recurso terapéutico importante en la ampliación de tiempos de aparición de resistencia a los antibióticos, así como en la prevención de enfermedades virales para las cuales no hay tratamiento (Pereira et al., 2019). El uso de IgY de gallina, en lugar de anticuerpos IgG de mamífero, para detectar antígenos no propios o incluso propios, ciertamente puede ayudar a reducir los costos de las pruebas inmunológicas clínicas o de investigación. Por otro lado, los

anticuerpos de gallina no activan el sistema de complemento de mamíferos ni interactúan con factores reumatoides, o receptores de Fc bacterianos y humanos.

Las ventajas de los anticuerpos aviares sobre los anticuerpos de mamíferos incluyen: (I) reducción en el uso de animales, ya que las gallinas producen mayores cantidades de anticuerpos que los animales de laboratorio; (II) la eliminación de colecciones de sangre dolorosas en animales; (III) la utilidad de IgY en muchos ensayos inmunológicos sin pérdida de especificidad y sensibilidad; (IV) el costo considerablemente más bajo de alimentación y manipulación de pollos que los mamíferos; (V) el huevo crudo puede usarse como fuente de anticuerpos. Los puntos (I) y (II) cumplen con las recomendaciones del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), que especifican que los anticuerpos de la yema deben usarse en lugar de los anticuerpos de los mamíferos por razones de bienestar animal (Da Silva et al., 2009).

Estas diferencias en interacciones moleculares aportan grandes ventajas a la aplicación de anticuerpos IgY que fueron exitosamente aplicado en una variedad de métodos en diferentes áreas de investigación, diagnóstico, aplicación médica y biotecnología, siendo de igual manera la mayor ventaja de usar gallinas el que los anticuerpos pueden ser cosechados en la yema de huevo en lugar de suero, por lo tanto, el muestreo de sangre se vuelve obsoleto (Michael et al., 2010).

Además, como se sabe, cuándo hay mayor diferencia filogenética entre el animal inmunizado y el animal que fue la fuente del antígeno aumenta la respuesta inmune. Eso es especialmente importante cuando se trata de proteínas de mamíferos altamente conservadas como las hormonas o los priones así el sistema inmune del pollo reconocerá los epítomos en la proteína de los mamíferos más fácilmente y a menudo detectará epítomos que difieren de los epítomos detectados por los mamíferos, como ratones o conejos. En los

últimos 5 años IgY fueron reportados para ser utilizado como agentes exitosos para pasivos y inmunización protectora contra patógenos gastrointestinales en humanos y animales, como inmunoterapéutico agentes contra patógenos que son difíciles de tratar con antibióticos tradicionales, como herramienta útil en la investigación del cáncer, diagnóstico y terapia (Narat, 2003).

1.2. Parvovirus canino

El virus de la Parvovirus canina (CPV) pertenece a la familia *Parvoviridae*, los cuales son virus icosaédricos, sin envoltura lipídica, con un genoma compuesto por una hebra de DNA en sentido negativo, esta familia está dividida en dos subfamilias basadas en su rango de hospederos: *Parvovirinae* infecta a vertebrados, y la *Densovirinae* que afecta a insectos y artrópodos (Díaz et al., 2008). El PVC, causa una enfermedad que afecta principalmente el sistema digestivo de los caninos, provocando diarrea sanguinolenta, vómitos y deshidratación, en ocasiones con resultados fatales (Hurtado et al., 2012). El período de incubación puede ser de 3 a 10 días. Los principales sitios de replicación son los tejidos con alta tasa de división mitótica como médula ósea, órganos linfoides y criptas intestinales después se inicia la viremia la cual presenta altos títulos de DNA viral por lo cual los títulos virales en el epitelio intestinal son menores pero más persistentes que los obtenidos en el tejido linfoide y alcanza su pico máximo entre los 5 a 7 días post-infección y persiste por varias semanas, antes de desaparecer del contenido intestinal dado los altos niveles de anticuerpos presentes en el lumen intestinal (Díaz et al., 2008).

La infección por parvovirus en perros puede dar origen a dos formas clínicas diferentes una de origen entérico y una forma cardiaca (Flores, 1987).

- Forma entérica:

Esta forma clínica puede producirse en perros de cualquier edad. Los signos clínicos más comunes son: tos, vómitos, anorexia, deshidratación y pérdida de peso debido a diarreas mucoides a hemorrágicas donde la viremia puede ser intensa y persistir por varias semanas (Puentes, 2012), esto se da ya que el virus invade las células epiteliales en división activa de las criptas del intestino delgado, la pérdida de células en este tejido conduce a un acortamiento de las vellosidades y la reducción de la capacidad de absorción y digestión; que da paso a la diarrea, lo cual produce una intensa hemorragia en la luz intestinal de los cachorros gravemente afectados de igual manera destruyen los precursores con actividad mitótica de las células linfáticas y leucocitos circulantes. La destrucción de GALT, placas de peyer y los linfonodos mesentéricos contribuye a una inmunosupresión del animal, lo que permite la proliferación de las bacterias gram negativas como: *Salmonella* spp y *Escherichia coli* o de parásitos oportunistas tal como coccidias, giardias, helmintos y cestodos (Hurtado et al., 2012).

- Forma miocárdica:

Esta forma de presentación de la parvovirus en perros se ha diagnosticado solamente en cachorros menores de 12 semanas de edad, la tasa de mortalidad en esta presentación es superior al 50%, generalmente ocurre en ausencia de signos de enteritis o bien puede manifestarse 3 a 6 semanas después de que los animales se han recuperado del cuadro entérico, los animales muestran postración y a la auscultación se pueden identificar arritmias cardíacas disnea e incluso edema pulmonar (Flores, 1987) algunos cachorros pueden sufrir un fallo cardíaco congestivo meses después de la miocárdica (Hurtado et al., 2012).

1.2.1 Diagnóstico

Se han desarrollado varios métodos diagnósticos para detectar en forma temprana la presencia del CPV-2 en heces tales como la hemaglutinación, ELISA y la aglutinación en látex, las pruebas de tipo molecular como PCR en tiempo real pueden diferenciar entre cepas vacunales y de campo al ser usadas con muestras de materia fecal fresca, con una alta sensibilidad y especificidad, pero todavía a costos relativamente altos (Díaz et al., 2008). En cuanto a la microscopía electrónica directa, a partir de muestras fecales, es una técnica costosa que requiere equipamientos y un manejo especial; la mayor parte se utiliza para seguimientos de casos particulares de investigación a diferencia de la inmunocromatográfica, es otro método de diagnóstico utilizado por un simple y rápido procedimiento, requiere grandes cantidades de antígeno viral para que se produzca un resultado confiable por lo cual algunos resultados de las pruebas de laboratorio pueden arrojar resultados negativos o falsos positivos, esto se debe a que el paciente, en ese momento no está eliminando por las heces el virus (Hurtado et al., 2012).

Por esto se hace importante conocer el seguimiento clínico del paciente, los signos, la duración de la sintomatología, decidiendo otro tipo de pruebas diagnósticas y el tratamiento de la enfermedad (Hurtado et al., 2012).

1.3. E. coli K99

La *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, con pocas exigencias nutritivas, por lo que crece en medios comunes; fermenta la lactosa (bacilos coliformes) y la glucosa, produciendo gas y diversos ácidos (fermentación ácido-mixta). A diferencia del resto de los coliformes puede desarrollarse a 45 °. Es relativamente resistente a los agentes externos. La *Escherichia coli* es habitante en la parte inferior del íleon y del resto de intestino en la mayoría de los vertebrados, con una colonización del tracto gastrointestinal neonatal el cual ocurre dentro de las primeras horas de nacimiento (Soriano, 2014). La

codificación del antígeno k99 es mediada por plásmidos y se encuentra altamente correlacionada con la presencia de cepas enterotoxigénicas para el bovino siendo un importante agente causal de la diarrea neonatal del ternero (Smith et al., 1988) causando diarrea a través de las enterotoxinas, elaboran por lo menos dos grupos definidos de enterotoxinas, termoestables (ST) y termolábiles (LT) las bacterias se establecen estrictamente después de las 24 horas de nacimiento, sin embargo, el intestino delgado del neonato contiene pocas bacterias, la peristalsis del intestino es fuerte, las vellosidades, y la ingesta de fluidos hacen que las bacterias viajen al intestino delgado y esto regula el establecimiento de las bacterias cuando se adhieren las bacterias al epitelio del intestino delgado, mediante un evento de las fimbrias (también llamados pili) que facilitan la colonización del intestino delgado y participan en la enfermedad, se establecen estrictamente después de las 24 horas de nacimiento, sin embargo, el intestino delgado del neonato contiene pocas bacterias, la peristalsis del intestino es fuerte, las vellosidades, y la ingesta de fluidos hacen que las bacterias viajen al intestino delgado y esto regula el establecimiento de las bacterias. Se manifiesta con diarrea grave, heces de color blanquecino-café y deshidratación rápida Si la infección pasa a ser septicémica los que sobreviven a este proceso pueden padecer posteriormente artritis y meningitis. Afecta principalmente a terneros que no consumen calostro en las primeras horas de vida y los animales moderadamente afectados pueden recuperarse espontáneamente. Presenta una morbilidad de 75% y una mortalidad de 50% (Franco, 2011).

1.3.1 Diagnóstico

El diagnóstico etiológico de la diarrea neonatal se lleva a cabo a través de la identificación del agente en materia fecal mediante aislamiento e identificación de agente causal en cultivos bacterianos requiere la detección de factores de virulencia (adhesinas,

enterotoxinas) mediante ensayos in vitro (aglutinación de látex o ELISA) en la mayoría de los casos. Tanto las adhesinas como las fimbrias pueden ser detectadas más eficientemente in vivo, por un método de inmunofluorescencia que utiliza anticuerpos antifimbriales policlonales o monoclonales. En contraste con las adhesinas, las enterotoxinas producidas in vivo son mucho más difíciles de detectar (Gaggianesi et al., 2016).

1.4. Conceptos y definiciones

1.4.1. Sistema inmunológico

Tiene como función principal proteger al organismo de agentes extraños, está integrado por diferentes órganos, tejidos, células y moléculas que funcionan coordinadamente. Sus componentes más importantes son: la piel y las mucosas, los órganos linfoides como las amígdalas, las adenoides, el bazo, el timo, los ganglios linfáticos; numerosas células leucocitarias (linfocitos) y sus productos de secreción como citocinas, quimiocinas e inmunoglobulinas entre otros. Este sistema tiene tres propiedades esenciales: primera, tiene la habilidad de reconocer sustancias extrañas denominadas antígenos principalmente provenientes de patógenos, tales como bacterias, virus, hongos, y parásitos, en un sentido más estricto, tiene la capacidad de reconocer la totalidad de las moléculas que no le son propias, inclusive las de los organismos que no le son propiamente patógenos, y como todo sistema complejo no está exento de fallas, debido a que en ocasiones reacciona contra moléculas propias (autoinmunidad); segunda, reacciona y desencadena una respuesta específica, está provisto de un vasto repertorio para diferentes especificidades, aún para sustancias con las que tal vez jamás tendrá contacto; y

tercera, tiene una memoria intrínseca, que puede responder a estimulaciones futuras e inclusive puede madurar su respuesta a sustancias con las que ya tuvo contacto previo (Sanabria y Landa, 2007).

1.4.2. Anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas de proteínas producidas en respuesta a un antígeno. Debido a su capacidad para unirse a objetivos específicos, son ampliamente utilizados en investigación, diagnóstico y terapia. La mayoría de los disponibles actualmente los anticuerpos se producen en mamíferos, especialmente en pequeños roedores. Sin embargo, la producción de anticuerpos en mamíferos puede ser un desafío debido al hecho de que algunos antígenos provocan respuestas inmunes débiles o son incluso completamente no inmunogénico (Pereira et al., 2019).

1.4.3. Inmunidad pasiva

La inmunización pasiva puede definirse como la administración de anticuerpos a un receptor, con el objetivo de proporcionar protección inmediata contra un agente microbiano, un tóxico, sustancia o células. Generalmente está indicado cuando un individuo no inmune está expuesto a una enfermedad infecciosa y la inmunización activa no está disponible o no había sido administrado antes de la exposición (Tavares et al., 2005).

1.4.4. Inmunidad pasiva en aves

La inmunidad pasiva se define como la transferencia natural de inmunoglobulinas de un individuo a otro. En las aves, los anticuerpos maternos pasan desde reproductoras hiperinmunizadas o infectadas de manera natural a la progenie a través del

huevo. Esta inmunidad pasiva tiene relativamente corta duración, normalmente 1 ó 2 semanas y, en general, menos de 4 semanas y su función es proteger a las aves jóvenes durante sus primeras semanas de vida, mientras su sistema inmune no está completamente desarrollado de cara a reaccionar y protegerse frente a una exposición temprana. La IgY es transferida desde la yema del huevo al embrión a través de la circulación embrionaria. La transferencia comienza desde el día 7 del desarrollo embrionario y alcanza el nivel máximo 3 a 4 días antes de la eclosión. La cantidad de IgY transferida a la yema y desde ésta al embrión es proporcional a la concentración de IgY en el suero de la reproductora. En un trabajo realizado por Hamal en el año 2006 se encontró que entre un 27 y un 30% del nivel de IgY de la gallina es transferido al embrión (Balaguer, 2000).

1.4.5. Antígeno:

Cualquier sustancia capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o a un receptor de la célula T y generar una respuesta que ponga en marcha el sistema inmune.

1.4.6. Epítomos antigénicos

Es el sitio o porción inmunodominante de un antígeno, a través del cual se une con un anticuerpo o con un receptor del linfocito T. La valencia de un antígeno, corresponde al número de epítomos que contiene.

Así, un mismo antígeno puede tener epítomos para unirse con anticuerpos o con el receptor de la célula T. Los anticuerpos reconocen a la estructura expuesta, primaria o terciaria, del antígeno nativo y los receptores de T principalmente a la primaria (proveniente de antígenos, principalmente proteínicos, procesados), lo que implica la existencia de dos tipos de epítomos:

- Lineal. Formado por secuencias de aminoácidos contiguos y continuos.

- Conformacional. Constituido por secuencias de aminoácidos continuos discontinuos y distantes, que se aproximan entre sí debido al plegamiento o conformación tridimensional del antígeno.

Inmunogenicidad. Es la potencia o capacidad que tiene una molécula para generar una respuesta inmune y depende tanto de su naturaleza, como de la inherente al individuo en el que actúa (Vega, 2008).

1.4.7. Vacuna

Es una suspensión de microorganismos vivos atenuados, muertos o inactivados, fracciones de los mismos o partículas proteicas, polisacáridas o ácidos nucleicos de patógenos que al ser administradas se distribuyen en el sistema inmunológico e inducen una respuesta inmune específica que inactivan, destruyen o suprimen al patógeno previniendo la enfermedad contra la que está dirigida. El resultado de la vacuna en el organismo es la capacidad de que el agente patógeno se multiplique y produce inmunidad, sin causar enfermedad. Se clasifican en vivas atenuadas, muertas o inactivas, polisacáridos y recombinantes.

1.4.8 Factores reumatoides

El factor reumatoideo (FR) es un autoanticuerpo relacionado con varias enfermedades. Se conoce que el mismo puede ser de diferentes isotipos, o clases, lo cual puede variar según el estado de salud o enfermedad del individuo. En relación con esto último se ha planteado la existencia de FR de clase IgM en estado de salud, mientras que puede ocurrir un cambio de clase hacia FR IgG, o IgA con mayor afinidad para su IgG antigénica en condiciones patológicas (Mendoza et al., 2010).

1.4.9 Receptores FC

Los receptores Fc son una familia heterogénea de glicoproteínas de membrana que unen la fracción Fc de la inmunoglobulina G, han sido clasificados en tres tipos básicos: FcgRI, FcgRII y FcgRIII. FcgRI posee alta afinidad por la IgG en forma monomérica, mientras que FcgRII y FcgRIII, son de baja afinidad y sólo unen la IgG en forma de complejos inmunes. Dentro de las funciones efectoras importantes de estos receptores se pueden encontrar la fagocitosis y la liberación de citoquinas proinflamatorias. Los receptores Fc poseen una función importante en el sistema inmune ya que proporcionan la conexión entre inmunidad humoral y celular. La unión de estos receptores con su ligando, como la IgG, produce cambios conformacionales y por lo tanto activación de funciones efectoras como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, ingestión de complejos inmunes, entre otras (Gómez et al., 2005).

1.4.10 Anticuerpos policlonales

Son aquellos anticuerpos que pueden reconocer una variedad de epítopes sobre el antígeno, el cual puede ser una característica de uso especial en algunos procedimientos experimentales. Debido a que esta mezcla de anticuerpos policlonales reacciona con múltiples epítopes sobre la superficie del antígeno, ellos pueden ser más tolerantes de cambios menores en el antígeno, por ejemplo, polimorfismo, heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización, que los anticuerpos monoclonales.

Algunos usos de las propiedades de anticuerpos policlonales son:

- Los anticuerpos policlonales frecuentemente reconocen múltiples epítopes haciéndolos más tolerantes a pequeños cambios en la naturaleza del antígeno. Son frecuentemente la opción preferida para la detección de proteínas desnaturalizadas.

- Pueden ser generados en una variedad de especies, incluyendo conejos, cabras, ovejas, asnos, gallinas y otros, dándole al usuario muchas opciones en el diseño experimental.
- Los anticuerpos policlonales son a veces usados cuando la naturaleza del antígeno en una especie no estudiada no se conoce.
- Los anticuerpos policlonales se unen a múltiples epítopes y así generalmente proveen una detección más robusta. (Calderón, 2007).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la integridad de anticuerpos IgY dirigidos contra las cepas vacunales *E. coli K99* y *Parvovirus canino* obtenidos a partir de yema de huevo de gallina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Extraer anticuerpos IgY dirigidos contra parvovirus canino y E. coli k99 a partir de huevos de gallinas inmunizadas con los antígenos vacunales de parvovirus canino y E. coli k99 mediante el protocolo de Pauly D.**
- 2. Cuantificar las proteínas IgY obtenidas a partir de huevos de gallina previamente inmunizadas con antígenos vacunales de Parvovirus canino y E. coli K99 mediante el método de Bradford.**
- 3. Evaluar la integridad de los anticuerpos IgY anti E. coli K99 y Parvovirus canino mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.**

METODOLOGÍA

Tipo de estudio:

Transversal experimental

Objeto de estudio.

Inmunoglobulinas IgY anti cepas vacunales de *E. coli K99* y de *Parvovirus canino* obtenidas de huevos de gallinas inmunizadas.

Antígenos:

Con el ánimo de evitar el uso de cepas patógenas se optó por usar las vacunas comerciales Enteroplus 7[®] y Parvo-C[®] que contienen los antígenos vacunales inactivados de las cepas *E. coli K99* y de *Parvovirus canino* respectivamente.

Metodología usada para la obtención de inmunoglobulinas IgY contra cepas vacunales *E. coli K99* y *Parvovirus canino* a partir de huevos de gallinas inmunizadas.

Esta parte no se considera dentro de la ejecución de este trabajo, pues se ejecutó previamente, y de esta surgió el presente trabajo de grado. A continuación se describe la metodología que fue empleada para obtener las inmunoglobulinas IgY contra cepas vacunales *E. coli K99* y *Parvovirus canino*.

Se usaron 8 gallinas de la raza Leghorn las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en grupos de dos. Aleatoriamente se seleccionaron dos gallinas para inmunización con la bacterina Enteroplus 7[®] que contiene la cepa vacunal *E. coli K99*, y otras dos fueron inmunizadas con la vacuna contra *Parvovirus canino* Parvo-C[®] que contiene la cepa vacunal para este mismo antígeno, las restantes 4 gallinas se distribuyeron en grupos de dos y se usaron como controles negativos (no inmunizadas).

El esquema de inundación contemplado se llevó a cabo efectuando inoculaciones en los días 0, 15 y 30, con un posterior refuerzo al día 56 (Wilmar Dias da Silva & Denise V. Tambourgi, 2010); las cuales se realizaron de la siguiente manera:

- El día cero (0) - inicio del esquema de inmunización; previamente a la inoculación se recolectaron y fecharon los huevos de las 8 gallinas, y se rotularon de acuerdo al grupo correspondiente.
- Inmediatamente, vía intramuscular se inmunizaron las 4 gallinas dispuestas para este fin, de las cuales, dos recibieron bacterina Entero plus 7[®] (*E.coli K99*) a razón de 1ml de antígeno repartido en 0.5 ml en cada músculo pectoral (pechuga) con adyuvante completo de Freund (Sigma[®]), y dos con la vacuna Parvo-C[®] (*Parvovirus canino*).
- El mismo procedimiento se realizó en los días 15, 30 y 56. Posteriormente del día 58 en adelante se procedió a recolectar los huevos por un periodo de 4 meses.
- Como controles negativos se recolectaron los huevos de las 4 gallinas no inmunizadas. Se recolectó un total de 60 huevos.

Metodología para alcanzar el objetivo 1 (*Realizar procedimiento de extracción de IgY contra parvovirus canino y E. coli k99 de manera manual mediante el uso del protocolo de Pauly D.*)

El proceso de extracción de la IgY a partir de yema se realizó de manera manual, siguiendo el protocolo de Pauly D et al., (2011) separando la de la membrana que recubre la yema y eliminando la clara del huevo. Se procedió a realizar la remoción de los lípidos de yema empleando el método de PEG (Polietilenglicol). La yema se vertió en un tubo falcon de 50 ml registrando el volumen de yema al cual

se le agregó dos veces el volumen de la yema de huevo de PBS, y se agregó PEG 8000 hasta alcanzar una concentración del 3,5% en el volumen final. Se homogeneizó la mezcla en vórtex y luego 10 minutos de agitación en Shaker. Los tubos se pasaron a centrifugación a 4 ° C durante 20 min a 12,000 rpm obteniendo así los lípidos de yema y una fase acuosa. La fase acuosa se vertió a través de un papel de filtro plegado a un nuevo tubo de falcón; los lípidos restantes se descartan.

Posteriormente, se añadió al tubo con el sobrenadante 8,5% de PEG 8000 (calculado de acuerdo con el nuevo volumen), se agitó en vórtex y nuevamente se centrifugó los tubos en las condiciones anteriormente mencionadas con la diferencia de que el sobrenadante resultante de la centrifugación se descartó, conservando el precipitado. El sedimento se disolvió cuidadosamente en 1 ml de PBS por medio de una varilla de vidrio y vórtex, y se completó con solución PBS a un volumen final de 10 ml, la solución se mezcló con PEG 8000 al 12% y se llevó luego al vórtex, y luego se centrifugó en las condiciones anteriormente establecidas; terminada la centrifugación se descartó el sobrenadante dejando el sedimento, al cual se le agregó 800 µl de PBS quedando un volumen final de 1ml (IgY purificada por precipitación diferencial con PEG 8000). El producto final de 1ml se encuentra conservado en refrigeración a 3°C. libre de proteasas lo que permite su conservación hasta por 8 meses sin degradación de los anticuerpos. Este proceso se repitió para cada uno de los antígenos.

Metodología usada para alcanzar el objetivo 2 (*Determinar la presencia de proteína, obtenida a partir de huevos de gallina previamente inmunizadas con antígenos de Parvovirus canino y E. coli K99 mediante el uso de la técnica de cuantificación de Bradford.*)

Se identificaron las proteínas IgY por el método de Bradford (microtécnica en placa) previa calibración de una curva estándar con seroalbúmina bovina fracción V de Sigma®. Para este método se utilizó una placa de 96 pozos fondo plano, en los cuales se depositaron 20 µl de reactivo de Bradford (5X), 2 µl de muestra problema (IgY obtenida para cada antígeno) y 72 µl de agua destilada. Toda muestra se cuantificó por duplicado. Las absorbancias fueron medidas a 595 nm en un espectrofotómetro Multiskan FC - ThermoScientific y se extrapolaron los resultados a la curva de calibración para obtener la concentración de proteína IgY en mg/ml.

Metodología usada para alcanzar el objetivo 3 (*Evaluar la presencia e integridad de los anticuerpos IgY anti E. coli K99 y Parvovirus canino mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.*)

Para determinar la integridad de las IgY, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida – SDS-PAGE de la siguiente manera: Se procedió a preparar el gel separador del 7.5% y posteriormente un gel concentrador del 5%, sobre el que se insertó un peine para demarcar los pocillos en los cuales se sembraron las muestras. En cada pocillo se sembró 10µg de proteína IgY en buffer de carga 1X, y en un pocillo lateral, se sembró un marcador de peso molecular para proteína de 6 a 200 KD de Sigma®.

La electroforesis de proteínas se realizó en una cámara Bio-Rad y una fuente de poder Hofer a 100 V, 50 mA y 15 W por 2 horas a 4°C; finalmente, las proteínas fueron reveladas por tinción Azul de Coomassie, sumergido el gel durante 24h en la solución teñidora, y posterior decoloración en solución de Metanol/Ácido acético glacial 30%/10% respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

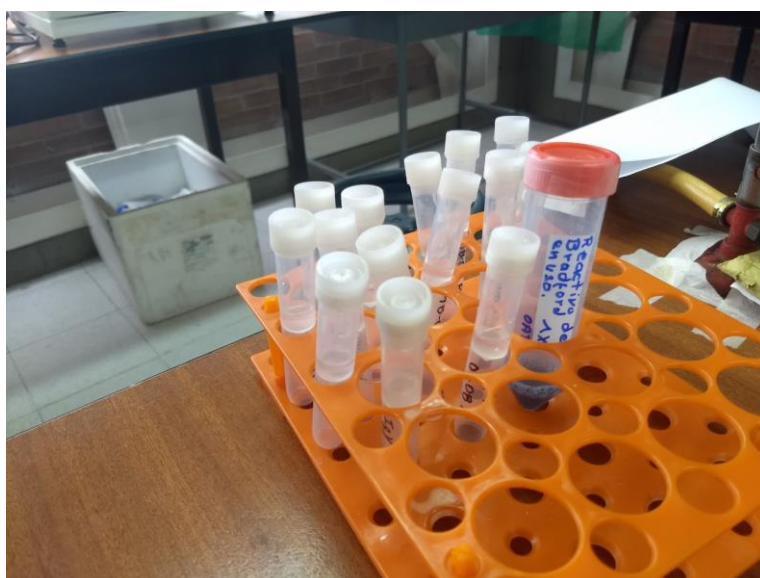
Los anticuerpos son moléculas de proteína producidas en respuesta a un antígeno. Debido a su capacidad para unirse a objetivos específicos, son ampliamente utilizado en investigación, diagnóstico y terapia.

En el presente trabajo se realizó la extracción de la IgY, que posteriormente fue sometida a técnicas para poder determinar su presencia.

De manera cronológica se muestra el procedimiento de extracción de la IgY de la yema del huevo, se

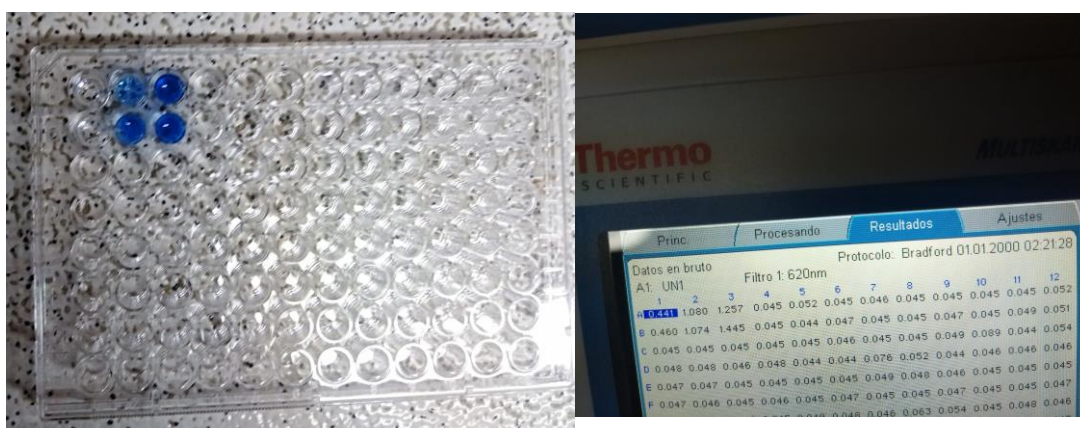
La yema de huevo se compone fundamentalmente de gránulos formados por fosfo vitrinas y lipoproteínas, dispersas en una fracción soluble que contiene livetinas y LDL (Moreno P et al 2013) por lo cual se debe elegir el mejor método para la extracción de IgY teniendo en cuenta su pureza durante el proceso que se lleva a cabo, dependiendo de la inmunogenicidad del antígeno, se pueden lograr títulos altos de anticuerpos (hasta

1:100,000 - 1:1,000,000) después de sólo una o 3 - 4 inmunizaciones de refuerzo. La pureza de una preparación de IgY se puede aumentar mediante una combinación de métodos; por ejemplo, la precipitación de PEG se puede combinar con afinidad cromatografía. En algunos casos, dependiendo de la aplicación final, un extracto acuoso de IgY es suficiente para lograr buenos resultados (Pauly D. et al 2011)



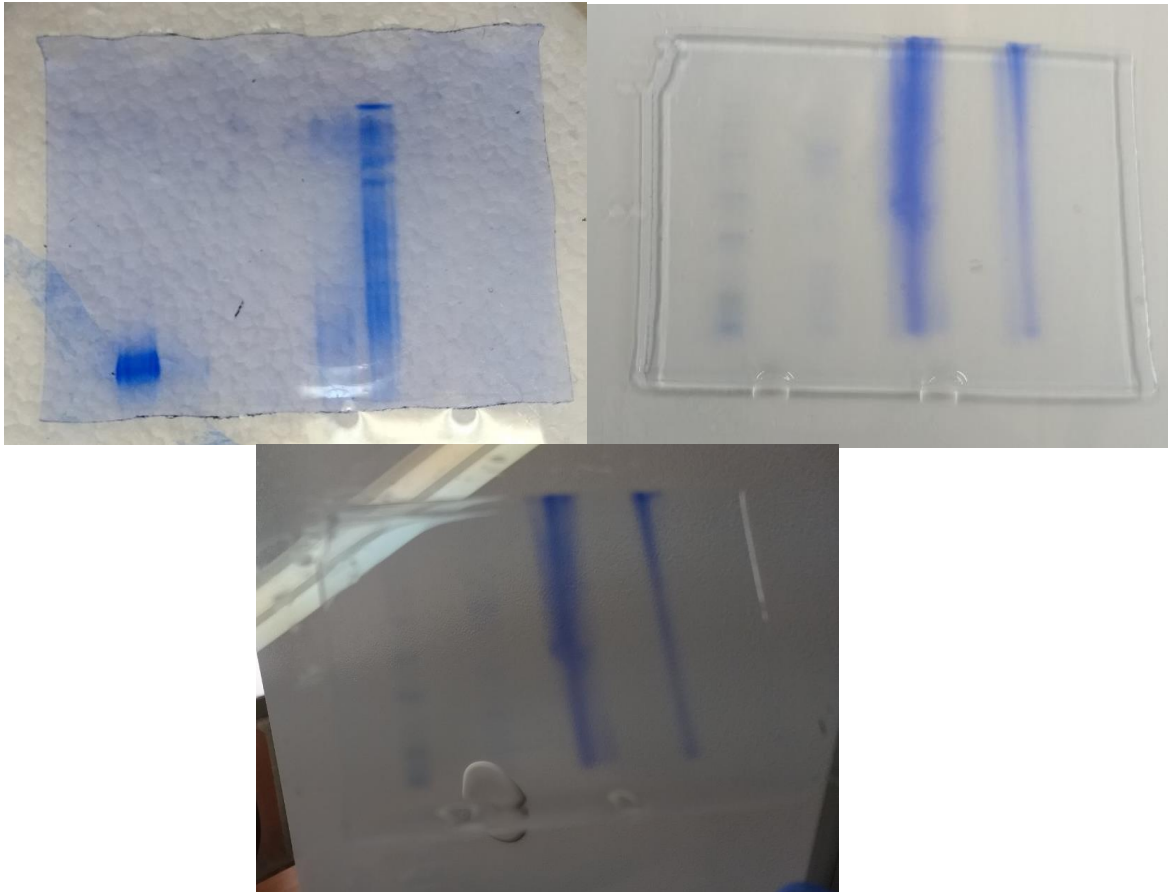
En cuanto a el método Bradford de cuantificación el cual se basa en la unión de un colorante, Coomassie Blue G-250 a las proteínas las cuales se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre (Reyes E, Cejudo A) en el cual se obtuvieron como resultados titulaciones entre 1.074 a 1.445 de proteína IgY extraída de la yema de huevo con el procedimiento

anteriormente mencionado



Finalmente para el proceso de electroforesis en geles de poliacrilamida el cual es un método para separar, identificar y purificar DNA, RNA o proteínas, el fenómeno denominado electroforesis sucede cuando una molécula con una carga neta en solución se desplaza por acción de un campo eléctrico; de esta manera la molécula migra hacia uno u otro electrodo según su carga: los aniones (-) irán hacia el ánodo (+) y los cationes (+) hacia el cátodo (-), siendo utilizados para separar la mayoría de las proteínas o pequeños oligonucleótidos (Universidad Nacional de Quilmes). En nuestro proceso fue usado un buffer de carga triglicina el cual se mezcló con la muestra obtenida de los procesos anteriormente mencionados el cual contenía las proteínas IgY tomando así 10mL de buffer y 5mL de muestra para luego posicionarse en los pocillos adecuados y los sobrantes

fueron cargados con colorante azul de coomassie en el cual obtuvimos como resultado una buena migración de proteínas IgY presentes en nuestras muestras finales evidenciando las líneas azules marcadas en los geles de las siguientes imágenes a mostrar.



Se debe tener en cuenta que los métodos anteriormente mencionados tanto para el proceso de extracción como cuantificación nos brindan seguridad al momento de mantener las proteínas en un estado óptimo y son de fácil acceso debido a sus bajos costos para poder llevar a cabo la obtención adecuada de proteínas a través de la yema de huevo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón C, Hurtado H & Castellanos J. (2000). Anticuerpos aviares: alternativa en producción y diagnóstico. *Biomédica*; 20:338-43.
- Amro W, Al-Qaisi W & Al-Razem F. (2018). Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16 (2018) 99–103.
- Balaguer J. (2008). Inmunidad pasiva (I). *Selecciones avícolas*.
- Baquero J. (2012). Evaluación clínica y tratamiento de la septicemia neonatal bovina. *Revista Veterinaria y Zootecnia* Vol 6 No.2, julio - diciembre de 2012.
- Barati B, Ebrahimi F & Nazarian S. (2016). Egg Yolk Antibodies for Disease Prevention. *Journal of Bacteriology & Mycology*.
- Cai Y, Guo J, Chen S, Tian L, Steinmann P, Chen M, Li H, Ai L & Chen J. (2012). Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosomajaponicum*. *Parasitology International* 61 (2012) 385–390.

- Calderón R. (2007). Curso de Métodos Fisicoquímicos en Biotecnología. Universidad Autónoma De México.
- Chacana P, Terzolo H & Gutierrez E. (2004). Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. Revista de medicina veterinaria Vol. 85 No 5.
- Da Silva M, Schaeferb R, Gava D, Kunzler C, da Silva VazJr I, Bastos A & Venancio E. (2018). Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine. Journal of Immunological Methods.
- Da Silva W & Tambourgi D. (2010). IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. Veterinary Immunology and Immunopathology 135 (2010) 173–180.
- Díaz C, Correa J & Vera J. (2008). Aspectos moleculares del virus de la parvovirus canina y sus implicaciones en la enfermedad. Revista de Medicina Veterinaria N° 15: 57-65 / Enero - junio 2008.
- Domínguez M. La escherichia coli enteropatógena y sus factores de patogenicidad. Real Academia Nacional de Farmacia.
- Duque A, Hernández L & Martínez C. (2016). Tecnología IgY para el control de enfermedades infecciosas como la caries dental. Repositorio digital – Universidad CES.

- Echeverri M, Duque Y, Molina A & Ruiz J. (2013). Caracterización clínica y molecular del parvovirus canino en Antioquia, 2012-2013. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias* 2013; 26: Suplemento. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Esfandiari J & Klingeborn B. (2000). A Comparative Study of a New Rapid and One-Step Test for the Detection of Parvovirus in Faeces from Dogs, Cats and Mink. *Journal Vet. Med. B* 47, 145–153.
- Fernández P & Díaz P. (2003). Pruebas diagnósticas. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo. A Coruña (España).
- Flores R. (1987). Parvovirus canina y aspectos de inmunización. *Ciencia Veterinaria* 4-1987.
- Franco S. (2011). Valor predictivo positivo del diagnóstico clínico de diarrea en terneros. (Tesis Magister scientiae en ciencias veterinarias) Universidad nacional del Litoral.
- Gaggianesi P., Mihura H & Etcheverria A. (2016). Mortandad periparto causada por *Escherichia coli* en establecimiento lechero de la Cuenca Mar y Sierras. Facultad de Ciencias Veterinarias –UNCPBA.
- Gómez A, Cañas C & Anaya J. (2005). Fcγ receptors and autoimmunity. *Acta Medica Colombiana* VOL. 30 N° 1, Enero- Marzo.

- Gutiérrez E. (2000). Anticuerpos de yema de huevo (IgY) como herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol 31. No. 1, 2000.
- Hasam H, Sayin Z. and Sanioglu S. G. (2016). The protective efficacy of immunoglobulin Y from immunized chickens against Salmonella infections in mice. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*
- Hurtado D. (2012). Nueva perspectiva de la parvovirus canina en el sur del Valle de Aburrá. Trabajo de grado. Facultad ciencias agropecuarias. Corporación universitaria Lasallista.
- Hurtado D & Báez P. (2012). Nueva perspectiva del parvovirus canino. *Journal of agriculture and animal sciences*. Julio - Diciembre de 2012. Vol. 1, No. 2.
- Kim M, Higashiguchi S, Iwamoto Y, Yang H, Cho H & Hatta H. (2000). Egg Yolk Antibody and Its Application. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2000, Vol. 5, No. 2.
- Mendoza U, Castro Z & Jiménez B. (2010). Factor reumatoideo. Asociación con marcadores de respuesta inflamatoria. *Rev méd electrón* 2010;32(1).
- Michael A, Meenatchisundaram S, Parameswari G, Subbraj T, Selvakumaran R & Ramalingam S. (2010). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian Journal of Science and Technology*. Vol. 3 No. 4 (Apr. 2010).
- Moreno P, Díaz G & Ramirez M. Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el

metabolismo del NAD⁺. Revista Colombiana Química. Volumen 42. No. 2 – 2013.

Indb 12.

Munhoz L, D'Ávila G, Fischer G, de Lima M, Esteves P & de Oliveira S.

(2014). Avian IgY antibodies: characteristics and applications

in immunodiagnostic Cienc. Rural vol.44 no.1.

Biotecnol

Murcia H. (2009). Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en

inmunoensayos. Teoría y praxis investigativa. Volumen 4 – No. 2, Julio-

Diciembre.

Narat M. (2003). Production of Antibodies in Chickens. Food Technol. Biotechnol. 41 (3)

259–267

Pardo D. (2012). Determinación de los factores de riesgo y de los agentes etiológicos

asociados con la presentación de Diarrea Neonatal Bovina (DNB) en fincas de la

sabana de Bogotá. Tesis Magister. Facultad de Medicina Veterinaria y de

Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.

Pauly D, Chacana P, Calzado G, Brembs B y Schade R. (2011). IgY Technology:

Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by PolyethyleneGlycol (PEG)

Precipitation. Journal of Visualized Experiments, e3084.

Pereira E, van Tilburg M, Florean E, Guedes M. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and

their applications in human and veterinary health: A review. International

Immunopharmacology 73 (2019) 293–303.

- Puentes R. (2012). Parvovirus Canina: situación actual y protección de las vacunas contra las nuevas variantes virales circulantes en la región. *Revista Veterinaria (Montevideo)* 48 (185) 5-10 (2012).
- Sanabria V & Landa A. (2007). Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas. *Médicas UIS* 2007; 20:15-30.
- Schade R, Gutierrez E, Sarmiento R, Chacana P, Porankiewicz-Asplund J & Terzolo H. (2005). Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. *ATLA* 33, 129–154.
- Smith P, Zurita L & Núñez C. (1988). Aislamiento de *Escherichia coli* enteroadhesiva (K99) en terneros con síndrome diarreico. *Avances en ciencias veterinarias*. Vol. 3 No. 1:48-51.
- Soriano M. (2014). Evaluación de la efectividad de la vacuna *Escherichia coli* K99 en bovinos de leche en dos fincas en la sabana de Bogotá. Universidad de la Salle. Facultad de ciencias agropecuarias.
- Tavares E, Ribeiro J & Oliveira L. (2005). Active and passive immunization in the extremely preterm infant. *Jornal de Pediatria* - Vol. 81, No.1(Suppl), 2005.
- Vega G. (2009). Antigenos e inmunogenos. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. Vol. 52 No. 1 Enero-Febrero.
- Vega G. (2008). La respuesta inmune. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. Vol. 51 No. 3 Mayo-Junio.

