

MAESTRÍA INTERINSTITUCIONAL EN PRODUCCIÓN PECUARIA

TESIS:

Efecto de las inmunoglobulinas Y de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas administradas a becerras Holstein como preventivo de diarrea neonatal.

QUE PRESENTA

M.V.Z. I<mark>LSSE</mark> P<mark>ATRICIA</mark> SÁNCHEZ GARAY

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN PRODUCCIÓN PECUARIA

TUTOR

CARLOS URBAN HAUBI SEGURA

COMITÉ TUTORIAL

JACINTO BAÑUELOS PINEDA

ABNER JOSUÉ GUTIÉRREZ CHÁVEZ

Jesús María, Ags., marzo 2021











TESIS

Efecto de las inmunoglobulinas Y de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas administradas a becerras Holstein como preventivo de diarrea neonatal.

QUE PRESENTA

ILSSE PATRICIA SÁNCHEZ GARAY

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO

MAESTRO EN PRODUCCIÓN PECUARIA

Jesús María, Ags., marzo 2021

Dr. RAÚL ORTIZ MARTINEZ DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS PRESENTE

Por medio del presente, como TUTOR designado de la estudiante MVZ ILSSE PATRICIA SÁNCHEZ GARAY con ID 264463, quien realizó la tesis titulada: EFECTO DE INMUNOGLOBULINAS Y DE YEMA DE HUEVO DE GALLINAS HIPERINMUNIZADAS ADMINISTRADAS A BECERRAS HOLSTEIN COMO PREVENTIVO DE DIARREA NEONATAL, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia ,doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

> ATENTAMENTE "Se Lumen Proferre" Aguascalientes, Ags., a día 4 de diciembre de 2020.

> > Dr. Carlos Urban Haubi Segura Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado. Revisado por Depto Control Escolar/Depto, Gestión de Calidad. Aprobado por Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado. Código: DO-SEE-FO-07 Actualización: 01 Emisión: 17/05/19

CARTA OF USTO APROGRAPHIC

Dr. Raúl Ortiz Martínez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como *ASESOR* designado del estudiante ILSSE PATRICIA SÁNCHEZ GARAY con ID 264463 quien realizó la tesis titulada: EFECTO DE INMUNOGLOBULINAS Y DE YEMA DE HUEVO DE GALLINAS HIPERINMUNIZADAS ADMINISTRADAS A BECERRAS HOLSTEIN COMO PREVENTIVO DE DIARREA NEONATAL, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que *ella* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a día 4 de diciembre de 2020.

Dr. Abner J. Gutiérrez Chávez Tutor de Tesis

c.c.p.- Interesado c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado. Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad. Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado. Código: DO-SEE-FO-07 Actualización: D1 Emisión: 17/05/19

OIROTAGOS SA OTOS: SO ATRAD LAUDIVIDAL

Dr. RAÚL ORTIZ MARTINEZ DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE

Por medio del presente como *ASESOR* designado del estudiante ILSSE PATRICIA SÁNCHEZ GARAY con ID 264463 quien realizó *la tesis* titulada: : EFECTO DE LAS INMUNOGLOBULINAS Y DE YEMA DE HUEVO DE GALLINAS HIPERINMUNIZADAS ADMINISTRADAS A BECERRAS HOLSTEIN COMO PREVENTIVO DE DIARREA NEONATAL, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que *ella* pueda proceder a imprimir*la* así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 19 de diciembre de 2021.

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda Asesor de la tesis

El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento pdf. No se puede abreviar, ni amitir nombres

c.c.p.- Interesado c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado. Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad, Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado. Código: DO-SEE-FO-07 Actualización: 01 Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAK LOS TRAMITTES DEL EXAMEN DE GRADO



18/03/2021 Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: ID 264463 NOMBRE: ILSSE PATRICIA SÁNCHEZ GARAY LGAC (del Salud - Rumiantes PROGRAMA: MAESTRÍA INTERINSTITUCIONAL EN PRODUCCIÓN PECUARIA posgrado):) Trabajo Práctico ((X) Tesis TIPO DE TRABAJO: Efecto de las inmunoglobulinas Y de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas administradas a becerras Holstein como preventivo de diarrea neonata TITULO: Este proyecto de investigación evalúa el efecto de las inmuglobulinas tipo Y (IgY) producidas por gallinas hiperinmunizadas contra bacterias y virus que producen diarreas neonatales en becerras. Los resultados muestran una disminución en la presentación de diarreas. Este mismo modelo de trabajo puede utilizarse IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): para generar anticuerpos contra otras enfermedades en animales y en humanos. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA: INDICAR SI N.A. Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico: El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado SI La problemàtica fue abordada desde un enfoque multidisciplinario Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnologica o profesional según el área SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país SI Generó transferecia del conocimiento o tecnológica Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio) El egresado cumple con lo siguiente: Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc) Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor SI SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario 51 Coincide con el título y objetivo registrado Tiene congruencia con cuerpos académicos Tiene el CVU del Conacyt actualizado Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda) N.A. En caso de Tesis por artículos científicos publicados N.A. Aceptación o Publicación de los articulos según el nivel del programa N.A. El estudiante es el primer autor El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico N.A N.A. En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación. N.A. Los artículos integran los capitulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto N.A. Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: FIRMAS Elaboró: were seemen * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCION: DR. CARLOS URBAN HAUBI SEGURA NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: CARLOS ACADEST DR. CARLOS URBAN HAUBI SEGURA * En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al jutor o miembro del comité tutoral, asignado por el Decano Revisó: NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ Autorizó: DR. RAUL ORTIZ MARTINEZ NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

Nota: procede el tràmite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En sumplimiento con el Art. 105C del Regiamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Cosejo Acadómico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico. Ilevar el seguimiento de los alumnos

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar presente de tantas maneras y a cada momento de mi vida por el amor que llego a mí de tantas formas. Por darme la capacidad de haber llegado tan lejos.

A Elmy Carrillo por su amor, paciencia, apoyo y dedicación infinitas en cada etapa del trabajo de investigación. Gracias por estar tan presente cada día, por escucharme atentamente y ayudarme a mejorar a cada paso.

A Jessica Sánchez por el amor y apoyo incondicional que sólo una hermana puede dar, gracias por escucharme y animarme cada vez que lo necesité. Gracias por darme uno de los motivos más grandes para sonreír.

A mis padres, Elvira Garay y Jesús Sánchez por su amor, por sus consejos, gracias por darme su apoyo en todas las formas en que se puede apoyar a alguien. Gracias por ser parte de esta investigación y hacer de ella una experiencia familiar que se agrega a los hermosos recuerdos que hemos construido juntos.

A mi tutor, Carlos Urban Häubi Segura por el tiempo, la dedicación, entusiasmo, paciencia y por todo el apoyo que me brindo desde el inicio, incluso desde antes de ser oficialmente su alumna. Gracias por las interesantes pláticas, por la empatía y comprensión. Gracias por marcar en mi vida un crecimiento académico, profesional y sobre todo, personal.

A mis asesores Dr. Abner Gutiérrez y Dr. Jacinto Bañuelos por el tiempo y dedicación que me brindaron, gracias por el interés que mostraron en cada seminario, por sus consejos, gracias por ser parte de esta investigación.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por su notable colaboración y apoyo en este proyecto de investigación

A todos y cada uno de los médicos y trabajadores de "Granja Lupita", su colaboración fue crucial, gracias por el conocimiento que compartieron sin dudar conmigo, gracias por permitirme ser parte de su familia.

A Nelly Alemán Muñiz, aprendí tanto de ti, gracias por tu paciencia, por todo el apoyo inigualable, gracias porque algunos de los mejores momentos de mi vida los pasé en el área de las becerritas, decirte gracias no bastaría, eres una persona clave en esta investigación que también es tuya.

A Katia López, agradezco infinitamente el esfuerzo y dedicación que prestaste a esta investigación, gracias por el tiempo que empleaste y por estar al pendiente de las becerritas.

A Maru Jasso gracias por estar siempre para mí, por tu paciencia, por escucharme y ayudarme incondicionalmente, gracias por ser luz en mi vida. Gracias, gracias, gracias.

A mis tíos Janeth Sánchez, Lourdes Garay y Sergio Sánchez por ser pilares fundamentales en mi vida, por escucharme, alentarme y apoyarme de tantas maneras, por mostrarme con su ejemplo el valor del esfuerzo y el trabajo. Los quiero, respeto y admiro.

A mi abuelita Elvira Rodríguez, por su amor incondicional y por cuidar de mi siempre.

A cada gallina y becerrita que fue parte de esta investigación, por su noble colaboración, definitivamente sin ellas nada de esto hubiera sido posible.



TESIS TESIS TESIS TESIS

DEDICATORIA

A Dios en todas sus manifestaciones.

A mi pequeña sobrina, Azul Amunet Salas Sánchez.

A mi Elmy Cirelhy Carrillo Contreras.

A mi hermana Jessica Arleth Sánchez Garay

A mis padres Elvira Garay García y Jesús Patricio Sánchez Rodríguez.

A mis tíos Janeth Sánchez, Lourdes Macías y Sergio Sánchez

A Elvira Rodríguez Ramos, mi abuelita.

A quienes llevo en el corazón, mis abuelitos Hermelinda García y Juan Garay.

A mi fiel Canela.

A mi querido Monroe.



INDICE GENERAL

CONTENIDO

| | INDICE GENERAL | 1 |
|-----|--|-----|
| | INDICE DE FIGURAS | 5 |
| | INDÍCE DE TABLAS | 8 |
| | Resumen | 9 |
| | Abstract | |
| | 1. Introducción | 12 |
| | 1.1 Hipótesis | 14 |
| | 1.2 Objetivos | 14 |
| | 1.2.1 Objetivo general | 14 |
| | 1.2.2 Objetivos específicos. | 14 |
| | 2. Revisión de literatura | 15 |
| | 2.1 Situación actual del sector productivo lechero en México | 15 |
| | 2.2 Situación actual de la produ <mark>cción de</mark> leche en Aguascalientes | 19 |
| | 2.3 Producción avícola en México | 20 |
| | 2.4 Producción de huevo en México | 21 |
| | 2.5 Crianza de becerras lecheras | 22 |
| | 2.5.1 Importancia del calostro | 23 |
| | 2.5.2 Composición del calostro bovino | 26 |
| | 2.6 Falla en la transferencia de inmunidad pasiva | 28 |
| | 2.7 Diarrea Neonatal del Ternero | 29 |
| | 2.8 Generalidades del sistema inmune | 32 |
| | 2.9 Características estructurales y propiedades biológicas de | las |
| inm | unoglobulinas | 36 |

| | 2.9.1 Clasificación de las Inmunoglobulinas de los mamíferos | 40 |
|----|--|----|
| | 2.10 Producción de anticuerpos | 43 |
| | 2.11 Mecanismos efectores de los anticuerpos | 47 |
| | 2.11.1 Neutralización | 47 |
| | 2.11.2. Opsonización y fagocitosis | 48 |
| | 2.11.3 Citotoxicidad | 49 |
| | 2.12 Sistema del complemento | 50 |
| | 2.12.1 Vía clásica | 51 |
| | 2.13 Sistema inmune del ternero | 54 |
| | 2.14 Sistema inmune de las aves | 56 |
| | 2.14.1Transferencia de inmunid <mark>ad pa</mark> siva aviar | 57 |
| | 2.15 Propiedades de la inmunoglobulina Y | 59 |
| | 2.16 Estructura y función de las inmunoglobulinas Y | 61 |
| | 2.17 Antecedentes del us <mark>o de las inmunoglobu</mark> linas Y (IgY) | 63 |
| | 2.18 Uso y ventajas de la inmunoglobulina Y (IgY) | 66 |
| | 2.19 Uso de IgY como preventivo de Diarrea Neonatal del Ternero | 68 |
| | 2.20 Gamma Glutamil Transfera <mark>sa (G</mark> GT) | 69 |
| 3. | Planteamiento del problema | 70 |
| 1. | Justificación | 71 |
| 5. | Materiales y Métodos. | 73 |
| | 5.1 Ubicación | 73 |
| | 5.1.1 Características del establo | 74 |
| | 5.2 Material biológico | 75 |
| | 5.2.1 Primera etapa | 75 |
| | 5.2.2 Segunda etapa | 79 |
| | 5.3 Métodos para obtener IgY hiperinmune | 80 |

| | 5.3.1 Extracción de IgY | 80 |
|---|--|------|
| | 5.3.2 Evaluación de IgY en yema de huevo | 82 |
| | 5.3.3 Almacenamiento de la yema de huevo | 83 |
| | 5.4 Métodos para evaluar la respuesta inmune de las becerras | 84 |
| | 5.4.1 Pesaje de las becerras | 84 |
| | 5.4.2. Clasificación de las heces | 84 |
| | 5.4.3. Determinación de inmunoglobulinas séricas (IgG e IgY) | 85 |
| | 5.4.4 Gamma-Glutamil Tansferasa (GGT) | 85 |
| | 5.4.5. Morbilidad y mortandad | 86 |
| | 5.4.6. Análisis económico | 88 |
| | 5.5 Modelo experimental | 89 |
| | 5.5.1 Tamaño de muestra | 89 |
| | 5.5.2 Desarrollo del experimento | 90 |
| | 5.5.3. Tratamientos | 92 |
| | 5.5.4. Etapas de la inve <mark>stigación</mark> | 93 |
| | 5.6 Análisis estadístico | 94 |
| 6 | . Resultados | 95 |
| | 6.1 lg's en suero sanguíneo de las becerras | 95 |
| | 6.2 Aspectos clínicos | .105 |
| | 6.3 Pesaje de las becerras | .114 |
| 7 | . Discusión | .115 |
| | 7.1 Efecto del consumo de yema de huevo en los parámetros productivos | .115 |
| | 7.2 Efecto de la IgY a nivel sistémico | .116 |
| | 7.3 Efectividad de los tratamientos según la dosis y el tiempo de administra | ción |
| | | .118 |
| | 7 4 Efecto de la IdY en el estado de salud de las becerras | .119 |

| 7.5 Efecto del consumo de yema de huevo hiperinmune y no hiperinmune | |
|---|-----|
| arámetros productivos | |
| 7.6 Costo-beneficio de la administración de yema de huevo hiperinmune | 122 |
| 7.7 Trabajo futuro | 124 |
| 8. Conclusiones | 125 |
| 10. Literatura citada | 126 |
| 11. Anexos | 134 |



INDICE DE FIGURAS

| Figura 1 Producción anual de leche en México | 16 |
|---|-----|
| Figura 2 Crecimiento de la producción anual de leche en México | 17 |
| Figura 3. Comparación de la producción anual de leche de México y con la de otros paí | ses |
| | 18 |
| Figura 4. Producción anual de leche en el Estado de Aguascalientes. | 19 |
| Figura 5. Principales países productores de huevo. | 21 |
| Figura 6. Origen de las células del sistema inmune | 34 |
| Figura 7. Resumen de las generalidades del sistema inmune | 35 |
| Figura 8. Estructura tridimensional de la inmunoglobulina G | 36 |
| Figura 9. Estructura general de una molécula de inmunoglobulina | 37 |
| Figura 10. Estructura tridimensional de los bucles CDR1, CDR2 y CDR3 de la re- | _ |
| Figura 11. Relación entre los frag <mark>mentos CDR de la región hipervariable y las región marco de un anticuerpo</mark> | |
| Figura 12 Estructura de las inmunoglobul <mark>inas de lo</mark> s mamíferos | 41 |
| Figura 13. Neutralización de toxinas por anticuerpos. | 47 |
| Figura 14. Opsonización y fagocitosis. | 48 |
| Figura 15. Citotoxicidad mediada por anticuerpos. | 49 |
| Figura 16. Vías de activación del complemento | 50 |
| Figura 17. Vía clásica de activación del complemento | 52 |
| Figura 18. Etapas finales de la activación del sistema del complemento | 53 |
| Figura 19. Placentación bovina. Fuente: Anatomía Veterinaria. Dyce, 2012 | 54 |
| Figura 20. Placentación epiteliocorial. La placenta se constituye de 6 capas histológicas donde el epitelio uterino intacto se pone en contacto con el corión intacto | |
| Figura 21 Transferencia de inmunidad pasiva aviar | 58 |

| Figura 22 E | Estructura de IgY e IgG59 |
|-------------|--|
| Figura 23 l | Jbicación del establo lechero: Granja Lupita73 |
| Figura 24. | Elaboración de jaulas para alojar a las gallinas75 |
| Figura 25. | Colocación de la malla en las jaulas76 |
| Figura 26. | Alojamiento de las gallinas en jaulas equipadas77 |
| Figura 27. | Distribución de las aves en las jaulas77 |
| | Almacenamiento de yema hiperinmune en bolsas rotuladas con la hora de administración prevista y los gramos de yema de huevo contenidos (dosis simple y/o dosis doble) |
| Figura 29. | Separación de yema de huevo para la realización de la prueba de sulfato de zinc. 8181 |
| Figura 30. | Diagrama de las etapas de la investigación93 |
| Figura 31 | Concentración de Ig's en suero sanguíneo en los grupos de becerras que recibieron algún tratamiento yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control respecto a las horas después del nacimiento |
| Figura 32 (| Concentración de inmun <mark>oglobulinas en los</mark> tratamientos control, 150 g de yema no hiperinmune, 150 y 30 <mark>0 g de yema hi</mark> perinmune a las 2 horas97 |
| Figura 33 (| Concentración de inmunoglobu <mark>linas en</mark> los tratamientos control y 150 g de yema hiperinmune a distintas horas de vida98 |
| Figura 34 (| Concentración de inmunoglobulinas en los tratamientos control y 300g de yema hiperinmune a distintas horas99 |
| • | Comparación de la concentración de inmunoglobulinas entre cada uno de los tratamientos con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control101 |
| Figura 36 (| Concentración de inmunoglobulinas con base a los tratamientos102 |
| · | Concentración de inmunoglobulinas en el grupo control y los grupos que recibieron 150 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas posteriores al nacimiento |

| Figura 38 Concentración de inmunoglobulinas en el grupo control y los grupos que recibieron 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas posteriores a nacimiento |
|---|
| Figura 39 Presencia de diarrea en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control |
| Figura 40 Características de las heces en los grupos que recibieron tratamiento con yema hiperinmune y no hiperinmune y en el grupo control |
| Figura 41 Duración de la diarrea (días) en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y en el grupo control |
| Figura 42 Días de edad a los que se presentó diarrea en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y en el grupo control108 |
| Figura 43 Análisis de la mortalidad en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control |
| Figura 44 Análisis de morbilidad a causa de diarrea de los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control |
| Figura 45 Unión de los datos refer <mark>entes a los aspectos c</mark> línicos de los grupos tratados cor yema hiperinmune y no hiperinmune y del grupo control |
| Figura 46. Curva de crecimiento en los grupos de terneras114 |

INDÍCE DE TABLAS

| Tabla 1. Composición del calostro, leche del estado de transición y leche entera de vacas Holstein |
|--|
| Tabla 2. Clasificación de las inmunoglobulinas de los mamíferos40 |
| Tabla 3. Comparación entre las respuestas T dependientes y T independientes |
| Tabla 4. Antecedentes del uso de IgY contra diferentes patógenos64 |
| Tabla 5. Comparación de la producción y características de IgG e IgY67 |
| Tabla 6. Tratamientos para los grupos de becerras79 |
| Tabla 7. Cantidad de agua destilada e IgG utilizadas para realizar la curva de calibración. |
| 82 |
| Tabla 8. Clasificación de las heces84 |
| Tabla 9. Incidencia de diarrea cada uno de los grupos86 |
| Tabla 10. Incidencia de diarrea en la población experimental86 |
| Tabla 11. Prevalencia de diarrea e <mark>n cada grupo86</mark> |
| Tabla 12. Muertes a causa de diar <mark>rea e</mark> n los grupos tratados con IgY y en el grupo control |
| Tabla 13. Protocolos utilizados de acuerdo a la severidad de la diarrea y su costo/día/becerra |
| Tabla 14. Comparación entre tratamientos92 |
| Tabla 16. Características de las heces en la población, grupo tratado con IgY y grupo control |
| Tabla 17. Costo de la administración de huevo hiperinmune a una becerra122 |
| Tabla 18. Costo extra de los protocolos de tratamiento para diarrea123 |

Efecto de las inmunoglobulinas Y de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas administradas a becerras Holstein como preventivo de diarrea neonatal.

RESUMEN

El sector productivo lechero mexicano enfrenta una problemática que le impide generar los reemplazos para cubrir la necesidad del consumo de leche de la sociedad. Lo anterior se debe a que durante la etapa de recría de becerras muchas de ellas enferman y pueden llegar a morir a causa de diarrea. La morbilidad que se llega a presentar en los hatos puede ser del 47%, lo que retrasa el crecimiento del animal y genera costos extra debido a tratamientos y a una disminución de la ganancia diaria de peso por la enfermedad. La mortalidad puede alcanzar hasta el 16%.

El objetivo de esta investigación es producir y administrar de manera oral inmunoglobulinas Y de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas a becerras Holstein recién nacidas y evaluar su efecto protector contra el síndrome diarreico neonatal.

Se establecieron dos grupos de gallinas, en el grupo uno se hiperinmunizaron 29 aves de la estirpe Bovans con una vacuna polivalente contra cuatro aislados diferentes de *Escherichia coli K99, Clostridium perfringens* tipo C, coronavirus y tres aislados diferentes de rotavirus bovino (incluyendo los serotipos G10, G6 y G8), el grupo dos estuvo conformado por 11 aves sin hiperinmunizar. El huevo se recolectó diariamente para realizar análisis del contenido de IgY por yema, una vez que se obtuvieron entre 140 y 160 mg/yema de huevo las yemas se mezclaron, empaquetaron y mantuvieron a una temperatura de 4°C hasta su uso.

Se utilizaron 40 becerras lecheras recién nacidas de raza Holstein que se asignaron completamente al azar a 5 grupos, cada uno de los grupos fue sometido a uno de los tratamientos. Se administró la yema de huevo a los grupos de terneras correspondientes mediante calostro durante las 2 primeras horas de vida y posteriormente con leche. Se tomaron muestras de sangre de cada una de las becerras (5 mL) a distintas horas de vida (2, 72, 120, 240 y 360). Las muestras se analizaron por el método de espectrofotometría.

El diseño experimental fue factorial 3X2 más dos controles, uno positivo y uno negativo.

Los datos obtenidos se capturaron en una hoja de Microsoft Excel para su análisis posterior. Se realizó una exploración visual de datos y después un ajuste al modelo matemático. Se sometieron a un análisis de varianza ANOVA por mediciones repetidas y posteriormente se realizó una separación de medias de Tukey. Asimismo, se realizó un análisis estadístico de supervivencia. Los resultados obtenidos demostraron que la administración de yema de huevo hiperinmune con calostro redujo la incidencia y la prevalencia de diarrea en las becerras, así como la duración y severidad de la misma. Los datos obtenidos indican que la suplementación del calostro con 150 y 300 g de yema hiperinmune previene la diarrea neonatal en becerras Holstein.



ABSTRACT

The calf rearing period is a crucial time for the milk production system costeffectiveness. The profitability of the system relies not only on milk production but also on calf rearing. During this stage morbidity and mortality because of diarrhoea represent one of the main causes of economic and genetic potential losses due to the extra cost treatments and death of the animals. The use of IgY has been proven to be an effective tool to transfer passive immunity to the calves reducing diarrhoea morbidity and mortality.

This work aimed to produce, administer orally and evaluate the passive immune transfer in newborn Holstein calves through the administration of two doses (150 and 300 g) of hyperimmune egg yolk and a single dose of 150 g of no hyperimmune egg yolk at 2, 120 and 240 hours after birth. For this purpose two groups of Bovans hens were established of which 29 birds were hyperimmunized against *Escherichia coli K99, Clostridium perfringens* type C, coronavirus and rotavirus. 11 hens were the control group. Pools of hyperimmune and control yolks were made and packed according to the established doses (150 and 300g). The yolks remained at 0oC until use. 40 newborn Holstein female calves were separated into 8 groups. 7 groups received hyperimmune and no hyperimmune egg yolk at 2, 120 and 240 hours after birth. The yolks were given through colostrum at 2 hours after birth and through milk at 120 and 240 hours after birth to the calves according to the established treatments.

Blood samples were taken (5 mL) at 2, 72, 120, 240 and 360 hours after birth to measure serum antibodies concentration. Blood samples were analyzed by spectrophotometry. Further, data on the clinical status of the calves were collected and analyzed through ANOVA analysis. The largest immunoglobulin concentration was obtained in hyperimmune treated groups compared with the control group, especially at 72 hours after birth measure. A decrease in the diarrhoea incidence, prevalence, severity and mortality besides a faster and more effective response to the established treatments once diarrhoea started was observed.

The administration of 150 and 300 grams of hyperimmune yolk at 2 hours after birth promotes a greater serum immunoglobulin concentration and increases passive immunity transfer.

1. INTRODUCCIÓN

El sector productivo lechero mexicano enfrenta una problemática que le impide generar los reemplazos productores (becerras que sustituirán a las vacas en producción) para cubrir las necesidades del consumidor de leche. Lo anterior se debe a que durante la etapa de crianza de becerras muchas de ellas mueren a causa de diarrea. En algunos hatos la diarrea ocasiona aproximadamente el 50% del total de muertes en becerras antes del destete (National Dairy Heifer Evaluation Project, 1994).

La crianza de becerras es un proceso clave en todo sistema lechero ya que de éste depende la rentabilidad del hato. Además, permite el establecimiento de un mejoramiento genético de los animales y por ende, mayores ingresos económicos. Cada cría nace con un potencial productivo que será afectado positiva o negativamente por el manejo que se le proporcione (Vitela, 2012).

Actualmente se ha puesto énfasis en el estudio de la inmunización pasiva vía oral con inmunoglobulinas Y (IgY) de yema de huevo de gallinas como alternativa al uso de antibióticos para el tratamiento y control de la diarrea en distintas especies domésticas incluyendo terneros, lechones, aves de corral, ratones e incluso humanos (Diraviyam *et al.*, 2014). Se conoce como "Tecnología IgY" el uso de las inmunoglobulinas contenidas en la yema de huevo (IgY) de gallinas con fines profilácticos e incluso terapéuticos de las enfermedades infecciosas (Vega *et al.*, 2011).

De esta manera se puede prevenir el desarrollo de una enfermedad sin necesidad de hacer uso posteriormente de los tratamientos convencionales como los antibióticos y, claro está, evitando los efectos colaterales a su administración en el organismo del animal y los ocasionados en el ambiente por sus residuos. Además de esto, tampoco será necesario esperar el tiempo de retiro establecido para el sacrificio de un animal destinado al consumo que requeriría algún otro fármaco, lo que a su vez se traduce en una mayor ganancia económica (Diraviyam *et al.*, 2014).

Los consumidores actuales, conscientes de la problemática en torno al uso desmedido de antibióticos que ha provocado una gran resistencia bacteriana, exigen una mayor calidad de los alimentos que ingieren, es por esto que reducir el uso de dichos medicamentos en la ganadería es una labor que requiere nuevas acciones en el combate de las enfermedades infecciosas (Diraviyam *et al.*, 2014).

El uso de esta tecnología salvaguarda el bienestar de los animales de los que es obtenida. El costo que supone el proceso de extracción y la cantidad que se puede llegar a conseguir la hace sumamente rentable.

Ibrahim *et al.* (2008) probaron el efecto de las inmunoglobulinas IgY anti-*Candida albicans* contra la candidiasis oral de ratones experimentalmente infectados, obteniendo como resultado un efecto protector, una reducción de la diseminación, del número de *C. albicans* y de las lesiones de la lengua en los animales enfermos.

Lee *et al.* (2009) concluyeron que la inmunización pasiva de pollos con anticuerpos IgY anti-coccidios provee inmunidad protectora contra la infección de desafío de coccidiosis.

Se ha reportado que los anticuerpos IgY contra el grupo A de rotavirus bovino se pueden utilizar para prevenir la diarrea asociada a este patógeno en terneros recién nacidos (Vega *et al.*, 2011).

Vega *et al.* (2012) indicaron que la administración oral de anticuerpos IgY como suplemento de leche confirió inmunidad pasiva a lechones recién nacidos contra rotavirus humano (HRV).

Vega et al. (2015) demostraron que la administración oral terapéutica de IgY específica contra rotavirus bovino grupo A en terneros desafiados con este patógeno redujo los días de presencia de diarrea, la severidad de esta y la excreción de virus en las heces.

El objetivo de este trabajo es evaluar el uso de las inmunoglobulinas Y de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas para el combate de los agentes que causan el síndrome diarreico neonatal en terneras Holstein.

1.1 Hipótesis

Hipótesis de la investigación (Hi).

La administración de inmunoglobulinas Y (IgY) de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas contra cuatro aislados de *Escherichia coli* K99, *Clostridium perfringens* tipo C, coronavirus y tres aislados de rotavirus bovino, incluyendo los serotipos G6, G10 y G8 previene la diarrea neonatal ocasionada por éstos patógenos en becerras Holstein.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de las inmunoglobulinas Y (IgY) de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas administradas a becerras Holstein recién nacidas como preventivo de diarrea neonatal.

1.2.2 Objetivos específicos.

- 1. Hiperinmunizar gallinas vía IM con una vacuna polivalente contra cuatro aislados de *Escherichia coli* K99, *Clostridium perfringens* tipo C, coronavirus y tres aislados de rotavirus bovino, incluyendo los serotipos G6, G10 y G8 y obtener huevo hiperinmune y no hiperinmune de las gallinas.
- 2. Analizar el título de anticuerpos IgY presentes en la yema de los huevos y posteriormente congelar las yemas en bolsas para su almacenamiento.
- 3. Evaluar la inmunidad de las becerras Holstein mediante la determinación de IgG y GGT séricas.
- 4. Corroborar la especificidad de las inmunoglobulinas Y mediante inmunodifusión radial.
- 5. Analizar el costo-beneficio del proceso de transferencia de inmunidad pasiva a las terneras mediante la administración oral de yema de huevo hiperinmune para el productor.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Situación actual del sector productivo lechero en México.

En México la producción de leche de bovino es muy heterogénea desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico, incluyendo la gran variedad de climas regionales y características de tradiciones y costumbres de las poblaciones. Sin embargo, la industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos en México, y depende de la disponibilidad de la leche nacional su crecimiento. Según cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), durante el período 2003-2011 la producción nacional de leche de bovino ha tenido una tasa media de crecimiento de 1.3% (Secretaría de Economía, 2012).

Al comparar esta tasa con la correspondiente al crecimiento poblacional, que es del 1.8 % se advierte que la producción de leche en México no es suficiente para satisfacer el consumo de la población. Al término del cuarto trimestre de 2016, la producción de leche de bovino alcanzó 11 mil 607 millones de litros, es decir, 1.9% más que en el mismo periodo de 2015. (SIAP, SAGARPA, 2016).

La producción de leche de bovino crece cada año de manera moderada.

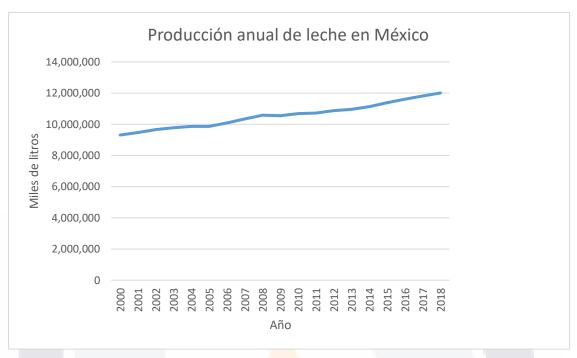


Figura 1 Producción anual de leche en México.

Fuente: Elaboración propia con datos de SAGARPA-SIAP, 2010-2017

Aunque la producción de leche en México ha ido en aumento en los últimos 18 años, la tasa de crecimiento anual ha tenido varios puntos negativos a lo largo del tiempo. El porcentaje de crecimiento máximo sucedió en el año 2000 con un 4.9%, por el contrario, en el año 2009 el país tuvo un decrecimiento de -0.4%. Al parecer, a partir del año 2016 el crecimiento anual tiende a estabilizarse (CANILEC, 2017).

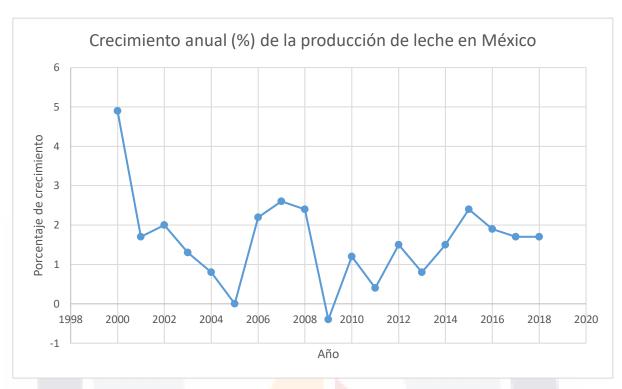


Figura 2 Crecimiento de la produc<mark>ción anu</mark>al de leche en México.

Fuente: Elaboración propia con datos de SAGARPA-SIAP, 2010-2017.

México ocupa el 14º lugar en la producción mundial de leche de bovino, con el 2% del total (CANILEC, 2017).

La producción anual de leche en México se ha comportado de manera muy similar a la de Argentina hasta el año 2015, donde incrementó, dando como resultado una mayor cantidad de leche en el año 2016.

México es una nación muy extensa, con una amplia variedad de regiones, cada una de ellas con su clima y relieve propio. Lo anterior da por resultado producciones muy diversas a nivel nacional. Así, podemos encontrar vacas que producen menos de 7,000 litros por año en zonas como el trópico y altas productoras con 10,000 a 15,000 litros anuales en la región de la laguna.

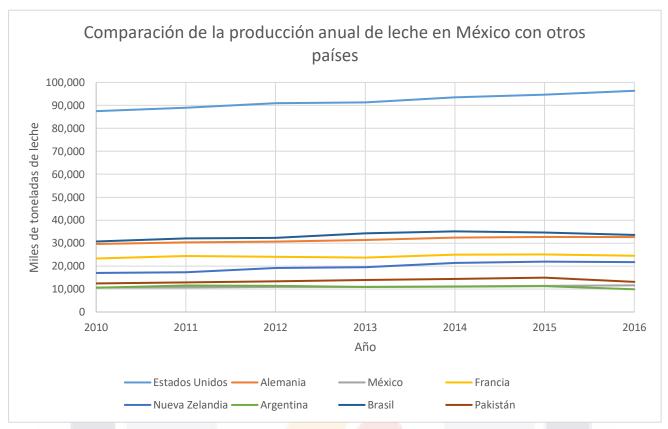


Figura 3. Comparación de la p<mark>roducción anual de</mark> leche de México y con la de otros países.

Fuente: Elaboración propia con datos de FAOSTAT, 2017.

2.2 Situación actual de la producción de leche en Aguascalientes

La producción de leche en el estado de Aguascalientes no figura dentro de las cuatro principales entidades a nivel nacional, sin embargo, considerando la superficie que se emplea para la industria lechera en esta región y por ende, la cantidad de animales por metro cuadrado, encontramos que es uno de los Estados más eficientes en la producción de leche del país.

La producción de leche en el Estado se ha incrementado de manera considerable desde el año 2012; registrando un aumento de 64,442 litros de leche en cinco años, es decir, 12,888.4 litros cada año sobre una superficie de 5.618 km², Aguascalientes representa 0.29% del territorio nacional y aportó el 3.66% de la producción total de leche del país en 2017 (INEGI, 2014).

En el año 2017, Aguascalientes produjo un total de 432,041 litros de leche, lo que lo posiciona en el noveno lugar a nivel nacional (CANILEC, 2017) (figura 4).

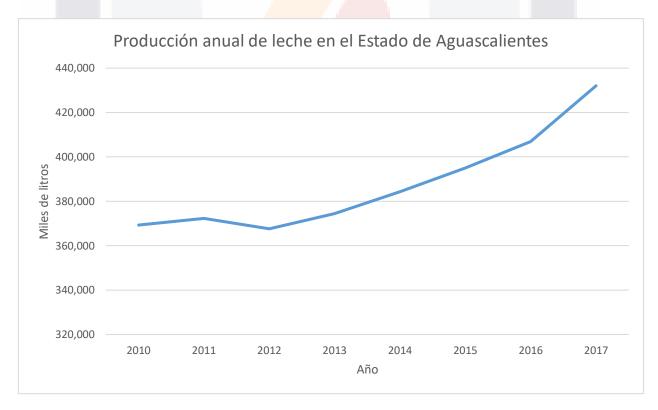


Figura 4. Producción anual de leche en el Estado de Aguascalientes.

Fuente: SAGARPA-SIAP, 2010-2017.

2.3 Producción avícola en México

La avicultura genera alrededor de un millón de empleos directos e indirectos en el país. Las aves que más se consumen son los pollos y las gallinas. De estas últimas existen distintas razas que cubren diferentes necesidades alimenticias. Las gallinas producen huevo, las gallinas pesadas se crían para el consumo de carne y las que son semipesadas o doble propósito se crían para producir carne y huevo (SAGARPA, 2015).

De los pollos obtenemos carne en su mayoría a estos animales se les conoce como pollo de engorda (SAGARPA, 2015).

En 2014, México produjo casi 3 millones de toneladas de pollo para consumo y más de 2 millones de toneladas de huevo. El estado con mayor producción de carne de pollo es Aguascalientes y Jalisco es el mayor productor de huevo (SAGARPA, 2015).

La avicultura de traspatio representa hasta un 70% de la producción de huevo y carne para autoconsumo. Esta actividad es realizada principalmente por mujeres. Contribuye a mejorar la seguridad alimentaria de países en vías de desarrollo. Genera ingresos a los agricultores, aprovecha los recursos locales y requiere pocos insumos (SAGARPA, 2017).

Por lo anterior, los sistemas de avicultura familiar son una parte importante del Proyecto Estratégico para la Seguridad Alimentaria (PESA). Estos sistemas pueden ser utilizados como modelos para el desarrollo de técnicas de producción avícola orgánica (SAGARPA, 2017).

La industria avícola nacional es uno de los sectores pecuarios más relevantes, con una aportación del 1% al Producto Interno Bruto (PIB) y genera seis de cada 10 kilogramos de proteína animal que se consumen en el país (SAGARPA, 2016).

Durante 2015 esta industria produjo cinco millones 830 mil 244 toneladas de alimentos, lo que significó un crecimiento de cuatro por ciento respecto a lo obtenido en 2014, con un valor de 131 mil 200 millones de pesos (SAGARPA, 2016).

En 2015, el huevo y pollo registraron un incremento de 2 y 5.6%, respectivamente (SAGARPA, 2016).

2.4 Producción de huevo en México

México ocupa el 1er lugar a nivel mundial en consumo de huevo. El consumo anual per cápita se ubica en 22.6 kilogramos (SAGARPA, 2015).

En agosto, la actividad avícola generó 252 mil 648 toneladas de huevo para plato, volumen que resultó 3.7% mayor al obtenido en el mismo mes de 2017 (SAGARPA, 2015).

La producción de huevo en el periodo enero-agosto de 2018, alcanzó un millón 908 mil 314 toneladas, que significa un aumento de 3.5% respecto de igual periodo del año previo (SAGARPA, 2015).

En el país se producen semanalmente un promedio de 30 millones de pollos (SAGARPA, 2015).

La comercialización de huevo se realiza a través de los mercados tradicionales y centrales de abasto, 81% a granel y 14% en empaques cerrados (SAGARPA, 2015).

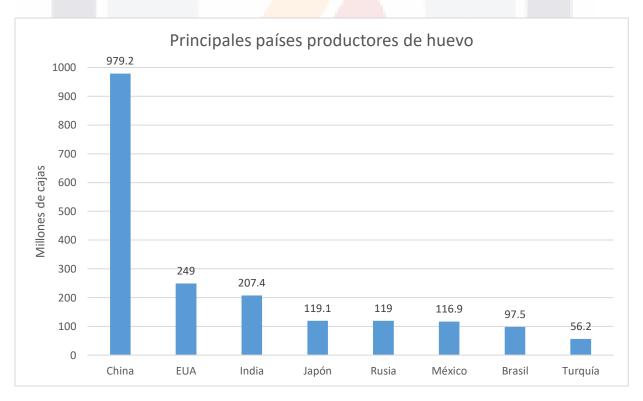


Figura 5. Principales países productores de huevo.

Fuente: Elaboración propia con datos de Financiera Nacional de Desarrollo (FND) http://datos.fnd.gob.mx/sccsei/Documents/Produccion_de_huevo_en_Mexico.pdf

2.5 Crianza de becerras lecheras

Un hato lechero puede considerarse como un sistema con dos componentes principales, animales adultos (vacas, incluyendo las que se encuentran en el periodo seco) y los reemplazos (becerras que mantendrán el crecimiento del hato reponiendo a las vacas de desecho voluntario). La interacción entre estos componentes determina el número de reemplazos que el sistema requiere (Tozer, Heinrichs, 2001).

La crianza de becerras es la etapa de mayor vulnerabilidad de un hato lechero, sobre todo durante el primer mes de vida de los animales. El manejo correcto de las terneras, que incluye manejo del calostro, alimentación, alojamiento y tratamientos oportunos son medidas esenciales para su supervivencia y productividad (Renaud *et al.*, 2018). Debido a esto podemos considerar la cría de becerras como la fase más transcendental en la ganadería lechera.

Este periodo requiere de un ingreso financiero proveniente del establo lechero que representa aproximadamente el 20% del costo total del sistema de producción (Curtis *et al.*, 2018).

El primer objetivo a alcanzar es que las vaquillas sean servidas entre los 13 y 15 meses de edad y con un 50 a 60% del peso vivo adulto. El segundo objetivo es que el parto ocurra entre los 22 y 24 meses y con 85 a 90% del peso vivo adulto. El cumplimiento de estos objetivos maximizará el consumo de alimento de las vaquillas, mejorará su salud y fertilidad, adicionalmente, con una atención adecuada del manejo y el alojamiento de los animales, especialmente alrededor del parto se podrá disminuir la tasa de sacrificio, de esta manera se logrará obtener un rendimiento óptimo en la vida productiva de las vacas. Aunque otra opción es comprar novillas a otras explotaciones o centros especializados, que ofrecen la ventaja de disminuir la inversión en alojamiento y mano de obra. Esta última opción sólo es recomendable si la explotación de origen ofrece todas las garantías sanitarias y si son animales con una genética superior a la de la propia explotación. (Patrón, 2016).

La mortalidad de las becerras conlleva pérdidas económicas en la industria debido al retraso en el progreso genético, la muerte de estas implica un costo extra al sistema debido a la perdida de los animales que sustituirían a las vacas menos productivas, por lo tanto, el costo del reemplazo se incrementa y el crecimiento del hato se disminuye (Raboisson et al., 2013).

Resulta paradójico que la crianza de becerras sea uno de los grupos a los que se les presta menos atención de forma casi sistemática dentro de la granja por no suponer ningún beneficio a corto plazo. Sin embargo, se trata de la fuente principal de ingresos en el futuro de la explotación, por lo que su adecuado desarrollo depende de la rentabilidad a medio plazo de la granja (Patrón, 2016).

2.5.1 Importancia del calostro

La transferencia de inmunoglobulinas de la madre al ternero es crucial en la protección del neonato contra enfermedades infecciosas (Weaver *et al.*, 2000). La inmunoglobulina más importante en el calostro es la IgG, la cual se deriva de la IgG del suero materno. Esta inmunoglobulina tiene principalmente dos subclases, IgG₁ e IgG₂ de las cuales, la primera es la que está presente en el calostro bovino (Marnila, 2002).

Células inmunológicamente activas y mediadores solubles como lactoferrina son transferidos de la madre a la cría a través del calostro. Los leucocitos de la secreción de la glándula mamaria son inmunológicamente activos y pueden ingresar a la circulación fetal (Weaver *et al.*, 2000). El calostro bovino contiene un sistema del complemento activo que participa en la defensa inmune de la ubre (Marnila, 2002).

El transporte de inmunoglobulinas del suero materno hacia la glándula mamaria es un proceso selectivo, dependiente del pH que se lleva a cabo durante el proceso de formación del calostro (calostrogénesis) de tres a cuatro semanas antes del nacimiento de la cría (Butler, 1998). El proceso continúa durante la gestación tardía pero se detiene de manera abrupta al momento del nacimiento del ternero (Guy *et al.*, 1994).

Debido a la influencia de hormonas como la progesterona los receptores secretorios de la glándula mamaria facilitan la transferencia de inmunoglobulinas desde la circulación materna hacia la glándula mamaria. Los cambios hormonales involucrados en el parto (i. e. la disminución de progesterona sérica antes del parto) están asociados con el inicio de la producción de calostro (Guy *et al.*, 1994).

Aproximadamente 500 g de IgG pueden ser trasferidos a las secreciones de la glándula mamaria durante la formación del calostro cada semana. Las inmunoglobulinas transferidas del suero al calostro aumentan la fagocitosis y la citotoxicidad de los leucocitos, la aglutinación de bacterias, la neutralización de microbios y toxinas y la activación del sistema del complemento en leche (Marnila, 2002).

Los enterocitos del recién nacido tienen una habilidad única para absorber inmunoglobulinas durante las primeras 24-36 horas después del nacimiento. Luego de ser absorbidas estas inmunoglobulinas son transportadas hacia el sistema linfático y de ahí pasan hacia la circulación sanguínea (Weaver *et al.*, 2000).

Los terneros no solamente dependen del consumo de calostro para obtener inmunoglobulinas maternas (ver tabla 1) sino también para la absorción de otras células con capacidad inmune como citocinas, sustancias inmunológicas no específicas, elementos nutricionales y factores de crecimiento (Barrington y Parish, 2001). El calostro contiene más proteínas, inmunoglobulinas, nitrógeno no proteico, grasa, cenizas, vitaminas y minerales que la leche (ver tabla 1) (McGuirk y Collins, 2004).

Los factores conocidos por tener efecto en la transferencia de la inmunidad a los terneros incluyen:

- a) Tiempo de la ingestión del calostro. La transferencia de inmunoglobulinas es óptima en las primeras 4 horas posteriores al nacimiento y comienza a disminuir rápidamente luego de las 12 horas posparto. El cese de la absorción no selectiva de macromoléculas (llamado cierre) ocurre aproximadamente a las 24 horas después del parto y es afectado por el tiempo de ingestión de alimento. Si la alimentación se retrasa, el cierre se puede extender hasta las 36 horas posteriores al nacimiento. Esto conlleva un mayor riesgo de colonización bacteriana intestinal y con ello una mayor probabilidad de incidencia de diarrea (Weaver *et al.*, 2000).
- b) Método y volumen administrado. La acción de succionar cierra la gotera esofágica, lo cual es sumamente importante para que tanto el calostro como la leche pasen al abomaso, de esta manera, así, el proceso digestivo ocurrirá de forma adecuada. Una comparación de la administración mediante biberón y sonda esofágica de igual volumen de calostro, con la misma concentración de IgG demostró que las becerras a las que les fue permitido succionar del biberón tuvieron una concentración de IgG sérica ligeramente mayor (Weaver et al., 2000).

La tasa de Fallo en la Transferencia de Inmunidad Pasiva (FPT) disminuye notablemente en los animales que reciben 100 g o más de IgG en el calostro. Administrar el 10% del peso vivo de la becerra (4 L de calostro, aproximadamente) puede asegurar que las recién nacidas consuman esa cantidad de IgG.

- c) Concentración de inmunoglobulinas (Ig) del calostro. La concentración de IgG es considerada el parámetro más importante para evaluar la calidad del calostro (Godden, 2008).
- d) Edad y raza de la madre. El calostro producido por vacas de tercera lactancia presentó niveles significativamente mayores de IgG que el producido por vacas de primera y segunda lactancia (Weaver *et al.*, 2000). Asimismo el calostro producido por vacas de las razas Ayrshire y Jersey tiene cantidades de IgG más altas que el producido por vacas de raza Holstein (Muller, 1981).
- e) Presencia de la madre: Los terneros tienen porcentajes más altos de absorción de las inmunoglobulinas del calostro cuando se les permite estar con la madre (Stott *et al.*, 1979).

2.5.2 Composición del calostro bovino

El calostro bovino es una mezcla de secreciones lácteas y elementos de la circulación sanguínea como inmunoglobulinas y otras proteínas presentes séricas (Godden, 2008).

Normalmente el calostro bovino contiene más de 1 x 10⁶ células/mL de leucocitos maternos inmunológicamente activos, incluyendo macrófagos, linfocitos B y T y neutrófilos (Godden, 2008). Algunos de los componentes con actividad antimicrobiana presentes en el calostro incluyen lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa (Donovan *et al.*, 2007). Los oligosacáridos presentes en el calostro podrían proveer protección contra patógenos ya que actúan como inhibidores competitivos del sitio de unión en las células epiteliales superficiales del intestino (Przybylska *et al.*, 2007).

La composición nutricional del calostro bovino presenta diferencias significativas con la leche. Los nutrientes encontrados en la leche varían de acuerdo a la etapa fisiológica y productiva de la vaca (Tabla1).

Las inmunoglobulinas encontradas en mayor cantidad en el calostro son IgG, IgM e IgA. Representan aproximadamente 85% a 90%, 7% y 5%, respectivamente. Particularmente la IgG es transferida desde la circulación sanguínea hasta el calostro mediante un mecanismo de transporte específico. Los receptores de las células epiteliales alveolares de la glándula mamaria capturan IgG del líquido extracelular y lo transportan hacia las secreciones luminales (Godden, 2008).

Tabla 1. Composición del calostro, leche del estado de transición y leche entera de vacas Holstein

| | 0-1 | 1 1 1 - | Lastada da | |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------|--------------|
| Parámetro | Calostro (+ 1 día) | Leche del estado de transición | | Leche entera |
| Gravedad específica | 1.056 | 1.04 | 1.035 | 1.032 |
| Sólidos Totales | 23.9 | 17.9 | 14.1 | 12.9 |
| Grasa (%) | 6.7 | 5.4 | 3.9 | 4 |
| Proteínas Totales (%) | 14 | 8.4 | 5.1 | 3.1 |
| Caseína (%) | 4.8 | 4.3 | 3.8 | 2.5 |
| Albúmina (%) | 6 | 4.2 | 2.4 | 0.5 |
| Inmunoglobulinas (%) | 6 | 4.2 | 2.4 | 0.09 |
| IgG (g/100mL) | 3.2 | 2.5 | 1.5 | 0.06 |
| Lactosa | 2.7 | 3.9 | 4.4 | 5 |
| IGF-I (μ/L) | 341 | 242 | 144 | 15 |
| Insulina (µ/L) | 65.9 | 34.8 | 15.8 | 1.1 |
| Cenizas (%) | 1.11 | 0.95 | 0.87 | 0.74 |
| Calcio (%) | 0.26 | 0.15 | 0.15 | 0.13 |
| Magnesio (%) | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Zinc (mg/dL) | 1.22 | | 0.62 | 0.3 |
| Manganeso (mg/100mL) | 0.02 | | 0.01 | 0.004 |
| Hierro (mg/100g) | 0.2 | | | 0.05 |
| Cobalto (µg/100g) | 0.5 | | | 0.1 |
| Vitamina A (µg/100mL) | 295 | 190 | 113 | 34 |
| Vitamina Ε (μg/g grasa) | 84 | 76 | 56 | 15 |
| Riboflavina (μg/mL) | 4.83 | 2.71 | 1.85 | 1.47 |
| Vitamina B12 (µg/100mL) | 4.9 | | 2.5 | 0.6 |
| Ácido Fólico (μg/100mL) | 8.0 | | 0.2 | 0.2 |
| Colina (mg/mL) | 0.7 | 0.34 | 0.23 | 0.13 |

Fuente: (Godden, 2008)

2.6 Falla en la transferencia de inmunidad pasiva

Se le llama transferencia pasiva a la absorción de inmunoglobulinas maternas a través del intestino delgado durante las primeras 24 horas después del nacimiento. Algunos de los beneficios de una transferencia de inmunidad pasiva exitosa son, reducción de la mortalidad en el periodo post destete, mejora de la ganancia diaria de peso y la eficiencia alimentaria, reducción de la edad al primer parto y mejora de la producción en la primera y segunda lactación (Godden, 2008).

La placenta bovina tiene una estructura epiteliocorial, y a diferencia de la de otros mamíferos como la de los cánidos, roedores y humanos impide la transmisión de inmunoglobulinas por parte de la madre hacia la cría en el útero, ésta nace sin anticuerpos que lo protejan hasta que su sistema inmune sea totalmente funcional y por ello depende casi completamente de la absorción de inmunoglobulinas maternas a través del calostro después del nacimiento (Godden, 2008). El momento de la ingestión, el método y volumen administrado, la concentración de inmunoglobulinas en el calostro, la época del año, la raza, edad y el estado nutricional de la vaca así como el número de parto y las enfermedades presentes al momento y/o las que haya tenido la vaca a lo largo de su vida son los factores que afectan la óptima absorción del calostro, incluso se ha reportado una mayor absorción de inmunoglobulinas por parte del neonato cuando la madre está presente (Weaver et al., 2000).

El fallo en la transferencia de inmunidad pasiva es una condición que predispone a los neonatos a enfermedades. La transferencia de IgG a través del epitelio intestino delgado es óptima dentro de las primeras cuatro horas de vida de la cría, luego declina rápidamente después de las 12 horas posparto. Los becerros tienen fallo en la transferencia de inmunidad pasiva si la concentración de IgG sérica es menor de 10 mg/mL cuando se toma una muestra entre las 24 y 48 horas de edad (Weaver et al., 2000).

La falla en la transferencia de inmunidad pasiva (IgG sérica <10 g/L) (Godden, 2008) incrementa la morbilidad y mortalidad en terneros lecheros.

Las vacas multíparas poseen mayores cantidades de inmunoglobulina G (IgG) que las primíparas. El número de lactaciones y la duración del periodo seco influencian el volumen y la concentración de inmunoglobulinas en el calostro de las vacas lecheras. (Pritchett *et al.* 1991).

2.7 Diarrea Neonatal del Ternero

El epitelio intestinal es la primera barrera protectora contra patógenos exógenos. Su integridad asegura una absorción correcta de nutrientes y previene la translocación de patógenos dentro de la lámina propia. La permeabilidad puede ser transcelular (principalmente utilizada para la absorción de moléculas pequeñas) o paracelular (principalmente utilizada para absorber moléculas grandes). Debido a la alta permeabilidad del intestino durante las primeras 12 horas de vida, éstos son muy susceptibles a la translocación bacteriana, lo cual incrementa la susceptibilidad a infecciones (Araujo *et al.*, 2015).

La diarrea neonatal del ternero representa la principal causa de muerte en el primer mes de vida de los animales (Medrano-Galarza *et al.*, 2018). Es una enfermedad multifactorial. Algunos de los factores predisponentes son, la edad, la genética, el alojamiento y el estado nutricional e inmunológico (Alfieri *et al.*, 2018). Es la consecuencia más frecuente de las infecciones entéricas en becerras recién nacidas. Los agentes infecciosos principales son virus, bacterias y protozoarios. Estos microorganismos pueden causar la enfermedad de manera individual o asociada (Coura *et al.*, 2015). El rotavirus y coronavirus bovino son considerados los virus entéricos más importantes involucrados en el desarrollo de esta enfermedad (Martella *et al.*, 2010).

a) Rotavirus: los terneros están expuestos alrededor de la tercera semana de vida y permanecen susceptibles como mínimo hasta la octava semana (Parreno *et al.*, 2004). Es considerada la causa principal de diarrea neonatal en bovinos. La incidencia de la infección usualmente se aproxima a 100% en los hatos y más de la mitad de las infecciones resultan en enfermedad clínica (Barrington *et al.*, 2002). Los terneros adquieren la infección entre los 4 y 14 días de edad al ingerir el virus de contaminantes fecales del ambiente. La dosis necesaria para causar la infección es de 10 partículas infecciosas o menos (Weaver *et al.*, 2000).

El periodo de incubación es corto debido a que la invasión viral de las vellosidades del intestino delgado ocurre a lo largo de la superficie luminal y grandes cantidades de partículas virales son producidas rápidamente (Barrington *et al.*, 2002).

El virus se replica dentro de los enterocitos, lo cual ocasiona su muerte. Esto conlleva a una pérdida de superficie de absorción, la presión osmótica creada por la glucosa

y otros carbohidratos no absorbidos genera un ingreso de agua dentro de la luz intestinal. Además, el líquido secretado por las criptas aumenta la cantidad de fluido en el lumen del intestino lo que finalmente ocasiona diarrea (Foster y Smith, 2009).

La malabsorción es ocasionada por la pérdida de enzimas hidrolíticas producidas por las células maduras de las vellosidades. Debido a esta pérdida de enzimas, la lactosa permanece sin digerir en el intestino delgado donde actúa osmóticamente atrayendo agua dentro del lumen intestinal (Barrington *et al.*, 2002). Puesto que los procesos de transporte de sodio y agua están dañados la diarrea causada por la infección por rotavirus es considerada principalmente diarrea por malabsorción, aunque también se le clasifica como secretora (Foster y Smith, 2009).

b) Coronavirus: normalmente afecta a becerros menores de 30 días de edad (Ammar *et al.*, 2014). Al igual que el rotavirus bovino, este patógeno es contraído mediante la ingestión de materia contaminada. La infección comienza en el intestino delgado proximal pero comúnmente se disemina hacia el yeyuno, íleo y colon. Inicialmente, el virus se adhiere al enterocito. Una vez dentro de la célula se replica y ocasiona la muerte celular al liberarse. De esta manera la pérdida de células del epitelio intestinal da origen a diarrea por malabsorción (Foster y Smith, 2009).

La infección por coronavirus al igual que la ocasionada por rotavirus resulta en daño a las vellosidades del epitelio intestinal, dicha infección produce manifestaciones clínicas más severas puesto que el grado de atrofia de las vellosidades es mayor, así como porque tanto el intestino delgado como el grueso se ven afectados (Barrington *et al.*, 2002).

Dentro de las bacterias patógenas causantes de diarrea neonatal del ternero *Escherichia coli*, especialmente *E. coli* enterotoxigénica es considerada como la causa más importante de diarrea en los primeros tres días de vida. Las bacterias se adhieren al epitelio intestinal por medio de adhesinas (Barrington *et al.*, 2002); esto les permite adherirse a receptores específicos en el epitelio intestinal y colonizar el íleo, proliferar, y diseminarse a lo largo del intestino delgado. Una vez que se establecida, *E. coli* produce enterotoxinas termoestables que desencadenan un exceso de secreción de fluido intestinal dando como resultado diarrea secretora (Foster y Smith, 2009).

Las serovariedades de Salmonella enterica como S. typhimurium y S. dublin son causas importantes de diarrea en terneros lecheros durante las primeras dos semanas de vida. La fisiopatología de la infección causada por esta bacteria es compleja e incluye inflamación y necrosis, incremento de la secreción de fluido y disminución de la absorción

y digestión. Además de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, los terneros infectados pueden llegar a presentar septicemia, lo cual ocasiona que la excreción del agente no solamente ocurra en heces, sino también en orina y secreciones oronasales incluso antes de la aparición de los signos clínicos (Barrington *et al.*, 2002).

Cryptosporidium parvum es extensamente endémico y es una de las causa más probables de diarrea en becerros entre 7 y 21 días de edad, causando enfermedad raramente en animales menores de 7 y mayores de 28 días de vida (de Graaf et al., 1999) (Avendano et al., 2018). La infección ocurre cuando los ooquistes son ingeridos del ambiente.

Al ser expuesto al ácido estomacal y sales biliares el quiste libera al esporozoíto. Los esporozoítos invaden las células del epitelio del íleo (que es donde la infección típicamente ocurre), en el cual crean una invaginación de la membrana luminal, en la cual se convertirán en trofozoítos. En esta etapa ocurre una reproducción asexual de los trofozoítos que origina merozoítos tipo I y II. Los merozoítos se reproducen sexualmente para generar ooquistes de pared delgada (autoinfección) y gruesa (excretados al ambiente en heces) (O'Handley,2006).

C. parvum causa diarrea debido a la destrucción del epitelio del intestino delgado. La destrucción epitelial resulta en atrofia de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas y muerte celular, lo cual conlleva a una digestión y transporte de nutrientes deficiente (Urie et al., 2018).

La malabsorción produce diarrea que puede variar desde muy leve hasta comprometer la vida del animal, dependiendo de la cantidad de protozoarios presentes en el intestino y de la asociación con otros organismos patógenos (Foster y Smith, 2009). Como ocurre con la infección por coronavirus y rotavirus, la incidencia de *C. parvum* usualmente se aproxima al 100% durante el primer mes de vida (Barrington *et al.*, 2002).

La mortalidad de las terneras es considerada un problema de bienestar animal, además ha sido identificada como uno de los indicadores más importantes de salud en la industria lechera (Ortiz-Pelaez et al., 2008). Causa un alto impacto económico negativo debido a los costos de los tratamientos veterinarios, a la reducción de la ganancia de peso de los animales afectados y a la muerte de éstos (Badaracco et al., 2012). También puede limitar en gran medida el potencial genético de la ternera (Graham et al., 2018).

2.8 Generalidades del sistema inmune

El sistema inmune protege al animal frente a las infecciones causadas por microorganismos y, por tanto, es esencial para la vida de los animales. Se necesitan muchos mecanismos complejos para asegurar la ausencia de enfermedad. Éstos incluyen las barreras físicas que impiden a los patógenos la entrada al organismo, la inmunidad innata que proporciona una respuesta inicial y rápida pero inespecífica y la inmunidad adquirida que proporciona una inmunidad retardada, prolongada, efectiva y específica (Tizard, 2009).

La protección más efectiva del organismo contra los patógenos es el rechazo a la entrada, sin esta barrera una buena defensa es prácticamente imposible. La presencia de microbiota normal establecida en el intestino excluye a muchos invasores potenciales del tracto gastrointestinal, previniendo así algunas de las enfermedades más importantes que pueden llegar a comprometer la vida de los animales, en especial cuando están en las primeras etapas de vida (Pavon, 2016).

La inmunidad innata actúa mediante el hecho de que los microorganismos invasores son químicamente distintos de los componentes normales del organismo. Lo anterior se logra debido a que el organismo reconoce y reacciona frente a moléculas que son diferentes a las propias intentando eliminarlas, para esto, se vale de una serie de reacciones químicas que consisten en mecanismos tanto químicos como celulares de respuesta rápida conocidos como inflamación (Pavon, 2016).

La inmunidad adquirida es una respuesta que tarda varios días en ser eficaz, pero, a pesar de que se desarrolla lentamente resulta increíblemente efectiva, además tiene la capacidad de recordar después de una exposición a los microorganismos extraños, esto le da la capacidad de reaccionar de manera más rápida y eficaz en exposiciones posteriores a los patógenos, es un sistema complejo y sofisticado que proporciona el último nivel de defensa del organismo (Moser y Leo, 2010).

En la figura 7 es posible observar las principales diferencias entre las respuestas que ocurren en la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

El sistema de inmunidad adquirida actúa mediante células y anticuerpos. Las células que se encargan de las respuestas inmunes adquiridas incluyen células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y T. Cada una de estas células tiene una función específica en la

inmunidad adquirida. Las células dendríticas tienen la capacidad de atrapar, procesar y presentar antígenos a las células con receptores para los antígenos procesados. Los linfocitos B producen anticuerpos en una forma unida a la membrana que actúan como receptores de los antígenos. La unión del antígeno con estos anticuerpos inicia las respuestas de la célula B, a este proceso se le denomina fase de reconocimiento de la inmunidad humoral.

Cuando las células B son estimuladas por el antígeno secretan anticuerpos, esto constituye la fase efectora de la inmunidad humoral. Los anticuerpos entonces son aptos para unirse al antígeno y desencadenar diversos mecanismos efectores que eliminan a los antígenos. La eliminación del antígeno generalmente precisa de la interacción del anticuerpo con componentes del sistema inmune innato, como las proteínas del complemento y células como los macrófagos y células NK (del inglés *natural killer*) (Abbas, 2002).

Las funciones efectoras mediadas por anticuerpos consisten en la neutralización de los microorganismos o las toxinas producidas por ellos, la activación del sistema del complemento, la opsonización de los antígenos para potenciar la fagocitosis, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, mediante la cual los anticuerpos identifican micororganismos para su lisis posterior por las células del sistema inmune innato, y la hipersensibildad inmediata en la que los anticuerpos provocan la activación de los mastocitos (Abbas, 2002).

Los linfocitos T también poseen receptores para reconocimiento de antígenos, una vez que les es presentado alguno, se activarán y participarán en la respuesta mediada por células destruyendo al antígeno. Los linfocitos B y T poseen también la capacidad de recordar las exposiciones a los antígenos, por lo que, se consideran células de memoria. Los macrófagos participan también en la respuesta mediada por células fagocitando partículas exógenas (Eisen, 2014).

En la figura 6 se muestra un esquema del origen de las células del sistema inmune tienen su origen en la médula ósea. Las células mieloides incluyen neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas y las células linfoides que están conformadas por linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) las cuales se diferencian a lo largo de diferentes vías (Gutiérrez, 2010).

TESIS TESIS TESIS TESIS

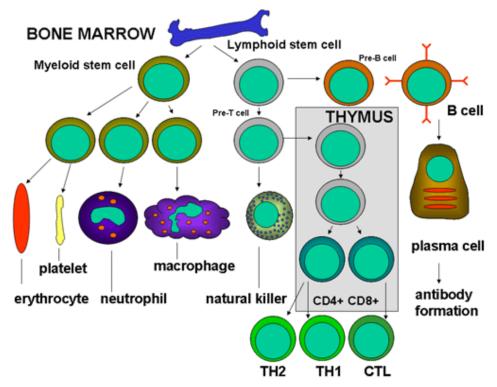


Figura 6. Origen de las células del sistema inmune.

Fuente: Gutiérrez (2010).

TESIS TESIS TESIS TESIS

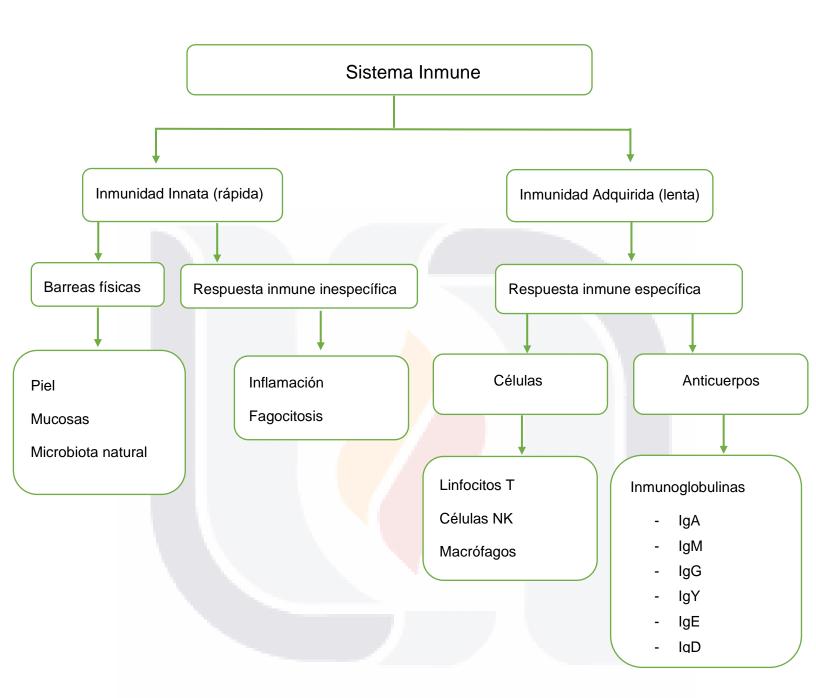


Figura 7. Resumen de las generalidades del sistema inmune.

Fuente: Elaboración propia.

TESIS

TESIS TESIS TESIS

2.9 Características estructurales y propiedades biológicas de las inmunoglobulinas

En el interior de las células B los anticuerpos se encuentran unidos al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi y en la superficie se expresan como proteínas integrales de membrana. Una vez que son secretados, los anticuerpos están presentes en el plasma, en las secreciones mucosas y, en menor medida, en el líquido intersticial de los tejidos. También se unen regularmente a los receptores de superficie de células efectoras, como los fagocitos mononucleares, las células NK y los mastocitos (Abbas, 2002).

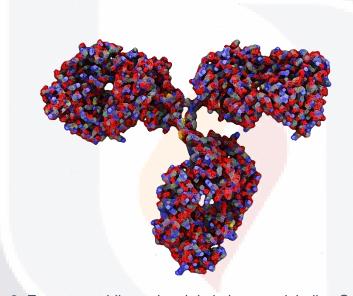


Figura 8. Estructura tridimensional de la inmunoglobulina G.

Fuente: https://es.123rf.com/photo_13696219_estructura-qu%C3%ADmica-de-una-inmunoglobulina-q-iqg-anticuerpo-mol%C3%A9cula-.html.

Las inmunoglobulinas son proteínas glucosiladas constituidas por cadenas polipetídicas y carbohidratos que representan el 82 a 96% y el 4 a 18% del total de la molécula, respectivamente (figura 8). Están formadas por dos cadenas pesadas (gamma) y dos cadenas ligeras (kappa o lambda) Las cadenas ligeras están unidas a las cadenas pesadas y estas a su vez están unidas entre sí mediante puentes disulfuro y uniones con covalentes como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones de tipo salino e hidrofóbicas (Carmona, 2010).

TESIS TESIS TESIS

Tanto las cadenas ligeras como las cadenas pesadas contienen series de unidades homólogas repetidas de 110 aminoácidos plegadas independientemente en un motivo globular denominadas regiones o dominios. Ambos tipos de cadenas se componen de regiones variables (V) amino terminales (N-terminales) y de regiones constantes (C) carboxi terminales (Butler, 1998). Las cadenas ligeras están formadas por una región constante y una región variable. Las cadenas pesadas están constituidas por una región variable y tres o cuatro constantes según en isotopo de anticuerpo (Abbas, 2002).

Las funciones efectoras y las propiedades fisicoquímicas comunes de los anticuerpos se asocian a los segmentos de las cadenas pesadas que no se unen al antígeno (región C) denominada fragmento Fc (del inglés *fragment crystallizable*), la cual muestra escasa variación. El reconocimiento antigénico ocurre en las porciones que se unen al antígeno (región V) denominada fragmento Fab (del inglés *fragment antigen binding*) (Abbas, 2002). En la figura 9 se observan las regiones de unión del antígeno y las regiones responsables de la actividad biológica.

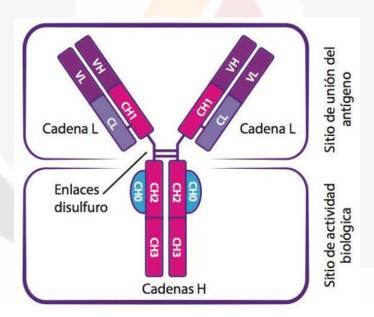


Figura 9. Estructura general de una molécula de inmunoglobulina.

Fuente: Inmunología molecular, celular y traslacional. Pavón, 2016.

Las regiones V de las cadenas ligeras (V_L) y de las cadenas pesadas (V_H) de las inmunoglobulinas poseen segmentos hipervariables en los cuales se encuentran la mayoría de las diferencias de secuencia de aminoácidos. Existen tres regiones hipervariables en cada dominio de V_L y tres en cada dominio de V_H (figura 8). Estas regiones se denominan

TESIS TESIS TESIS TESIS

regiones determinantes de la complementariedad o CDR (del inglés *complementarity-determining regions*). Cada región CDR consta de tres fragmentos llamados CDR1, CDR2 y CDR3. Las regiones CDR forman bucles extendidos disponibles para interaccionar con el antígeno (figura 10) (Abbas, 2002).

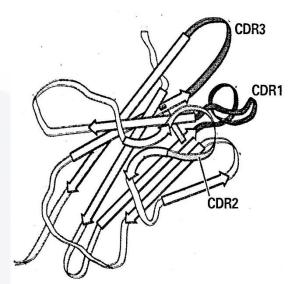


Figura 10. Estructura tridimensional de los bucles CDR1, CDR2 y CDR3 de la región hipervariable de una cadena ligera.

Fuente: Inmunología celular y molecular. Abbas, 2002.

Como se observa en la figura 11, existen secuencias conservadas adyacentes a las regiones CDR que son llamadas regiones marco. Esto permite que a pesar de la variabilidad en la secuencia en los fragmentos CDR, la estructura básica de las inmunoglobulinas se conserve (Abbas, 2002).

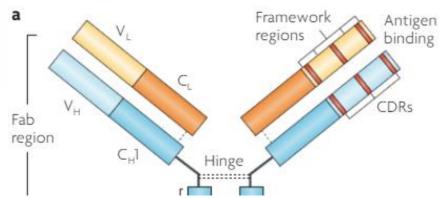


Figura 11. Relación entre los fragmentos CDR de la región hipervariable y las regiones marco de un anticuerpo.

Fuente: Modificado de Hansel T.T., (2010).

La síntesis de un anticuerpo implica el reordenamiento y la unión de varios segmentos de genes y es la base del desarrollo de una gran variedad de estas moléculas. Este proceso aunado, a la hipermutación somática, genera un amplio repertorio de inmunoglobulinas capaces de reconocer un vasto número de antígenos (Butler, 1998).

Las diferencias encontradas en las regiones C de las cadenas pesadas de los anticuerpos definen a qué clase (isotipo) y subclase (subtipo) pertenecen éstos y cuáles serán sus funciones efectoras. Las regiones C de las cadenas pesadas de un isotipo o subtipo de anticuerpos comparten la misma secuencia de aminoácidos (Abbas, 2002).

El fragmento Fc confiere a las inmunoglobulinas actividades biológicas únicas que incluyen la activación del complemento, transporte a través de las células epiteliales reconocimiento por receptores de membrana de macrófagos neutrófilos y mastocitos y reconocimiento por las proteínas de unión al anticuerpo producidas por algunas bacterias. Diferentes isotipos y subtipos realizan distintas funciones efectoras (Butler, 1998).

Los anticuerpos poseen una estructura flexible gracias a una secuencia de 10 a más de 60 aminoácidos (dependiendo del isotipo) conocida como región de bisagra. Esta característica confiere al anticuerpo la capacidad para unirse a dos antígenos al mismo tiempo en una superficie plana como la membrana celular (Abbas, 2002).

2.9.1 Clasificación de las Inmunoglobulinas de los mamíferos

Las inmunoglobulinas, también llamadas anticuerpos, son proteínas del sistema inmune, producidas por organismos superiores para la protección contra agentes patógenos (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

Son producidas en las células plasmáticas (linfocitos) y se encuentran en el suero sanguíneo y las secreciones corporales. Las funciones biológicas que llevan a cabo son, bloqueo, neutralización, opsonización, fijación del complemento y citotoxicidad celular mediada por células (Chames *et al.*, 2009).

Existen cinco clases de inmunoglobulinas producidas por los mamíferos (ver Tabla 2). Su clasificación depende de la estructura que presenten (figura 12). Podemos encontrar cinco formas distintas de cadena pesada. Dichas cadenas se han nombrado con letras griegas α (alfa) δ (delta), ϵ (épsilon), γ (gamma) y μ (mu) (Day, 2014).

Tabla 2. Clasificación de las inmunoglobulinas de los mamíferos

| | IgM | IgD | IgG | lgA | IgE |
|------------------------|---|---|--|---|--|
| Localización | Suero | Suero | Suero y líquido extracelular | Secreciones corporales y suero | Suero, células cebadas y mucosas |
| Porcentaje en suero | 5 - 10% | 0.20% | 75 -80% | 10 - 15% | 0.01% |
| Función | Participa en la primera línea de defensa y en la inmunorregulación | Su función no es clara aún. | Transferencia de inmunidad pasiva. Participa en la respuesta inmune general, específicamente en la respuesta secundaria. | Protección de mucosas por neutralización; impide la unión de patógenos a estas superficies. | Participa en la primera línea de defensa y en las respuestas inmunes a helmintos intestinales. |
| Vida media | Corta | Corta | Larga | Larga | Muy corta |
| Subclases | No existen | No existen | lgG1, lgG2, lgG3 e lgG4 | lgA1 e lgA2 | No existen |

Fuente: Elaboración propia con datos de (Schroeder y Cavacini, 2010).

FESIS TESIS TESIS TESIS

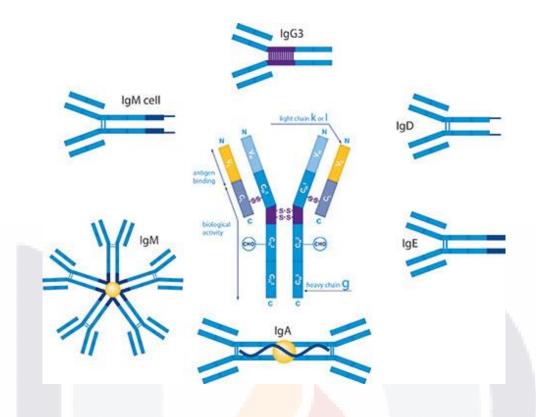


Figura 12 Estructura de las inm<mark>unoglob</mark>ulinas de los mamíferos.

Fuente: https://www.abcam.com/protocols/antibody-structure-and-isotypes

Durante el desarrollo temprano de los linfocitos B los dominios variables (V_H y V_L) son reordenados productivamente y expresados en asociación con la cadena pesada µ para producir IgM y luego IgD mediante un empalme alterativo. Después en respuesta a estimulación antigénica y regulación por medio de citocinas, estos dominios variables se pueden conjugar con otros isotopos (IgG, IgA, e IgE) en un proceso controlado. Esta nueva asociación depende del antígeno por sí mismo y de las vías de señalización que se activen, así como también del microambiente en el que se encuentren las moléculas (Schroeder y Cavacini, 2010).

IgM es la primera inmunoglobulina expresada durante el desarrollo de los linfocitos B. Representa de 5 a 10% de las inmunoglobulinas séricas. Actúa opsonizando el antígeno para la destrucción y fijación del complemento. Su estructura pentamérica la hace muy eficiente en este proceso. Participa en la primera línea de defensa del organismo y en la inmunorregulación por lo que es utilizada en el diagnóstico de exposiciones agudas a algún patógeno. Estos anticuerpos tienen poca afinidad por lo que se les llama anticuerpos

naturales. En consecuencia, IgM raramente ocasiona enfermedades autoinmunes (Schroeder y Cavacini, 2010).

IgD se encuentra circulando en el suero sanguíneo a niveles muy bajos. Representa el 0.2% de las inmunoglobulinas séricas. Tiene una vida media corta, lo cual se puede atribuir a la sensibilidad de la molécula a la proteólisis. Su función no es clara pero se sabe que puede reaccionar contra proteínas bacterianas especificas (Schroeder y Cavacini, 2010).

IgG representa la clase de anticuerpos predominante en el suero sanguíneo (85 a 90%). Tiene la vida media más larga de todas las inmunoglobulinas. Mediante estudios de la estructura, capacidad antigénica y diferencias funcionales de la cadena pesada se han identificado cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Cada una de las subclases presenta diferencias específicas, pero en términos generales son similares. Todas las inmunoglobulinas de esta clase participan en el transporte transplacentario y en las respuestas inmunes secundarias. Las inmunoglobulinas IgG contribuyen también directamente en la respuesta inmune. Actúan neutralizando toxinas, virus y bacterias. Estos anticuerpos pueden estar asociadas a enfermedades individuales (Schroeder y Cavacini, 2010).

IgA representa de 10 a 15% de las inmunoglobulinas séricas, pero son la clase más abundante en las secreciones corporales, como la saliva, la leche, las lágrimas y el moco de las vías bronquiales, genitourinarias y digestivas. Constituye más del 50% de la proteína del calostro. Generalmente presenta una estructura monomérica en el suero pero cuando se encuentra en la mucosa su estructura es un dímero y se le denomina IgA secretora. Hay dos subclases de IgA (IgA1 e IgA2) (Schroeder y Cavacini, 2010).

La función de las inmunoglobulinas IgA es muy importante ya que protege las mucosas de toxinas, virus y bacterias mediante neutralización directa o previniendo la unión de los patógenos a la superficie de la mucosa (Schroeder y Cavacini, 2010).

IgE. Aunque representa cerca del 0.005% de los anticuerpos del suero y tiene la vida media más corta de todas, es una inmunoglobulina sumamente potente. Es encontrada también en las células cebadas y en las mucosas. Se le asocia a las reacciones de hipersensibilidad y a la respuesta inmune a las infecciones causadas por gusanos parásitos (helmintos) (Schroeder y Cavacini, 2010).

2.10 Producción de anticuerpos

Los antígenos se clasifican en timo dependientes (T dependientes) y timo independientes (T independientes). Los primeros tienen naturaleza proteica, los polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos constituyen los antígenos timo independientes. La respuesta humoral a los antígenos proteicos requiere la participación de los linfocitos T colaboradores. Las respuestas a los antígenos timo independientes no necesitan la colaboración de los linfocitos T (Abbas, 2002). La Tabla 3 muestra una comparación entre las respuestas T dependientes y T independientes.



Tabla 3. Comparación entre las respuestas T dependientes y T independientes

| | Comparación entre las respuestas T dependientes y T independientes | | | |
|---|---|---|--|--|
| | Respuesta T dependiente | Respuesta T independiente | | |
| Antígenos estimulantes | De origen proteico | Polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos | | |
| Células implicadas | Linfocitos B y T colaboradores | Linfocitos B | | |
| Receptores de antígeno | MHC clase II, complejo receptor para el antígeno del linfocito B, CD40, receptor del complemento tipo 2 (CR2) | Complejo receptor para el antígeno del linfocito B, receptor del complemento tipo 2 (CR2) | | |
| Sitio de presentación de antígenos | Órganos linfoides periféricos: límite de los folículos linfoides | Tejidos linfoides: zona marginal de los folículos linfoides | | |
| Activación del sistema del complemento | Vía clásica | Vía clásica, algunos polisacáridos lo activan por la vía alternativa | | |
| Clases de anticuerpos predominantes | IgG, I <mark>gA, IgE, Ig</mark> D | IgM, algunos subtipos de IgG | | |
| Formación de centros germinales | Sí | No | | |
| Cambio de isotipo | Sí | Únicamente a algunos subtipos de IgG | | |
| Maduración de la afinidad | Sí | No | | |
| Generación de células B de memoria | Sí | Respuestas de memoria contra polisacáridos bacterianos | | |
| Formación de células secretoras | Sí | No | | |
| Afinidad de anticuerpos | Gran afinidad | Escasa afinidad | | |
| Especialización de la respuesta inmune | Sumamente especializadas | Poco especializadas | | |

Fuente: Abbas, 2002.

De manera general, estas respuestas se inician en los órganos linfoides periféricos. Cuando los antígenos son transportados por la sangre, la respuesta comienza en el bazo, si los antígenos penetran a través de la piel o de los epitelios mucosos, la respuesta

comienza en los ganglios linfáticos de drenaje y si los antígenos son inhalados o ingeridos, la respuesta comienza en los tejidos linfoides de las mucosas (Abbas, 2002).

Una vez iniciada la respuesta, los anticuerpos ingresan a la circulación sanguínea o a la luz de los órganos mucosos y allí median sus efectos protectores. Las células productoras de anticuerpos permanecen principalmente en los órganos linfoides secundarios y en la medula ósea (Abbas, 2002).

Las respuestas humorales comienzan con la activación de los linfocitos B. Esta activación que conduce a la proliferación mediante expansión clonal y finalmente a la diferenciación que resulta en la generación de células efectoras que secretan activamente anticuerpos y de linfocitos B de memoria (Abbas, 2002) consta de cuatro fases:

- 1) La fase de reconocimiento inicia con la interacción de los antígenos con algunos linfocitos B maduros que expresan IgM e IgD. Dicha interacción da inicio a
- 2) Durante la fase de activación la unión del antígeno al receptor en la membrana del linfocito B genera una transducción de señales que activan esta célula a través del complejo receptor para el antígeno del linfocito B. El complejo antígeno-anticuerpo ocasiona que las proteínas del sistema del complemento se de Cd3, un fragmento proteolítico que se genera en respuesta a los microorganismos El sistema del complemento proporciona segundas señales esenciales para la activación de esta célula mediante un fragmento proteolítico del complemento que se genera en respuesta a los microorganismos (Abbas, 2002).

Los acontecimientos celulares iniciales inducidos por el reconocimiento del antígeno por el complejo receptor del linfocito B preparan a estas células para la proliferación y diferenciación (Abbas, 2002).

- 3) La expresión de moléculas de superficie como el ligando CD40L en los linfocitos T colaboradores y el receptor CD40 expresado por los linfocitos B que median la señalización bidireccional y la activación subsiguiente de los dos tipos de células (Abbas, 2002).
- 4) La síntesis y la secreción de anticuerpos en respuesta a los antígenos proteicos, así como la proliferación de los linfocitos B son estimuladas por señales mediadas por Cd40 y por citoquinas. Las citoquinas aumentan la proliferación y diferenciación de este tipo de células y determina los tipos de anticuerpos producidos mediante cambios en los isotipos de las cadenas pesadas (Abbas, 2002).

TESIS TESIS TESIS TESIS

Durante una respuesta T dependiente el reconocimiento del antígeno por los linfocitos B y T colaboradores y su interacción estimula la expansión clonal de estas últimas, el cambio de isotipo, la maduración de la afinidad y la diferenciación en células B de memoria (Abbas, 2002).

Las respuestas T dependientes se dividen en dos fases. La fase inicial ocurre en los límites de las zonas ricas en linfocitos T y en los folículos primarios. Conduce a la proliferación de los linfocitos B, a la secreción inicial de anticuerpos y al cambio de isotipo. La fase tardía tiene lugar en los centros germinales dentro de los folículos linfoides y da lugar a la maduración de la afinidad y a la generación de linfocitos B de memoria (Abbas, 2002).



2.11 Mecanismos efectores de los anticuerpos

Las funciones efectoras de los anticuerpos son desencadenadas por la unión de antígenos a las regiones variables. Muchas de estas funciones están mediadas por las regiones constantes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, por tanto, cada isotipo tiene funciones efectoras diferentes (Abbas, 2002).

2.11.1 Neutralización

La neutralización ocurre cuando los anticuerpos se unen a microorganismos y/o toxinas microbianas impidiendo de esta manera la unión de estos a los receptores celulares (figura 13). Así, los anticuerpos inhiben o "neutralizan" la infectividad de los microorganismos y los posibles efectos nocivos de la infección. La eficacia de la neutralización está determinada por la afinidad de cada inmunoglobulina por su antígeno. Los anticuerpos de alta afinidad se producen mediante el proceso de maduración de la afinidad (Abbas, 2002).

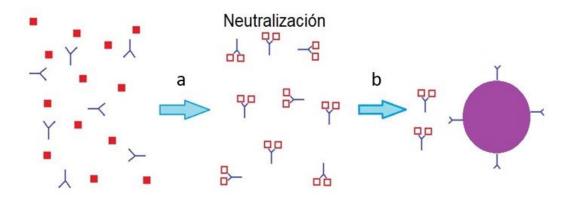


Figura 13. Neutralización de toxinas por anticuerpos.

Fuente: Elaboración propia.

FESIS TESIS TESIS TESIS

a) Los anticuerpos se unen a los antígenos, por ejemplo, algunas toxinas bacterianas; b) Al quedar unidas a los anticuerpos, las toxinas quedan inhabilitadas para unirse a los receptores celulares, de esta manera, los anticuerpos evitan que dichas moléculas ocasionen daño a las células y con ello, el desarrollo de una enfermedad. Fuente: Elaboración propia.

2.11.2. Opsonización y fagocitosis

Este mecanismo es realizado por los anticuerpos del isotipo IgG. Al recubrir (opsonizar) un antígeno, inducen su fagocitosis cuando se unen a los receptores presentes en los fagocitos (Abbas, 2002). En la figura 14 se ilustra este mecanismo.

Opsonización y fagocitosis

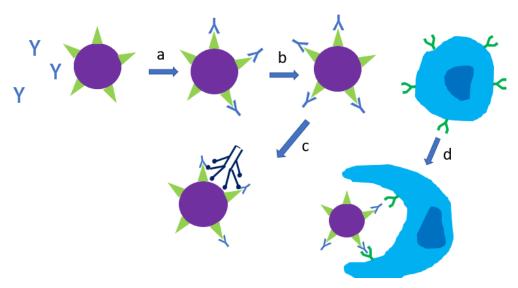


Figura 14. Opsonización y fagocitosis.

Fuente: Elaboración propia.

a) Los anticuerpos se unen al antígeno, por ejemplo, una bacteria; b) Formación del complejo antígeno-anticuerpo; c) Unión de C1q al complejo antígeno-anticuerpo, activación

ESIS TESIS TESIS TESIS

del sistema del complemento; Unión de las regiones Fc a los receptores celulares de los fagocitos, por ejemplo, un neutrófilo. Fuente: Elaboración propia.

2.11.3 Citotoxicidad

Es mediada por células dependientes de anticuerpos como las células NK. La figura 15 ejemplifica la unión del receptor de estas células, conocido como CD16 a los anticuerpos IgG unidos a células, que da como resultado la lisis de las células recubiertas de anticuerpos (Abbas, 2002).

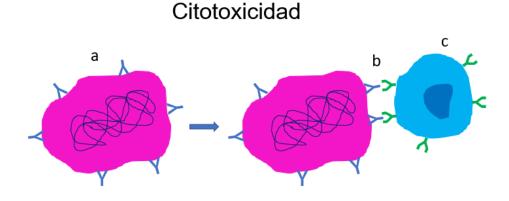


Figura 15. Citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Fuente: Elaboración propia.

a) Unión de los anticuerpos a una bacteria; b) Unión de las regiones Fc de las inmunoglobulinas a los receptores CD16 de las células NK; c) Estimulación de las células NK que resulta en la producción de moleculas citotóxicas dirigidas a la celulas recubiertas por anticuerpos. Fuente: Elaboración propia.

2.12 Sistema del complemento

Es uno de los principales mecanismos efectores de la inmunidad humoral y uno muy importante de la inmunidad innata. Está constituido por más de 30 proteínas que pueden ser activadas secuencialmente en una cascada enzimática compleja (Lateb, 2019). Estas proteínas normalmente inactivas se activan en condiciones especiales y por proteínas de la superficie celular que interaccionan entre sí y con otras moléculas del sistema inmunitario de manera sumamente regulada. (Abbas, 2002). Se han descrito tres vías de activación principales: clásica, alternativa y la vía de las lectinas (figura 16). Cada una de ellas se activa por estímulos diferentes y todas ellas convergen en la generación de la proteína del complemento denominada C3 (Lateb, 2019).

La activación del complemento inicia una proteólisis secuencial de proteínas que genera enzimas (en forma de zimógenos) con actividad proteolítica. De esta manera, los productos generados por la activación del complemento se unen por enlaces covalentes a las superficies celulares microbianas o a anticuerpos unidos a microorganismos o a otros antígenos (Abbas, 2002).

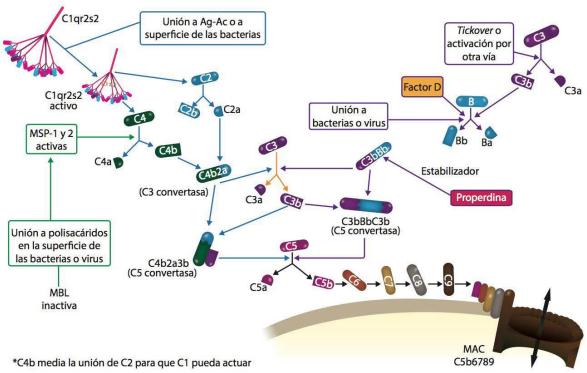


Figura 16. Vías de activación del complemento.

Fuente: Inmunología molecular, celular y traslacional. Pavón, 2016.

A pesar de diferir un poco en el inicio de la cascada de reacciones proteolíticas, todas las vías de activación del sistema del complemento tienen como etapas finales la escisión de la proteína C5 por la C5 convertasa y la formación del MAC. Fuente: Pavón (2016).

Los receptores del sistema del complemento son receptores acoplados a proteínas G y son expresados en varios tipos de células del sistema inmune y raramente en otras células. Estos receptores se activan por fragmentos de proteínas del complemento generados en el plasma durante la activación de este sistema (Ling, 2019).

La activación del complemento es inhibida por proteínas reguladoras presentes en las células del hospedero y ausentes en los microorganismos. Esto permite que este proceso tenga lugar en las superficies microbianas y no en las células propias del huésped, así se minimiza la lesión mediada por las proteínas del complemento en dichas células (Abbas, 2002). La fase fluida y los reguladores unidos a la membrana promueven una defensa contra la infección efectiva y la homeostasis de este sistema, además, previene la activación inapropiada del complemento (Ling, 2019).

2.12.1 Vía clásica

Se inicia por la unión de C1 a los dominios C_H2 de los anticuerpos IgG o a los dominios C_H3 de los anticuerpos IgM unidos a un antígeno (figura 17). C1q es un complejo compuesto por las subunidades C1q, C1r y C1s; C1q se une al anticuerpo, C1r y C1s son proteasas. Para activarse, cada molécula de C1q debe unirse a dos cadenas pesadas de inmunoglobulina (Abbas, 2002).

La unión del complejo C1q a las cadenas pesadas de IgG o IgM resulta en la activación enzimática de C1r asociado, este a su vez escinde y activa la proteína C1s. Posteriormente, el C1s activado escinde C4, esto produce C4b. La proteína C4 es homologa a C3. A continuación la proteína C2 se une con C4b para formar complejos para

TESIS TESIS TESIS TESIS

luego escindirse debido a la acción de C1s y formar C2b soluble y un fragmento de mayor tamaño denominado C2a, esta molécula se mantiene asociada de manera física a C4b en la superficie celular (Abbas, 2002).

El resultado de las reacciones descritas anteriormente es un complejo llamado convertasa de C3 de la vía clásica (C4b2a), esta enzima se une a C3 y lo escinde. Algunas moléculas de C3b se unen a la convertasa de C3, esta unión da lugar a la convertasa de C5 de la vía clásica que escinde C5 e inicia las etapas finales de la activación del complemento (Abbas, 2002).

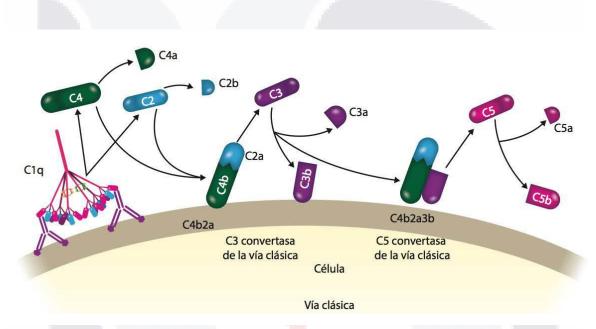


Figura 17. Vía clásica de activación del complemento.

La unión de la proteína C1q al complejo antígeno-anticuerpo inicia la vía clásica de activación del sistema del complemento. Fuente: Pavón (2016).

Fuente: Inmunología molecular, celular y traslacional. Pavón, 2016.

En las etapas finales de la activación del complemento las convertasas de C5 inician la activación de los componentes finales del sistema del complemento cuyo resultado final es la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) (figura 18). El MAC resulta de la formación de poros en las membranas plasmáticas que forman canales que permiten el movimiento libre de agua e iones a través de la membrana y ocasionan una hinchazón osmótica y con ello la rotura de las células. Además, el MAC también permite el ingreso de

ESIS TESIS TESIS TESIS

altas concentraciones de calcio, lo cual puede inducir apoptosis en células nucleadas (Abbas, 2002).

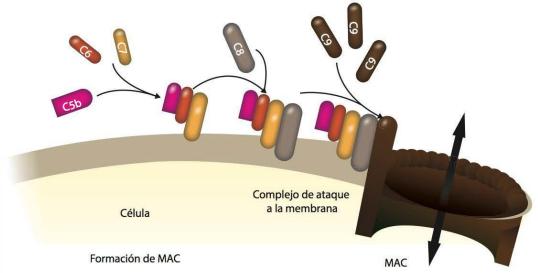


Figura 18. Etapas finales de la activación del sistema del complemento.

Fuente: Inmunología molecular, celular y traslacional. Pavón, 2016.

Las convertasas de C5 escinden la proteína C5 en un pequeño fragmento llamado C5a, que es liberado, y un fragmento que permanece unido a la superficie celular, C5b. C6, C7, C8 y C9 son proteínas estructuralmente relacionadas y no poseen actividad enzimática. La proteína C5b mantiene una conformación temporal que le confiere la capacidad de unirse a la siguiente proteína, C6, la molécula resultante, el complejo C5b,6 se mantiene débilmente asociado a la membrana celular hasta que se une a la proteína C7. A continuación se forma el complejo C5b,6,7, C7 es hidrófobo y se inserta en la bicapa lipídica de la membrana de la célula, una vez insertada se convierte en un receptor de alta afinidad para la proteína C8. Luego de la unión a esta última, el resultado es el complejo C5b,6,7,8 (C5b-8) que una vez insertado posee una capacidad limitada de citólisis. La formación de un MAC totalmente requiere la unión de la molécula C9 (Abbas, 2002).

2.13 Sistema inmune del ternero

El desarrollo del sistema inmune sigue un patrón constante. Se desarrolla en una serie de periodos. Cada uno de ellos capacita al feto para responder a más antígenos. Durante las primeras fases del desarrollo fetal se forma el sistema inmune de los becerros. El timo es el primer órgano linfoide que se desarrolla y es reconocible a los 40 días de gestación. La médula y el bazo se aparecen a los 55 días, los nódulos linfáticos a los 60 y las placas de Peyer se observan hasta el día 175. Los linfocitos pueden ser encontrados en la circulación sanguínea periférica de los terneros a los 45 días. Los linfocitos se sintetizan hasta el final de la etapa fetal. La capacidad para desarrollar una respuesta inmune mediada por células surge al mismo tiempo que la producción de anticuerpos (Tizard, 2009).

La placenta de los bovinos forma una estructura compuesta por las células fetales y maternales que crea un sistema de comunicación entre la madre y la cría (Rutkowska *et al.*, 2018). Como se muestra en la figura 20, la estructura epiteliocoral separa el aporte sanguíneo maternal y fetal impidiendo la transferencia de inmunoglobulinas durante la gestación, por lo tanto, los terneros nacen sin inmunidad pasiva (Godden, 2008). Para proteger a su progenie, la madre produce calostro, el cual contiene altos niveles de inmunoglobulina G, además de otros nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la cría (Fischer *et al.*, 2018).

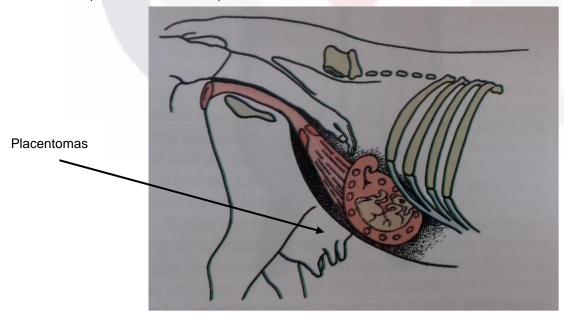


Figura 19. Placentación bovina. Fuente: Anatomía Veterinaria. Dyce, 2012

FESIS TESIS TESIS TESIS

A pesar de que no se ha utilizado, el sistema inmune está completamente desarrollado al nacimiento. Por lo cual, todas las respuestas inmunes adquiridas del neonato son primarias y se desarrollan lentamente (Tizard, 2009).

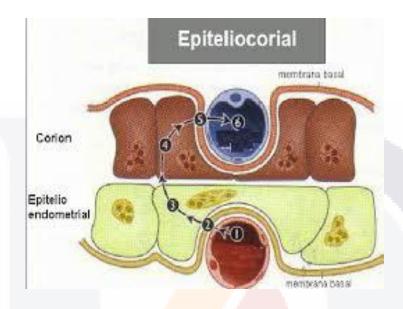


Figura 20. Placentación epiteliocorial. La placenta se constituye de 6 capas histológicas, en donde el epitelio uterino intacto se pone en contacto con el corión intacto.

Fuente: Manual de laboratorio de reproducción animal. Mellisho (2010).

2.14 Sistema inmune de las aves

La organización en general y los mecanismos de inmunidad son bastante similares a aquellos en mamíferos. Se ha identificado una dicotomía del sistema inmune en compartimentos B y T (Saif y col, 2003).

El sistema inmune de las aves, como el de los mamíferos, es complejo y compromete un número de células y factores solubles que deben trabajar para producir una respuesta inmune protectora. Las células inmunes residen en órganos linfoides primarios u órganos linfoides secundarios. El timo y la bolsa de Fabricio, respectivamente, son los órganos linfoides primarios donde los precursores T y B se diferencian y son sometidos a maduración (Saif y col, 2003).

Las células inmunes funcionales dejan los órganos linfoides primarios y comienzan a poblar los órganos linfoides secundarios, los sitios principales de la respuesta inmune inducida por antígenos. Ejemplos de órganos linfoides secundarios incluyen: bazo, médula ósea, glándula de Harder, tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT), tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) y tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Saif y col, 2003).

La producción de inmunoglobulinas en las aves presenta diferencias significativas con la de los mamíferos. Durante la embriogénesis ocurre un reordenamiento de los genes que codifican las inmunoglobulinas, limitando de esta manera el número posible de anticuerpos al de precursores de linfocitos B (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

Se han reportado tres clases de inmunoglobulinas en las gallinas, IgA, IgM e IgY. IgA e IgM son similares a las mismas encontradas en mamíferos. La IgY es análoga en función a la IgG del suero de los mamíferos. IgA e IgM son incorporadas al huevo durante su formación. La IgY sérica es transferida hacia la yema mediante un receptor específico para IgY encontrado en la membrana de la yema (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

2.14.1Transferencia de inmunidad pasiva aviar

Las inmunoglobulinas Y (IgY) son anticuerpos presentes en el suero sanguíneo de aves, reptiles, y anfibios. Son transferidas a la yema de huevo a través de una membrana ampliamente vascularizada (saco de la yema) para conferir inmunidad pasiva a la progenie (Diraviyam *et al.*, 2014) (figura 21). El ordenamiento de los genes que codifican éstas inmunoglobulinas ocurre en una sola ola durante la embriogénesis, a diferencia de los mamíferos, en los cuales la formación de anticuerpos es un proceso que continua durante toda la vida, por tanto, en las aves, reptiles y anfibios, el número posible de IgY se limita al número de células B precursoras (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

Los pollitos dependen de los anticuerpos maternos como la principal fuente de inmunidad pasiva hasta que su sistema inmune sea capaz de protegerlos contra las infecciones. Después de haber eclosionado la proteína presente en el saco vitelino es decisiva para la absorción normal del contenido de éste y para la transferencia de inmunoglobulinas Y hacia la circulación del pollo (Ulmer-Franco, 2012).

Las inmunoglobulinas A y M (IgA e IgM) son incorporadas a la clara de huevo durante la ovogénesis mientras que la inmunoglobulina Y es transportada de manera selectiva a la yema por medio de un receptor específico en la superficie de la membrana de la yema (Tressler y Roth, 1987). Las concentraciones aproximadas de IgA e IgM son, respectivamente, 0.15 y 0.7 mg/mL, en tanto que la concentración de IgY en la yema puede llegar a ser de hasta 25 mg/mL (Rose *et al.*, 1974).

La yema de huevo contiene más de 100 mg de IgY (Kovacs-Nolan y Mine, 2007). La cantidad de IgY por mililitro es de 8-20 mg (Ruan *et al.*, 2005).

La mayoría de los componentes de la yema son transferidos del plasma sanguíneo al ovario gracias a un proceso que comienza en la pubertad estimulado por un incremento de estrógeno en plasma (Ulmer-Franco, 2012). La transferencia de IgY desde el torrente sanguíneo hacia el ovario es selectiva sobre proteínas como la albúmina y aumenta de manera proporcional al tamaño del folículo dos o tres días antes de la ovulación (Patterson, 1962a). Al igual que ocurre en mamíferos, la transferencia de anticuerpos al saco de la yema es un proceso dependiente del pH (Tesar *et al.*, 2008).

TESIS TESIS TESIS TESIS

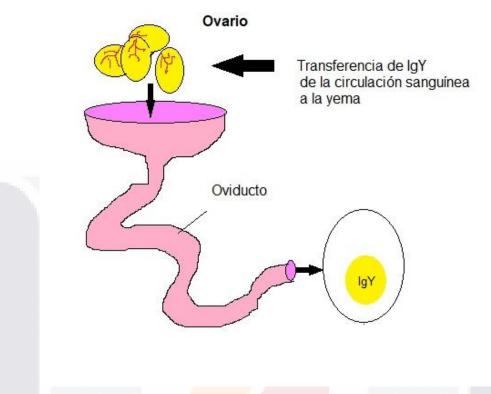


Figura 21 Transferencia de inmunidad pasiva aviar.

Fuente: Elaboración propia.

ESIS TESIS TESIS TESIS

2.15 Propiedades de la inmunoglobulina Y

La inmunoglobulina Y representa el mayor porcentaje de la proteína contenida en la yema de huevo. Protege al embrión contra los patógenos (Justiz Vaillant, 2013).

Aunque es análoga a la IgG de los mamíferos en función, la estructura de la IgY es significativamente diferente (Carlander *et al.*, 1999).

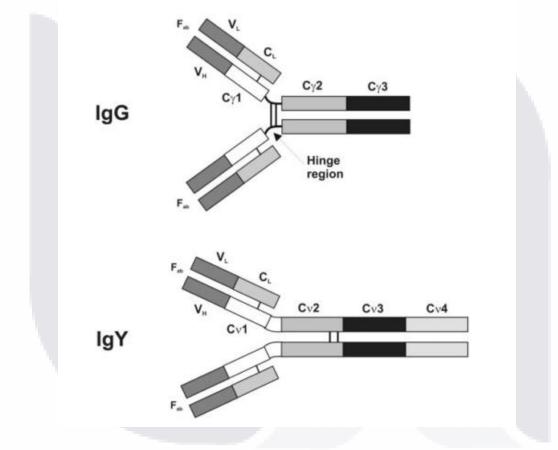


Figura 22 Estructura de IgY e IgG.

Fuente: (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

La figura 22 muestra las diferencias estructurales entre la IgY y la IgG. Contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, tiene una masa molecular de 180 kDa y un peso molecular de 68 kDa. La cadena H no tiene bisagra y posee cuatro dominios constantes adicionales al dominio variable (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

Su estructura consiste en dominios de aproximadamente 115 aminoácidos con residuos de cisteína y triptófano de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L), altamente conservados. Además, un puente disulfuro le confiere su funcionalidad y nivel terciario (Ulmer-Franco, 2012). Es más desordenada que la de la IgG debido a que contiene menos estructuras β. La carencia de una región de bisagra es otro factor que afecta su estabilidad molecular (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

Los dominios terminales de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) son altamente variables (V) y la unión de los dominios $V_H y V_L$ producen un sitio de enlace para el antígeno conocido como la región Fab que proporciona a la IgY su especificidad. Cada molécula de IgY posee dos pares de V_H - $V_L y$ por consiguiente dos sitios de unión de antígeno (Ulmer-Franco, 2012).

La región Fc está conformada por los dominios constantes C_H y C_L, esta región confiere propiedades biológicas para el transporte a través de la membrana incluyendo la vida media y propiedades efectoras secundarias como la iniciación de la fijación del complemento y la opsonización (Davison *et al.*, 2008).

La estabilidad de IgY depende del pH, el calor y la acción de enzimas proteolíticas. La molécula es menos estable en condiciones ácidas. Pierde completamente su actividad a un pH de 3. Es también más sensible al calor, su actividad disminuye si se aumenta la temperatura a más de 70°C o más durante 15 minutos (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

Cuando se adiciona azúcar a una solución con IgY la estabilidad de la molécula incrementa. De esta manera se puede conservar su actividad a temperaturas de 75-80°C, un pH bajo o a condiciones de alta presión (5000kg/cm²) (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

IgY es susceptible a la actividad proteolítica de las enzimas digestivas pepsina, tripsina y quimotripsina (Kovacs-Nolan y Mine, 2007). Es estable por meses dentro del huevo y una vez purificada, puede permanecer viable por años a bajas temperaturas (Larrson, 1993).

El potencial a gran escala, así como el hecho de que provenga de una fuente alimentaria natural, hacen de las inmunoglobulinas Y una herramienta ideal para la transferencia de inmunidad pasiva (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

2.16 Estructura y función de las inmunoglobulinas Y

La inmunoglobulina Y (IgY) es una glicoproteína sintetizada y secretada por los linfocitos B y circulan a través de la sangre y la linfa de las aves donde se une a antígenos. Para que la IgY sea efectiva, debe tener regiones que se unan a antígenos y a células especializadas del sistema inmune (Harlow, 1999).

Cada IgY está formada por dos cadenas pesadas idénticas entre sí y dos cadenas ligeras idénticas entre sí. Una cadena ligera se asocia con el extremo amino terminal de una cadena pesada para formar el fragmento de unión al antígeno (Fab). El extremo carboxilo terminal de las dos cadenas pesadas se une para formar el fragmento cristalizable (Fc) (Harlow, 1999).

El sitio de unión del antígeno está formado por la región variable de las cadenas pesadas y ligeras. Las dos regiones variables presentes en la IgY están estrechamente asociadas y unidas por interacciones no covalentes. Los aminoácidos que forman el sitio de unión al antígeno se derivan tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras y corresponden a los aminoácidos de las regiones hipervariables. Las regiones hipervariables se conocen como Regiones Determinantes de Complementariedad o CDR (del inglés Complementarity Determinant Regions) (Pavón, 2016).

La interacción de un antígeno y un anticuerpo es una reacción de enlace entre dos moléculas y tiene similitudes con las reacciones de enlace de otras proteínas (como la interacción ligando-receptor y la interacción enzima). Es reversible y presenta especificidad y afinidad respecto al anticuerpo (Pavón, 2016).

Las funciones de la inmunoglobulina Y son neutralización y opsonización. Durante la neutralización, las inmunoglobulinas se unen a microorganismos, especialmente virus y toxinas. Al unirse bloquean la acción de dichos antígenos. La IgY puede bloquear las interacciones de un antígeno con su receptor inactivando de esta manera el desarrollo de la enfermedad o, en el caso de los virus, se une a la cápside de tal manera que inhibe el desenvolvimiento del genoma evitando así la replicación y patogénesis (Payne, 2017).

La opsonización está mediada por el sistema del complemento y comienza cuando un complejo antígeno-anticuerpo (complejo Ag-Ab) activa la vía clásica. El primer componente de esta vía es el complejo C1, que circula en el suero sanguíneo en forma activa y está constituido por la proteína C1q, compuesta por seis subunidades idénticas con

cabezas globulares y colas semejantes a las del colágeno, y dos moléculas de cada uno de los zimógenos C1R y C1s (Pavón,2016).

La unión de dos de las fracciones globulares de C1q a diferentes fragmentos cristalizables (Fc) de los anticuerpos adyacentes activa la proteína C1q. Una vez activa, la C1q favorece la autoproteólisis de las C1r que, a su vez, activan a C1s, la proteólisis de este último expone los dominios catalíticos que constituyen una serin-proteasa (Pavón, 2016).

La C1s proteoliza a C4 para conformar C4b que se une covalentemente a carbohidratos de la superficie del antígeno por medio de la exposición de un enlace tioester. En presencia de Mg²⁺, C4b se une no covalentemente a C2 haciendola suceptible de ruptura por C1s para formar otra serin-proteasa, C2a. Es en esta fase cuando se integra el complejo C4b2a, que representa la C3 convertasa de esta vía (Pavón, 2016).

C3 convertasa fragmenta grandes cantidades de C3 plasmática y forma la opsonina C3b, la cual se unirá a la superficie del antígeno, y la anafilotoxina C3a, que iniciará una respuesta inflamatoria local. C3b favorece la fagocitosis al opsonizar los antígenos (Pavón, 2016).

2.17 Antecedentes del uso de las inmunoglobulinas Y (IgY)

Las infecciones causadas por agentes patógenos han estado presentes a lo largo de la historia. Los tratamientos convencionales incluyen un gran número de fármacos. Uno de los fármacos más empleados a nivel mundial son los antibióticos. Estos medicamentos se han utilizado desde hace 70 años aproximadamente.

Debido al uso desmedido de la antibioterapia, actualmente existe una problemática a nivel mundial causada por la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Lo cual dificulta el tratamiento de las enfermedades infecciosas originadas por estos microorganismos (Abbas *et al.*, 2018).

Las infecciones virales pueden prevenirse mediante la vacunación pero esta medida no siempre resulta completamente efectiva pues enfrenta dificultades como las variaciones antigénicas, las respuestas poco eficaces o las respuestas inmunes de corto periodo y en el caso de brotes, el desarrollo de una vacuna puede no ser posible para controlar la diseminación del agente (Abbas *et al.*, 2018).

Considerando lo anterior y las desventajas económicas, de manejo y ambientales que conlleva el uso de tratamientos convencionales, desde hace más de 20 años muchas investigaciones acerca del uso de las inmunoglobulinas Y (IgY) como preventivo, terapéutico e incluso como método de diagnóstico para una amplia variedad de enfermedades se han llevado a cabo en todo el mundo.

En la tabla 4 se muestran los antecedentes del uso de IgY como preventivo a infecciones causadas por agentes patógenos desde el año 2013 al 2018.

Tabla 4. Antecedentes del uso de IgY contra diferentes patógenos.

| Patógeno | Especie objetivo | Uso de IgY | Referencia |
|-------------------------------|--|---|------------------------------------|
| Rotavirus y norovirus | Humanos | Una IgY dual de pollo contra rotavirus y norovirus | (Dai <i>et al.</i> , 2013) |
| Virus y bacterias | Lechones, Ratones, Aves de corral y Becerros | Efecto de los anticuerpos de pollo (IgY) contra diarrea en animales domésticos: un meta análisis sistemático | (Diraviyam <i>et al.,</i> 2014) |
| Prevotella intermedia | Ratas | Efecto protector de una inmunoglobulina derivada de yema de huevo (IgY) contra <i>Prevotella intermedia</i> mediada por gingivitis | (Hou <i>et al.</i> , 2014) |
| Calicivirus | Conejos | IgY de yema de huevo contra la proteina VP60 de la cápside de RHDV promueve la defensa de los conejos contra la infección por RHDV | (Z. X. Li <i>et al.,</i> 2014) |
| Escherichia coli | Ratones | La inmunoglobulina de yema de huevo de pollo desarrollada contra la proteina de fusión LTB-Sta-STb neutraliza la toxicidad de las enterotoxinas termo estables de Escherichia coli | (You <i>et al.</i> , 2014) |
| Aeromonas salmonicida | Carpa koi | Profilaxis de la enfermedad de úlcera en carpa koi mediante baño de inmersión con yema de huevo de pollo conteniendo IgY anti- <i>Aeromonas salmonicida</i> | (Gan <i>et al.,</i> 2015) |
| Parvovirus | Perros | Evaluación de la IgY de pollo generada contra partículas virales iguales a parvovirus canino y el desarrollo de un ensayo inmunoabsorbente de enzimas ligadas ey un ensayo de inmocromatografía para detección de Parvovirus Canino | (He <i>et al.</i> , 2015) |
| Coronavirus | Lechones | Efecto inmunoprofiláctico del anticuerpo de la yema de huevo de pollo (IgY) contra un dominio recombinante S1 de la proteína pico del virus de la diarrea epidémica porcina en lechones | (Lee <i>et al.,</i> 2015) |
| Rotavirus | Becerros | Anticuerpos de la yema de huevo: Una intervención terapéutica contra el grupo A de rotavirus en terneros | (Vega <i>et al.,</i> 2015) |
| Shewanella putrefacens | Rodaballo | Efecto de fragmentos Fab' de anticuerpos (IgY-Fab') de yema de huevo specificos contra <i>Shewanella putrefacens</i> en la preservación de rodaballo refrigerado | (Q. Zhang <i>et al.,</i> 2015) |
| Helicobacter pylori | Humano y conejos | Efectos inhibitorios de rHP-NAP IgY contra la unión de Helicobacter pylori a las células AGS | (Borhani <i>et al.,</i> 2016) |
| Vibrio harveyi y Vibrio | Camarones | Protección inmune pasiva de <i>Litopenaeus vannamei</i> contra infecciones por <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio</i> | (Gao, Zhang, Lin, et al., 2016) |

64

| parahaemol yticus | | parahaemolyticus con yema de huevo (IgY) anti-Vibrio como alimento encapsulado | |
|------------------------------|----------------------|--|------------------------------------|
| Vibrio anguillarum | Lenguado | Efecto de la protección pasiva anti <i>Vibrio anguillarum</i> -IgY con alimento encapsulado contra <i>V. anguillarum</i> en lenguado medio liso <i>(Cynoglossus semilaevi)</i> | (Gao, Zhang, Sun, et al., 2016) |
| Vibrio splendidus | Pepino de mar | Efectos protectores de los anticuerpos de yema de huevo contra infección experimental de pepino de mar (Apostichopus japonicus) con Vibrio splendidus | (X. Li <i>et al.,</i> 2016) |
| virus | Bovinos | Preparación de IgY de pollo contra proteína E2 recombinante del virus de diarrea viral bovina (BVDV) y el desarrollo de ELISA e ICA para su detección | (X. Zhang <i>et al.,</i> 2016) |
| Trypanosom a cruzi | Humanos | Anticuerpos aviares (IgY) contra <i>Trypanosoma cruzi</i> : estudios de purificación y caracterización | (Grando <i>et al.,</i> 2017) |
| Escherichia coli | Lechones | Una combinación de IgY de yema de huevo y fosvitina inhibe el cre <mark>cim</mark> iento de <i>Escherichia coli</i> ent <mark>erotoxig</mark> én <mark>ica K88 y K99</mark> | (Gujral <i>et al.,</i> 2017) |
| Rotavirus | Bovinos | Expresión de <mark>rotavirus bovino</mark> VP8 y preparación de anticu <mark>erpos IgY contra VP8</mark> recombinante | (Kim <i>et al.,</i> 2017) |
| Helicobacter pylori | Humanos | Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos inhibitorios de IgY de tensión cruzada contra anticuerpos policionales de <i>H. pylori</i> | (Solhi <i>et al.,</i> 2017) |
| Clostridium | Humanos | Distribución de I <mark>gY en el colo</mark> n contra la Toxina A y B de Clostridium med <mark>iante enc</mark> apsulación en micro perlas de pectin <mark>ato d</mark> e quitosano y calcio | (Xing <i>et al.,</i> 2017) |
| Infecciones respiratorias | Humanos | Anticuerpos IgY para inmunoprofilaxis y terapia de las infecciones respiratorias | (Abbas <i>et al.,</i> 2018) |
| Vibrio harveyi | Camarones | Propiedades físico-químicas anti <i>Vibrio harveyi</i> del anticuerpo de yema de huevo (IgY) y su influenza inmunológica en el camarón indio blanco <i>Fenneropenaeus indicus</i> | (da Silva <i>et al.,</i> 2018) |
| Aeromonas hydrophila | Pez | Efectos protectores de las inmunoglobulinas de yema de huevo (IgY) contra infección experimental con Aeromonas hydrophila en Megalobrama amblycephala | (Kumaran <i>et al.,</i> 2018) |
| Helicobacter pylori | Ratones | Efecto preventivo de la inmunoglobulina de yema de huevo (IgY) anti-VacA en ratones infectados con Helicobacter pylori | (Qin <i>et al.,</i> 2018) |
| Vibrio cholerae | Ratones lactantes | Los anticuerpos IgY anti- <i>Vibrio cholerae</i> inhiben la mortalidad en ratones lactantes | (Rodgers y Rice, 2018) |

65

Fuente: Elaboración propia

2.18 Uso y ventajas de la inmunoglobulina Y (IgY)

La administración oral de anticuerpos específicos contra varios patógenos es una alternativa interesante para establecer una inmunización pasiva tanto en humanos como en animales. El uso de la inmunoglobulina Y es considerada una fuente más económica de anticuerpos que los obtenidos del suero de mamíferos como los conejos (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

Las principales diferencias entre la producción y obtención de IgY e IgG se resumen en la tabla 5. A diferencia de la inmunidad contra patógenos específicos adquirida mediante la vacunación, la inmunización pasiva se basa en la transferencia de inmunidad humoral en la forma de anticuerpos activos que son tomados de un individuo y administrados a otro (Lee *et al.*, 2009).

Se conoce como "Tecnología IgY" el uso de las inmunoglobulinas contenidas en la yema de huevo (IgY) de gallinas con fines profilácticos e incluso terapéuticos de las enfermedades infecciosas (Vega *et al.*, 2011). Las gallinas que han sido inmunizadas con algún antígeno específico producen grandes cantidades de anticuerpos (IgY) que son transportadas de la sangre hacia la yema de huevo (Nilsson *et al.*, 2012).

Una de las grandes ventajas que ofrece el uso de esta nueva tecnología es que preserva el bienestar animal ya que los anticuerpos se recolectan del huevo producido por gallinas, de esta manera no es necesario extraer sangre de algún animal (Chalghoumi *et al.*, 2008). Adicionalmente, dado de que el abuso de medicamentos como los antibióticos se ha convertido en un serio problema de salud pública, se hacen necesarias alternativas que promuevan tanto la salud humana como la animal sin representar riesgos a mediano y largo plazo para las mismas (Lee *et al.*, 2012).

A diferencia del suero sanguíneo de los mamíferos, la yema de huevo contiene una clase única de anticuerpos, IgY, los cuales pueden ser purificados fácilmente mediante técnicas de precipitación simples (Gassmann *et al.*, 1990). Además, es necesaria una cantidad mucho menor de antígeno para producir una respuesta eficiente en las gallinas (Larsson, 1998). Puesto que los títulos de anticuerpos se mantienen elevados en estas aves, se disminuye el número necesario de inmunizaciones. La tecnología IgY está incluida

dentro de los tres principios del bienestar animal: reducción, refinamiento y reemplazo de animales de laboratorio (Vega *et al.*, 2011).

Puesto que la distancia evolutiva entre aves y mamíferos es muy amplia, las inmunoglobulinas que produce una gallina pueden reaccionar a más epítopos de un antígeno humano que las obtenidas de algún otro mamífero (Nilsson *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se ha demostrado que los huevos de gallinas hiperinmunizadas tienen propiedades anti-inflamatorias y antidiarreicas y ofrecen una variedad de beneficios a otros sistemas del cuerpo humano incluyendo el circulatorio, el inmune y las articulaciones (Vega *et al.*, 2012). Asimismo, dado que el huevo es un componente común en la alimentación del humano, el riesgo de efectos colaterales por el consumo de IgY es prácticamente nulo (Carlander *et al.*, 2000).

Los anticuerpos presentes en la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas tienen propiedades bioquímicas que reducen la interferencia en muchos ensayos inmunológicos debido a que no interactúan con factores reumatoides y tampoco activan el sistema de complemento del ser humano, por ende, no se presentan reacciones cruzadas (Nilsson *et al.*, 2012).

El potencial de esta nueva tecnología es tan extenso que se ha llegado a utilizar para la producción de sueros contra el veneno de arañas, serpientes y escorpiones (antisueros). El primer antisuero para humanos fue preparado por Calmette en 1894 (Sevcik et al., 2008).

Tabla 5. Comparación de la producción y características de IgG e IgY

| | Mamíferos (IgG) | Pollo (IgY) |
|---|----------------------------|-------------------|
| Fuente de Ig | Suero sanguíneo | Yema de huevo |
| Obtención de Ig | Extracción de sangre | Colecta de huevo |
| Procedimiento | Invasivo | No invasivo |
| Cantidad de Ig | 200mg/extracción de sangre | 50-100mg/huevo |
| Tamaño de la muestra obtenida | 40mL da sangre | 5-7 huevos/semana |
| Cantidad de Ig/año | 1400mg | 40,000mg |
| Cantidad de Ig específica | ~5% | 2-10% |
| Unión de proteína A/G | Sí | No |
| Interferencia con factores reumatoides | Sí | No |
| Activación del complemento de mamíferos | Sí | No |

Fuente: (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

2.19 Uso de IgY como preventivo de Diarrea Neonatal del Ternero

Los antibióticos se han usado por más de cincuenta años con diferentes propósitos, a dosis sub-terapéuticas como promotores del crecimiento, a dosis preventivas con fines profilácticos y a dosis terapéuticas como tratamiento de enfermedades infecciosas. Debido a esto en los últimos años se ha registrado una resistencia bacteriana a estos fármacos cada vez mayor (Diraviyam *et al.*, 2014).

Recientemente múltiples investigaciones se han centrado en el uso de IgY como alternativa al uso de anticuerpos obtenidos del suero de mamíferos para varias aplicaciones, en especial, para la inmunización pasiva por vía oral contra patógenos como virus y bacterias (Kovacs-Nolan y Mine, 2007).

La administración oral de IgY especifica obtenida de gallinas hiperinmunizadas ha demostrado ser una herramienta efectiva contra patógenos intestinales, especialmente los causantes de diarrea (Diraviyam *et al.*, 2014)

La diarrea es la enfermedad más común de los terneros recién nacidos y la primera causa de mortalidad. La estrategia actual para el control de esta enfermedad se basa en la vacunación de la madre para proteger a la cría mediante la inmunización pasiva que recibe el ternero al ingerir calostro. Esta estrategia puede reducir la diarrea severa pero no previene las infecciones (virales o bacterianas) para las cuales la madre no estaba vacunada y tampoco previene la aparición de los signos clínicos (Vega et al., 2011).

La administración oral de calostro enriquecido con inmunoglobulinas de yema de huevo ha sido propuesta como una herramienta eficaz en la prevención de infecciones entéricas por la inmunización pasiva que provee (Lee *et al.*, 2012). Considerando la susceptibilidad de los neonatos a las infecciones, la presencia de anticuerpos transmitidos de manera pasiva en la luz intestinal tiene un papel crítico en la protección contra enfermedades (Parreno *et al.*, 2010).

2.20 Gamma Glutamil Transferasa (GGT)

Al igual que las inmunoglobulinas esta enzima es absorbida por la ternera cuando consume calostro (Weaver *et al.*, 2000). Es una enzima involucrada en la transferencia del residuo γ-glutamil de la formación de aminoácidos a péptidos γ-glutamil, H₂O, y otros péptidos pequeños. En la mayoría de los sistemas biológicos el glutatión sirve como donador de γ-glutamil. Se cree que esta enzima está implicada en la síntesis de péptidos y proteínas, en la regulación de los niveles de glutatión en los tejidos y en el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares (Bishop *et al.* 2010).

La GGT se asocia predominantemente a las microvellosidades de los hepatocitos, a las células del epitelio biliar, a las células del epitelio de los túbulos renales y a las células de la glándula mamaria (especialmente durante la lactancia). El calostro bovino contiene una alta actividad de GGT. Los neonatos pueden tener una actividad sérica muy alta de GGT (más de 1000 veces que la actividad en adultos). Esta enzima puede ser muy útil como indicador de transferencia de inmunidad pasiva en estos animales. El epitelio de la glándula mamaria en lactación es la fuente del incremento de la actividad de esta enzima (Latimer *et al.* 2003).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos en México (Secretaría de Economía, 2012).

La etapa de crianza de becerras tiene uno de los principales problemas que afronta el sector productivo lechero. Durante las primeras semanas de vida aproximadamente 40% de la población de terneras presenta diarrea (García, 2014). Las consecuencias de esta enfermedad impactan negativamente en distintos aspectos, abarcando no solamente el de salud, sino también el productivo y, uno de los más importantes en todo sistema de producción, el económico (Cho y Yoon, 2014).

Las pérdidas son directas (muerte del animal afectado) e indirectas (costos productivos extra en tratamientos aunado a la baja ganancia de peso de los animales enfermos) (Badaracco *et al.*, 2012).

La solución a esta problemática es multifactorial (Coura *et al.*, 2015). Dentro de los métodos de combate una medida que ha tomado creciente importancia en la prevención, tratamiento y control de la diarrea de las terneras se centra en la inmunización pasiva de los animales por medio de la administración de inmunoglobulinas Y (IgY) provenientes de la yema de huevo depositado por gallinas previamente inmunizadas contra determinado antígeno (Diraviyam *et al.*, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN.

Una de las grandes ventajas que ofrece el uso de IgY es el bajo costo de producción y la cantidad que se puede llegar a obtener, que supera al de su análoga IgG, la cual además de conseguirse mediante procesos que cuestan mucho a la industria porque las cantidades logradas en cada proceso son muy pequeñas también lo hace con métodos invasivos para los animales de los que se extrae, lo anterior implica que cada individuo sometido a esos procedimientos carece de bienestar.

Para obtener inmunoglobulinas Y las gallinas deben ser expuestas a los antígenos causantes de la diarrea neonatal de los terneros (hiperinmunización) para que de esta manera puedan generar anticuerpos específicos. Estos anticuerpos se encuentran en la yema de huevo y pueden administrarse vía oral para transferir inmunidad pasiva a los neonatos.

Lo anterior toma gran relevancia no sólo debido a la rentabilidad que ofrece utilizar estas inmunoglobulinas por lo poco que cuesta producirlas, algo que es sumamente importante es que esta nueva tecnología preserva el bienestar animal. Los anticuerpos son obtenidos directamente de la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas, por lo cual, solamente se hace necesaria la recolección de cada uno de éstos después de la inmunización. El aislamiento de los anticuerpos es rápido y fácil, además, son necesarias cantidades muy pequeñas de antígeno para obtener altos y duraderos títulos de IgY. Un huevo contiene aproximadamente la misma cantidad de inmunoglobulinas que las encontradas en una extracción de sangre de un conejo (Gassmann *et al.*, 1990).

La sociedad está cada vez más preocupada por evitar el maltrato de los animales (de compañía y de abasto) en respuesta a una mayor concientización de que el alimento será perjudicial para la salud si los seres de los que proviene son restringidos de alguna de sus libertades, asimismo lo será si son manipulados de alguna forma para forzarlos a aumentar la producción, cuyas consecuencias terminan disminuyendo también la calidad de vida humana.

Además de esto, la resistencia bacteriana derivada del uso indiscriminado de los antibióticos y la creciente demanda de alimentos orgánicos por la sociedad hace necesaria la investigación y aplicación de alternativas a estos medicamentos. La utilización de

inmunoglobulinas Y como preventivo de diarrea neonatal del ternero no solamente disminuiría los costos de producción (puesto que no sería necesario administrar un tratamiento a las becerras), sino que además podría dar un valor agregado a los productos de ese establo como mayor calidad y seguridad alimentaria.

El cuidado y manejo correcto de las becerras lecheras desde el nacimiento tiene efectos substanciales a corto y largo plazo, desde afectar los índices de morbilidad y mortalidad (Trotz-Williams et al., 2008) hasta tener implicación en la primera lactancia de la vaquilla (Gelsinger et al., 2015). Asimismo, se reduce la mortalidad en el periodo post-destete y la edad al primer parto, se obtiene una tasa de ganancia mejorada y una alimentación eficiente, así como una mejora en la producción de la primera y segunda lactancia, por tanto, se reduce la tendencia al sacrificio de los animales durante la primera lactancia (DeNise et al., 1989).

La administración de IgY como alternativa al uso de antibióticos y otros tratamientos convencionales supone también beneficios económicos puesto que los últimos superan en precio a la IgY.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Ubicación

La investigación se llevó a cabo en dos etapas. La primera consistió en la producción de huevo hiperinmune, la cual se realizó en las instalaciones de La Posta Agropecuaria, en el Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, ubicada en el municipio de Jesús María a una altura de 1,880 msnm, sus coordenadas son 10 20 21' longitud oeste y 21 05 08' latitud norte. El clima predominante es de tipo estepario con una temperatura media anual de 17°C, y una precipitación pluvial de 531 mm. De acuerdo a la clasificación de Köeppen, modificada por García (1998) el clima es BSkw.

El trabajo de la segunda etapa se realizó en el establo lechero "Granja Lupita", ubicado en el municipio de Pabellón de Arteaga del Estado de Aguascalientes a una altura de 1,900 msnm, sus coordenadas son: 22°10'19.1" latitud norte y 102°16'59.1" longitud oeste (figura 23). El clima predominante es semicálido, la temperatura media anual es de 18°C y la precipitación pluvial de 440 mm. De acuerdo a la clasificación de Köeppen, modificada por García (1998) el clima es BSkw.



Figura 23 Ubicación del establo lechero: Granja Lupita.

5.1.1 Características del establo

En el establo "Granja Lupita" se cría ganado lechero de raza Holstein. El número total de animales es de 3500. Tiene aproximadamente 60 partos mensuales de los cuales aproximadamente 30 corresponden a hembras y 30 a machos. Los becerros son enviados a rastro en un máximo de 24 horas después del nacimiento. Las becerras son separadas de su madre al nacimiento. Se las traslada al área de recría y se les ubica en una becerrera individual de madera con cama de aserrín.

Se les suministra el 10% de su peso vivo de sustituto de calostro enriquecido con inmunoglobulinas (Calostro Bovino Completo de Bayer) con biberón o sonda en las primeras seis horas posteriores al nacimiento. A partir de 12 a 24 horas sucesivas reciben alimentación dos veces al día con dos litros de sustituto de leche (Bionat Sano) en cada toma con biberón durante las primeras 12 a 96 horas de vida y después de este periodo con cubeta. A partir del segundo día se les proporciona alimento seco a base de concentrado (50%) y maíz rolado (50%). El destete se realiza una vez que las becerras consuman 2.5 kg de alimento seco y 0 litros de leche, esto ocurre aproximadamente a los 60 días de vida.

5.2 Material biológico

5.2.1 Primera etapa

Para la primera etapa del proyecto, se construyeron cinco módulos de dos jaulas cada uno. Cada módulo mide 2 m de largo x 1 m de ancho x 1.80 m de altura y tiene una división longitudinal que da como resultado dos jaulas de 1 m de largo x 1 m de ancho x 1.80 m de altura. Se fabricó una puerta para cada jaula.

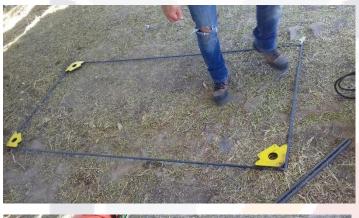






Figura 24. Elaboración de jaulas para alojar a las gallinas.

Dichos módulos tienen aristas de hierro elaboradas con varillas cuadradas de 3/8", las caras (excepto la que está en contacto con el suelo), las puertas y la división longitudinal de dichos módulos están hechas de malla hexagonal de acero inoxidable de 1/2". La malla está tejida a las aristas con hilo nylon y con puntos de refuerzo hechos con alambre recocido.



Figura 25. Colocación de la malla en las jaulas.

Los módulos fueron construidos por el Ing. Jesús Patricio Sánchez Rodríguez y el personal de mantenimiento del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) en el área de mantenimiento del mismo Centro. La malla fue colocada por la M.V.Z. Ilsse Patricia Sánchez Garay. Las dimensiones fueron basadas en el bienestar de las aves.

Cada una de las jaulas se equipó con lo necesario para albergar a las gallinas. Se instaló un bebedero automático de copa por jaula, así como también comederos de tolva de lámina galvanizada. Se colocó una cama de paja en las jaulas para hacer más fácil la limpieza y para ofrecer mayor comodidad a las aves.



Figura 26. Alojamiento de las gallinas en jaulas equipadas.

Por medio de la Asociación de Avicultores de Aguascalientes se adquirieron 40 gallinas de estirpe Bovans que fueron recibidas a las 100 semanas de edad. Posteriormente se ubicaron 4 animales por jaula. Las aves de las jaulas 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, y 10 se hiperinmunizaron y las aves de las jaulas 5 y 6 permanecieron sin hiperinmunizar. Se les ofreció alimento de postura manufacturado en el Centro de Ciencias Agropecuarias hecho a base de grano (maíz, sorgo, trigo), enriquecido con vitaminas y minerales. Tanto el alimento como el agua estuvieron a libre acceso. Se realizaron labores de limpieza dos veces por semana en cada una de las jaulas. La recolección del huevo se realizó diariamente.



Figura 27. Distribución de las aves en las jaulas.

La yema se separó de la clara con un separador de yema, después las yemas se colocaron en bolsas de cierre hermético de acuerdo a la dosis correspondiente para cada becerra, hecho esto, dichas bolsas se almacenaron en un congelador hasta su uso.



Figura 28. Almacenamiento de yema hiperinmune en bolsas rotuladas con la hora de administración prevista y los gramos de yema de huevo contenidos (dosis simple y/o dosis doble).

5.2.2 Segunda etapa

Se seleccionaron cuarenta becerras Holstein recién nacidas de parto no distócico y que no hubieran tomado calostro y se asignaron aleatoriamente a uno de los ocho tratamientos. Seis de los grupos recibieron dos dosis diferentes de IgY específica para diarrea neonatal, 1,200 y 2,400 mg que correspondieron a 150 y 300 g de yema de huevo respectivamente, mismas que se administraron por medio del calostro a las 2 horas de vida de las terneras en los seis grupos, posteriormente, se administraron mediante leche a las 120 y 240 horas de vida solamente a cuatro de los seis grupos. Otro grupo recibió 1,200 mg de IgY inespecífica correspondiente a 150 g a las 2hrs de nacimiento y el grupo restante no recibió IgY, únicamente calostro durante las primeras cuatro horas de vida y después leche (Tabla 6).

Tabla 6. Tratami<mark>entos pa</mark>ra los grupos de becerras

| Tratamiento | lgY (mg) | Yema de huevo (g) | Yema de huevo hiperinmune | Tiempo de administración (hrs) | Modo de administración |
|------------------|-------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| | | . 1 | Sí-No | | |
| Control negativo | 0 | 0 | No | 0 | Calostro solo |
| YO | 1,200 | 150 | No | 2 | Calostro |
| Y2 | 1,200 | 150 | Sí | 2 | Calostro |
| Y2D | 2,400 | 300 | Sí | 2 | Calostro |
| Y120 | 1,200 | 150 | Sí | 2 y 120 | Calostro/Leche |
| Y120D | 2,400 | 300 | Sí | 2 y 120 | Calostro/Leche |
| Y240 | 1,200 | 150 | Sí | 2, 120 y 240 | Calostro/Leche |
| Y240D | 2,400 | 300 | Sí | 2, 120 y 240 | Calostro/Leche |

5.3 Métodos para obtener IgY hiperinmune

Treinta gallinas de 105 semanas de edad se hiperinmunizaron en el Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes a las 105 semanas de edad con una vacuna polivalente (Scour Bos 9 del laboratorio Novartis) que contiene tres aislados diferentes de rotavirus bovino incluyendo los serotipos G10, G6 Y G8, cuatro aislados diferentes de *Escherichia coli* K99, y antígenos contra coronavirus bovino y *Clostridium perfringens* tipo C. Con ayuda de una persona que sujetara al ave se desinfectó el sitio a inyectar, luego se administró 1 mL de la vacuna a cada ave vía IM (0.5 mL en cada músculo pectoral). Luego de 14 días se analizó el título de anticuerpos IgY de la yema de los huevos recolectados.

Quince días después (a las 107 semanas de edad de las gallinas) de la primera hiperinmunización se utilizó la mitad de la dosis inicial de vacuna y se hiperinmunizó a las aves por segunda ocasión con el objetivo de obtener mayor cantidad y especificidad de anticuerpos, diez días posteriores a la revacunación se analizó nuevamente la titulación de inmunoglobulina Y en la yema.

5.3.1 Extracción de IgY

Se recolectaron los huevos (hiperinmunizados y no hiperinmunizados) diariamente. Cuidadosamente se rompió el cascarón del huevo, luego se separó la yema de la clara con un separador de yemas, la yema se transfirió entonces a una toalla de papel y se enjuagó con agua destilada con el fin de remover el exceso de clara aún adherida a la membrana de la yema. Las membranas que envuelven la yema se rasgaron y su contenido se vertió en un tubo Falcon de 50 mL.



Figura 29. Separación de yema de huevo para la realización de la prueba de sulfato de zinc.

Nota: La técnica de extracción de IgY no se realizó por cuestiones de disponibilidad de laboratorio debido al cierre temporal de las Universidades en atención al llamado de las autoridades respecto a la contingencia sanitaria para evitar la propagación del Covid-19 (ver Anexo C). Se continuará con la realización de esta técnica, la obtención y el análisis de resultados como parte de una investigación de doctorado en un plazo de 1 a 2 años.

5.3.2 Evaluación de IgY en yema de huevo

Se tomaron 2 mL de la solución obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente y se colocaron en cubetas para espectrofotometría. Previo a la realización de las lecturas se llevó a cabo una curva de calibración con IgG para tener una referencia durante la interpretación de los resultados (ver tabla 7). Para realizar la curva de calibración se diluyeron 40 mg de IgG en 1 mL de agua destilada. Se agregaron 6 mL de sulfato de zinc a tubos Falcon de 12 mL, la prueba de hizo por duplicado para cada concentración de inmunoglobulina (0 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg y 40 mg) por lo que se utilizaron 10 tubos. Después se agregó agua destilada y/o IgG de acuerdo al siguiente criterio:

Tabla 7. Cantidad de agua destilada e IgG utilizadas para realizar la curva de calibración.

| μL de agua destilada | μ <mark>L de Ig</mark> G | Concentración final (mg) | |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| 100 | 0 | 0 | |
| 75 | 25 | 10 | |
| 50 | 50 | 20 | |
| 25 | 75 | 30 | |
| 0 | 100 | 40 | |

Posteriormente cada tubo se dejó incubar durante una hora. Quince minutos antes de que se cumpliera el tiempo de incubación se encendió el espectrofotómetro. Cumplido dicho tiempo se realizó la lectura cero (la cubeta contenía únicamente sulfato de zinc) y después de las muestras con IgG.

Para llevar a cabo la lectura de las muestras del huevo recolectado se separó cuidadosamente la yema de la clara con un separador de yemas de plástico. Después la yema se transfirió a una toalla de papel para retirar el exceso de clara. Se enjuagó la yema con agua destilada (aún en la toalla de papel). Se rompió la yema y se recolectaron 5 mL del contenido en dos tubos Falcon de 50 mL. Se agregó una solución PBS y TWEEN a razón de dos partes de solución por una yema. Se centrifugó en una centrifuga refrigerada

a 4000 rpm durante 20 minutos. Se filtró el sobrenadante con un papel filtro Wattman #1. Se agregaron 6 mL de sulfato de zinc a tubos Falcon de 12 mL. Luego se agregaron 100 µL del filtrado a cada tubo y se dejó incubar por una hora. El espectrofotómetro se encendió 15 minutos antes de finalizado el tiempo de incubación. Se realizó una lectura cero con sulfato de zinc y posteriormente la lectura de las muestras por triplicado.

5.3.3 Almacenamiento de la yema de huevo

Cuando se obtuvo la titulación deseada de inmunoglobulinas por mL de yema (aproximadamente 140mg/mL), se rompió el huevo y cuidadosamente se separaron las yemas de las claras. Se colocaron en un recipiente de plástico de acuerdo a la dosis establecida de 1,200 y 2,400 mg, lo que corresponde a 150 y 300 g respectivamente y se mezclaron con un tenedor. Luego se empaquetaron en bolsas resellables de plástico y se congelaron a -5°C.

5.4 Métodos para evaluar la respuesta inmune de las becerras

5.4.1 Pesaje de las becerras

Las becerras se pesaron al nacimiento y al destete con el objetivo de realizar una comparativa entre el peso inicial y el final puesto que un sistema inmune apto garantiza un adecuado estado de salud y lo anterior se verá reflejado en una correcta ganancia de peso.

5.4.2. Clasificación de las heces

Se determinó la incidencia de diarrea utilizando una adecuación al sistema establecido por Vega *et al.* (2015): 0: normal, 1: pastosa, 2: semi-líquida y 3: líquida, considerando una puntuación igual o mayor que 2 como diarrea (ver Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación de las heces

| Características de las heces | Puntuación | | |
|------------------------------|------------|--|--|
| Normal | 0 | | |
| Pastosa | 1 | | |
| Pastosa con sangre | 1.5 | | |
| Semi-líquida | 2 | | |
| Semi-líquida con sangre | 2.5 | | |
| Líquida | 3 | | |
| Líquida con sangre | 3.5 | | |

5.4.3. Determinación de inmunoglobulinas séricas (IgG e IgY)

Se extrajeron 5 mL de sangre de cada becerra a las 2 (antes del calostrado), 72, 120, 240 y 360 horas de vida por venopunción de la vena yugular con una aguja de 21 G x 1.5" y un tubo Vacutainer de tapa roja sin anticoagulante (BD Diagnostic Systems). Cada tubo se identificó con el ID del animal y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos para luego centrifugarlo a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga. Se recolectó el suero (sobrenadante) y se depositó en tubos Eppendorf. Se obtuvieron tres alícuotas de 0.5mL de cada muestra de sangre y se congelaron para su análisis posterior en el laboratorio de investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Se llevó a cabo la técnica de precipitación con sulfato de zinc para analizar el contenido de IgG en el suero sanguíneo (Anexo B).

5.4.4 Gamma-Glutamil Tansferasa (GGT)

La enzima Gamma-Glutamil Transferasa (GGT) en la muestra cataliza la transferencia del grupo glutamil de GLUPA-C a glicilglicina. La cantidad de 5-amino-2-nitrobenzoato formado es proporcional a la actividad de GGT y puede ser medido cinéticamente a 405 nm.

5.4.5. Morbilidad y mortandad

Con los resultados obtenidos se calculó la morbilidad y la mortandad. Para la morbilidad se calculó la incidencia de diarrea en los grupos tratados y el grupo control (Tabla 9).

Tabla 9. Incidencia de diarrea cada uno de los grupos.

| | Incidencia de diarrea | | | | | |
|---|-------------------------|---------------|--|--|--|--|
| 7 | Grupos tratados con IgY | Grupo control | | | | |
| | 8.57% | 34.88% | | | | |
| | | | | | | |

También se calculó la incidencia de diarrea con respecto al número total de becerras contempladas en la investigación (población) (Tabla 10).

Tabla 10. Incidencia de diarrea en la población experimental.

| Incide <mark>ncia de di</mark> a | rrea en la población |
|---------------------------------------|----------------------|
| Grupos tratados <mark>con Ig</mark> Y | Grupo control |
| 3.84% | 19.23% |

La prevalencia calculada con base en los datos obtenidos se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Prevalencia de diarrea en cada grupo.

| Prevalencia | Prevalencia de diarrea | | | | |
|-------------------------|------------------------|--|--|--|--|
| Grupos tratados con IgY | Grupo control | | | | |
| 10.98 | 63.9 | | | | |

Los datos de las muertes de becerras a causa de diarrea en los grupos tratados con IgY y en el grupo control se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Muertes a causa de diarrea en los grupos tratados con IgY y en el grupo control

| Muertes a causa de diarrea | | | |
|----------------------------|----------------------|---------------|--|
| Grup | oos tratados con IgY | Grupo control | |
| | 0 | 5 | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

5.4.6. Análisis económico

Se obtuvo información acerca de los protocolos de tratamiento utilizados de acuerdo a la severidad de la diarrea, así como del costo por día de cada uno y aproximadamente por cuánto tiempo se aplica cada uno de ellos. Los datos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Protocolos utilizados de acuerdo a la severidad de la diarrea y su costo/día/becerra

| Protocolo | Costo / día / becerra | Promedio de días de tratamiento | |
|-----------|------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | \$ <mark>37.49</mark> | 4 | |
| 2 | \$ <mark>67.68</mark> | 4-5 | |
| 3 | \$533.6 <mark>4</mark> | 5-6 | |
| 4 | \$572.14 | 5-6 | |
| | | | |



5.5 Modelo experimental

5.5.1 Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de muestra se realizó utilizando la fórmula:

$$n = 2*t^2 (\%C.V.)^2/(\%dif)^2$$

Donde:

n = tamaño de muestra.

 $t = 1.96^2$

%C.V. = porcentaje del Coeficiente de Variación.

%dif = porcentaje de diferencia.

 $n = 2*2^2 (0.2)^2/(0.4)^2$

Utilizando datos preliminares donde el coeficiente de variación (DE/Media)= 5/25= 0.04 y, el porcentaje de diferencia esperado es de 0.4, lo que da una n por tratamiento de 2 animales. Se utilizarán 5 animales para toma de muestra de sangre y para análisis de IgG y GGT y peso y talla hasta el destete. Para la morbilidad y mortalidad se utilizó los 40 animales de la muestra experimental y los 38 animales restantes.

5.5.2 Desarrollo del experimento

De una población de 78 becerras de raza Holstein recién nacidas se utilizaron 40 de parto no distócico. Se distribuyeron de manera aleatoria en ocho grupos de cinco animales cada uno (n=5) los cuales recibieron alguno de los tratamientos.

Las becerras fueron retiradas de la madre al nacimiento y alojadas en jaulas individuales de madera de 2.00 m de largo por 1.40 m de ancho, equipadas con techo de lámina y cama de aserrín. Cada jaula cuenta con un comedero de madera con tapa y una cubeta de plástico de 4 L de capacidad como bebedero en el cual se les suministra también la leche.

El calostrado artificial se realizó dentro de las primeras 2 a 6 horas posteriores al nacimiento. Para preparar el calostro artificial se utilizaron 2 litros de agua a una temperatura de 55°C y se le añadieron 1,050 g de sustituto de calostro del laboratorio Bayer (Calostro® Bovino Completo) el cual proporciona 100 g de inmunoglobulina G por cada 470 g de producto seco. Se le agregaron también 40 g de un enriquecedor de calostro (First Defense ®,) que aporta 160 mg de inmunoglobulinas IgG por cada 40 g de producto (para conocer el análisis nutricional ver anexo C). Para homogenizar los constituyentes se utilizó una batidora casera de alimento Koblenz modelo BMKM- 150 PB. Una vez hecho esto se obtuvo un aproximado de 4 litros de calostro.

Para preparar el calostro destinado a los individuos asignados a los tratamientos con yema de huevo se siguieron las pautas anteriores de preparación del mismo y únicamente se añadió la dosis y el tipo de yema determinada, se mezcló de la manera antes descrita y se administró a la becerra.

El calostro se administró con biberón a razón del 10% de su P.V. Se les aplicó una vacuna intranasal del laboratorio Zoetis contra Parainfluenza 3, Rinotraqueítis y Virus Respiratorio Sincitial Bovino al día de nacidas así como también 2 mL de selenio vía intramuscular.

Las becerras se pesaron en el día 1 posterior al parto. Se les colocó un arete en la oreja izquierda con el número propio de animal y el nombre del padre en la parte frontal y con el número de la madre y la fecha de nacimiento en la parte trasera. A partir del segundo día de vida se les ofrecieron 4 litros de sustituto de leche (Sanolac Lila Citro) divididos en

dos tomas al día. Para la administración de la yema hiperinmune a las 120 y 240 horas se mezcló la yema con la leche y luego se les daba suministraba a las terneras.



91

5.5.3. Tratamientos

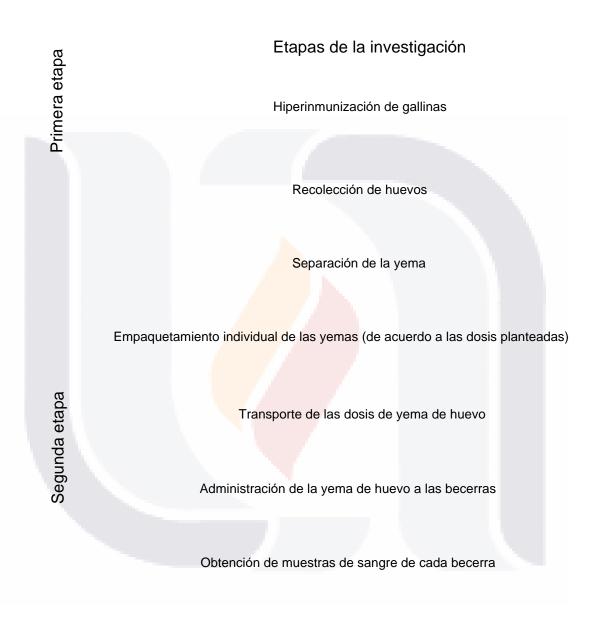
Los tratamientos fueron implementados de manera factorial para obtener datos de la respuesta de las terneras a diferentes dosis y tiempos de administración. La tabla 14 muestra el diseño del experimento.

Tabla 14. Comparación entre tratamientos

| Tratamiento | | lgY (mg/dosis) | Yema de huevo (g) | Yema de huevo hiperinmune | Tiempo de administración (hrs) | Modo de administración |
|------------------|---|-------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| | n | | | Sí-No | | |
| Control negativo | 5 | 0 | 0 | No | 0 | Calostro solo |
| YO | 5 | 1,200 | 150 | No | 2 | Calostro |
| Y2 | 5 | 1,200 | 15 <mark>0</mark> | Sí | 2 | Calostro |
| Y2D | 5 | 2,400 | 300 | Sí | 2 | Calostro |
| Y120 | 5 | 1,200 | 150 | Sí | 2 y 120 | Calostro/Leche |
| Y120D | 5 | 2,400 | 300 | Sí | 2 y 120 | Calostro/Leche |
| Y240 | 5 | 1,200 | 150 | Sí | 2, 120 y 240 | Calostro/Leche |
| Y240D | 5 | 2,400 | 300 | Sí | 2, 120 y 240 | Calostro/Leche |

- Contraste 1: Control negativo vs. Todos (consumo de yema)
- Contraste 2: Yema no hiperinmune vs. Yema hiperinmune.(Y0 vs. Resto)
- Contraste 3: Dosis simple de yema hiperinmune vs. Dosis doble de yema hiperinmune (Y2 vs Y2D, Y120 vs. Y120D, Y240 vs. Y240D)
- Contraste 4: Dosis única de yema hiperinmune vs. Dosis repetida de yema hiperinmune (Y2 vs Y120 y Y240) y de la misma manera para las dosis dobles (Y2D vs Y120D y Y240D)
- Contraste 5: Dosis en dos tiempos vs. Dosis en tres tiempos (Y120 vs. Y240) y de la misma manera para las dosis dobles (Y120D vs. Y240D)

5.5.4. Etapas de la investigación



Cuantificación de IgG, PT y ALB

Resultados

Figura 30. Diagrama de las etapas de la investigación

5.6 Análisis estadístico

Se realizó una exploración visual de los datos mediante el uso de gráficos y se utilizó un diseño completamente al azar para comparar cada uno de los ocho tratamientos en función de las horas de muestreo (2, 72, 120, 240 y 360). Se realizó la prueba de homocedasticidad de los datos con el método de Levene, así como también la prueba de normalidad con el método de Anderson Darling. Posteriormente los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) mediante el procedimiento para modelos lineales generales (GLM). Se realizó la comparación de los tratamientos con yema contra el grupo control mediante el método de Dunnett y una comparación entre todos los tratamientos con el método de Fisher en el software Minitab 15.

Para los casos de morbilidad y mortalidad se utilizará un análisis de supervivencia (Hernández, 2010) que permitirá analizar el tiempo que transcurre hasta que se presente diarrea y muerte respectivamente tanto en la población experimental como en la población control.

6. RESULTADOS

6.1 Ig's en suero sanguíneo de las becerras

Se realizó la técnica de precipitación con sulfato de zinc para determinar la concentración de IgG en las muestras de suero sanguíneo de las becerras del experimento. Los resultados que se exponen a continuación son presentados con respecto al tiempo de vida de las becerras con el objeto de analizar y facilitar la visualización y comparación del comportamiento de los niveles de anticuerpos de acuerdo a cada tratamiento.

En la figura 31 se presenta una comparación del promedio de la cantidad de IgG en cada uno de los tratamientos. La mayor titulación de anticuerpos se obtuvo en los tratamientos de 150 y 300 g de yema hiperinmune (dosis simple y dosis doble) administrada a las 2 horas de vida de las becerras. Los tratamientos de yema control y de 150 g de yema hiperinmune a las 120 y 240 horas de vida demostraron tener una titulación media de anticuerpos. Los tratamientos correspondientes a los grupos control y de 300 g de yema hiperinmune a las 120 y 240 horas de nacimiento de las terneras presentaron la menor titulación de anticuerpos.

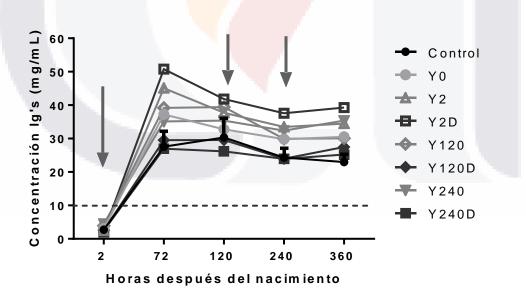


Figura 31 Concentración de Ig's en suero sanguíneo en los grupos de becerras que recibieron algún tratamiento yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control respecto a las horas después del nacimiento.

Y0= Yema no hiperinmune; Y2= 150 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida Y2D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida. Y120= 150 g de yema hiperinmune a las 2 y 120 horas de vida; Y120D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 y 120 horas de vida; Y240= 150 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida; Y240D= 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida; Y240D= 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida. Las flechas indican el tiempo en el que fue administrada la yema (2, 120 y 240 horas después del nacimiento). La línea punteada indica la cantidad mínima de IgG necesaria para una transferencia exitosa de inmunidad pasiva. Se observa una diferencia a las 72, 240 y 360 horas entre el grupo control y los grupos Y0, Y2, Y120, Y240 y Y2D. A las 120 horas la diferencia estadísticamente significativa se presenta entre el grupo control y los tratamientos Y2 y Y2D.

El comportamiento que se presentó en la concentración de IgG en los tratamientos de 150 y 300 g de yema hiperinmune a las 2 horas de nacimiento es muy parecido, se observa diferencia a las 120 horas para luego volver a comportarse de manera muy similar y finalmente tener una mínima diferencia a las 360 horas.

A pesar de haber mostrado un comportamiento similar al de los tratamientos de 150 y 300 g de yema hiperinmune a las 120 y 240 horas, las becerras que recibieron 150 g de yema control tuvieron una titulación menor de anticuerpos a las 360 horas.

El tratamiento que consto de la ad<mark>ministrac</mark>ión de 300 g de yema hiperinmune a las 120 horas presentó un comportamiento muy similar al del grupo control, sin embargo, hay una diferencia de aproximadamente 5 mg/mL en la cantidad de inmunoglobulinas a las 360 horas de vida de los animales.

El tratamiento que obtuvo la menor concentración de anticuerpos en todos los muestreos a excepción del grupo que recibió 300 g de yema a las 240 horas fue el grupo control.

En la figura 32 se muestra una comparación entre las respuestas a los tratamientos control, yema no hiperinmune, 150 y 300 g de yema hiperinmune administradas a las 2 horas de nacimiento.

Se observa una diferencia de más de 20 mg/mL en la concentración de anticuerpos de los grupos que recibieron yema hiperinmune (150 y 300 g) en contraste con la que se obtuvo en el tratamiento control en la muestra tomada a las 72 horas. Esta diferencia se

hace menor en la lectura de 120 y 240 horas para finalmente ser de aproximadamente 15 mg/mL a las 360 horas.

La concentración de inmunoglobulinas en los grupos que recibieron yema hiperinmune a las 2 horas es prácticamente igual a las 72 horas y muy similar a lo largo del tiempo hasta llegar a las 360 horas.

La concentración de inmunoglobulinas en el grupo de tratamiento con 150 g de yema no hiperinmune a las 2 horas se posiciona entre los grupos que recibieron yema hiperinmune y el grupo control.

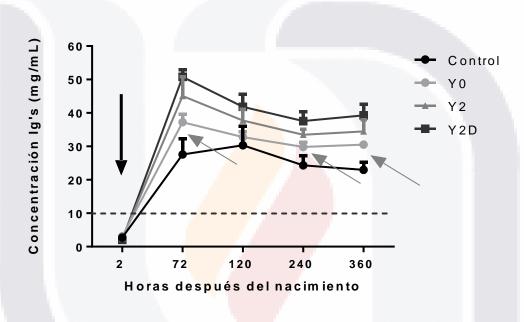


Figura 32 Concentración de inmuno<mark>glob</mark>ulinas en los tratamientos control, 150 g de yema no hiperinmune, 150 y 300 g de yema hiperinmune a las 2 horas.

Y0= Yema no hiperinmune; Y2= 150 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida Y2D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida. La flecha negra indica el tiempo en el que fue administrada la yema (2 horas después del nacimiento). La línea punteada indica la cantidad mínima de IgG necesaria para una transferencia exitosa de inmunidad pasiva. Las flechas grises indican la diferencia entre el grupo control y los tratamientos que incluyeron 150 o 300 gramos de yema no hiperinmune e hiperinmune.

En la figura 33 se muestra una comparativa entre los tratamientos control y 150 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas.

La mayor concentración de inmunoglobulinas se obtuvo con en el grupo que recibió yema hiperinmune a las 2 horas. Los tratamientos que involucraron más de una administración de yema hiperinmune dieron como resultado una concentración de inmunoglobulinas similar a la del grupo control.

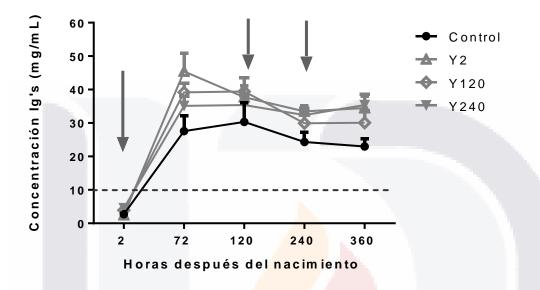


Figura 33 Concentración de inmunoglobulinas en los tratamientos control y 150 g de yema hiperinmune a distintas horas de vida.

Las flechas indican el tiempo en el que fue administrada la yema (2, 120 y 240 horas después del nacimiento). La línea punteada indica la cantidad mínima de IgG necesaria para una transferencia exitosa de inmunidad pasiva. Se observa diferencia entre el grupo control y los tratamientos que recibieron 150 gramos de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida a las 72, 240 y 360 horas.

En la figura 34 se muestran los niveles de anticuerpos alcanzados en los grupos que recibieron 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida y se comparan con el grupo control.

Únicamente el grupo que recibió yema hiperinmune a las 2 horas de vida obtuvo niveles más altos de anticuerpos. Los dos grupos restantes que recibieron yema hiperinmune en más de una ocasión mostraron un comportamiento similar al grupo control en cuanto a concentración de anticuerpos. El tratamiento que constó en la administración de 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida mostró un patrón irregular.

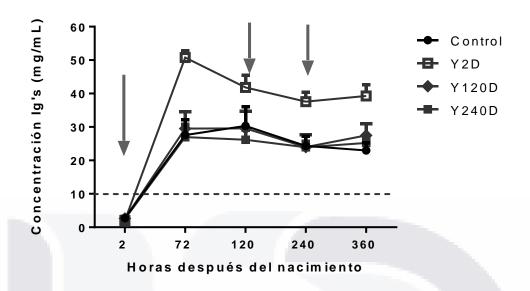
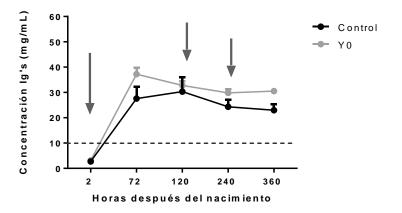


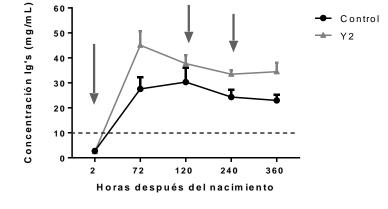
Figura 34 Concentración de inmunoglobulinas en los tratamientos control y 300g de yema hiperinmune a distintas horas.

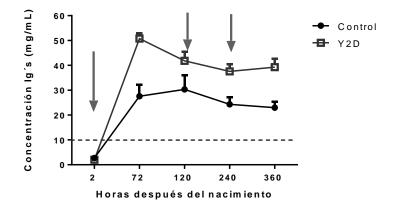
Las flechas indican el tiempo en el que fue administrada la yema (2, 120 y 240 horas después del nacimiento). La línea punteada indica la cantidad mínima de IgG necesaria para una transferencia exitosa de inmunidad pasiva. El tratamiento que fue diferente al grupo control fue el de 300 gramos de yema hiperinmune a las 2 horas de nacimiento.

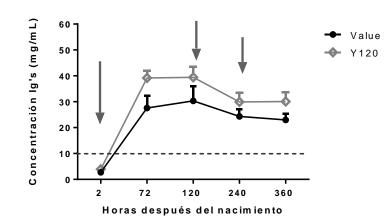
A continuación, se muestran los resultados de la concentración de IgG en el suero sanguíneo de las becerras obtenidos y la comparación individual con el grupo control. Se puede observar que los tratamientos en los que hubo mayor diferencia fueron los de 150 y 300 g de yema hiperinmune a las 2 horas de nacimiento. Los tratamientos restantes se comportaron de manera muy similar al grupo control (figura 35).

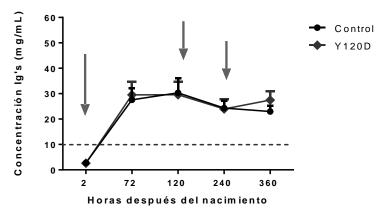
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

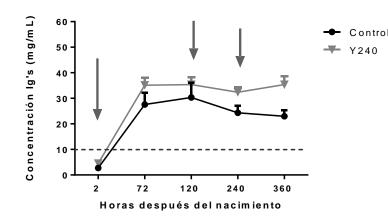


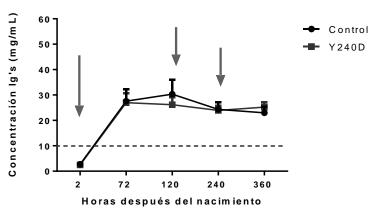












100 [8] T

TESIS

TESIS

Figura 35 Comparación de la concentración de inmunoglobulinas entre cada uno de los tratamientos con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control.

Comparación de la concentración de inmunoglobulinas entre cada uno de los tratamientos con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control. Y0= Yema no hiperinmune; Y2= 150 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida Y2D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida Y120= 150 g de yema hiperinmune a las 2 y 120 horas de vida; Y120D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 y 120 horas de vida; Y240= 150 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida; Y240D= 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida. Las flechas indican el tiempo en el que fue administrada la yema (2, 120 y 240 horas después del nacimiento). La línea punteada indica la cantidad mínima de IgG necesaria para una transferencia exitosa de inmunidad pasiva. Se aprecia de manera individual la concentración de cada tratamiento utilizado y la diferencia con el grupo control.

En la figura 36 se observa el promedio de la concentración de inmunoglobulinas en el suero de las becerras según el tratamiento al que fueron asignadas. La suplementación del calostro y la leche con yema de huevo hiperinmune y no hiperinmune promovió un aumento en la cantidad de anticuerpos en el suero de los animales con excepción del grupo que recibió dosis repetidas de 300 g de yema hiperinmune, en el que se observó un efecto contrario al esperado atribuido al exceso de lípidos administrados en cada dosis.

Se observa que la administración de 150 g de yema hiperinmune a las 120 y 240 horas resultó, en promedio, en una concentración similar de inmunoglobulinas. Se requiere más investigación para determinar el criterio para la suplementación de la leche de las terneras en repetidas ocasiones.

Al suplementar el calostro con 300 g de yema hiperinmune se obtuvo la mayor concentración de IgG en el suero de las becerras. Es interesante analizar la diferencia del nivel de anticuerpos entre el grupo de becerras que recibió 150 g de yema no hiperinmune y el grupo que recibió 150 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida puesto que, aunque se les suministró la misma cantidad de yema, el hecho de hacerlo con yema hiperinmune dio mejores resultados que la yema control y por ende, que el grupo al que no se le administró yema (control).

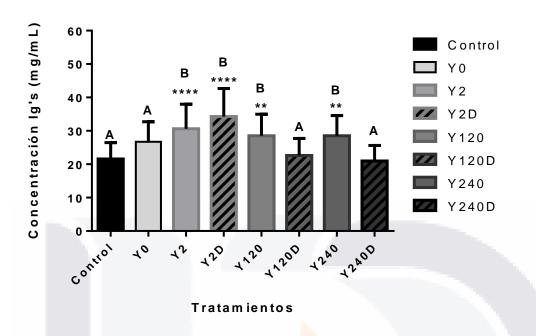


Figura 36 Concentración de inmunoglobulinas con base a los tratamientos.

Se muestra la concentración de Ig's incluyendo todas las horas de muestreo estipuladas para la investigación para cada tratamiento. Y0= Yema no hiperinmune; Y2= 150 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida Y2D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida Y120= 150 g de yema hiperinmune a las 2 y 120 horas de vida; Y120D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 y 120 horas de vida; Y240= 150 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida; Y240D= 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida. Los tratamientos que fueron diferentes al grupo control son los que incluyeron 150 gramos de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas y el tratamiento de 300 gramos de yema hiperinmune a las dos horas de vida. *:p \leq 0.05; **: p \leq 0.01; ****: p \leq 0.001. Las letras A y B muestran las diferencias estadísticamente significativas que hubo entre los grupos que recibieron dosis diferentes de yema de huevo a distintas horas.

En la figura 37 se muestra el promedio de la concentración de IgG entre el grupo control y los grupos a los que se les suministraron 150 g de yema hiperinmune con calostro y/o leche. Se aprecia que hay una diferencia significativa de dicha concentración entre el grupo control y el que recibió yema hiperinmune a las dos horas de vida. Se aprecia también que con la administración de dosis repetidas de yema hiperinmune se obtuvo un resultado similar.

PESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La diferencia entre el grupo que recibió yema hiperinmune a las dos horas de vida y los que lo hicieron a las 120 y 240 horas respectivamente no es estadísticamente significativa, pero hubo una mejor respuesta al administrar la yema únicamente a las dos horas posteriores al nacimiento.

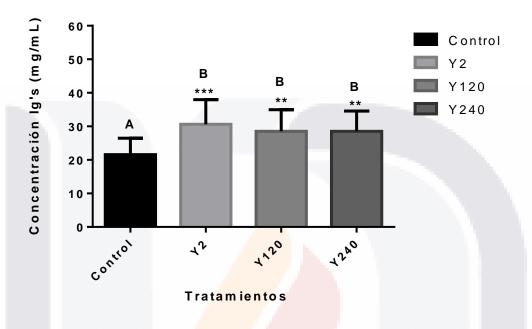


Figura 37 Concentración de inmunoglobulinas en el grupo control y los grupos que recibieron 150 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas posteriores al nacimiento.

De manera general, las terneras que recibieron 150 gramos de yema hiperinmune obtuvieron valores más altos de inmunoglobulinas séricas. *:p \leq 0.05; **: p \leq 0.01; ***: p \leq 0.001; ****: p \leq 0.0001. Las letras A y B muestran las diferencias estadísticamente significativas que hubo entre los grupos que recibieron dosis diferentes de yema de huevo a distintas horas.

La figura 38 muestra el promedio de la concentración de IgG en el grupo control y los que recibieron 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida.

Se observa que la diferencia entre el grupo control y el grupo al que se suplemento con yema hiperinmune a las dos horas posteriores al nacimiento es significativa, obteniendo casi el doble de anticuerpos en el suero de las becerras con la administración de la yema. Se advierte también que al suministrar la yema en repetidas ocasiones el resultado es contrario al esperado por lo cual lo ideal será evitar ofrecer 300 g de yema hiperinmune en más de una ocasión a las terneras.

103

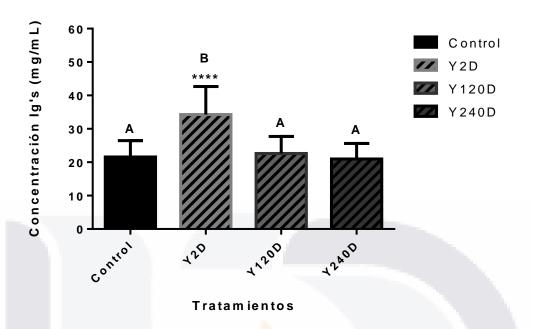


Figura 38 Concentración de inmunoglobulinas en el grupo control y los grupos que recibieron 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas posteriores al nacimiento.

El tratamiento de 300 gramos de yema hiperinmune a las 2 horas de nacimiento mostró conferir niveles de inmunoglobulinas séricas significativamente mayores a los obtenidos en el grupo control. Los tratamientos en los que se administraron 300 gramos de yema hiperinmune a las 120 y 240 horas de nacimiento resultaron conferir una inmunidad igual o menor a la obtenida en el grupo control. *:p \leq 0.05; **: p \leq 0.01; ***: p \leq 0.001; ***: p \leq 0.001. Las letras A y B muestran las diferencias estadísticamente significativas que hubo entre los grupos que recibieron dosis diferentes de yema de huevo a distintas horas.

6.2 Aspectos clínicos

En el establo en que se realizó la segunda fase de la investigación se presentan aproximadamente 60 partos mensuales, de los cuales el 50% corresponde a nacimientos de hembras. De la población total de terneras existente durante el desarrollo del experimento se tomaron dos muestras, una correspondiente a los animales de los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune (grupos tratado con yema hiperinmune y no hiperinmune) y otra muestra que incluyó tanto al grupo de becerras pertenecientes al tratamiento control como también a las becerras que nacieron durante el tiempo en que se llevó a cabo el experimento pero que no se les administró algún tratamiento con yema de huevo ni se les tomó muestra de sangre al cual se denominó grupo control. Se utilizó un formato para obtener datos sobre la presencia de diarrea (Anexo D), sus características, su duración y la edad a la cual se presentó.

Durante el tiempo que se llevó a cabo el experimento se observó menor presencia de diarrea en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune.

Para determinar la severidad de la diarrea se clasificó la consistencia de las heces de acuerdo a lo establecido por Vega *et al.* (2015): 0: normal, 1: pastosa, 2: semi-líquida y 3: líquida, considerando una puntuación igual o mayor que 2 como diarrea.

Se obtuvieron datos sobre la presencia de diarrea en ambos grupos. En los grupos que recibieron algún tratamiento con yema 3 becerras de un total de 35 presentaron diarrea durante el periodo de Agosto – Octubre de 2019. En el grupo control 15 becerras de una muestra total de 43 presentaron diarrea en el periodo de Agosto – Octubre de 2019 (figura 39).

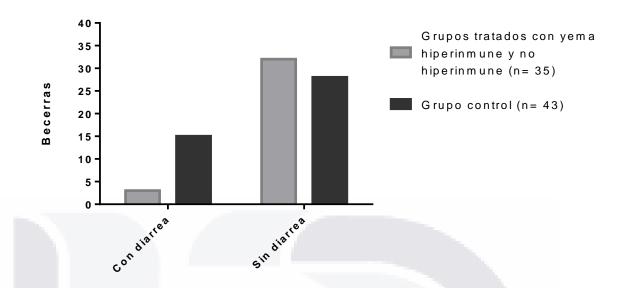


Figura 39 Presencia de diarrea en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control.

Las terneras que recibieron yema (hiperinmune y no hiperinmune) tuvieron una menor incidencia de diarrea durante el periodo de observación (60 días).

Asimismo, se obtuvieron datos de las características de las heces, la duración de la diarrea (días) y la edad a la que se presentó. La figura 40 muestra las características de las heces de ambos grupos.

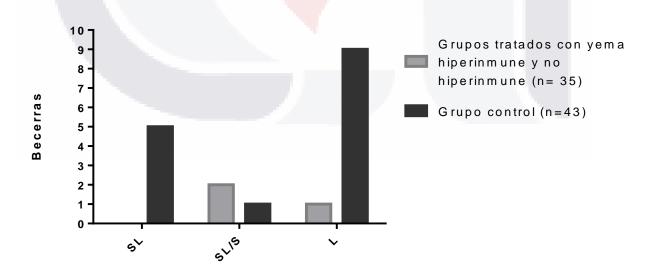


Figura 40 Características de las heces en los grupos que recibieron tratamiento con yema hiperinmune y no hiperinmune y en el grupo control.

S TESIS

FESIS TESIS TESIS

SL: semi-líquida. SL/S: semi-líquida con sangre. L: líquida. La severidad de la diarrea también fue menor en los grupos tratados con yema.

En la figura 41 se observa la duración de la diarrea (días) en el grupo control y en los grupos que recibieron yema hiperinmune y no hiperinmune.

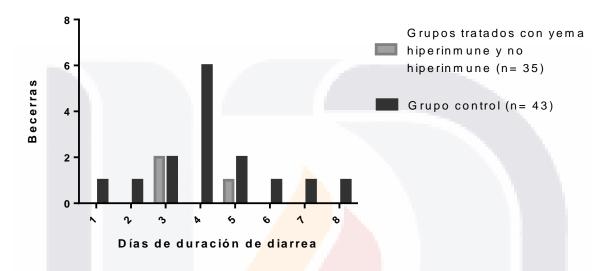


Figura 41 Duración de la diarrea (días) en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y en el grupo control.

Los días con presencia de diarrea fueron menos en los grupos que recibieron algún tratamiento con yema hiperinmune y no hiperinmune.

Se a nalizó también la edad a la que las becerras presentaron signos clínicos de diarrea. En los grupos que recibieron algún tratamiento con yema se presentó a los 7 días de vida de las terneras. La figura 42 muestra la edad a la que se presentó diarrea en el grupo control.

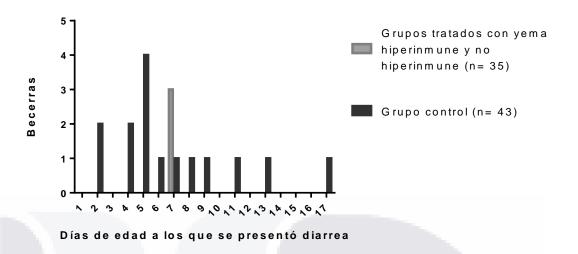


Figura 42 Días de edad a los que se presentó diarrea en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y en el grupo control.

En los animales que recibieron algún tratamiento con yema tuvieron la edad de incidencia de diarrea fue constante mientras que en el grupo control la incidencia fue variable.

La edad a la que las becerras presentaron signos clínicos de diarrea fue muy irregular en el grupo control. A los cinco días posteriores al nacimiento 4 becerras enfermaron, siendo está edad la única tendencia observada en el gráfico ya que sólo se detectaron dos casos de diarrea a los 2 y a los 4 días de vida respectivamente.

Es posible apreciar que la diarrea que se presentó en las becerras de los grupos tratados con yema fue regular tanto en características de las heces como en cuanto a duración de la misma ya que la variación en la duración de la enfermedad es mayor en el grupo control. Es importante señalar que la becerra que presentó diarrea únicamente por un día fue debido a que murió al día siguiente de presentar los signos propios de esta patología.

Durante el periodo en que se realizó la investigación murieron 5 becerras de un total de 43 a causa de diarrea en el grupo control y hubo cero muertes debido a diarrea en los grupos con algún tratamiento con yema hiperinmune y no hiperinmune.

En el grupo control 5 becerras presentaron fiebre durante el tiempo que presentaron diarrea; las becerras de los grupos tratados con yema de huevo no presentaron fiebre.

108

Se realizó una comparación de los días de con presencia de diarrea en ambas muestras (tabla 9).

Tabla 9. Días con presencia de diarrea en la población experimental y en la población control.

| Días con presencia de d | liarrea |
|---|-----------------------|
| Grupos tratados con yema hiperinmune y no | |
| hiperinmune (n= 35) | Grupo control (n= 43) |
| 11 | 64 |

^{*}Corresponde a la suma de todos los días/becerra.

Las becerras que enfermaron de diarrea (tanto en el grupo control como en los grupos que recibieron algún tratamiento con yema) recibieron un protocolo de tratamiento estipulado por el médico veterinario zootecnista encargado del área de crianza de becerras del establo de acuerdo a las características de las heces. De manera general se observó una respuesta más efectiva y rápida a los tratamientos por parte de los grupos que recibieron algún tratamiento con yema además de exhibir un mayor estado de alerta y menor decaimiento.

Se realizó un análisis de supervivencia que permitiera visualizar los datos de morbilidad y mortalidad con respecto al tiempo en los grupos de becerras a las cuales se les administró yema hiperinmune y no hiperinmune y en el grupo control.

La figura 43 muestra el análisis de mortalidad de ambos grupos

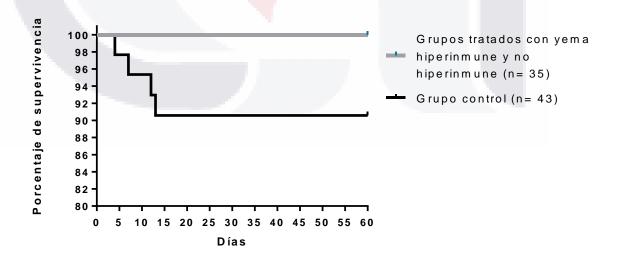


Figura 43 Análisis de la mortalidad en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control.

109

En los grupos que recibieron algún tratamiento con yema hiperinmune y no hiperinmune el 100% de las terneras sobrevivió a diferencia del grupo control en el que aproximadamente el 91% de los animales permaneció vivo durante el periodo de observación.

Se observa que la supervivencia en los grupos tratados con yema fue del 100% mientras que en el grupo control fue del 90%. La mortalidad ocurrió de manera irregular en el grupo control antes de los 15 días de vida de las becerras. Los primeros 15 días representan el periodo de tiempo crítico para la vida del animal. El costo extra debido a la muerte de cada becerra varía de acuerdo a la edad a la que ésta se presente, entre más edad tenga el animal mayor será la pérdida económica, así mismo el costo cambiará en función del protocolo de tratamiento implementado y la duración del mismo. Se calculó el costo extra debido a la muerte de las terneras en el grupo control.

La figura 44 corresponde al análisis de supervivencia con respecto a la incidencia de diarrea en ambos grupos.

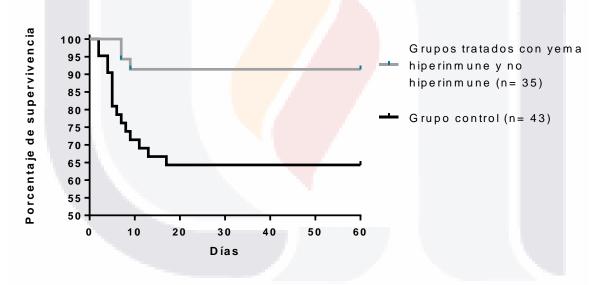


Figura 44 Análisis de morbilidad a causa de diarrea de los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control.

Durante el periodo de observación más del 90% de las terneras que recibieron algún tratamiento con yema permanecieron sin incidencia de diarrea en tanto que en el grupo control el porcentaje de becerras sin presencia de diarrea fue de aproximadamente 65%.

En esta figura se puede apreciar que en los grupos que recibieron yema de huevo más del 90% de las becerras se mantuvieron sin presencia de diarrea durante el periodo de observación. La incidencia de diarrea se presentó antes de los diez días de vida en un

tiempo casi homogéneo. En el grupo control poco menos del 65% de las terneras permaneció sin incidencia de diarrea durante el periodo de 60 días. La enfermedad se presentó de manera heterogénea desde el día 2 después del nacimiento hasta el día 17 de vida. Esta figura muestra la diferencia entre el efecto de los tratamientos con yema de huevo hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control sobre la incidencia de diarrea. Se observa que casi la mitad del grupo control recibió algún tratamiento por diarrea durante la etapa de lactancia comparado con los grupos con algún tratamiento con yema en la que el porcentaje de animales en tratamiento por diarrea fue menor al 10%.

Las dos figuras anteriores permiten advertir que la diferencia en términos económicos que el productor puede conseguir con la práctica sencilla de enriquecer el calostro con yema de huevo hiperinmune es importante. Ya que se reducen las pérdidas por muerte y por tratamientos implementados, además puede llegar a impactar en la etapa productiva del animal puesto que una enfermedad que afecte a la ternera en los primeros días de vida puede tener repercusiones en la productividad de la etapa adulta.

Se utilizó una tabla a colores para mostrar de una manera novedosa y visualmente llamativa la diferencia entre el estado de salud de las terneras en los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y el grupo control (Figura 45). La explicación de los colores utilizados para crearla se presenta a continuación.

Heces normales
Heces pastosas

Heces pastosas con sangre
Heces semilíquidas
Heces semilíquidas con sangre
Heces líquidas
Heces líquidas
Muerte

Figura 45 Unión de los datos referentes a los aspectos clínicos de los grupos tratados con yema hiperinmune y no hiperinmune y del grupo control.

Las becerras del grupo control pertenecientes a los animales de la investigación muestreados aparecen resaltadas en negritas e itálicas. El número y las letras en los recuadros de color amarillo, anaranjado y rojo indican el protocolo médico instaurado. 1: Protocolo 1; 2: Protocolo 2; 3: Protocolo 3, S: solución antiséptica; IE: Inmunoestimulante.

La figura anterior permite observar de manera práctica y sencilla además de unir los datos de los aspectos clínicos presentados anteriormente como la edad a la que enfermaron las becerras, la duración y la severidad de la diarrea, así como el tratamiento utilizado para cada animal. También se muestran las muertes ocurridas durante el periodo de observación representado por la etapa de lactancia.

Así mismo, se elaboró una tabla (tabla 16) que permitiera visualizar las características de las heces y su impacto a nivel de población, de grupo tratado con IgY y de grupo control.

Tabla 15. Características de las heces en la población, grupo tratado con lgY y grupo control.

| Características de las heces | Pastosas | Pastosas | Semi-líquidas | Semi-líquidas | Líquidas |
|-------------------------------------|----------|------------|---------------|---------------|----------|
| | | con sangre | | con sangre | |
| No. de terneras afectadas | 23 | 1 | 5 | 3 | 10 |
| Terneras grupo tratado con IgY | 11 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| Terneras grupo control | 12 | | 5 | 1 | 9 |
| Días totales | 71 | 3 | 15 | 11 | 44 |
| Días totales grupo tratado con IgY | 37 | 3 | 0 | 6 | 5 |
| Días totales grupo control | 34 | | 15 | 5 | 39 |
| % Terneras afectadas | 29.48 | 1.28 | 6.41 | 3.84 | 12.82 |
| % Poblacional del grupo tratado con | | | | | |
| lgY | 14.1 | 1.28 | | 2.56 | 1.28 |
| % Poblacional del grupo no tratado | 15.38 | | 6.41 | 1.28 | 11.53 |
| % Grupo tratado con IgY | 31.42 | 2.85 | | 5.71 | 2.85 |
| % Grupo control | 27.9 | | 11.62 | 2.32 | 20.93 |

6.3 Pesaje de las becerras

Los animales fueron pesados al nacimiento, al mes y a los dos meses de, posteriormente se obtuvieron estimaciones del peso a los 4 y 6 meses de edad. La medición del peso al nacimiento y al mes de vida fue llevada a cabo midiendo el diámetro torácico con una cinta métrica pesadora para ganado bovino. El peso al destete fue obtenido con una báscula para terneros. Con los datos obtenidos se construyó una curva de crecimiento (figura 46).

Se observa la diferencia en el crecimiento entre los grupos tratados de la investigación. Para determinar la diferencia estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para las mediciones de peso al nacimiento, 1 mes, 2 meses y 6 meses. El resultado del análisis indicó que no hubo diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento por efecto de alguno de los tratamientos.

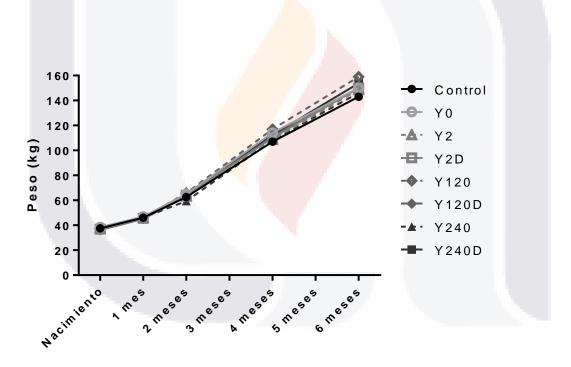


Figura 46. Curva de crecimiento en los grupos de terneras.

Y0= Yema no hiperinmune; Y2= 150 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida Y2D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 horas de vida. Y120= 150 g de yema hiperinmune a las 2 y 120 horas de vida; Y120D= 300 g de yema hiperinmune a las 2 y 120 horas de vida; Y240= 150 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida; Y240D= 300 g de yema hiperinmune a las 2, 120 y 240 horas de vida.

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto del consumo de yema de huevo en los parámetros productivos

La fase pre-destete representa un periodo crítico en la vida de las terneras lecheras de reemplazo debido a que en esta etapa son más susceptibles a enfermar y morir. Durante los primeros 21 días de vida se presenta el riesgo de mortalidad más alto (Wells *et al.*, 1997). Considerando que el estado de salud de la ternera lechera pre destetada puede afectar en gran medida la producción a lo largo de su vida, su crecimiento, eficiencia reproductiva y producción lechera (Urie *et al.*, 2018), y además, que la morbilidad, el tratamiento de las enfermedades y la mortalidad en terneras tiene como consecuencia la pérdida del potencial genético para el mejoramiento futuro del rebaño (Wells *et al.*, 1997) y del bienestar animal es sumamente importante asegurar que las becerras tengan un desarrollo y crecimiento saludables para mejorar la rentabilidad en los sistemas de producción.

En algunos sistemas de producción la diarrea ocasiona aproximadamente el 52% de las pérdidas económicas por muerte de los animales (USDA, 1994). La mayoría de los agentes que ocasionan la diarrea neonatal con excepción de *Salmonella* spp y algunas cepas de *E. coli* están presentes en el tracto gastrointestinal de casi todos los animales adultos sanos, aunque en bajas concentraciones y sin signos clínicos de infección. Las infecciones mixtas con estos microorganismos son comunes durante la vida del ternero (Barrington *et al.*, 2002).

Debido a la placentación epiteliocorial de los bovinos el suministro sanguíneo materno y fetal queda separado, evitando la transferencia de inmunoglobulinas maternas al feto. Por lo tanto, ya que los terneros nacen desprovistos de inmunoglobulinas dependen completamente del aporte de las mismas contenidas en el calostro (Godden, 2008). Ofrecer cantidades suficientes de calostro de alta calidad dentro de las primeras 6 horas de vida de las terneras previene el 31% de la mortalidad que se presenta durante los primeros 2 días de vida (Barrington *et al.*, 2002).

Robison *et al.*, (1988) demostraron un incremento significativo en la ganancia promedio en vaquillas que tuvieron una transferencia de inmunidad pasiva adecuada en comparación con aquellas que no la tuvieron. DeNise *et al.*, (1989) reportaron que las vaquillas con falla en la transferencia de inmunidad pasiva tuvieron significativamente menor producción de leche durante la primera lactación, además de una mayor tendencia a ser sacrificadas durante este periodo comparadas con aquellas que tuvieron una transferencia de inmunidad pasiva adecuada.

Kuroki *et al.* (1997) indicó que el efecto de la yema cruda por sí misma en la ganancia peso corporal fue mejorada por la presencia de anticuerpos específicos contra BRV, los cuales indujeron altos niveles de protección contra la diarrea causada por BRV. Posteriormente, Touchette *et al.* (2003) concluyó que cuando el huevo es incluido en una proporción de más del 10% de la dieta (aproximadamente 30% de la proteína total), el crecimiento de los terneros es mejor o similar al observado cuando reciben únicamente leche libre de anticuerpos.

En el presente trabajo suplementamos el calostro con 7.5% de yema no hiperinmune. En el caso de la yema hiperinmune la suplementación del calostro y de la leche a las 120 y 240 h posteriores al nacimiento y conforme a las dosis estipuladas de 150 y 300 g, respectivamente fue de 7.5 y 15%. La poca relación en la ganancia de peso de los animales con el consumo de yema puede deberse en primera instancia a que la suplementación se realizó en pocas ocasiones y además no fue continua. Lo segundo que pudo tener un efecto, en el caso de las dosis doble administradas fue el hecho de la presencia de diarrea mecánica que presentaron las becerras que pudieron haber dado como resultado un menor desempeño debido a la enfermedad.

7.2 Efecto de la IgY a nivel sistémico

Vega et al., (2012) demostraron que la administración de IgY a cerdos por vía sistémica y local indujeron una respuesta de anticuerpos anti-IgY consistiendo principalmente en subclases de IgG. Torche et al., (2006) detectaron anticuerpos IgY específicos en el suero de cerdos que habían recibido inmunoglobulinas Y en solución y en micro esferas de PLGA MS (poly(D,L-lactida-co-glicólido) microspheres) por vía oral.

Las IgY de huevo de gallinas han sido evaluadas para su uso como agentes inmunoterapéuticos o profilácticos pasivos contra virus de influenza (Abbas *et al.*, 2018). Además del efecto de las IgY anti-H1N1, se mostró un efecto protector comparable al del inhibidor de la neuraminidasa osetalmivir (Tamiflu®, Hoffamnn-LaRoche, Basilea, Suiza).

.

Durante las primeras 24 a 36 horas posteriores al nacimiento la permeabilidad intestinal de las terneros es alta, de esta manera permite que las IgG del calostro ingresen a la circulación sanguínea para conferir inmunidad pasiva a los recién nacidos (Besser y Gay, 1994). La permeabilidad intestinal puede ser transcelular (a través de las células epiteliales mediante transporte activo o pasivo) el cual es utilizado principalmente para la absorción de moléculas pequeñas o paracelular (a través de las uniones que conectan las células epiteliales entre sí) usado principalmente para la absorción de las macromoléculas (Hall, 1999).

Además de su función en sangre y espacios tisulares, la IgG del calostro podría ejercer una actividad protectora en el intestino antes de ser absorbida por la pared intestinal, o en las secreciones de la ternera después de la absorción y re secreción (Besser y Gay, 1994). Es posible que la IgY aumente la protección conferida por la IgG, especialmente si es específica. Es necesaria más investigación para analizar y elucidar mayor cantidad de aspectos acerca de la acción que la IgY ejerce en el organismo de los animales que reciben algún tipo de tratamiento con anticuerpos específicos.

Durante las primeras 6 horas de vida tiene lugar la máxima absorción de las inmunoglobulinas del calsotro. La IgG tiene un peso de 160 kD, la pared intestinal ofrece las condiciones necesarias para que una molécula de características como la inmunoglobulina G pase a través de ella. La IgY tiene un peso de 180 kD y la similitud estructural con la IgG es suficiente como para inferir que una absorción de inmunoglobulina Y ocurra durante las primeras horas de vida de las becerras.

En un estudio realizado por Vega *et al.* (2011) se administró yema de huevo no hiperinmune (control) y yema hiperinmune específica contra rotavirus bovino con calostro durante las primeras 24 horas y posteriormente con leche. Es importante destacar que la yema se administró deliberadamente después de que la permeabilidad intestinal estuviera activa con el fin de evitar que las IgY fueran absorbidas y pasaran a la sangre de los terneros, por lo cual no se esperó encontrar IgY en el suero de los animales.

Posteriormente Vega *et al.* (2012 y 2015) analizaron la presencia de IgY en el suero de lechones y terneros a los cuales se les había administrado yema (hiperinmune y no hiperinmune) mediante calostro y posteriormente con leche.

De esta manera, observamos que la absorción de IgY en el intestino de las terneras recién nacidas probablemente ocurre debido a la permeabilidad intestinal que sucede durante las primeras horas de vida. Ya que la absorción de macromoléculas tiene lugar en el espacio intercelular, que se trata de un proceso no selectivo, inespecífico, por lo cual es muy probable que moléculas de gran tamaño (como la IgY), pasen a través de la pared del intestino, en especial durante las primeras 6 horas posteriores al nacimiento.

Ibrahim *et al.* (2008) administraron IgY anti *Candida albicans* a ratones desafiados y encontraron reducción de la diseminación de *C. albicans* a los órganos por lo cual sugirieron que la IgY tuvo un efecto sistémico al mejorar la respuesta inmune del hospedador. Encontraron que la reducción de la diseminación de *C. albicans* podría ser un reflejo de la dificultad de estos microorganismos para invadir los tejidos como un resultado de la actividad de adhesión alterada que pudo contar para el retaso o reducción de la colonización.

Investigadores han reportado un efecto en el aparato respiratorio al administrar IgY de manera oral para diversas patologías. Thomsen et al. (2016) encontraron que la IgY anti-Pseudomonas aeruginosa induce una rápida y competente limpieza bacteriana en un modelo de neumonía murino. Los ratones tratados con IgY anti-P. aeruginosa tuvieron un mejor estado clínico comparado con los grupos control, lo cual pudo ser atribuible a la falta de diseminación de la infección ya que la IgY especifica administrada confirió protección contra bacteriemia.

7.3 Efectividad de los tratamientos según la dosis y el tiempo de administración.

Estudios recientes indican que el aumento en la incidencia de falla de transferencia de la inmunidad pasiva con distocia no es causada por una falla en la absorción de inmunoglobulinas del calostro sino debido a las severas alteraciones metabólicas que ocasionan que estas terneras se alimenten de manera oportuna (Weaver et al., 2000).

En un estudio realizado por Vega *et al.* (2015) se observó un efecto negativo en los terneros que fueron privados del consumo de calostro al desafiarlos con rotavirus bovino. Los autores reportaron un aumento significativo en la duración de la diarrea en el grupo que fue privado del calostro (10.4 días) en comparación con el grupo al que sí se les administro durante las primeras 6 horas de vida (7.6 días). En este experimento además, se observó que la presencia de anticuerpos en el suero de este grupo de terneros tuvo lugar del día 7 al día 21 post-infección, siendo la titulación estadísticamente similar al grupo que consumió calostro en el día 14 post-infección.

Esto significa que los terneros que no consumieron calostro tuvieron una "ventana" inmunológica de aproximadamente 7 días. Durante este periodo de tiempo tuvieron poca o nula protección frente a agentes patógenos por lo cual la duración de la diarrea fue tan extensa. Lo anterior implica un aumento en los costos del sistema de producción que se puede evitar únicamente administrando calostro de alta calidad en la cantidad adecuada, durante las primeras 6 horas de vida.

Es interesante observar que la cantidad de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo de las becerras que consumieron dosis doble de yema hiperinmune en más de una ocasión no sólo no fue mayor, sino que de hecho, hubo un efecto contrario al esperado. Esto puede explicarse considerando que la yema se administró cruda, por tanto, al aumentar la concentración de inmunoglobulinas también se aumentó la cantidad de lípidos administrados. El exceso de grasa probablemente resulto en una menor absorción.

7.4 Efecto de la IgY en el estado de salud de las becerras

Los resultados obtenidos concuerdan con los conseguidos por Vega *et al.* (2011), quienes luego de administrar yema de huevo hiperinmune contra rotavirus bovino y yema de huevo no hiperinmune a terneros desafiados con rotavirus bovino encontraron que el comienzo de los signos clínicos de un individuo al que se le administró yema hiperinmune se retrasó, mientras la duración y severidad de la enfermedad fue disminuida significativamente comparada con los animales pertenecientes a los grupos que no recibieron yema hiperinmune. En este mismo estudio se reportó que el 100% de los terneros que recibieron leche suplementada con IgY no especifica contra rotavirus bovino (IgY control) desarrollaron diarrea. Sin embargo, la severidad de la enfermedad se redujo

significativamente y tuvo una menor duración comparada con el grupo que recibió únicamente calostro y con el que no recibió calostro.

Vega et al. (2011) reportaron que la administración de yema no hiperinmune (control) y yema hiperinmune específica contra rotavirus bovino a terneros desafiados con BRV causo un pequeño retraso en el desarrollo de las respuestas inmunes activas en el suero que pudieron estar relacionadas con signos clínicos más leves. Además, cuando la leche fue suplementada con yema de huevo, independientemente de la especificidad del tratamiento una diversificación y mejoramiento significativos de las respuestas inmunes locales contra BRV fue observada.

Nelson *et al.* (2007) reportaron la presencia de moléculas inmunomoduladoras en la yema de huevo que promueven la expansión clonal de las células B y el cambio de IgA relacionado a las respuestas antiinflamatorias a antígenos dietarios. También encontraron que fragmentos de proteína de yema de huevo de gallinas no inmunizadas tiene actividades inmunomoduladoras en el intestino *in vivo*. Estos fragmentos pueden actuar directamente para bloquear la entrada del patógeno o indirectamente mediante la activación del sistema inmune para prevenir la infección. Además, demostraron que la yema de huevo orquestó las respuestas Th1/Th2, induciendo la secreción de IL-4 e IL-10, potentes activadores de las células B y de agentes antiinflamatorios en el intestino.

Xu et al. (2006) describieron las propiedades inmunomoduladoras del factor de transferencia (TF) encontrado en la yema de huevo de gallinas inmunizadas. El TF incrementa el índice timo-bazo y estimula la proliferación de linfocitos en ratones. Este factor parece tener no sólo actividad inmune contra el virus de la hepatitis B sino también actividad inmune no específica, haciéndolo un potencial inmunoregulador en la yema para el mejoramiento de tratamientos para esta infección viral.

Los resultados obtenidos en esta investigación están de acuerdo con los reportados por Vega *et al.* (2011, 2012 y 2015) quienes observaron que la IgY específica contra rotavirus bovino era efectiva como profiláctico en terneros (2011) y posteriormente en lechones (2012) desafiados con BRV y Rotavirus Humano, respectivamente. Así mismo demostraron que el uso terapéutico de IgY específica contra rotavirus bovino en terneros desafiados (2015) reduce la duración y severidad de la diarrea.

Además, los presentes resultados están en concordancia con Vega et al. (2015) quienes reportaron que los terneros que recibieron tratamiento pasivo con IgY específica

contra rotavirus bovino que presentaron diarrea no mostraron otros signos clínicos de infección con BRV como anorexia, deshidratación o depresión.

A nivel clínico la dosis doble repetida pudo haber ocasionado una diarrea mecánica debido a la cantidad de grasa. La diarrea mecánica pudo haber propiciado las condiciones para que se presentara una diarrea de tipo infeccioso y así ocasionar un efecto contrario al deseado en los animales de estos grupos.

Es interesante que las becerras de la población experimental no sólo hayan tenido menor incidencia y prevalencia de diarrea, sino que también la hubieran presentado de manera homogénea a los 7 días de edad mientras que la población control presentó una incidencia con más variación. Estos resultados no se han reportado en investigaciones anteriores.

De acuerdo con la edad de la incidencia de diarrea en la población experimental parece poco probable que el gente etiológico haya sido rotavirus o coronavirus debido a que, además de que la vacuna que recibieron las gallinas contenía estos antígenos y por lo tanto, se esperaba que la yema de huevo tuviera anticuerpos contra dichos antígenos, la diarrea ocasionada por rotavirus y coronavirus comúnmente ocurre entre la primer y segunda semana de vida de las becerras (Cho y Yoon, 2014).

Crypostoridium parvum es un parásito comúnmente presente en los sistemas de producción lechera, su distribución alrededor del mundo es amplia. C. parvum ocasiona diarrea generalmente alrededor de 7 días posteriores al nacimiento y rara vez ocurre en animales mayores de 28 días (Barrington et al., 2002). Considerando lo anterior parece probable que la diarrea hubiese sido causada por este protozoario.

Es necesaria más investigación para analizar si existe alguna relación entre el consumo de IgY y/ o yema de huevo específica y la edad a la que hay incidencia de diarrea en las terneras. Además del mecanismo por el cual esta suplementación del calostro y/o la leche proveerían dicho efecto. Las implicaciones de lo anterior para el sistema de producción son importantes debido a que si al hacer uso de esta tecnología es posible de alguna manera predecir el tiempo de aparición de los signos clínicos será viable implementar medidas preventivas que refuercen la salud de las becerras antes del periodo de mayor vulnerabilidad. Así el sistema de producción se beneficiará al soslayar costos extra debidos a tratamientos e incluso pérdida de potencial genético debido a la muerte de los animales, aumentando con esto su rentabilidad.

7.5 Efecto del consumo de yema de huevo hiperinmune y no hiperinmune en parámetros productivos

Algunos sustitutos de leche contienen proteínas lácteas desnaturalizadas por el calor, proteínas de origen vegetal con muy poca digestibilidad, o carbohidartos diferentes a la lactosa que las enzimas de las becerras recién nacidas no pueden digerir. El consumo de estos productos resulta en una nutrición inadecuada, bajas tasas de crecimiento y alta morbilidad y mortalidad debido a diarrea (Barrington *et al.*, 2002).

7.6 Costo-beneficio de la administración de yema de huevo hiperinmune.

Una becerra sana al destete que no haya requerido tratamiento le cuesta al productor aproximadamente \$6,445.00, utilizando esta información se realizó un cálculo del costo que implicó administrar huevo hiperinmune a cada una de las becerras y la inversión extra, expresada en porcentaje, que conllevaría implementar un protocolo de tratamiento en un sistema de producción (Tabla 17).

Tabla 16. Costo de la administración de huevo hiperinmune a una becerra.

| Huevo Hiperinmunizado | Costo con TX | \$/tx | % extra |
|-----------------------|--------------|-----------|---------|
| 1 huevo | \$ 6,465.00 | \$ 20.00 | 0.31% |
| 2 huevos | \$ 6,485.00 | \$ 40.00 | 0.62% |
| 4 huevos | \$ 6,525.00 | \$ 80.00 | 1.24% |
| 8 huevos | \$ 6,605.00 | \$ 160.00 | 2.48% |
| 16 huevos | \$ 6,765.00 | \$ 320.00 | 4.97% |

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación una administración de 6 a 12 yemas hiperinmunes con calostro a las 2 horas de vida es suficiente para asegurar una transferencia exitosa de inmunidad pasiva. Con base en la tabla 17 suplementar el calostro con 6 yemas hiperinmunes aumentaría el costo de producir una becerra al destete en un 1.86% mientras que administrar 12 yemas con calostro a las becerras recién nacidas supondría un incremento del 3.72% en la inversión del productor.

Tabla 17. Costo extra de los protocolos de tratamiento para diarrea

| Protocolo de tratamiento para diarrea | Costo total | % Extra |
|---------------------------------------|-------------|---------|
| Protocolo 1 | 149.96 | 2.3% |
| Protocolo 2 | 270.72 | 4.2% |
| Protocolo 3 | 2134.56 | 33.1% |
| Protocolo 4 | 2288 | 35.5% |

Como se observa en las tablas 17 y 18 la administración de yema de huevo hiperinmune como preventivo de diarrea neonatal en becerras Holstein está justificada y recomendada, en especial la suplementación con 6 yemas ya que pueden llegar a reducirse los días de tratamiento e incluso a evitarse el uso de alguno de los protocolos.

Únicamente dos becerras pertenecientes al grupo que recibió yema hiperinmune recibieron el protocolo 3, en tanto que en el grupo que no recibió suplementación con yema hiperinmune dicho protocolo se utilizó en el tratamiento de 8 animales (uno de ellos recibió también el protocolo 4). Esto supone un aumento considerable de los costos de producción que se verá reflejado en la rentabilidad del sistema de producción y en la ganancia del productor. Además, la presencia de enfermedades tiene consecuencias a largo plazo que afectan la vida productiva del animal y con ello la economía del productor y del sistema de producción.

7.7 Trabajo futuro

El conocimiento adquirido y los resultados obtenidos en esta investigación alientan trabajos posteriores enfocados en el amplio uso y aplicación que ofrecen las inmunoglobulinas Y. El potencial que ofrece la "Tecnología IgY" brinda la posibilidad de utilizar este conocimiento en una gran variedad de maneras para la realización e implementación de técnicas que mejoren el acercamiento diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades tanto de animales como de humanos.

Debido a la contingencia sanitaria por Covid 19 parte del trabajo que se había programado para la realización de esta tesis se interrumpió y el proceso de investigación se concluyó con el trabajo y resultados que ya se habían obtenido, por tanto, se planea continuar con investigación enfocada en la producción y uso de las inmunoglobulinas Y con fines preventivos y terapéuticos de las enfermedades.

8. CONCLUSIONES

La administración de yema hiperinmune es más eficaz promoviendo una adecuada transferencia de inmunidad pasiva que la yema control.

De acuerdo con los resultados obtenidos, una vez que se ha suplementado el calostro con 300 g de yema hiperinmune no se aconseja repetir la administración con leche a las 120 y 240 horas debido a que podría ocasionar diarrea mecánica por la cantidad de lípidos que contiene la yema.

La administración de yema hiperinmune (150 ó 300 g) a las 2 horas de vida es altamente recomendable para asegurar niveles altos de inmunoglobulinas séricas.

La incidencia y prevalencia de diarrea neonatal disminuyó al suplementar el calostro con 150 y 300 g de yema hiperinmune.

La administración de 150 g de yema hiperinmune a las 120 y 240 horas posteriores al nacimiento promovió concentraciones más altas de IgG con cada dosis.

Los tratamientos con yema y especialmente los grupos que recibieron yema hiperinmune (exceptuando el tratamiento de dosis repetida de 300 g de yema hiperinmune) presentaron mayor cantidad de IgG/mL.

Clínicamente, la diferencia en el estado de salud observada entre la población experimental y la población control fue evidente puesto que además de la disminución en la incidencia y prevalencia de diarrea en la primera, las becerras que enfermaron no se mostraron decaídas ni con anorexia, tampoco presentaron fiebre y se recuperaron de manera más rápida.

Según los resultados obtenidos en esta investigación, no hay relación entre el consumo de yema y la tasa de crecimiento de los animales. Esto sugiere que los nutrientes aportados por la yema no afectaron de manera significativa la ganancia de peso de las becerras.

La suplementación del calostro con 150 y 300 g de yema hiperinmune promueve una repuesta inmune efectiva por parte de las becerras evitando así las pérdidas económicas del sistema de producción por tratamientos y pérdida de potencial genético debido a la muerte de las terneras aumentando de esta manera la rentabilidad para el productor.

10. LITERATURA CITADA.

- Abbas, A.K., Litchman, A.H., Pober, J.S., (2002). *Anticuerpos y antígenos*. En: Inmunología Celular y Molecular (43-65). España: McGrawHill.
- Abbas, A.T., El-Kafrawy, S.A., Sohrab, S.S., and Azhar, E.I.A. (2018). IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum Vaccin Immunother*. 1-12.
- Alfieri, A.A., Ribeiro, J., de Carvalho Balbo, L., Lorenzetti, E., and Alfieri, A.F. (2018). Dairy calf rearing unit and infectious diseases: diarrhea outbreak by bovine coronavirus as a model for the dispersion of pathogenic microorganisms. *Trop Anim Health Prod.*
- Ammar, S.S., Mokhtaria, K., Tahar, B.B., Amar, A.A., Redha, B.A., Yuva, B., Mohamed, H.S., Abdellatif, N., and Laid, B. (2014). Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed.* 4 (Suppl 1): S318-322.
- Araujo, G., Yunta, C., Terre, M., Mereu, A., Ipharraguerre, I., and Bach, A. (2015). Intestinal permeability and incidence of diarrhea in newborn calves. *J Dairy Sci. 98* (10): 7309-7317.
- Avendano, C., Ramo, A., Vergara-Castiblanco, C., Sanchez-Acedo, C., and Quilez, J. (2018). Genetic uniqueness of Cryptosporidium parvum from dairy calves in Colombia. *Parasitol Res.* 117 (5): 1317-1323.
- Badaracco, A., Garaicoechea, L., Rodriguez, D., Uriarte, E.L., Odeon, A., Bilbao, G., Galarza, R., Abdala, A., Fernandez, F., and Parreno, V. (2012). Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Vet Microbiol.* 158 (3-4): 394-399.
- Barrington, G.M., and Parish, S.M. (2001). Bovine neonatal immunology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 17 (3): 463-476.
- Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (2010). Clinical Chemistry: Techniques, principles, correlations, sixth ed. Philadelphia.
- Borhani, K., Mohabati Mobarez, A., Khabiri, A.R., Behmanesh, M., and Khoramabadi, N. (2016). Inhibitory effects of rHP-NAP IgY against Helicobacter pylori attachment to AGS cell line. *Microb Pathog. 97*: 231-235.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (1999). editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1840, 1841, 1844, 1845; 1799; 1834-5.
- CANILEC (Cámara Nacional de Industriales de la Leche) (2017). Estadísticas del Sector Lácteo. *Online*. Cámara Nacional de Industriales de la Leche. 2017, from http://www.canilec.org.mx/index.html

- TESIS TESIS TESIS
- Carlander D, KollbergH, Wejaker PE, Larsson A. (2000). Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res* 21,1-6.
- Carmona, S. (2010). Anticuerpos: estructura, función propiedades biológicas y su uso en la medicina. En La Inmunología en la Salud y la Enfermedad. México: Editorial Médica Panamericana pp. 91-105.
- Chacana, P. A., Terzolo H. R., Gutiérrez Calzado, E. & Schade R. (2004). Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de IgY de gallina. *Rev Med Vet* 85: 179-189.
- Chalghoumi, R., Marcq, C., Théwis, A., Portetelle., Beckers, Y., (2009). Effects of feed supplementation with specific hen egg yolk antibody (immunoglobin Y) on *Salmonella* species cecal colonization and growth performances of challenged broiler chickens. *Poult Sci.* 88: 2081–2092.
- Chalghoumi, R., Thewis, A., Portetelle, D., and Beckers, Y. (2008). Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium in the same egg yolk. *Poult Sci. 87*: 32-40.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., and Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol.* 157: 220-233.
- Coura, F.M., Freitas, M.D., Ribeiro, J., de Leme, R.A., de Souza, C., Alfieri, A.A., Facury Filho, E.J., de Carvalho, A.U., Silva, M.X., Lage, A.P., and Heinemann, M.B. (2015). Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic Escherichia coli, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Trop Anim Health Prod.* 47 (1): 3-11.
- Curtis, G., McGregor Argo, C., Jones, D., and Grove-White, D. (2018). The impact of early life nutrition and housing on growth and reproduction in dairy cattle. *PLoS One.* 13: e0191687.
- Da Silva, M.C., Schaefer, R., Gava, D., Souza, C.K., da Silva Vaz, I., Jr., Bastos, A.P., and Venancio, E.J. (2018). Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine. *J Immunol Methods*. *461*: 100-105.
- Dai, Y.C., Zhang, X.F., Tan, M., Huang, P., Lei, W., Fang, H., Zhong, W., and Jiang, X. (2013). A dual chicken IgY against rotavirus and norovirus. *Antiviral Res.* 97: 293-300.
- Davison, F., Magor, K.E., Kaspers, B. (2008). Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: Davison, F., Kaspers, B. and Schat, K.A. (eds), *Avian immunology*, pp. 107-127. Academic Press, London, UK.
- Day, M.J., (2014). Antigens and Antibodies. En: Day, M.J., Vet Immunol. Boca Raton, p. 19.
- Diraviyam, T., Zhao, B., Wang, Y., Schade, R., Michael, A., and Zhang, X. (2014). Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. *9*: e97716.

- S TESIS TESIS TESIS TESIS
- Donovan, D.C., Reber, A.J., Gabbard, J.D., Aceves-Avila, M., Galland, K.L., Holbert, K.A., Ely, L.O., and Hurley, D.J. (2007). Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves. *Am J Vet Res.* 68: 778-782.
- Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G., (2012). *Anatomía Veterinaria*, 4a ed. El Manual Moderno, México.
- Harlow, E., Lane, D. (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2018), from http://www.fao.org/faostat/en/#home
- Fischer, A.J., Song, Y., He, Z., Haines, D.M., Guan, L.L., and Steele, M.A. (2018). Effect of delaying colostrum feeding on passive transfer and intestinal bacterial colonization in neonatal male Holstein calves. *J Dairy Sci.* 101: 3099-3109.
- Foster, D.M., and Smith, G.W. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 25: 13-36, xi.
- Gan, H., He, H., Sato, A., Hatta, H., Nakao, M., and Somamoto, T. (2015). Ulcer disease prophylaxis in koi carp by bath immersion with chicken egg yolk containing anti-Aeromonas salmonicida IgY. Res Vet Sci. 99: 82-86.
- Gao, X., Zhang, X., Lin, L., Yao, D., Sun, J., Du, X., Li, X., and Zhang, Y. (2016). Passive Immune-Protection of Litopenaeus vannamei against Vibrio harveyi and Vibrio parahaemolyticus Infections with Anti-Vibrio Egg Yolk (IgY)-Encapsulated Feed. *Int J Mol Sci.* 17.
- Gao, X., Zhang, X., Sun, J., Du, X., Li, X., Zhang, Y., and Lin, L. (2016). Passive protection effect of anti-Vibrio anguillarum IgY-encapsulated feed on half-smooth tongue sole (Cynoglossus semilaevi) against V. anguillarum. *Fish Shellfish Immunol. 56*: 483-488.
- García-Flor, V.L., (2014). Evaluación de la administración de calostro mediante biberón y sonda esofágica suplementado con inmunoglobulina "y" para coadyuvar a la inmunidad pasiva y el desarrollo de las becerras holstein. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.
- Gendler, S. y Kaplan, A. (1984). γ-GT Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1120-1123, 1268-1273 y 425.
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 24: 19-39.
- Gómez-Gazque, R.G. (2008). Enciclopedia bovina *Cría de becerras lecheras p.43-68*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

- Graham, A.N., Renaud, D.L., Duffield, T.F., and Kelton, D.F. (2018). Short communication: Calf cleanliness does not predict diarrhea upon arrival at a veal calf facility. *J Dairy Sci.* 101: 3363-3366.
- Grando, T.H., Baldissera, M.D., de Sa, M.F., do Carmo, G.M., Porto, B.C.Z., Aguirre, G.S.V., Azevedo, M.I., de Jesus, F.P.K., Santurio, J.M., Sagrillo, M.R., Stefani, L.M., and Monteiro, S.G. (2017). Avian antibodies (IgY) against Trypanosoma cruzi: Purification and characterization studies. *J Immunol Methods*. 449: 56-61.
- Gujral, N., Yoo, H., Bamdad, F., Lee, K.Y., Suh, J.W., and Sunwoo, H. (2017). A Combination of Egg Yolk IgY and Phosvitin Inhibits the Growth of Enterotoxigenic Escherichia coli K88 and K99. *Curr Pharm Biotechnol.* 18: 400-409.
- Gutiérrez, E. J., Chávez, T. S., Sierra, G., Higginson, D., Rodriguez, G., Shade, R., (2007). Desarrollo de un Sistema ELISA para cuantificar IgG de ratón tomando como base la tecnología IgY. *CENIC Cienc Biol.* 38: 75-83.
- Gutiérrez, P. J.A. (2010). Inmunología veterinaria. Editorial El Manual Moderno. México.
- He, J., Wang, Y., Sun, S., and Zhang, X. (2015). Evaluation of Chicken IgY Generated Against Canine Parvovirus Viral-Like Particles and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Assay for Canine Parvovirus Detection. *Viral Immunol.* 28: 489-494.
- Hernández, A. (2010). Introducción a la inferencia estadistica para datos de supervivencia.

 Alemania.
- Hou, Y.Y., Zhen, Y.H., Wang, D., Zhu, J., Sun, D.X., Liu, X.T., Wang, H.X., Liu, Y., Long, Y.Y., and Shu, X.H. (2014). Protective effect of an egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) against Prevotella intermedia-mediated gingivitis. *J Appl Microbiol.* 116: 1020-1027.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) (2014). Perspectiva Estadística Aguascalientes. Edición 2014. México 56 61.
- Justiz, A. A., Ramirez, N., Cadiz, A., Ferret; B., Akpaka, P., Smikle., (2013). Separation and Reactivity of Avian Immunoglobulin Y. *J Chromat Separation Techniq.* 4:3.
- Justiz Vaillant, A.A. (2013). Separation and Reactivity of Avian Immunoglobulin Y. *J Chromatogr Sep Tech. 04* (03).
- Kim, H.S., Lee, B., Han, S.Y., and Jung, Y.T. (2017). Expression of bovine rotavirus VP8 and preparation of IgY antibodies against recombinant VP8. *Acta Virol.* 61: 143-149.
- Kovacs-Nolan, J., and Mine, Y. (2007). Passive Immunization Through Avian Egg Antibodies. *Food Technol Biotechnol.* 18: 39-62.
- Kovacs, J., Mine, Y., (2004). Passive Immunization Through Avian Egg Antibodies. *Food Biotechnol.* 18: 39–62.
- Kumaran, T., Thirumalaikumar, E., Lelin, C., Palanikumar, P., Michaelbabu, M., and Citarasu, T. (2018). Physicochemical properties of anti Vibrio harveyi egg yolk

- antibody (IgY) and its immunological influence in Indian white shrimp Fenneropenaeus indicus. Fish Shellfish Immunol. 74: 349-362.
- Larsson, A., Balow, R., Lindahl, T. L., Forsberg, P. (1993). Chicken antibodies: taking advantage of evolution; a review. Poult. Sci. 72:1807–1812.
- Larsson, A., Carlander, D., Wilhelmsson, M. (1998). Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. Food Agr. Immunol. 10:29–36.
- Lee, D.H., Jeon, Y.S., Park, C.K., Kim, S., Lee, D.S., and Lee, C. (2015). Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. *Arch Virol.* 160: 2197-2207.
- Lee, J., Kang, H.E., and Woo, H.J. (2012). Stability of orally administered immunoglobulin in the gastrointestinal tract. *J Immunol Methods*. *384*: 143-147.
- Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Park, D.W., Jang, S.I., Morales, A., Garcia, D., Lucio, E., Larios, R., Victoria, G., Marrufo, D., and Lillehoj, E.P. (2009). Induction of passive immunity in broiler chickens against Eimeria acervulina by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. *Poult Sci. 88*: 562-566.
- Li, X., Jing, K., Wang, X., Li, Y., Zhang, M., Li, Z., Xu, L., Wang, L., and Xu, Y. (2016). Protective effects of chicken egg yolk antibody (IgY) against experimental Vibrio splendidus infection in the sea cucumber (Apostichopus japonicus). *Fish Shellfish Immunol.* 48: 105-111.
- Li, Z.X., Hu, W.D., Li, B.C., Li, T.Y., Zhou, X.Y., and Zhang, Z. (2014). Egg yolk IgY against RHDV capsid protein VP60 promotes rabbit defense against RHDV infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 157: 97-104.
- Martella, V., Banyai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., and Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 140: 246-255.
- McGuirk, S.M., and Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20: 593-603.
- Medrano-Galarza, C., LeBlanc, S.J., Jones-Bitton, A., DeVries, T.J., Rushen, J., Marie de Passille, A., Endres, M.I., and Haley, D.B. (2018). Associations between management practices and within-pen prevalence of calf diarrhea and respiratory disease on dairy farms using automated milk feeders. *J Dairy Sci. 101*: 2293-2308.
- National Dairy Heifer Evaluation Project (1994). Dairy heifer morbidity, mortality, and health management focusing on preweaned heifers. Fort Collin (CO): US Department of Agriculture, Animal Plant Inspection Service, Veterinary Services, National Animal Health Monitoring Service. p. 4–10.
- Nilsson, E., Stalberg, J., and Larsson, A. (2012). IgY stability in eggs stored at room temperature or at +4 degrees C. *Br Poult Sci.* 53: 42-46.

TESIS TESIS TESIS

- Ortiz-Pelaez, A., Pritchard, D.G., Pfeiffer, D.U., Jones, E., Honeyman, P., and Mawdsley, J.J. (2008). Calf mortality as a welfare indicator on British cattle farms. *Vet J. 176*: 177-181.
- Parreno, V., Bejar, C., Vagnozzi, A., Barrandeguy, M., Costantini, V., Craig, M.I., Yuan, L., Hodgins, D., Saif, L., and Fernandez, F. (2004). Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol.* 100: 7-24.
- Parreno, V., Marcoppido, G., Vega, C., Garaicoechea, L., Rodriguez, D., Saif, L., and Fernandez, F. (2010). Milk supplemented with immune colostrum: protection against rotavirus diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol.* 136: 12-27.
- Parreño, V., Vega, C., Bok, M., Ebinger, M., Fernández, F., Wigdorovitz, A., Diarreas neonatales del ternero: Por qué desarrollar IgYDNT. (2015).
- Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O. and Dixon, F.J. (1962a) The Metabolism of Serum Proteins in the Hen and Chick and Secretion of Serum Proteins by the Ovary of the Hen. *J. Gen. Physiol.*, 45, 501-513.
- Pavon, L., (2016). *Inmunología molecular, celular y traslacional*, primera ed. Barcelona.
- Payne, S. (2017). *Immunity and Resistance to Viruses*, En: Viruses pp. 61-71. DOI: 10.1016/B978-0-12-803109-4.0006-4
- Pritchett, L. C., Gay, C. C., Besser, T. E., Hancock, D. D., (1991). Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *J Dairy Sci.* 74:2336-2341.
- Przybylska, J., Albera, E., and Kankofer, M. (2007). Antioxidants in bovine colostrum. *Reprod Domest Anim.* 42: 402-409.
- Qin, Z., Babu, V.S., Li, N., Fu, T., Li, J., Yi, L., Zhao, L., Li, J., Zhou, Y., and Lin, L. (2018). Protective effects of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) against experimental Aeromonas hydrophila infection in blunt snout bream (Megalobrama amblycephala). *Fish Shellfish Immunol.* 78: 26-34.
- Raboisson, D., Delor, F., Cahuzac, E., Gendre, C., Sans, P., & Allaire, G. (2013). Perinatal, neonatal, and rearing period mortality of dairy calves and replacement heifers in France. *J Dairy Sci*, 96(5), 2913-2924. doi: 10.3168/jds.2012-6010
- Renaud, D. L., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Haley, D. B., & Duffield, T. F. (2018). Calf management risk factors on dairy farms associated with male calf mortality on veal farms. *J Dairy Sci*, 101(2), 1785-1794. doi: 10.3168/jds.2017-13578
- Rodgers, M. L., & Rice, C. D. (2018). Monoclonal antibodies against loggerhead sea turtle, Caretta caretta, IgY isoforms reveal differential contributions to antibody titers and

- relatedness among other sea turtles. *Dev Comp Immunol*, 87, 12-15. doi: 10.1016/j.dci.2018.05.015
- Rose, M. E., Orlans, E., & Buttress, N. (1974). Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol*, 4(7), 521-523. doi: 10.1002/eji.1830040715
- Ruan, G. P., Ma, L., He, X. W., Meng, M. J., Zhu, Y., Zhou, M. Q., . . . Wang, X. N. (2005). Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A*0201 heavy chain and light chain (beta2m). Protein Expr Purif, 44(1), 45-51. doi: 10.1016/j.pep.2005.03.013
- Rutkowska, K., Stachowiak, M., Oprzadek, J., Bauersachs, S., & Flisikowski, K. (2018).

 Altered miRNA-4321 expression in maternal and foetal placenta of intrauterine growth restricted bovine foetuses. *Placenta*, 70, 50-52. doi: 10.1016/j.placenta.2018.09.004
- Schroeder, H. W., Jr., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046
- Sevcik, C., Diaz, P., & D'Suze, G. (2008). On the presence of antibodies against bovine, equine and poultry immunoglobulins in human IgG preparations, and its implications on antivenom production. *Toxicon*, 51(1), 10-16. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.06.009
- Solhi, R., Alebouyeh, M., Khafri, A., Rezaeifard, M., & Aminian, M. (2017). In vitro evaluation of cross-strain inhibitory effects of IgY polyclonal antibody against H. pylori. *Microb Pathog*, 110, 682-687. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.025
- Tesar, D. B., Cheung, E. J., & Bjorkman, P. J. (2008). The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 19(4), 1587-1593. doi: 10.1091/mbc.E07-09-0972.
- Torche, A. M. Le Dimna, M. Le Corre, P. Mesplede, A. Le Gal, S. Cariolet, R. Le Potier, M. F.. (2006). Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs. Vet Immunol Immunopathol, 109, 209-17.
- Tressler, R. L., & Roth, T. F. (1987). IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *J Biol Chem*, 262(32), 15406-15412.
- Trotz-Williams, L. A., Leslie, K. E., & Peregrine, A. S. (2008). Passive immunity in Ontario dairy calves and investigation of its association with calf management practices. *J Dairy Sci*, 91(10), 3840-3849. doi: 10.3168/jds.2007-0898
- Ulmer-Franco, A. M. (2012). Transfer of chicken immunoglobulin Y (IgY) from the hen to the chick. *Avian Biology Research*, 5(2), 81-87. doi: 10.3184/175815512x13350053184471
- Urie, N. J., Lombard, J. E., Shivley, C. B., Adams, A. E., Kopral, C. A., & Santin, M. (2018). Preweaned heifer management on US dairy operations: Part III. Factors associated

- with Cryptosporidium and Giardia in preweaned dairy heifer calves. *J Dairy Sci*, 101(10), 9199-9213. doi: 10.3168/jds.2017-14060
- Vega, C., Bok, M., Chacana, P., Saif, L., Fernandez, F., & Parreno, V. (2011). Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol*, 142(3-4), 156-169. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.05.003
- Vega, C., Bok, M., Saif, L., Fernandez, F., & Parreno, V. (2015). Egg yolk IgY antibodies: A therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. *Res Vet Sci*, 103, 1-10. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.09.005
- Weaver, D. M., Tyler, J. W., VanMetre, D. C., Hostetler, D. E., & Barrington, G. M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J Vet Intern Med*, 14(6), 569-577.
- Wells, S. J., Garber, L. P., & Hill, G. W. (1997). Health status of preweaned dairy heifers in the United States. *Prev Vet Med*, 29(3), 185-199. doi: 10.1016/s0167-5877(96)01078-1
- Xing, P., Shi, Y., Dong, C., Liu, H., Cheng, Y., Sun, J., Feng, D. (2017). Colon-Targeted Delivery of IgY Against Clostridium difficile Toxin A and B by Encapsulation in Chitosan-Ca Pectinate Microbeads. *AAPS PharmSciTech*, 18(4), 1095-1103. doi: 10.1208/s12249-016-0656-2
- You, J., Xu, Y., Li, H., Wang, L., Wu, F., Xu, F., Li, X. (2014). Chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) developed against fusion protein LTB-STa-STb neutralizes the toxicity of Escherichia coli heat-stable enterotoxins. *J Appl Microbiol*, 117(2), 320-328. doi: 10.1111/jam.12525
- Zhang, Q., Lin, H., Sui, J., Wang, J., & Cao, L. (2015). Effects of Fab' fragments of specific egg yolk antibody (IgY-Fab') against Shewanella putrefaciens on the preservation of refrigerated turbot. *J Sci Food Agric*, 95(1), 136-140. doi: 10.1002/jsfa.6693
- Zhang, X., Diraviyam, T., Li, X., Yao, G., & Michael, A. (2016). Preparation of chicken IgY against recombinant E2 protein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) and development of ELISA and ICA for BVDV detection. *Biosci Biotechnol Biochem*, 80(12), 2467-2472. doi: 10.1080/09168451.2016.1217144

11. ANEXOS

Anexo A. Tablas

| | Ca | iscarón (po | or huevo) | Líquido/cor | | Líquido/congelado (por 100g) | | Deshidratado (por 100g) | | |
|-------------------------|--------|-------------|-----------|-------------|-------|------------------------------|-----------|-------------------------|-------|-------|
| | | | | | | | Yema | | | |
| | Entero | Clara | Yema | Entero | Clara | Puro | Comercial | Entero | Clara | Yema |
| Nutrientes y unidades | | | | | | | | | | |
| Aproximado | | | | 1 | | | | | | |
| Sólidos (g) | 13.47 | 4.6 | 8.81 | 24.5 | 12.1 | 51.8 | 44.0 | 96.8 | 93.6 | 97.2 |
| Calorías | 184 | 19 | 64 | 152 | 50 | 377 | 313 | 600 | 388 | 692 |
| Proteína (NX6.25) (g) | 6.60 | 3.88 | 2.74 | 12.0 | 10.2 | 16.1 | 14.9 | 47.4 | 79.1 | 32.9 |
| Lípidos totales (g) | 6.00 | | 5.80 | 10.9 | | 34.1 | 27.5 | 43.1 | | 60.8 |
| Cenizas (g) | 0.55 | 0.26 | 0.29 | 1.00 | 0.68 | 1.69 | 1.49 | 4.0 | 5.3 | 3.3 |
| Ácidos grasos (g) | | | | | | | | | | |
| Saturados (total) | 2.01 | | 1.95 | 3.67 | | | 9.16 | 14.51 | | 20.35 |
| 8:0 | 0.027 | | 0.027 | 0.05 | | | 0.13 | 0.20 | | 0.29 |
| 10:0 | 0.022 | | 0.080 | 0.15 | | | 0.38 | 0.59 | | 0.84 |
| 12:0 | 1.37 | | 0.026 | 0.05 | | | 0.12 | 0.20 | | 0.27 |
| 14:0 | 0.462 | | 0.022 | 0.04 | | | 0.09 | 0.16 | | 0.20 |
| 16:0 | 0.022 | | 1.31 | 2.5 | | | 6.2 | 9.84 | | 13.8 |
| 18:0 | 2.53 | | 0.459 | 0.84 | | | 2.14 | 3.36 | | 4.73 |
| 20:0 | | | 0.022 | 0.04 | | | 0.10 | 0.16 | | 0.22 |
| Monoinsaturados (total) | | | 2.50 | 4.5 | | | 11.80 | 18.18 | | 25.64 |
| 14:1 | 0.005 | | 0.005 | 0.01 | | | 0.03 | 0.04 | | 0.07 |
| 16:1 | 0.214 | | 0.211 | 0.39 | | | 0.97 | 1.54 | | 2.14 |
| 18:1 | 2.31 | | 2.28 | 4.2 | | | 10.8 | 16.60 | | 23.43 |
| Poliinsaturados (total) | 0.73 | | 0.72 | 1.32 | | | 3.37 | 5.22 | | 7.45 |
| 18:2 | 0.660 | | 0.650 | 1.20 | | | 3.07 | 4.74 | | 6.79 |
| 18:3 | 0.011 | | 0.014 | 0.02 | | | 0.06 | 0.08 | | 0.13 |
| 20:4 | 0.055 | | 0.051 | 0.10 | | | 0.24 | 0.40 | | 0.53 |
| Colesterol (g) | 0.213 | | 0.213 | 0.425 | | | 1.23 | 1.90 | | 2.72 |
| Lecitina (g) | 1.27 | | 1.22 | 2.32 | | | 5.81 | 9.16 | | 12.84 |
| Cefalina (g) | 0.253 | | 0.241 | 0.46 | | | 1.15 | 1.82 | | 2.54 |

Valores para la composición nutricional de huevos expresados en cascarón (por huevo), base líquida/congelado (por 100g), y base seca (por 100g).

| (por 100g), y base seca (por 100g). | | | | | | | | | | |
|---|-------|----------|----------|---------|-------------|-------|-----------|---------|--------------|-------|
| - | Casc | arón (po | r huevo) | Lío | quido/conge | | | Deshidr | atado (por : | 100g) |
| | | | | | 202.700 | | 'ema | 1000 00 | | |
| | Ente | ro C | lara Yer | na Ente | ero Clara | Puro | Comercial | Enter | o Clara | Yema |
| Vitaminas | | | | | | | | | | |
| A (IU) | 264 | | 260 | 480 | | 1527 | 1240 | 1896 | | 2740 |
| D (IU) | 27 | | 27 | 50 | | 161 | 129 | 198 | | 285 |
| E (mg) | 0.88 | | 0.87 | 1.6 | | 5.1 | 4.1 | 6.7 | | 9.1 |
| B12 (μg) | 0.48 | | 0.48 | 0.88 | | 2.83 | 2.27 | 3.5 | | 5.0 |
| Biotina (μg) | 11.0 | 2.58 | 8.35 | 20.0 | 6.8 | 49.1 | 40.8 | 79 | 53 | 90 |
| Colina (mg) | 237 | 0.46 | 238 | 430 | 1.2 | 1400 | 1130 | 1699 | 9 | 2497 |
| Ácido fólico (mg) | 0.023 | 0.006 | 0.026 | 0.060 | 0.016 | 0.154 | 0.128 | 0.24 | 0.12 | 0.28 |
| Inosita (mg) | 5.94 | 1.52 | 4.35 | 10.8 | 4.0 | 25.6 | 21.4 | 43 | 31 | 47 |
| Niacina (mg) | 0.045 | 0.035 | 0.010 | 0.082 | 0.092 | 0.061 | 0.067 | 0.32 | 0.71 | 0.15 |
| Manganeso | 0.021 | 0.0002 | 0.019 | 0.038 | 0.007 | 0.11 | 0.09 | 0.15 | 0.05 | 0.19 |
| Fósforo | 111 | 8 | 102 | 202 | 22 | 599 | 485 | 798 | 171 | 1072 |
| Potasio | 74 | 57 | 17 | 135 | 150 | 100 | 110 | 533 | 1163 | 243 |
| Sodio | 71 | 63 | 9 | 129 | 165 | 52 | 74 | 510 | 1279 | 164 |
| Azufre | 90 | 62 | 28 | 164 | 163 | 165 | 165 | 648 | 1263 | 366 |
| Zinc | 0.72 | 0.05 | 0.66 | 1.3 | 0.12 | 3.89 | 3.15 | 5.1 | 0.93 | 7.0 |
| Aminoácidos (g) | | | | | | | | | | |
| Alanina | 0.38 | 0.24 | 0.14 | 0.69 | 0.64 | 0.81 | 0.77 | 2.73 | 4.96 | 1.70 |
| Arginina | 0.42 | 0.23 | 0.19 | 0.77 | 0.60 | 1.14 | 1.03 | 3.04 | 4.65 | 2.28 |
| Ácido aspártico | 0.65 | 0.4 | 0.25 | 1.18 | 1.06 | 1.44 | 1.37 | 4.66 | 8.22 | 3.03 |
| Cistina | 0.15 | 0.11 | 0.05 | 0.28 | 0.28 | 0.27 | 0.27 | 1.11 | 2.17 | 0.60 |
| Ácido glutámico | 0.85 | 0.52 | 0.33 | 1.54 | 1.36 | 1.94 | 1.83 | 6.08 | 10.54 | 4.04 |
| Glicina | 0.22 | 0.14 | 0.08 | 0.4 | 0.36 | 0.49 | 0.47 | 1.58 | 2.79 | 10.4 |
| Histidina | 0.16 | 0.09 | 0.07 | 0.29 | 0.24 | 0.41 | 0.38 | 1.15 | 1.86 | 0.84 |
| Isoleucina | 0.36 | 0.21 | 0.15 | 0.66 | 0.56 | 0.87 | 0.81 | 2.61 | 4.34 | 1.79 |
| Leucina | 0.57 | 0.33 | 0.24 | 1.04 | 0.88 | 1.39 | 1.29 | 4.11 | 6.82 | 2.85 |
| Lisina | 0.45 | 0.25 | 0.2 | 0.82 | 0.66 | 1.17 | 1.07 | 3.24 | 5.12 | 2.37 |
| Metionina | 0.21 | 0.15 | 0.06 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 1.54 | 3.02 | 0.86 |
| Fenilalanina | 0.35 | 0.23 | 0.12 | 0.64 | 0.61 | 0.69 | 0.67 | 2.53 | 4.73 | 1.48 |
| Prolina | 0.26 | 0.15 | 0.11 | 0.48 | 0.4 | 0.65 | 0.60 | 1.90 | 3.1 | 1.33 |
| Serina | 0.50 | 0.27 | 0.23 | 0.91 | 0.71 | 1.36 | 1.24 | 3.60 | 5.5 | 2.74 |
| Treonina | 0.32 | 0.18 | 0.14 | 0.59 | 0.47 | 0.85 | 0.78 | 2.33 | 3.64 | 1.72 |
| Triptófano | 0.11 | 0.07 | 0.04 | 0.19 | 0.17 | 0.24 | 0.23 | 0.75 | 1.32 | 0.51 |
| Tirosina | 0.28 | 0.16 | 0.12 | 0.51 | 0.41 | 0.73 | 0.67 | 2.02 | 3.18 | 1.48 |
| Valina | 0.43 | 0.27 | 0.16 | 0.79 | 0.72 | 0.96 | 0.91 | 3.12 | 5.58 | 2.01 |
| 3-0000000000000000000000000000000000000 | | | 2.20 | | | | | 1 | | |

135

SIS TESIS TESIS TESIS TES

Composición de ácidos grasos de las fracciones lipídicas de la yema y lípido dietético

% de ácidos grasos totales

| | | 10-11-1 | | | |
|-------------|--------------|---------------|----------|----------|------------------|
| Ácido graso | Lípido crudo | Triglicéridos | Lecitina | Cefalina | Lípido dietético |
| 16:0 | 23.5 | 22.5 | 37.0 | 21.6 | 14.0 |
| 16:1 | 3.8 | 7.3 | 0.6 | traza | 2.7 |
| 18:0 | 14.0 | 7.5 | 12.4 | 32.5 | 2.4 |
| 18:1 | 38.4 | 44.7 | 31.4 | 17.3 | 29.1 |
| 18:2 | 16.4 | 15.4 | 12.0 | 7.0 | 44.4 |
| 18:3 | 1.4 | 1.3 | 1.0 | 2.0 | 3.2 |
| 20:4 | 1.3 | 0.5 | 2.7 | 10.2 | 0.8 |
| 20:5 | | | | | |
| 22:5 | 0.4 | 0.2 | 8.0 | 3.0 | 0.8 |
| 22:6 | 0.8 | 0.6 | 2.1 | 6.4 | 1.3 |

Composicion elemental de la albumina y la yema

| F2 | | |
|----------|---------------|----------------|
| Elemento | % en Albúmina | % en Yema |
| Azufre | 0.195 | 0.016 |
| Potasio | 0.145 - 0.167 | 0.112 - 0.360 |
| Sodio | 0.161 - 0.169 | 0.070 - 0.093 |
| Fósforo | 0.018 | 0.543 - 0.980 |
| Calcio | 0.008 - 0.02 | 0.121 - 0.262 |
| Magnesio | 0.009 | 0.032 - 0.128 |
| Hierro | 0.0009 | 0.0053 - 0.011 |

136

Composición de albumina, yema y huevo entero

| Componente del huevo | % Proteína | % Lípidos | % Carbohidratos | % Cenizas |
|----------------------|-------------|-------------|-----------------|-----------|
| Clara | 9.7 - 10.6 | 0.03 | 0.4 - 0.9 | 0.5 - 0.6 |
| Yema | 15.7 - 16.6 | 31.8 - 35.5 | 0.2 - 1.0 | 1.1 |
| Huevo entero | 12.8 - 13.4 | 10.5 - 11.8 | 0.3 - 1.0 | 0.8 - 1.0 |



137

Anexo B

Técnica de precipitación con sulfato de zinc para el análisis de IgG sérica.

Preparación del reactivo.

Hervir 500 mL de agua destilada.

Pesar 104 mg de Sulfato de Zinc heptahidratado.

Una vez que el agua se haya enfriado agregar el Sulfato de Zinc.

Mezclar y verter el reactivo en un frasco ámbar. Sellar con parafilm.

Refrigerarlo a 4°C hasta su uso.

Desarrollo de la técnica.

- 6. Pipetear 6.0 mL del reactivo antes preparado y vertirlo en un tubo Falcon.
- 7. Agregar 100 µL de muestra (suero).
- 8. Mezclar en un vórtex durante 15 a 20 segundos.
- 9. Incubar a temperatura ambiente durante una hora.
- 10. Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de la lectura.
- 11. Encender la computadora y abrir el programa CARY.
- 12. Seleccionar la longitud de onda de 600 nm.
- 13. Realizar la "lectura cero" colocando el Sulfato de Zinc preparado en ambas las cubetas para espectrofotómetro.
- 14. Mezclar nuevamente el contenido de los tubos en un vórtex durante 15 a 20 segundos.
 - 15. Vaciar el contenido en la cubeta correspondiente.
 - 16. Realizar la lectura de la muestra.
 - 17. Los resultados se expresarán en mg/mL.

Anexo C

Técnica de extracción de IgY con PEG 6000

- Se toman 5 mL de yema del tubo y se colocan en dos tubos Falcon de 50 mL (5 mL en cada tubo).
- 2. Se añaden 10 mL de solución PBS (Buffer Fosfatado Salino) a cada tubo y se homogeniza.
- 3. Se añade un 3.5% del volumen total (de cada tubo) de PEG (Polietilenglicol) 6000, se homogeniza durante 10 minutos en un vórtex y después se centrifuga a 5000 rpm durante 40 minutos a 4°C.
- 4. El sobrenadante se filtra a otro tubo a través de un papel filtro.
- 5. Se añade 8.5% de PEG 6000 en relación al volumen total del tubo y se centrifuga a 5000 rpm durante 40 minutos a 4°C.
- 6. El sobrenadante se descarta y el pellet resultante de la centrifugación se disuelve con 1 mL de PBS.
- 7. Se agregan 9 mL más para obtener un total de 10 mL de solución de PBS.
- 8. La solución se combina con 12% de PEG 6000 y los tubos se centrifugan a 5000 rpm por 40 minutos a 4°C.
- El sobrenadante se descartado y el pellet obtenido se reconstituye en 800 μL de PBS y se mezcla con un vórtex.
- 10. Finalmente, el extracto se transfiere a una membrana de diálisis para remover las sales.
- 11. Se evalúa el contenido de IgY mediante espectrofotometría.





TESIS TESIS TESIS TESIS