



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON OPCIÓN A: AGRONÓMICAS O
VETERINARIAS**

TESIS

**EFFECTO DE LA INMUNOGLOBULINA Y (IgY) DE YEMA DE HUEVO DE
GALLINAS HIPERINMUNIZADAS, SOBRE LA CARGA PARASITARIA Y
BACTERIANA FECAL EN CANINOS.**

QUE PRESENTA

MVZ. Estefany Del Carmen Vázquez Sánchez

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

TUTOR

DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores

Dr. Fernando Alberto Muñoz Teneria

Dr. Carlos Cruz Vázquez

Jesús María, Ags., junio de 2022



DR. RAUL ORTIZ MARTINEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Integrante del Comité Tutoral de la estudiante
ESTEFANY DEL CARMEN VÁZQUEZ SÁNCHEZ, quien realizó la tesis titulada:

**EFFECTO DE LA INMUNOGLOBULINA Y (IgY) DE YEMA DE HUEVO DE
GALLINAS HIPERINMUNIZADAS, SOBRE LA CARGA PARASITARIA Y
BACTERIANA FECAL EN CANINOS.**

y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de
Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda
proceder a imprimirlo, y 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
permiso enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de junio de 2022.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Teódulo Quezada Tristán'.

Dr. Teódulo Quezada Tristán
Director de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Clínica Veterinaria
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



CENTRO DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

DR. RAUL ORTIZ MARTINEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como integrante del Comité Tutoral de la estudiante **ESTEFANY DEL CARMEN VÁZQUEZ SÁNCHEZ**, quien realizó la tesis titulada:

EFFECTO DE LA INMUNOGLOBULINA Y (IgY) DE YEMA DE HUEVO DE GALLINAS HIPERINMUNIZADAS, SOBRE LA CARGA PARASITARIA Y BACTERIANA FECAL EN CANINOS,

Y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla, y 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 17 de junio de 2022.

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Asesor de Tesis

Centro de Ciencias Agropecuarias





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAUL ORTIZ MARTINEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como integrante del Comité Tutorial de la estudiante **ESTEFANY DEL CARMEN VÁZQUEZ SÁNCHEZ**, quien realizó la tesis titulada:

EFFECTO DE LA INMUNOGLOBULINA Y (IgY) DE YEMA DE HUEVO DE GALLINAS HIPERINMUNIZADAS, SOBRE LA CARGA PARASITARIA Y BACTERIANA FECAL EN CANINOS.

Y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla, y 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 17 de junio de 2022.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernando Muñoz Tenería'.

Dr. Fernando Alberto Muñoz Tenería
Asesor de Tesis



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 20/06/2022

NOMBRE: Estefany del Carmen Vázquez Sánchez ID: 285866

PROGRAMA: Maestría en Ciencias con opción a: Agronómicas o Veterinarias IGAC (del postgrado): Producción y Salud Animal

TIPO DE TRABAJO: Tesis Trabajo Práctico
 EFECTO DE LA IMMUNODOSIS Y (gp) DE YEMA DE HUEVO DE GALINAS HIPERINMUNIZADAS, SOBRE LA CARGA PARASITARIA Y BACTERIANA FECAL EN CANINOS.

TITULO: El estudio aporta información para usar la IgY de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas y no hiperinmunizadas como una alternativa no natural e invasiva para los tratamientos de enfermedades infecciosas, parasitarias o inmunológicas

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): El estudio aporta información para usar la IgY de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas y no hiperinmunizadas como una alternativa no natural e invasiva para los tratamientos de enfermedades infecciosas, parasitarias o inmunológicas

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
SI				El trabajo es congruente con las IGAC, del programa de postgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				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, tecnológica 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				Demanda transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (según de la normatividad anteposita)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (prácticas curriculares, optativas, actividades complementarias, etc., productiva, etc.)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutelar, en caso de los programas profesionales si tiene solo tú tutor podrá tener solo el tuteo
SI				Cuenta con la carta de notificación del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Consejo actualizado
NO				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que precise)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados:</i>				
SI				Aceptación o publicación de los artículos según el nivel de grado
SI				El estudiante es el primer autor
SI				El autor de correspondencia es el Tutor del Trabajo Académico Básico
SI				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya sea son producto de este trabajo de investigación.
SI				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: SI
No

FIRMAS

Elaboró: DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LEY DE ADOLESCENCIA: DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

* En caso de conflicto de intereses, firmar un escrito indicando del todo de la IGAC correspondiente dicho artículo o miembros del comité tutoral, según por el Decano

Revisó: DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO: DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

Autorizó: DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Postgrado
 De conformidad con el AA. 1080 del Reglamento General de Docencia que a su vez se refiere entre las funciones del Consejo Académico... (text partially obscured)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes por haberme brindado la oportunidad de brindarme la educación necesaria para poder obtener un posgrado. Esto no hubiera sido posible sin el apoyo económico que me brindo la U.A.A. con el apoyo financiero PIP/ SA20-1 y CONACYT de la cual fui becaria. Le ofrezco mi gratitud a la Posta zootécnica de la misma universidad y a todo su personal.

Reconozco la gran ayuda que me brindaron los médicos veterinarios de Aguascalientes a los cuales les pedí ayuda para la búsqueda de la población de este proyecto, en especial a las M.V.Z. Ana Lucia Martínez Benítez y M.V.Z. Gloria Karina Escobedo Ramírez quienes me permitieron obtener muestras de sus pacientes y mascotas. Gracias por contribuir a la investigación veterinaria y solidarizarse con su colega.

Este proyecto no hubiera podido efectuarse sin el asesoramiento y seguimiento del Dr. Teódulo Quezada Tristán, quien siempre me apoyo y confió en este trabajo. Así como de mi comité tutorial conformado por el Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores, Dr. Fernando Muñoz Teneria y el Dr. Carlos Cruz Vázquez, M.C. Felipe De Jesús Diaz Serrano. Por ello no me queda más que decirles ¡Gracias!

Una mención especial para mi queridísimo amigo, que me apoyo y ayudo tanto en mi estancia en Aguascalientes, para ti M.V.Z. Efrén Martínez, no sé qué hubiera hecho sin tu apoyo tan valioso en todo, tu hiciste que los tiempos de pandemia fuera más llevaderos.

Agradezco con el corazón al M.V.Z. Salvador Alejandro Miramontes Álvarez por apoyarme y escucharme cuando más lo necesite, gracias por recordarme todo lo que puedo hacer y por regresarme la confianza en mí, es algo que nunca voy a olvidar.

Pero sin duda, nada de esto hubiera sido posible sin el apoyo incondicional que siempre me ha brindado mi familia, gracias a mi padre por siempre impulsarme a salir de mi zona de confort y tener esa ambición y hambre de conocimiento. Gracias a mi madre por estar siempre pendiente de mis necesidades y brindarme todo su amor, y gracias a mis queridos hermanos por apoyarme y enseñarme a ver siempre la vida con humor, todos mis logros siempre son y serán para ustedes. ¡Los amo!

DEDICATORIA

Para las dos personitas que más amo en la vida, para mis sobrinas Alejandra y Rebeca, cuando crezcan quiero que nunca dejen de creer en ustedes, que superen cada paso que yo di, y que sin importar lo que pase yo siempre estaré orgullosa de lo que son y de lo que logran. Nunca le pongan limite a sus sueños mis niñas.



INDICE GENERAL

<u>CONTENIDO</u>	<u>PAG.</u>
INDICE GENERAL.....	1
INDICE DE CUADROS	4
INDICE DE FIGURAS.....	5
ACRONIMOS	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
JUSTIFICACIÓN	11
1. ANTECEDENTES	12
1.1. SITUACIÓN Y PERSPECTIVA ACTUAL DE LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN MÉXICO Y EL MUNDO	12
1.2. ZONOSIS PARASITARIAS TRANSMITIDAS POR CANINOS	12
1.3. INMUNOLOGÍA DEL SISTEMA GASTROINTESTINAL CANINO	13
1.4. PROTECCIÓN INMUNOLOGICA AL NACIMIENTO.....	13
1.5. RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE FRENTE A AGENTES INFECCIOSOS.....	14
1.6. IMPORTANCIA DE LA MICROBIOTA FECAL EN LA SALUD INTESTINAL CANINA	15
1.7. ENFERMEDADES PARASITARIAS GASTROINTESTINALES	16
1.7.1. GIARDIA.....	17
1.7.2. TOXOCAROSIS.....	19
1.7.3. ANCILOSTOMIASIS.....	21
1.7.4. DIPILIDIASIS	23
1.8. EVALUACIÓN DE SALUD INTESTINAL Y DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS GASTROINTESTINALES	24
1.9. TRATAMIENTO Y PREVENCION DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS GASTROINTESTINALES EN CANINOS.....	24
1.10. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS PARA MANTENER LA SALUD INTESTINAL EN CANINOS.....	25
1.11. TECNOLOGIA IGY.....	27
1.11.1. Antecedentes de la IgY	27
1.11.2. Estructura	28

1.11.3.	Características	29
1.11.4.	Modo de Acción.....	30
1.11.5.	Producción de la IgY.....	31
1.11.6.	Extracción y Conservación de la IgY.....	31
1.11.7.	Ventajas de la IgY.....	32
1.11.8.	Uso de la IgY en animales domésticos.....	33
2.	OBJETIVOS.....	35
2.1.	OBJETIVO GENERAL	35
2.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	35
3.	HIPOTESIS	35
4.	MATERIAL Y METODOS.....	36
4.1.	UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	36
4.1.1.	CARACTERISTICAS DE LAS INSTALACIONES AVICOLAS	37
4.1.2	CLINICAS VETERINARIAS	37
4.1.3	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	37
4.2	MANEJO DE LAS GALLINAS Y EL HUEVO	38
4.2.1	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA IGY.....	39
4.2.2	CUANTIFICACIÓN DE LA IGY	39
4.2.3	PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LA DOSIS DE IGY	40
4.3	MANEJO, OBTENCIÓN Y ANALISIS DE LA MUESTRA DE HECES	40
4.3.1	DETERMINACIÓN DE CARGA PARASITARIA EN HECES.....	40
4.3.2	DETERMINACIÓN CUALITATIVA PARASITARIA	41
4.3.3	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA PARASITARIA	41
4.3.4	DETERMINACIÓN DE LAS UFC/G EN HECES	42
4.4	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	43
4.5	ANALISIS ESTADISTICO	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO.....	46
5.1.1	CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) POR GRAMO DE HECES.....	46
5.1.2	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	48
5.2	ANÁLISIS COPROPARASITOSCÓPICO	49
5.2.1	IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS.....	49
5.2.2	CUANTIFICACIÓN DE HUEVECILLOS POR GRAMOS DE HECES	50
6.	DISCUSIÓN.....	51

6.1 CUANTIFICACIÓN DE UFC/G DE HECES 51

6.2 IDENTIFICACION DE GENEROS BACTERIANOS 52

6.3 CUANTIFICACION HUEVECILLOS POR GRAMOS DE HECES..... 52

6.4 IDENTIFICACIÓN DE PARASITOS EN HECES 53

CONCLUSIONES..... 54

REFERENCIAS 55

ANEXOS..... 65



INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de IgG e IgY..... 29
Cuadro 2 Mecanismos de acción de la IgY 30
Cuadro 3.- Comparación del rendimiento de anticuerpos policlonales de conejo y gallina durante un período de dos semanas después de la segunda inmunización..... 32
Cuadro 4.- Total de bacterias identificadas por pruebas biquímicas..... 48



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de defensa del hospedero contra Giardia lamblia 18

Figura 2. Huevo de Toxocara canis..... 19

Figura 3. Ciclo Biológico de Ancylostoma caninum 22

Figura 4. Huevo de Dipylidium caninum..... 23

Figura 5. Comparación estructura de IgY e IgG. 28

Figura 6. Ubicación del estudio..... 36

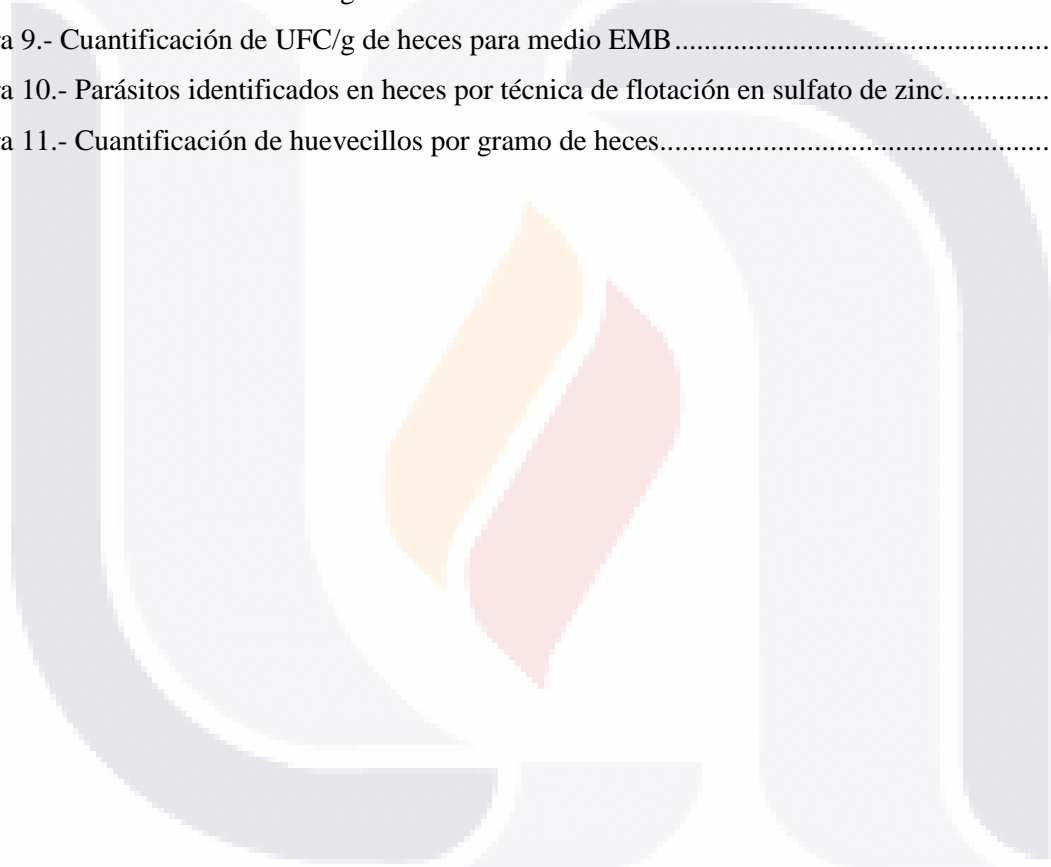
Figura 7.-Curva de calibración..... 39

Figura 8.- Cuantificación de UFC/g de heces en Medio estándar 46

Figura 9.- Cuantificación de UFC/g de heces para medio EMB 47

Figura 10.- Parásitos identificados en heces por técnica de flotación en sulfato de zinc..... 49

Figura 11.- Cuantificación de huevecillos por gramo de heces..... 50



ACRONIMOS

%	Por ciento	MIO	Movilidad, Motilidad y Orinitina
°	Grado	mL	Mililitros
° C	Grado centígrado	mm	Milímetro
>	Mayor que	NK	Células Natural Killer
<	Menor que	pH	Potencial de Hidrogeno
≤	Menos o igual que	PMN	Polimorfonucleares
±	Más-menos	CPV-2	Parvovirus Canino tipo 2
Ac	Anticuerpo	SAS	System Analysis Statistical
ADN-	Ácido	SIM	Ácido sulfúrico, Indol y motilidad
DNA	Desoxirribonucleico	TGI	Tracto gastrointestinal
AMP	Células de Panneth	TSI	Triple azúcar y Hierro
ASB	Albumina Sérica Bovina	UFC	Unidades Formadoras de colonias
EDA	Enfermedad diarreica aguda	Zn	Zinc
NK	Natural Killer	ON	Óxido Nítrico
G	Giardia	NaN3	Azida de sodio
d	Día	Rpm	Revoluciones por minuto
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino	L	Litro
OMS	Organización Mundial de la Salud	µl	Microlitro
g	Gramos	10X	10 aumentos
IL	Interleucina	100X	100 aumentos
PCR	Reacción en cadena de polimerasa	c.b.p.	Cantidad bastante para
ELISA	Enzimoinmunoanálisis de adsorción	XLD	Xilosina, lisina, desoxicolato
IgA	Inmunoglobulina A	EMB	Eosina azul de metileno
IgG	Inmunoglobulina G	LIA	Lisina y Hierro
IgM	Inmunoglobulina M	w/v	Peso/volumen
IgY	Inmunoglobulina Y	SID	Una vez al día
IgE	Inmunoglobulina E	AGCC	Ácidos grasos cadena corta
Kcal	Kilocalorías	TMF	Trasplante de microbiota fecal
KDa	Kilo Dalton	G.I.	Gastrointestinal
kg	Kilogramo	TGI	Tracto gastrointestinal
µg	Microgramo	Ig	Inmunoglobulina
µm	Micrómetro		
m	Metro		
Mcal	Mega calorías		
mg	Miligramos		

RESUMEN

Las enfermedades gastrointestinales en caninos son de los principales motivos de consulta en la clínica diaria. A pesar de todas las medidas preventivas y manejo terapéuticos que se les administra a los perros, los problemas gastrointestinales siguen siendo de los principales motivos de consulta, por ello es de importancia la búsqueda de alternativas de tratamiento. Una alternativa de tratamiento es la utilización de la inmunoglobulina Y. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la inmunoglobulina Y (IgY) de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas, sobre la reducción de la carga parasitaria y bacteriana fecal en caninos.

El estudio se realizó bajo un diseño no experimental de tipo longitudinal. Se seleccionaron 44 caninos de dos a seis meses de edad, raza y sexo indistinto, con un peso promedio de dos a diez kg, y serán divididos al azar en 6 grupos. Para el grupo I (perros sanos), grupo II (perros parasitados con 20mg/kg/SID/ de IgY de yema de gallinas hiperinmunizadas), grupo III (perros parasitados con 20mg/kg/SID/ de IgY de yema de gallinas no hiperinmunizadas), grupo IV (perros parasitados con Fenbendazol 50mg/kg/SID/ por 5 días), grupo V (perros parasitados con 20mg/kg/SID/ de IgY de yema de gallinas hiperinmunizadas y con Fenbendazol 50mg/kg/SID/ por 5 días) y grupo VI (perros sanos con 20mg/kg/SID/ de IgY de yema de gallinas hiperinmunizadas) . La dosis de IgY se administró durante 15 días, los días del 0-15. Se registró la mejoría clínica y de las defecaciones del paciente. Se tomaron muestras de excretas fecales del recto con un hisopo estéril en los días 0, 15 y 30 a todos los sujetos de estudio. Las muestras se procesaron para cuantificación de unidades formadoras de colonias por gramo de heces (UFC/g) y número de huevecillos/g heces. Resultados: no se encontraron diferencias significativas en la administración de la IgY hiperinmunizada sobre las UFC/g de heces y el número de huevecillos/g de heces. Si se encontraron diferencias significativas en los tratamientos de perros sanos con la administración de la IgY hiperinmunizada y la adición de la IgY con tratamientos desparasitante sobre las UFC. Conclusión: la administración de IgY hiperinmunizada con Giardia no disminuye el número de huevecillos/g de heces, pero si disminuye las UFC en perros sanos, y mantiene estable la cuantificación de UFC tras la administración de un desparasitante.

ABSTRACT

Gastrointestinal diseases in canines are one of the main reasons for consultation in the daily clinic. Despite all the preventive measures and therapeutic treatments that are administered to dogs, gastrointestinal problems continue to be the main reasons for consultation, which is why the search for treatment alternatives is important. An alternative treatment is the use of immunoglobulin Y. The objective of this study is to evaluate the effect of immunoglobulin Y (IgY) from egg yolk of hyperimmunized hens, on the reduction of fecal parasitic and bacterial load in canines.

The study was conducted under a longitudinal non-experimental design. 44 canines from two to six months of age, of indistinct race and sex, with an average weight of two to ten kg, were selected and will be randomly divided into 6 groups. For group I (healthy dogs), group II (dogs parasitized with 20mg/kg/SID/ of IgY from yolk of hyperimmunized hens), group III (dogs parasitized with 20mg/kg/SID/ of IgY from yolk of non-hyperimmunized hens), group IV (dogs parasitized with Fenbendazole 50mg/kg/SID/ for 5 days), group V (dogs parasitized with 20mg/kg/SID/ of yolk IgY from hyperimmunized hens and with Fenbendazole 50mg/kg/SID/ for 5 days). days) and group VI (healthy dogs with 20mg/kg/SID/ of IgY from the yolk of hyperimmunized hens). The IgY dose was administered for 15 days, days 0-15. There was clinical improvement and improvement in the patient's bowel movements. Fecal excreta samples were taken from the rectum with a sterile swab on days 0, 15 and 30 from all study subjects. The samples were processed to quantify colony-forming units per gram of feces (CFU/g) and number of eggs/g feces. Results: no significant differences were found in the administration of hyperimmunized IgY on the CFU/g of feces and the number of eggs/g of feces. If significant differences were found in the treatments of healthy dogs with the administration of hyperimmunized IgY and the addition of IgY with deworming treatments on CFUs. Conclusion: the administration of hyperimmunized IgY with Giardia does not decrease the number of eggs/g of feces, but it does decrease the CFU in healthy dogs, and maintains stable CFU quantification after administration of a dewormer.

INTRODUCCIÓN

Los problemas gastrointestinales son de los principales motivos de consulta en la clínica de caninos (Agüero Vega, 2006). Según Ramírez y col. (2014) la presentación de enfermedades gastrointestinales es más evidente en perros menores de un año, dentro de estos los cachorros de los 0-4 meses son los más afectados con un 67.58% de predisposición. De estas enfermedades, las provocadas por parásitos son las más frecuentes en cachorros. Los parásitos frecuentemente encontrados en el tracto digestivo de caninos son *Isoospora*, *Toxocara canis*, *Giardia lamblia*, *Ancylostoma caninum* y *Dypilidium caninum*.

El tratamiento para infecciones parasitarias se basa en medicamentos para reducir la signología, infecciones secundarias y la eliminación del agente causal. Para ello se utilizan diversos desparasitantes, que son eficaces para la eliminación del agente causal pero que alteraran la microbiota intestinal del perro, predisponiéndolo a un incremento en la presentación de enfermedades gastrointestinales (Moretó y Pérez, 2009). Sin mencionar que, por el uso descontrolado de desparasitantes para el manejo preventivo y terapéutico de parasitosis en caninos, cada vez hay mayor resistencia parasitaria (Peña y col., 2017).

Por lo anterior se han buscado nuevas alternativas de tratamiento, que ayuden en la terapéutica de infecciones del tubo digestivo, sin alterar la microbiota gastrointestinal, ni causar resistencia a los medicamentos empleados.

Una opción reciente para el tratamiento y prevención de enfermedades gastrointestinales es la tecnología a base de IgY. La IgY es un anticuerpo de origen aviar, que es utilizado en medicina veterinaria y humana para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas (Pereira y col., 2019). En los caninos se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de infecciones virales, Ngyen y col. En 2006 demostrando que su uso en cachorros infectados con parvovirus canino tipo 2, redujo las manifestaciones clínicas de la enfermedad y mejoro la ganancia de peso de los cachorros. Pero falta por explorar el efecto de la IgY con otros agentes infecciosos en caninos.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la inmunoglobulina de yema de huevo (IgY) de gallinas hiperinmunizadas con *Giardia lamblia*, sobre la carga parasitaria y bacteriana fecal en caninos cachorros. Lo que permitirá conocer si la IgY es eficaz para el tratamiento de enfermedades parasitarias en caninos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales motivos de consulta en la clínica veterinaria diaria de pequeñas especies, son los problemas gastrointestinales, caracterizados por vómitos y diarreas. Por lo que la salud gastrointestinal en perros es un tema de alta relevancia médica, por estar expuesto a gran cantidad de virus, bacterias, parásitos y hongos.

Actualmente existen en el mercado una gran cantidad de productos preventivos y terapéuticos gastrointestinales, que van desde alimentos nutracéuticos, probióticos, prebióticos, antibióticos, desparasitantes, proteínas plasmáticas, por mencionar algunas. Todos ellos están destinados a mantener o restaurar la homeostasis de este sistema. A pesar de todas las medidas preventivas y manejo terapéuticos disponibles para su uso en caninos, los problemas gastrointestinales siguen siendo de los principales motivos de consulta. Los productos terapéuticos actuales para el manejo de enfermedades infecciosas del tubo digestivo tienen repercusiones en la microbiota gastrointestinal y uso inadecuado ocasiona disbiosis y resistencia a los medicamentos administrados, lo que dificulta la terapéutica.

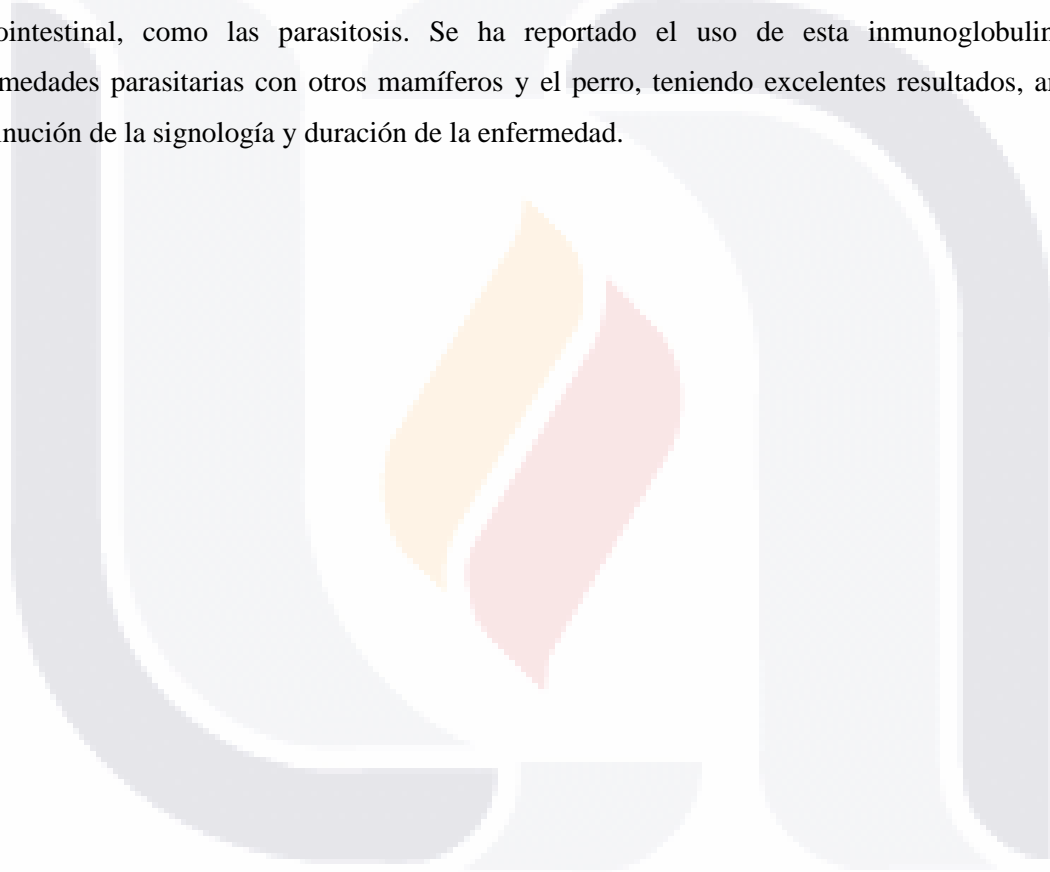
Las parasitosis gastrointestinales no solo son un problema en la especie canina, también son de importancia en la salud pública. Cada vez son más frecuentes las zoonosis transmitidas por esta especie, lo cual se debe a la estrecha relación que se ha ido dando entre el humano y el perro a través de los siglos.

JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de alternativas para el tratamiento y prevención de enfermedades gastrointestinales en caninos es de vital importancia, no solo para la salud animal, si no para la salud pública en general, debido a las múltiples enfermedades zoonóticas que existen.

El uso de anticuerpos de origen mamífero ha sido utilizado ampliamente para tratar, prevenir y diagnosticar enfermedades. La IgY es una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades tanto en humanos como en animales, y las enfermedades parasitarias no son una excepción.

La IgY es una excelente propuesta para el tratamiento y prevención de enfermedades del tracto gastrointestinal, como las parasitosis. Se ha reportado el uso de esta inmunoglobulina en enfermedades parasitarias con otros mamíferos y el perro, teniendo excelentes resultados, ante la disminución de la signología y duración de la enfermedad.



1. ANTECEDENTES

1.1. SITUACIÓN Y PERSPECTIVA ACTUAL DE LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN MÉXICO Y EL MUNDO

El principal síntoma de enfermedad gastrointestinal es la diarrea. La diarrea se define como la deposición de heces con una mayor frecuencia de lo habitual, de consistencia semi-liquida a liquida. Es difícil determinar la etiología de la enfermedad diarreica aguda (EDA) debido a que 94% de estas se catalogan como ocasionadas por microorganismos (amebiasis, shigelosis, fiebre tifoidea, giardiasis, entre otros) y otras como mal definidas (intoxicación alimentaria, paratifoidea, salmonelosis y otras enfermedades por protozoos) (Olaiz y col., 2019).

En personas con signos de EDA, los géneros bacterianos más frecuentemente aislados son *Shigella*, *Salmonella* y *Campylobacter* (Da Silva, 2011). En cuanto a la especie canina, tiene una amplia variedad de entero bacterias patógenas presentes en su tracto gastrointestinal, pero, al igual que en humanos, los géneros *Campylobacter*, *Salmonella* y *Clostridium* producen signología gastrointestinal (Schaer, 2006). Dentro de los agentes causales de EDA, tanto en humanos como en animales, los virus son los que producen una mayor mortalidad, los parásitos son el agente más frecuentemente encontrado, mientras que el papel de las bacterias enteropatógenas en la EDA es principalmente secundaria a la infección por parásitos o virus (Da Silva, 2011).

En los caninos los principales agentes infecciosos que causan signos gastrointestinales son: enfermedades virales (Parvovirus, Coronavirus y Distemper), parasitarias (*Isospora*, *Toxocara* y *Giardia*) y bacterianas (*Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium*) (Rangel y col., 2014).

1.2. ZONOSIS PARASITARIAS TRANSMITIDAS POR CANINOS

Desde el punto de vista de la salud pública, los perros no solo tienen importancia por su mordida, también causan contaminación ambiental a consecuencia de sus micciones y defecaciones, excretando también parásitos y microorganismos patógenos que pueden ser zoonóticos (Fok y col., 2001). Los caninos pueden transmitir diversas especies de parásitos a los humanos, como lo son *Toxocara spp*, *Giardia spp*, *Ancylostoma spp*, *Spirocerca spp*, por mencionar algunas, de ahí la importancia de su control, por el impacto que estas tienen en la salud pública (Del Campillo y col., 1999). Entre los agentes infecciosos propios de los perros se destacan los helmintos y protozoarios intestinales (*Toxocara canis*, *Anquilostómidos*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*), potencialmente patógenos para el ser humano y los perros, teniendo un interés zoonótico (Oliveira y col., 2002).

1.3. INMUNOLOGÍA DEL SISTEMA GASTROINTESTINAL CANINO

El sistema inmune mantiene la homeostasis del organismo, diferenciando lo propio de lo extraño para activar una respuesta de eliminación a los antígenos peligrosos y tolerar a los antígenos inocuos. Tradicionalmente se divide en un sistema inmune innato de rápida respuesta y un sistema inmunitario adaptativo con reconocimiento, respuesta específica y memoria inmunológica (Saker, 2006). La inmunidad innata está basada en barreras fisiológicas que aíslan el medio interno del externo, así como en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), por receptores especializados en leucocitos y células epiteliales. Dentro de las barreras fisiológicas del sistema gastrointestinal se incluyen epitelios que funcionan como barreras físicas y secretan fluidos para mantener su integridad como la saliva, moco, sales biliares, peristaltismo, mucus, pH y microbiota autóctona. Así mismo cuenta con células innatas que incluyen monocitos, macrófagos, granulocitos polimorfonucleares, células dendríticas, células natural killer (NK) y linfocitos intraepiteliales, así como factores solubles como el sistema del complemento y citocinas innatas (Blanco y col., 2013).

El sistema inmune mucosal mas extenso es el del sistema gastrointestinal, donde el sistema inmune de mucosas interactúa con la microbiota intestinal, desempeñando un papel fundamental en la homeostasis de las mucosas, manteniendo un ambiente antiinflamatorio protector. El sistema inmunitario de la mucosa intestinal mantiene la homeostasis por inmunidad innata y adquirida a lo largo de la superficie epitelial. El tejido linfoide asociado al intestino representa el 80% del sistema inmune de la mucosa y se distribuye por todo el intestino, como tejido linfoide difuso (células inmunes dispersas en la lamina propia) y tejido linfoide estructurado que incluye las placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, folículos linfoides aislados (Moretó y Pérez, 2009).

Una función clave del epitelio intestinal es servir como barrera selectiva que permite la absorción de nutrientes evitando el contacto con antígenos peligrosos como toxinas y microorganismos. Sin embargo, el epitelio está bajo un delicado equilibrio entre la absorción de nutrientes, la tolerancia a la microbiota y antígenos inocuos, y la presencia de patobiontes, pero manteniendo siempre un ambiente antiinflamatorio. La disrupción de este equilibrio genera la patogénesis de enfermedades gastrointestinales con la pérdida de la homeostasis gastrointestinal (Barrett, 2008).

1.4. PROTECCIÓN INMUNOLOGICA AL NACIMIENTO

Al nacer, debido a la placentación endoteliochorial en los caninos solo del 1-7% del total de IgG es obtenida por inmunidad pasiva de origen placentario. Por lo cual la gran mayoría de IgG y células

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

inmunes son absorbidos al nacimiento, por medio de la ingesta de calostro durante las primeras horas de vida gracias a la mayor permeabilidad y expresión de receptores para inmunoglobulinas de la mucosa intestinal del neonato, la cual permite el paso a través de la mucosa, de macromoléculas y células para alcanzar la circulación sistémica del neonato (Grundy, 2006). Sin embargo, la mucosa intestinal aumenta sus uniones estrechas y disminuye la expresión de receptores para inmunoglobulinas en los enterocitos en cuestión de horas, por lo que disminuye el paso de células y macromoléculas, incluidos anticuerpos como la IgG. La tasa de absorción de inmunoglobulinas disminuye gradualmente a las pocas horas tras el nacimiento, pasando del 40% al nacer, al 14% a las 8 horas y siendo nula a las 24 horas de nacido (Chastant-Maillard y col., 2012).

De acuerdo a datos experimentales, los cachorros a los 2 días de nacidos, con concentraciones séricas de IgG inferiores a 230 mg/dL, tienen nueve veces más riesgo de morir que un cachorro con concentraciones mayores a 230 mg/dL (Mila y col., 2014).

La protección inmunológica del cachorro no solo depende de la absorción de la IgG en la lactancia. Aunque la IgG es la inmunoglobulina predominante contenida en la leche en los primeros días de lactancia, la IgA aumenta rápidamente convirtiéndose en la principal inmunoglobulina de la leche, desde el día 7 hasta el final de la lactancia (Mila y col., 2017). A diferencia de la IgG que se encarga de la inmunidad a nivel sistémico después de ser absorbida, la IgA tiene una función fundamental en la inmunidad mucosal del individuo. Ambas inmunoglobulinas son cruciales para la inmunidad y mantenimiento de la salud del cachorro los primeros días de vida (Tizard, 2009).

1.5. RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE FRENTE A AGENTES INFECCIOSOS.

El inicio de la signología de una enfermedad infecciosa se genera cuando hay una disrupción de las barreras epiteliales, lo que activa al sistema inmune. La característica común a todas las infecciones parasitarias es que producen moléculas inmunomoduladores con efecto antiinflamatorio, evitando la respuesta inmunológica manteniendo un estado silencioso frente al sistema inmune mucosal del hospedador (Tizard, 2009).

En la defensa contra los protozoos la inmunidad adquirida cobra mayor importancia. En general los anticuerpos actúan frente a los estadios de vida libre, mientras que la inmunidad celular mediada por Linfocitos T actúa en contra del ciclo intracelular de estos. Los anticuerpos séricos dirigidos contra los antígenos de superficie de los protozoos pueden opsonizarlos, aglutinarlos o neutralizarlos. Los parásitos intracelulares utilizan múltiples estrategias para evitar la respuesta inmunitaria. La mayoría

penetran a la célula mediante procesos mediados por el hospedador como la fagocitosis (Tizard, 2009).

En cuanto a la defensa bacteriana y viral, la célula epitelial juega un papel muy importante. La activación de los mecanismos de defensa depende en primer lugar del reconocimiento rápido a través de receptores innatos (PRRs, receptores de reconocimiento de patrones, por sus siglas en inglés) que detectan los PAMPs de estos microorganismos. La activación de los PRRs genera inmediatamente señales que activan factores de transcripción al núcleo celular, activando la expresión de genes para la síntesis de citocinas proinflamatorias. De este modo, las células epiteliales inician el proceso inflamatorio, alterando la permeabilidad vascular y reclutando leucocitos al sitio de daño (Guarner, 2007).

1.6. IMPORTANCIA DE LA MICROBIOTA FECAL EN LA SALUD INTESTINAL CANINA

La microbiota gastrointestinal forma un microambiente complejo, que juega un papel importante en la salud e inmunidad del hospedero, está compuesto por billones de microorganismos que recubren el tracto gastrointestinal, desde la boca al ano. La microbiota está compuesta por bacterias, hongos, arqueas, virus y protozoos (Wernimont y col., 2020).

La microbiota gastrointestinal participa en múltiples procesos fisiológicos del hospedero, manteniendo una gran diversidad de microorganismos que diluyen, eliminan y compiten con potenciales patógenos, producen una gran cantidad de metabolitos y nutrientes que modulan el sistema inmune de mucosas y ayudan a mantener la integridad de las células epiteliales, fortaleciendo y estimulando constantemente las barreras fisiológicas sin generar inflamación (Garcia y Minamoto, 2013).

La microbiota varía en abundancia y diversidad a lo largo del tracto gastrointestinal, su número fluctúa desde 10^2 hasta 10^{14} UFC/g de contenido luminal, encontrándose los valores más alto en intestino grueso. De manera que, el conteo de UFC tampoco es el mismo para las excretas, que para el contenido luminal. En el 2005, Mentula y colaboradores reportaron diferencias significativas entre la cuantificación de UFC/g en yeyuno (10^2 a 10^6 UFC/g) y excretas (10^8 a 10^{11} UFC/g). A lo largo del TGI, encontramos los siguientes filos de bacterias: *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actino bacterias* (Pilla y Suchodolski, 2020)

Las bacterias intestinales ayudan a la digestión de alimentos, extracción de nutrientes, producción de sustancias como ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y vitaminas K, B9 y B12. Estos organismos defienden el sistema gastrointestinal de invasores por competencia directa de nutrientes, estimulación de antimicrobianos, producción de péptidos por el enterocito y la inmodulación del huésped (Redfern y col., 2017).

Las bacterias son las más abundantes y metabólicamente activas de toda la microbiota gastrointestinal. En estudios realizados se ha mostrado que las bacterias pueden representar hasta el 98% de toda la microbiota fecal en perros. La microbiota es dinámica y está sujeta a cambios importantes durante la vida del hospedero en respuesta a una variedad de factores que incluyen la dieta, factores hormonales y ambientales, fármacos, y procesos de enfermedad (Barko y col., 2018).

Un factor muy importante que repercute en la microbiota intestinal es el estrés, tal y como lo menciona Lutgendorff en el 2008, reduce el número de bacterias benéficas, permitiendo de esta manera la proliferación de bacterias patógenas y alterando la homeostasis del ambiente intestinal.

1.7. ENFERMEDADES PARASITARIAS GASTROINTESTINALES

Los parásitos gastrointestinales constituyen la causa más común de las enteritis agudas y crónicas en perros. Afecta a animales de cualquier edad, aunque los jóvenes son los más susceptibles. Los parásitos causan diarrea a través de diversos mecanismos. La mayor parte lesiona la mucosa y reduce la superficie de absorción intestinal dando lugar a una diarrea de carácter osmótico. Otros inducen una secreción o exudación intestinal, o bien alteran la motilidad del intestino causando diarrea. En la mayor parte de los casos se alteran simultáneamente dos o más de estos mecanismos, ocasionando diarreas de carácter mixto (Schaer, 2006). Los cánidos son hospedadores de diversos parásitos, de los cuales los más comunes y ampliamente diseminados son: nematodos, cestodos y protozoarios. Los efectos de estos parásitos en la salud animal van desde efectos subclínicos a crónicos que deterioran la condición del animal y casos extremos a ocasionar la muerte (Encalada y col., 2011). Dentro de las enfermedades parasitarias con mayor prevalencia en los perros domésticos se encuentran *Isoospora canis*, *Toxocara canis*, *Giardia lamblia*, *Ancylostoma caninum* y *Dypilidium caninum* (Rangel y col., 2014); (López, 2018).

Las enfermedades gastrointestinales representan una de las causas más comunes de atención médica en las clínicas veterinarias (Armstrong, 2011). En un estudio observacional analítico, realizado a partir de la base de datos del Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Universidad Autónoma del Estado de México (HVPE-UAEM) durante el periodo, agosto de 2012 - diciembre de 2013, se

tomaron todos los casos de pacientes caninos con un diagnóstico de enfermedad gastrointestinal. Se observó que los animales más afectados por las patologías del tracto gastrointestinal fueron pacientes menores del año de edad representando el 72.23% del total de la población estudiada. Mientras que dentro de este grupo de edad de los pacientes caninos el grupo de animales de entre 0 a 4 meses de edad, fueron los más afectados ya que representaron el 67.58%; esto fue asociado a que los cachorros tienen un sistema inmune menos vigoroso por no tener aun, un desafío antigénico extenso, como en el caso de los adultos. De los 211 casos clínicos con un diagnóstico definitivo, fueron en primer lugar las gastroenteritis de origen parasitario con un 42.65% de los casos, gastroenteritis de origen viral con un 28.85%, gastroenteritis alimentaria el 21.32%, obstrucciones intestinales con el 3.72% casos totales y por último se presentaron con menor frecuencia patologías como intususcepción, gastroenteritis de origen farmacológico, afecciones hepáticas, megaesófago congénito y pancreatitis (Rangel y col., 2014).

Las asociaciones parasitarias son comunes en caninos, se ha demostrado que es más común encontrar monoparasitosis (68.21%), seguida de las biparasitarias (23.17%) y por último las triparasitarias (8.60%) (Encalada y col., 2011). Mundialmente el 35.0% de las zoonosis son consideradas de etiología parasitaria y representan un gran problema de salud pública (Vélez y col., 2014). En México la parasitosis de mayor prevalencia en humanos es la Giardiasis, causada por el protozoo *Giardia lamblia*, misma que tiene como hospedero al perro doméstico (Vázquez y Campos, 2009).

1.7.1. GIARDIA

La Giardiasis es una infección protozoaria intestinal, crónica, presente en todo el mundo en la mayoría de los mamíferos domésticos, salvajes, aves e inclusive en el hombre. Los animales jóvenes son los que presentan más frecuentemente esta enfermedad. Afecta principalmente las primeras porciones del intestino delgado, y ocasionalmente en el intestino grueso, se caracteriza prioritariamente por un síndrome de mala absorción y diarrea, afectando la salud de los animales. (Del Campillo y col., 1999). Uno de los aspectos más desconcertantes de la infección por *Giardia* es la diversidad de síntomas y signos en los pacientes afectados tanto en humanos como en animales. Su presencia en el intestino puede causar diarrea, pérdida del apetito, distensión y dolor abdominal, sin embargo, muchos de los animales afectados pueden permanecer asintomáticos a pesar de la expulsión de quistes al medio ambiente (Tysnes y col., 2014). El pasaje de parásitos en las heces no es continuo: un solo examen de deposiciones puede demostrar sólo 50 a 70% de las infecciones, por lo cual se recomienda obtener tres muestras, una cada día. El diagnóstico de la *Giardiasis* tradicionalmente ha dependido de la

identificación de trofozoítos o quistes en heces frescas de animales afectados (Carvajal, 2008). La flotación con sulfato de magnesio o sulfato de zinc es el método de elección para la concentración y detección de quistes de *Giardia* spp (Del Campillo y col., 1999).

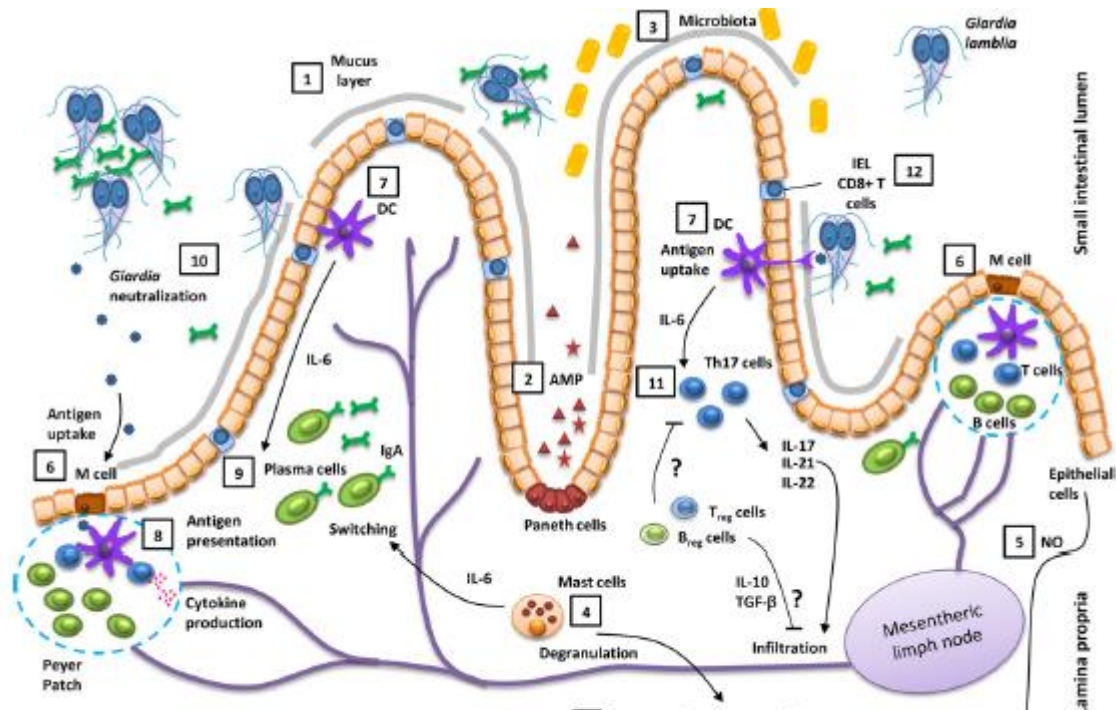


Figura 1. Mecanismos de defensa del hospedero contra *Giardia lamblia*

(1). Los péptidos antimicrobianos liberados por las células de Panneth (AMP) y otras células, pueden matar a trofozoítos (2). La microbiota tiene un efecto anti-*Giardia* por competencia, toxicidad directa o por modulación de la respuesta inmune. Y, además, contribuye a preservar la integridad del intestino (3). Los mastocitos liberan citocinas pro-inflamatorias como la IL-6, la degranulación de su contenido promueve la peristalsis (4). Las células epiteliales y algunos leucocitos liberan óxido nítrico (ON), el cual tiene efecto citostático, inhibe los procesos de desenquistamiento y enquistamiento y contribuye a la peristalsis (5). Las células M son importantes para la captura de antígeno hacia placas de Peyer (6). Las células dendríticas juegan un papel como conectores de la inmunidad innata y adaptativa. Se localizan en lámina propia y placas de Peyer donde pueden tener contacto con el antígeno (7). Las dendríticas fagocitan y procesan antígenos de *Giardia* para presentarlos a células T a través de sus MHC-II. Las células T activadas liberan un panel de citocinas que modulan la respuesta anti-*Giardia* (8). La IL-6 liberada por mastocitos, dendríticas o células T, modula la maduración de células B e induce un cambio de isotipo ("switching") hacia IgA (9). Estos anticuerpos pueden actuar como neutralizantes (10). Las células T CD4+ Th17 liberan citocinas IL-17, IL-21, IL-22, los cuales tienen un papel pro-inflamatorio anti-*Giardia* (11). Los linfocitos intraepiteliales (IEL) contribuyen en el daño patológico durante la giardiasis. (López-Romero et al. 2015).

1.7.2. TOXOCAROSIS

Esta parasitosis es provocada por un nematodo del orden Ascaridida, llamado *Toxocara canis*. Son parásitos relativamente grandes, de color blanquecino, su cutícula posee finas estriaciones transversales. Tienen 3 labios y lateramente dos alas cervicales. Los machos miden de 4-10 cm X 2-3 cm de diámetro y las hembras de 5-18 cm. Los huevos (Figura 2) son esféricos de 75-90 μm y poseen una cubierta gruesa y rugosa con varias capas concéntricas. Son de color marrón oscuro, no segmentados, y su contenido ocupa prácticamente todo el espacio interior (Del Campillo y col., 1999).

La infestación por *Toxocara canis* en el perro surge por tres fuentes: transmisión intrauterina,



Figura 2. Huevo de *Toxocara canis*

Fuente: (Blagburn y Dryden, 1999)

lactogénica e ingestión de huevos embrionados del medio ambiente. En el caso de los humanos generalmente se da por vía oral, por ingestión de alimentos contaminados sin lavar con huevos de *Toxocara* o por ingestión de larvas presentes en carne cruda o mal cocida de huéspedes paraténicos (pollos, rumiantes o cerdos) (Overgaauw y van Knapen, 2013).

Los caninos se infestan por ingestión de huevos con la segunda larva, este eclosiona en el intestino y penetra en la mucosa intestinal, después de esto comienza la migración larvaria, la cual es determinada por edad, sexo, estado reproductivo e infestaciones previas (Rojas-Salamanca y col., 2016).

En cachorros, la migración ascaroide finaliza en el intestino con la muda de la cuarta larva, la cual crece, copula y es excretada en las heces. En perros adultos la mayoría de las larvas llegan al intestino, si no que pasan a la circulación y permanecen en diferentes tejidos (hígado, musculo, corazón, pulmones), en los perros adultos, las larvas no logran su desarrollo intestinal (Overgaauw y van Knapen, 2013).

En el caso de perras gestantes con larvas tisulares, en el último tercio de la gestación estas se reactivan y migran al útero para infestar a los cachorros. Si la hembra no había tenido infestación y se infesta durante la gestación, las larvas emigran a feto, pero llegan al intestino de la perra para alcanzar su madurez sexual. Tras el parto un pequeño número de larvas reactivas pueden eliminarse en la leche, pero es un tipo secundario de transmisión para este parásito. Los cachorros infestados por vía transplacentaria comienzan con la eliminación de huevos en las heces a las 2 o 3 semanas de edad (Browman, 2011).

Para el diagnóstico de *Toxocara canis*, se debe tener en cuenta el estadio larvario que está cursando el huésped. El diagnóstico de rutina para cachorros, los cuales tienen eliminación de quistes en las heces, es por medios coprológicos. Los métodos coprológicos con mayor efectividad para detectar a este parásito son las técnicas de flotación y sedimentación (Dryden y col., 2005).

Para su tratamiento, este también va a depender del huésped y estadio larvario en que se encuentre. La terapéutica en cachorros con eliminación de quistes en heces va a depender de la edad del animal. El pamoato de pirantel es el único tratamiento autorizado en cachorros de 2 semanas de edad. Para cachorros de más de 6 semanas de edad pueden ser tratados con fenbendazol o ivermectina y pamoato de pirantel (Browman, 2011). El fenbendazol oral a 50 mg/kg cada 24 h durante tres días es el tratamiento de elección para toxocariasis canina. (Delgado y Rodríguez-Morales, 2009).

1.7.3. ANCILOSTOMIASIS

Ancylostoma caninum es un nematodo que se localiza en el intestino delgado de caninos domésticos y salvajes. Los vermes en estado fresco son de color grisáceo o gris rojizo y miden de 1-2 cm; los huevos son ovalados de unos 45 X 75 μm , con cubierta fina y transparente y tienen 6-8 células al salir con las heces (Del Campillo y col., 1999).

Su transmisión se produce por ingestión de huevos del medio ambiente o a través del calostro (figura 3). Las larvas también pueden infestar por vía transplacentaria, los cachorros infestados comienzan con la expulsión de huevos en las heces a los 10-12 días de nacidos. Las larvas recién salidas del huevo tienen la capacidad de penetrar la piel. Los adultos habitan en la luz del intestino delgado donde se adhieren a la mucosa intestinal (Nelson y Couto, 2010)

Esta parasitosis puede ir desde una infección asintomática hasta una pérdida de sangre que puede ser mortal, esto depende de la resistencia del hospedador y del grado de infección. La forma clínica de esta enfermedad, puede presentarse de manera: hiperaguda (presente en neonatos), aguda (cachorros y perros adultos) y crónica (Browman, 2011)

La signología varía según la forma clínica presente. La presentación hiperaguda es la más agresiva, el paciente presenta diarreas con sangre y moco, mucosas pálidas, consecuente a una anemia severa, y ocasionalmente signos respiratorios consecuente a la migración larvaria, en estos casos el tratamiento antihelmíntico debe ser acompañado de transfusión sanguínea. En la forma aguda y crónica, suele presentarse pérdida de peso, lesiones cutáneas y de pelaje, signos intermitentes de enfermedad gastrointestinal, la respuesta al tratamiento con solo el antihelmíntico suele ser alta, y la terapia de soporte más allá de una dieta pertinente no es necesaria en la mayoría de los casos (Taylor y col., 2016).

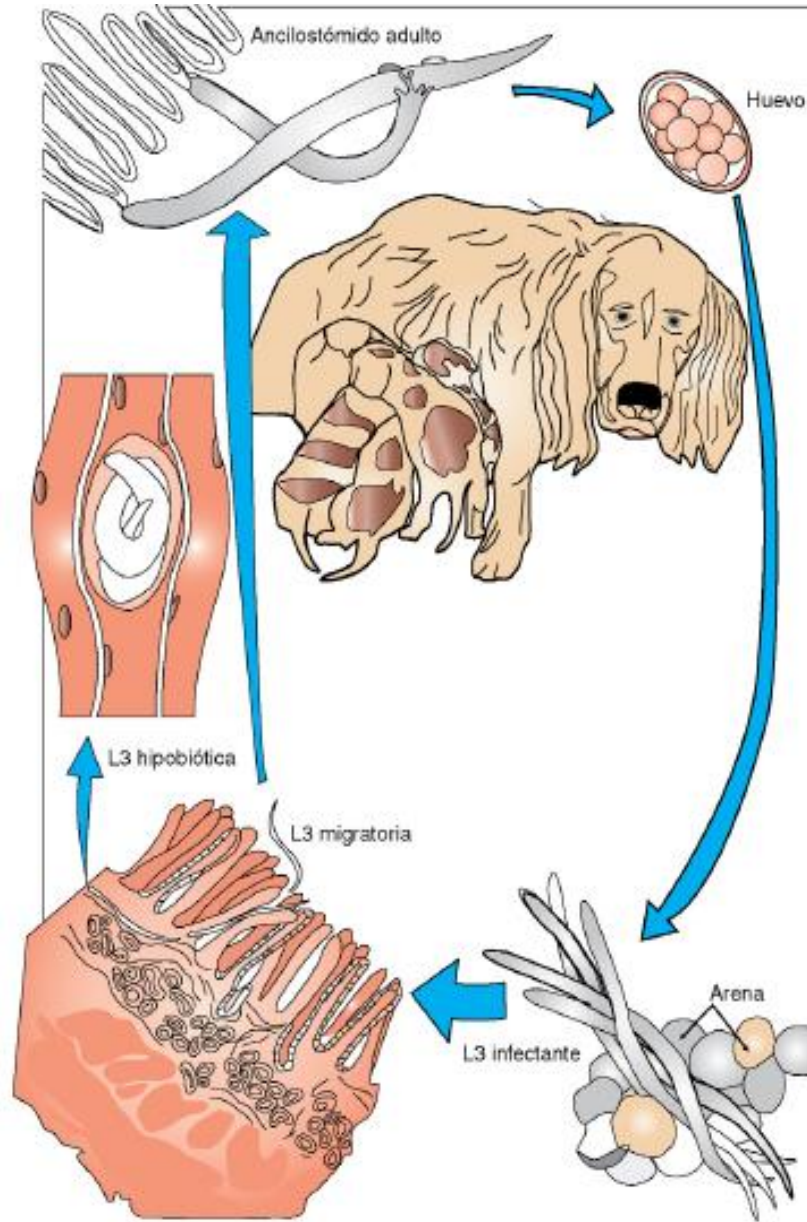


Figura 3. Ciclo Biológico de *Ancylostoma caninum*

(Browman, 2011)

Las larvas pueden infectar al hospedador, tanto por deglución, como por penetración cutánea. Los huevos se eliminan con las heces alrededor de las 2 semanas tras la ingestión de las larvas y un mes tras la penetración percutánea de las larvas. Sin embargo, o maduran todas las larvas, algunas invaden las células de la musculatura esquelética o la pared intestinal y entran en un estado de latencia. Estas larvas se reactivan posteriormente y migran al intestino delgado donde maduran, como a la glándula mamaria, donde se excretan. Las larvas latentes se reactivan durante las 2 últimas semanas de gestación.

1.7.4. DIPILIDIASIS

La Dipilidiasis es una zoonosis parasitaria ocasionada por *Dipylidium caninum* (*D. caninum*) es un parásito perteneciente a la familia de los cestodos. Está conformado por una cadena de proglótides elípticas, miden de 100-700 mm de longitud, cada proglótide tiene un ancho máximo de 3,2 mm y 10-12 mm de longitud. Su escólex es pequeño, romboide, con 4 ventosas ovales y profundas. Los huevos se encuentran en grupos de 5-30 en el interior de capsulas ovígeras (Figura 4), son de color marrón amarillento y casi esférico (Del Campillo y col., 1999).

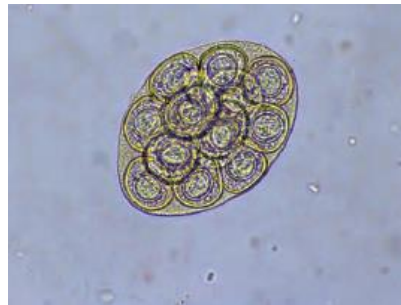


Figura 4. Huevo de Dipylidium
Fuente:(Blagburn & Dryden, 1999)

Los perros dispersan los proglótidos y los huevos en sus heces, los huéspedes intermediarios son pulgas *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis* y *Pulex irritans*, que se infestan cuando sus larvas ingieren heces de perros contaminadas con los huevos de *D. caninum*. Estas pulgas son ingeridas por los perros en su forma adulta, y parasitan el intestino de delgado de sus huéspedes definitivos (perros y gatos). Donde se alimentan y reproducen, para así después ser expulsados en las defecaciones e iniciar de nuevo con su ciclo. Los humanos contraen la infección con la ingesta accidental de pulgas infectadas ocasionando teniasis (Jiang y col., 2017).

El adulto en el intestino es poco patógeno, puede ser tolerado sin causar efectos clínicos significativos. Los signos clínicos más comunes son molestias anales, picazón que se manifiesta en los perros frotando su ano contra el piso. En cuanto a su tratamiento y control, debe tomarse en cuenta el ciclo del parásito y no olvidar al huésped intermediario, para poder eliminar por completo la infestación. El control anti pulgas es fundamental para el tratamiento y control de esta parasitosis (Taylor y col., 2016).

1.8. EVALUACIÓN DE SALUD INTESTINAL Y DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS GASTROINTESTINALES

Las enfermedades gastrointestinales ocurren comúnmente en animales de compañía, pero debido a sus signos clínicos inespecíficos, los trastornos gastrointestinales plantean un desafío para el diagnóstico clínico, recopilar una base de datos inicial con un buen examen clínico es básico para poder llegar a un diagnóstico certero (Washabau y Day, 2012).

Varios procedimientos de laboratorio especializados están disponibles para el diagnóstico de pacientes con enfermedad gastrointestinal. Muchas de estas pruebas se utilizan en el diagnóstico clínico o puede ser realizado por un laboratorio especializado. Estas pruebas incluyen marcadores séricos de la función gastrointestinal e inflamación y la evaluación de muestras fecales para detección de agentes infecciosos. Estas pruebas son útiles para el diagnóstico de la enfermedad gastrointestinal y evaluación de su gravedad, y puede emplearse antes de continuar a procedimientos diagnósticos más invasivos como las biopsias o laparoscopias (Washabau y Day, 2012).

Para el diagnóstico de endoparásitos, existen múltiples pruebas coproparasitoscópicas, que identifican y cuantifican a estos organismos. En el caso de parásitos gastrointestinales, las muestra a analizar son heces. La prueba que se elija para el diagnóstico va a depender del tipo de parásito, curso de la enfermedad y de la disponibilidad de equipo. Las técnicas de diagnóstico parasitológico se dividen en cualitativas (Frotis directo, flotación, sedimentación, detección de antígenos parasitarios, reacción en cadena de polimerasa, micrometría y cultivo de larvas de nematodos) y cuantitativas (técnica de McMaster, recuento de huevos por concentración) (Browman, 2011). En cuanto a la evaluación de técnicas de diagnóstico coprológicas para protozoarios, el frotis directo modificado y la técnica de flotación Faust han mostrado mayor eficacia para la detección cualitativa de estos parásitos en heces (Carvajal, 2008)

1.9. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS GASTROINTESTINALES EN CANINOS.

Para el tratamiento de cualquier enfermedad, primero es necesario establecer la causa, para de esta manera poder dar el tratamiento adecuado. Dentro de los tratamientos para enfermedad gastrointestinal existen desde medicamentos, hasta dietas especializadas. En este caso nos enfocaremos en describir y mencionar los medicamentos mayormente utilizados para el tratamiento de enfermedad diarreicas aguda. La fluidoterapia es primordial en el tratamiento de pacientes con enfermedad diarreica aguda, para reponer los fluidos y electrolitos perdidos. Se debe ser sumamente

cuidadoso con la solución para reponer los líquidos perdidos, se puede elegir entre cristaloides y coloides. Lo más recomendable es la utilización de parámetros clínicos para la administración de fluidos (Nelson y Couto, 2010).

El tratamiento con antibióticos es una práctica común en pacientes con enfermedad gastrointestinal. Está indicada en pacientes con lesiones que inducen a la inflamación producida por bacterias en el tracto gastrointestinal, las mismas que son evidenciadas por numerosas bacterias y tejido intestinal inflamado presentes en exámenes coprológicos. Entre los antimicrobianos utilizados para el control y eliminación de patógenos asociados a gastroenteritis están: Gentamicina, Cloranfenicol, Metronidazol, Ampicilina y Amikacina (Jiménez, 2017).

Para el tratamiento sintomático de la enfermedad gastrointestinal, principalmente sintomáticos, se utilizan antidiarreicos, antieméticos, analgésicos, antiinflamatorios, antimicóticos, protectores gástricos, antiespasmódicos y desparasitantes. Para que el tratamiento tenga éxito, la administración de cualquier medicamento debe ser justificada mediante un diagnóstico previo (Washabau y Day, 2012).

1.10. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS PARA MANTENER LA SALUD INTESTINAL EN CANINOS.

En los últimos años, ha tomado gran importancia el mantenimiento del homeostasis del sistema gastrointestinal, lo cual va de la mano con el mantenimiento del equilibrio del microbioma intestinal. El uso excesivo de antibióticos y medicamentos para tratar enfermedades gastrointestinales, ocasiona resistencia microbiana y repercute directamente en la población de bacterias comensales en el intestino, ejerciendo efectos adversos sobre la salud del animal, esto ha llevado a la búsqueda de alternativas de tratamiento, prevención y apoyo (Kelley y col., 2012).

Existen opciones terapéuticas para tratar las disbiosis, a través del uso de prebióticos, probióticos, simbióticos, trasplante de microbiota fecal, alimentos nutraceuticos y proteínas bioplasmaticas (Redfern y col., 2017)

Los probióticos se definen como microorganismos vivos y viables que producen un efecto terapéutico cuando se administra en cantidades suficientes, modulando la microbiota intestinal, favoreciendo un estado antiinflamatorio. Se han observado efectos variables en perros con probióticos a base de los géneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*,

Pediococcus y *Weissella* (Shmalberg y col., 2019). Un estudio reciente controlado con placebo concluyó que los probióticos pueden reducir la duración de los signos clínicos en perros con diarrea aguda de etiología variada (Herstad y col., 2010).

Los prebióticos son carbohidratos no absorbibles, que funcionan como sustrato para el crecimiento y actividad metabólica de bacterias comensales intestinales, en especial de las especies *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Los prebióticos promueven la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como lactato y butirato (Sartor, 2004).

Por su parte, un simbiótico, es la combinación de un probiótico y un prebiótico. La unión de ambos crea un efecto sinérgico para mantener la salud intestinal. Los simbióticos reducen la concentración de metabolitos indeseables, con las nitrosaminas, inactivan carcinogénicos, previene el estreñimiento y la diarrea en humanos (Redfern y col., 2017). Existen pocos reportes que estudien el efecto de los simbióticos en animales. En el 2011, Garcia Mazcorro y col., evaluaron el efecto de una formulación simbiótica sobre la microbiota de perros y gatos sanos, encontrando que la administración de esta formulación elevó el número de especies probióticas en las excretas de los animales.

Una opción novedosa, es el trasplante de microbiota fecal (TMF), que consiste en la infusión de una suspensión fecal de un individuo sano en el colon de un individuo con enfermedades inflamatorias intestinales, previa depleción de su microbiota. El trasplante fecal busca sustituir una microbiota alterada con una microbiota sana, que promueva un ambiente antiinflamatorio. En humanos se ha demostrado su efecto benéfico en infección recurrente por *Clostridium difficile*, con una tasa media de curación del 87-90% (Kassam y col., 2013).

El uso de alimentos nutracéuticos, especializados en la recuperación de la mucosa gastrointestinal dañada es una práctica común para la recuperación de paciente con enfermedad del tracto digestivo. La L-glutamina es un aminoácido que se usa comúnmente en este tipo de alimentos. La glutamina es un aminoácido esencial para el enterocito y es necesario para el mantenimiento y recuperación de la integridad de la mucosa intestinal. Diversos estudios realizados en animales de experimentación han mostrado que un suplemento de glutamina previene la atrofia de las vellosidades del intestino y la traslocación bacteriana, condiciones asociadas con la nutrición enteral (Jassim, 2012).

Por otra parte, las proteínas bioplasmáticas son otro método alternativo no solo para el tratamiento, sino también para la prevención de enfermedades gastrointestinales. Se ha comprobado en estudios recientes que la adición de IgY en la dieta de perros sanos mantiene el equilibrio microbiano gastrointestinal, por lo que se considera como una buena alternativa para la prevención y tratamiento de enfermedades intestinales en animales de compañía (Scheraiber y col., 2019).

1.11. TECNOLOGIA IGY

1.11.1. Antecedentes de la IgY

La IgY es la inmunoglobulina sérica predominante en aves, reptiles y anfibios, y se transfieren del plasma de las gallinas a la yema de huevo para transferir inmunidad pasiva a sus crías (Patterson y col., 1962). En 1893 Kemperer describió por primera vez un experimento que demostró que, por medio de la inmunización de gallinas, se podía obtener de la yema de sus huevos la transferencia pasiva de anticuerpos específicos. La IgY es el equivalente funcional a la de IgG de los mamíferos. Mientras que desde una perspectiva evolutiva, se considera a la IgY ser el antepasado de los anticuerpos IgG e IgE de mamíferos (Warr y col., 1995).

1.11.2. Estructura

La estructura de la molécula de IgY es similar a la IgG, con dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), pero la IgY tiene un peso molecular de 180 kDa mayor a la IgG (150 kDa) (Figura 5). El peso molecular (67-70 kDa) de la cadena H de IgY es más pesada que la de mamíferos. El aumento en el peso molecular de IgY se debe a un aumento en la cantidad de dominios constantes de cadena pesada y de carbohidratos, su punto isoeléctrico es de 5.7-7.6 (Warr y col., 1995). La región bisagra de la IgY es mucho menos flexible en comparación con la de IgG en mamíferos, la IgY también es más hidrófoba (Davalos y col., 2000).

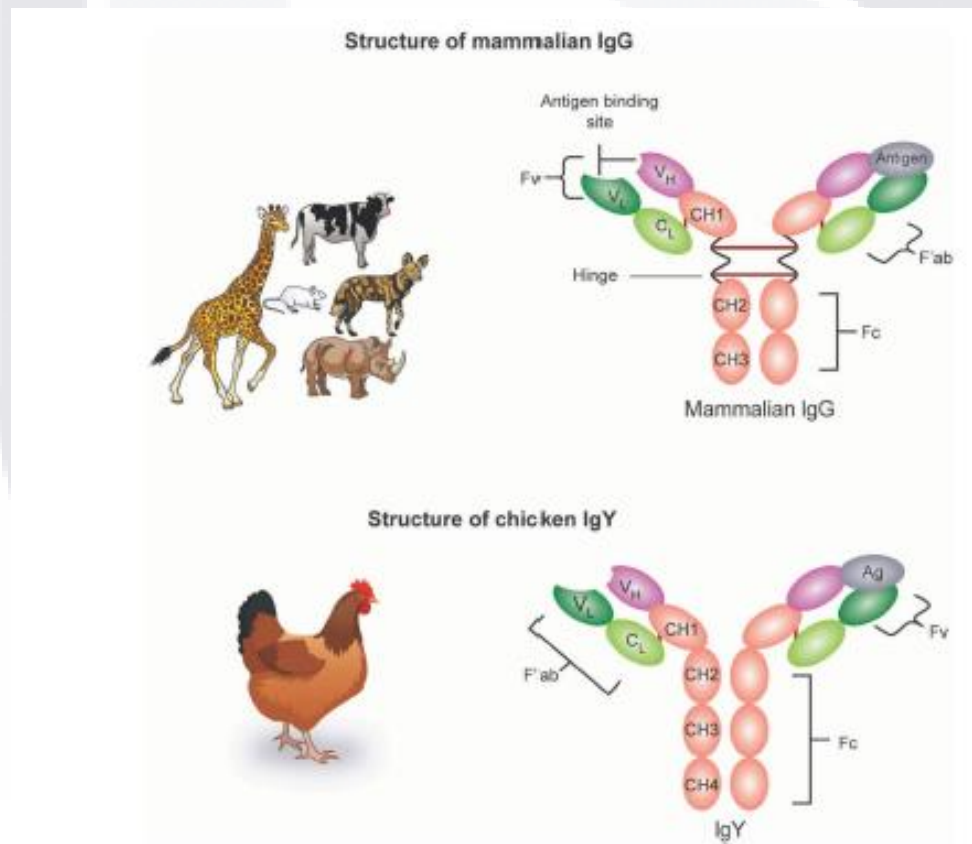


Figura 5. Comparación estructura de IgY e IgG.

Fuente: (Abbas y col., 2019)

1.11.3. Características

Aunque la IgY es una inmunoglobulina con características y funciones similares a la IgG, posee una estructura diferente que proporciona diferentes propiedades. IgY parece combinar funciones similares a la IgG e IgE de mamíferos, no solo proporciona defensa contra las infecciones, también ayuda a mediar la anafilaxia. La flexibilidad molecular potencialmente reducida de la IgY por la ausencia de la región bisagra en su estructura, se puede asociar con una menor susceptibilidad a la degradación proteolítica, pero puede ser fragmentada por tripsina y quimiotripsina al ser ingerida de manera oral, pero al administrarse con soluciones alcalinas o proteicas se incrementa su resistencia. En cuanto a la resistencia a temperatura la IgY es estable entre 60 y 70° C (Spillner y col., 2012). En el cuadro 1 se comparan las principales características de la IgG e IgY.

Cuadro 1. Comparación de IgG e IgY

Característica	IgG	IgY
Animal	Mamíferos	Aves, reptiles, anfibios
Fuente	Plasma sanguíneo	Yema de huevo
Forma de extracción	Invasiva	No invasiva
Peso molecular (KDa)	150	180
Punto isoeléctrico (pI)	6.4-9.0	5.7-7.6
Estructura	Región de bisagra flexible, región Fc más corta con 2 pares de cadenas de carbohidratos	Región bisagra más corta y menos flexible, región Fc más larga con 3 pares de cadenas de carbohidratos
Respuesta inmune a antígenos de mamíferos	Afectado negativamente por la homología filogénica	Mejorada por la diferencia filogénica
Afinidad por avides	Buena	Comparable
Inmunidad cruzada	Reacciona al factor de complemento	Sin unión a inmunoglobulinas de mamíferos, ni al factor de complemento.
Aislamiento	Es necesario remover varios componentes plasmáticos	Se necesita principalmente remover los componentes lipídicos de la yema de huevo
Estabilidad	Buena, pH 3-10, resiste hasta 70°C, menos hidrofóbica que la IgY	Buena, pH 4-9, resiste hasta 65°C, región Fc hidrofóbica
Interferencia con factor reumatoide	Si	No

Fuente: Adecuado y modificado a partir de (Zhang, 2003)(Xu y col., 2011).

1.11.4. Modo de Acción

Los mecanismos precisos por los cuales la IgY interactúa con los patógenos gastrointestinales no están bien definidos en la actualidad. Sin embargo, la IgY específica podría inhibir la acumulación y multiplicación de patógenos, neutralizar sus toxinas, y de esta forma se han propuesto algunos mecanismos sobre el modo de acción de esta inmunoglobulina. La IgY tiene la capacidad de modificar y modular la composición de la microbiota intestinal, cuando se administra IgY específica contra ciertos microorganismos patógenos que colonizan el tracto gastrointestinal (Goepf, 2019). Dentro de sus modos de acción se describe el bloqueo de la adherencia de patógenos, opsonización, aglutinación bacteriana y neutralización de toxinas, tal como se describe en el cuadro 2 (Thirumalai y col., 2019).

Cuadro 2 Mecanismos de acción de la IgY

Mecanismo de acción	
Bloqueo de la adherencia de patógenos	Evita la adherencia de patógenos a sus sitios objetivo. Este es el mecanismo más significativo por el cual la IgY combate contra los patógenos. La unión de la IgY con antígenos en la superficie de patógenos bloquea los componentes responsables del crecimiento celular e interrumpe la señalización celular para inhibir su crecimiento.
Opsonización	La unión de la IgY con los antígenos de superficie de patógenos podría mejorar la fagocitosis. Se ha observado que la unión de IgY específica produce alteraciones estructurales en la superficie de los patógenos, debido a variaciones en la nube de electrones y/o campo eléctrico de la bacteria. Esto puede influir en la susceptibilidad de los patógenos a la fagocitosis.
Aglutinación	Pocos estudios sugiere que el crecimiento bacteriano podría ser inhibido por la aglutinación bacteriana debido a la unión de IgY en la superficie bacteriana, en lugar de efectos directos sobre células bacterianas individuales.
Neutralización de toxinas	Si el efecto fisiopatológico se debe a toxinas secretadas por el patógeno y no por la célula, la actividad de neutralización de toxinas con IgY es más significativa que el prevenir el crecimiento de patógenos.

Fuente: Adecuado y elaborado a partir de (Thirumalai y col., 2019)

1.11.5. Producción de la IgY

Para producir anticuerpos IgY específicos, las gallinas deben ser inmunizadas con patógenos específicos para inducir una respuesta inmune específica, la cual producirá anticuerpos contra específicos que serán transferidos a la yema de huevo. Se necesitará una vacunación de refuerzo para garantizar la transferencia continua de anticuerpos (Li y col., 2015). Se han descrito diferentes protocolos de inmunización para cada antígeno, y para cada especie animal, estos tienen que ser probados para descubrir que método induce la mayor cantidad de títulos de anticuerpos en la yema de huevo. Por lo general, se emplean de 10 a 100 µg de antígeno proteico en un volumen final de 1mL, y se aplica por vía intramuscular en el musculo de la pechuga. La frecuencia e intervalo de vacunación dependen del potencial inmunogenico del antígeno y adyuvante utilizado (Pereira y col., 2019)

1.11.6. Extracción y Conservación de la IgY

Los métodos para la extracción de IgY de la yema de huevo, se pueden categorizar en 3 grupos: Técnicas de precipitación (Utilizando sulfato de amonio o sodio, polietilenglicol, ácido caprílico y carragenano), Delipidación (usando pectina, carragenano, carboximetilcelulosa, metilcelulosa y sulfato de dextrano) en el primer paso, seguido de la técnica de precipitación, y las Técnicas cromatográficas (afinidad, intercambio iónico, interacción hidrofóbica, interacción tiofilica y métodos de cromatografía de filtración en gel). Cada uno de estos métodos produce diferentes rendimientos, pureza, estabilidad y actividad de la IgY. La elección del método de extracción va a depender de la aplicación que se le dé a los anticuerpos, costos, accesibilidad (Thirumalai y col., 2019).

Debido a la inestabilidad que presenta la IgY en medios ácidos, se han desarrollado técnicas donde la inmunoglobulina ha sido encapsulada dentro de liposomas obteniendo mejores resultados que la IgY administrada directamente. Como medio de conservación se ha utilizado la congelación donde se ha comprobado que las temperaturas de hasta -20°C no afectan la concentración de la IgY (Chacana y col., 2004). La estabilidad de IgY durante el almacenamiento es razonablemente bueno bajo condiciones específicas. Las soluciones de IgY pueden almacenarse a 4°C por periodos que van desde meses a unos pocos años, añadiendo 0.0% NaN3, 0.03% w/v thimerosal o 50 µg/mL de Gentamicina han tenido buenos efectos retardando el crecimiento microbiano en la solución (Schade y col., 2005).

1.11.7. Ventajas de la IgY

La utilización de gallinas para la producción de anticuerpos policlonales proporciona muchas ventajas sobre los métodos de producción en mamíferos. Una de las ventajas más importantes es que para su obtención no es necesario el sacrificio del animal, debido a que se obtiene de la yema de huevo de la gallina. Debido a la distancia filogenética entre aves y mamíferos, las gallinas requieren una menor inoculación de antígeno para poder producir una respuesta inmune eficiente y de esta manera producir los anticuerpos IgY específicos necesarios, sin poner en riesgo la vida del animal con dicha inoculación, ya que no reacciona de forma clínica ante la administración del antígeno (Xu y col., 2011).

Una gallina produce de 50-100 mg de IgY por huevo, por lo tanto, una gallina inmunizada produce 22,500 mg de IgY por año, lo que equivale a la producción de 4.3 conejos en el transcurso de un año, para la obtención de IgG. El costo de mantenimiento de las gallinas, es más bajo que el de mamíferos, como por ejemplo el conejo (Schade y col., 2005). En el cuadro 3, se muestra la comparación del rendimiento de anticuerpos de conejo (IgG) y gallina (IgY) durante un periodo de dos semanas después de la segunda inmunización.

Cuadro 3.- Comparación del rendimiento de anticuerpos policlonales de conejo y gallina durante un período de dos semanas después de la segunda inmunización.

	Conejo	Gallina
No. De animales	1	1
Método de muestreo	Desangrado (20mL/semana)	Colecta diaria de huevo
Volumen de muestreo (en 2 semanas)	40 mL de sangre	14 huevos= 210 mL de yema*
Cantidad total de anticuerpos	200 mg	1120 mg **
Cantidad de anticuerpos específicos	5% (10 mg)	2-10 % (22.4-112mg)
Conejo/ Gallina total***	5-6	1
Conejo/ Gallina Especifica****	2-11	1
Presencia de otras Ig	IgM, IgA, IgE	Ninguna

Fuente: modificado de (Leenaars y col., 1999).

* el volumen promedio de yema de huevo es de 15 mL; ** la cantidad promedio de IgY es de 80 mg por una yema de huevo;

***No. de conejos que producen la misma cantidad de anticuerpos totales que un pollo en un período de dos semanas;

****No. de conejos que producen la misma cantidad de anticuerpos específicos que un pollo en un período de dos semanas.

1.11.8. Uso de la IgY en animales domésticos

En el ganado bovino, se ha comprobado que el uso de IgY específica contra *Staphylococcus aureus* y/o *Escherichia coli* (*E. coli*) son efectivas para el control clínico de mastitis, la IgY reduce la capacidad de las bacterias para adherirse a las células epiteliales a la mama (Zhen y col., 2008). En cerdos se ha comprobado que la IgY específica contra *E. coli* enterotoxigénica ofrece un potencial profiláctico y terapéutico para controlar la diarrea, debido a que inhibe la adhesión bacteriana a la mucosa intestinal (Hideaki Yokoyama y col., 1992).

La administración de IgY específica contra *Salmonella typhimurium* y *Salmonella dublin* en bovinos, previene la infección por salmonelosis en terneros, y reduce significativamente la gravedad de presentación de los signos clínicos, mejorando la recuperación de los pacientes (Yokoyama y col., 1998).

En cuanto a su acción antiparasitaria, existen múltiples estudios realizados al respecto, tanto en humanos como en animales. Thirumalai y col., (2019) expone en una revisión literaria de diversos autores, estudios donde se evalúa el uso de la IgY en el diagnóstico y terapéutica de enfermedades parasitarias. En el 2017 Selim y col. Demostraron que en ratones infectados con *Giardia lamblia*, la aplicación de IgY específica reducía significativamente la producción de quistes. De igual manera, se comprobó que la IgY específica contra *Eimeria* administrada en pollos de engorde redujo el desprendimiento de oocistos fecales significativamente e también se registró un aumento del peso corporal de las aves (Lee y col., 2009)

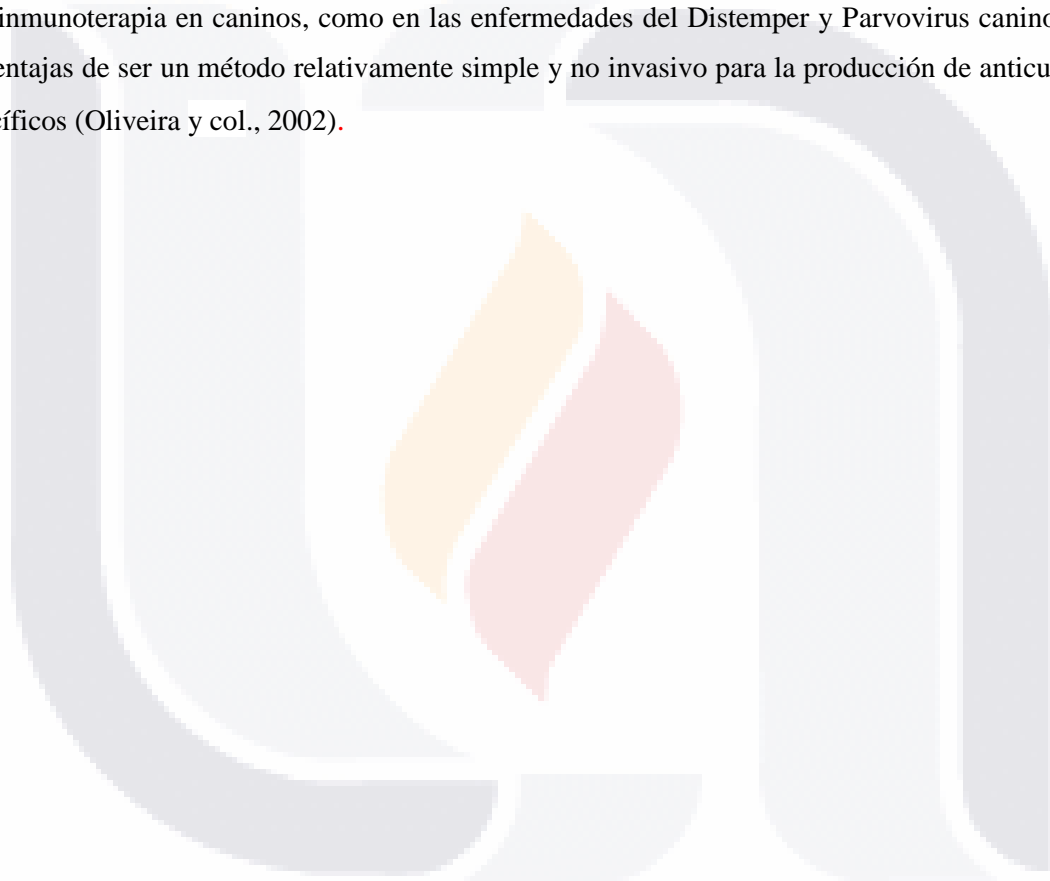
La IgY tiene la capacidad de modificar y modular la composición de la microbiota intestinal, cuando se administra IgY específica contra ciertos microorganismos patógenos que colonizan el tracto gastrointestinal (Leiva y col., 2020)

En cuanto a lo nutricional y regulación de enfermedades metabólicas, IgY es capaz de mejorar los síntomas asociados con enfermedad del hígado graso no alcohólico, la IgY contra secuencias de una proteína de transporte de colesterol conocida como NiemanPick C1-Like 1, tiene efecto sobre la absorción del colesterol, similar a medicamentos convencionales que inhiben su captación (Bae y col., 2017). Por lo tanto se informó que la unión de la IgY a la proteína de transporte reduce la transferencia del fosfato a células Caco-2 humanas, por lo que su uso es una alternativa para la terapéutica de hiperfosfatemia (Bobeck y col., 2015)

Se ha comprobado que la adición de IgY en la dieta de perros sanos mantiene el equilibrio de la microbiota gastrointestinal y tiene un efecto benéfico sobre los metabolitos microbianos intestinales

(Scheraiber y col., 2019). La administración oral o endovenosa de IgY en caninos es útil para proteger contra la enfermedad clínica provocada por Parvovirus caninos tipo 2 (CPV-2), reduciendo la mortalidad y morbilidad de la infección (Van y col., 2006). Por otra parte, la IgY se ha aplicado con éxito en diferentes especies, incluida la canina, para la detección del factor-1 de hipoxia inducible (HIF-1). El uso del anticuerpo IgY permitió la detección y localización subcelular de HIF-1a en los núcleos de las células hipóxicas en caninos y otros mamíferos (Tini y col., 2002).

Por lo anterior, la tecnología IgY ha sido reconocido como una alternativa prometedora para generar una gran cantidad de anticuerpos altamente específicos, calificados para su uso en inmunodiagnóstico y en inmunoterapia en caninos, como en las enfermedades del Distemper y Parvovirus canino, con las ventajas de ser un método relativamente simple y no invasivo para la producción de anticuerpos específicos (Oliveira y col., 2002).



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inmunoglobulina Y (IgY) de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas, en la carga parasitaria y bacteriana fecal en caninos.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto de la IgY en la carga parasitaria intestinal que presenten los caninos.
- Evaluar el efecto de la IgY en la carga bacteriana intestinal que presenten los caninos.

3. HIPOTESIS

La utilización de Inmunoglobulina Y de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas, reduce la carga parasitaria y bacteriana fecal en caninos.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

La explotación avícola y el laboratorio del CCA, están ubicados en el área pecuaria de Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, ubicada en el municipio de Jesús María, Aguascalientes, cuyas coordenadas son 21.970545° latitud norte y -102.374883° longitud oeste, con una elevación de 1939 m (Figura 5). En el estado predomina el clima semiseco en el 86% de su territorio, el 14% presenta clima templado subhúmedo. La temperatura más alta (30°C o más), se presenta en los meses de mayo y junio y la más baja, es alrededor de 4°C, en el mes de enero. Las lluvias son escasas y se presentan durante el verano.

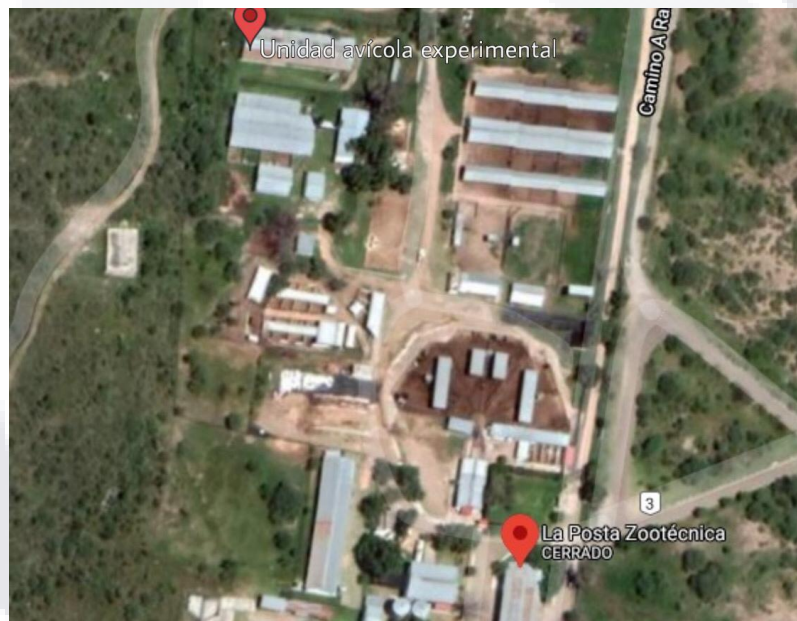


Figura 6. Ubicación del estudio

4.1.1. CARACTERISTICAS DE LAS INSTALACIONES AVICOLAS

La explotación es una caseta de aves experimental que cuenta con 480 jaulas tipo batería de alambre galvanizado con una dimensión de 45x40x40 cm, comederos tipo canalón de lámina galvanizada, bebederos automáticos marca Siji (México, DF).

4.1.2 CLINICAS VETERINARIAS

La recolección y toma de muestra se realizó en clínicas veterinarias del municipio de Aguascalientes. Se visitaron diferentes clínicas veterinarias en varios puntos de la ciudad, se habló con los médicos encargado de las mismas, para brindarles información sobre el trabajo de investigación y se les entregaron trípticos (Anexo 1) para facilitar la difusión de la información a los propietarios. Los criterios de inclusión para las clínicas veterinarias, eran únicamente que un médico veterinario zootecnista se encontrara como responsable de la misma, autorizara que su paciente entrara en el estudio y facilitara las instalaciones de su clínica para la revisión y toma de muestras del paciente durante todo el estudio.

4.1.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio fueron 44 caninos, cachorros, de raza y sexo indistinto, con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión de los caninos:

- Sin síntomas de enfermedad (enfermedad subclínica).
- Peso indistinto
- Color indistinto
- Ser alimentado únicamente con croqueta
- Tener mínimo dos vacunas polivalentes
- Edad: 4 a 12 meses
- Defecaciones solidas o pastosas
- Condición corporal de 3 a 4
- Coproparasitoscópicos positivo
- No haber recibido la vacuna contra Giardia anteriormente.

Criterios de exclusión:

- Haber padecido una enfermedad gastroenterica en el último mes,
- Consumir antibióticos, desparasitantes, prebióticos o probióticos en el último mes.
- Presentar vómitos.
- Tener más de 4 defecaciones diarias.
- Presentar hematoquecia o melena.
- Heces líquidas.
- Consumir comida casera o dieta BARF.

4.2 MANEJO DE LAS GALLINAS Y EL HUEVO

Las gallinas se alimentaron a base de una dieta isoproteicas e isoenergéticas con un 14% de proteína y 2,800 kcal y un 0.3% de calcio y agua de manera ad libitum. La alimentación fue controlada a 120 g por día, se lleva a cabo un protocolo de 16 horas luz, el que se monitorea y regula a través de un temporizador de 24 horas marca Steren (México, DF).

A todas las gallinas se les aplicó un protocolo de inmunización como manejo general con Triple Aviar PM (Newcastle cepa La Sota, *Pasteurella multocida* A aviar, *Pasteurella multocida* X73) a 1 ml/ave vía intramuscular, y se reforzó cada 3 meses.

De las 60 aves totales, se seleccionaron 40 gallinas las cuales se vacunaron en presentación líquida con el parásito de *Giardia lamblia* inactivada con concentrado de trofozoítos de ($\geq 1.2 \times 10^8$ organismos/mL) R.P. ≥ 1.55 en Vehículo, cbp. 1 mL. La dosis administrada fue de 0.10 mL/ave ($\geq 1.2 \times 10^7$ organismos/mL) vía intramuscular, con cuatro aplicaciones a intervalos de 21 días. Después de cuatro semanas de la última aplicación de vacunas, el huevo se recolectó, clasificó y almacenó a una temperatura de 4° C (García y col., 2005), para la posterior preparación de las dosis..

Para el almacenamiento del huevo, se separaron las yemas con ayuda de un separador de plástico, se vertieron en un vaso de precipitado estéril para poder medir su volumen. Con ayuda de un agitador de vidrio, se homogenizan y se vierten en bolsas plásticas herméticas la cantidad de 300 ml de yema de huevo sin diluir. Las bolsas son etiquetadas con fecha, volumen y las iniciales “H” para la yema de huevo hiperinmunizada y “NH” para las yemas no hiperinmunizadas, posteriormente se procedió a su congelamiento a -15 °C (Chacana et al., 2004)

4.2.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA IGY

Una vez finalizado el periodo de vacunación de las gallinas, se seleccionaron al azar 10 huevos en total, cinco de los huevos hiperinmunizados, y el resto de los no hiperinmunizados. Los cuales se llevaron al Laboratorio de Investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes donde se procedió a realizar la extracción y purificación de la IgY, para realizar este proceso se utilizó la técnica con un Kit de la empresa Gallus Immunotech (Cat. No. IK 2000) (Carolina del Norte, EE. UU.), que contiene un reactivo A (4 x 500mL) y un reactivo B (4 x 500mL) (Anexo 2).

4.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LA IGY

Se realizó una curva de calibración para proteínas mediante diluciones de Albumina Sérica Bovina (ASB) en concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20 mg/mL. Se realizó la cuantificación de proteínas totales (Anexo 3) a través de un método espectrofotométrico por medio de la reacción de Biuret (G., 1949) utilizando el espectrofotómetro V visible, marca VARIAN MODELO CARY 100 a 540 nm. Obteniendo la siguiente curva de calibración (figura 7) con una concentración de 9mg/ml.

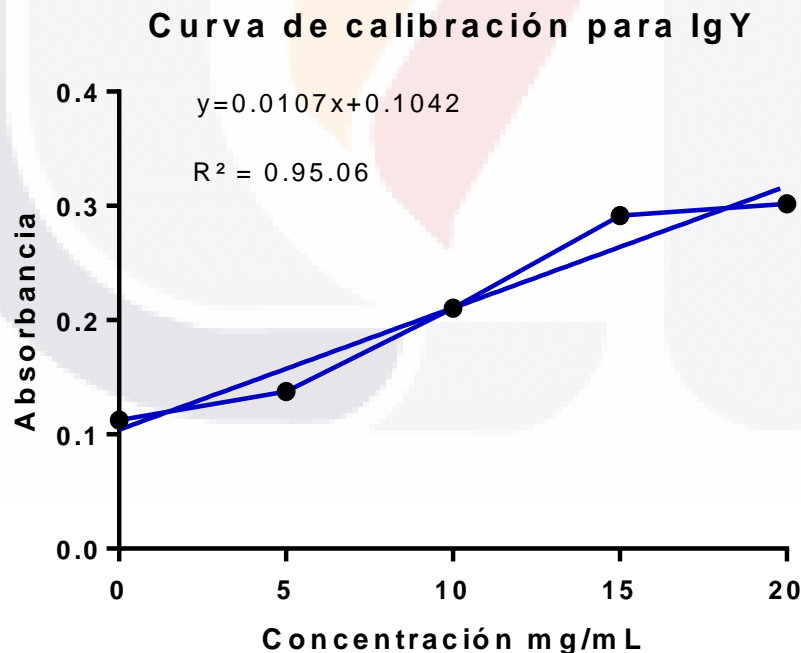


Figura 7.-Curva de calibración

4.2.3 PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LA DOSIS DE IGY

Se descongelaron las yemas de huevo, a una temperatura de 4 °C por 24 h, una vez descongeladas, se procedió a realizar una dilución 1:1, agregando agua destilada y estéril a las yemas y homogenizándolas.

Una vez homogenizadas las yemas, se calculó la dosis del animal a razón de 20 mg de IgY por kg. Al realizar la dilución, la solución quedo con una concentración de 4.5mg/ml, de esta forma se administró a los perros 4.4 mL/kg. Las dosis se almaceno en frascos estériles a 4° C hasta su administración a los individuos. Este proceso se llevó a cabo un día antes del inicio del periodo de administración en los caninos.

Los días de administración de IgY fueron del día 0 al 15 por vía oral. La dosis se dio junto con el alimento seco a los perros, en una ración al día por la mañana y agua a libre acceso.

4.3 MANEJO, OBTENCIÓN Y ANALISIS DE LA MUESTRA DE HECES

Se seleccionaron los caninos que asistían a manejo preventivo o consulta clínicas veterinaria, con los criterios de inclusión y exclusión antes mencionados. Se realizó un examen clínico riguroso a todos los perros sin excepción, al no encontrarse ninguna anormalidad al examen físico general, se continuo con la toma de muestra. A los propietarios de los animales seleccionados, se le explico y pidió autorización para que sus perros formen parte del estudio. El propietario del canino firmo una hoja de autorización y consentimiento (Anexo 4) donde estipula estar de acuerdo en que su mascota forme parte del estudio.

Se realizó asepsia con alcohol al 96% de la zona perianal del animal, se tomó una muestra de 2 a 5 g de heces, estimulando el recto con un hisopo estéril. Las heces recolectadas se colaron en un frasco estéril, y fueron transportadas inmediatamente al laboratorio en una hielera con refrigerante para su posterior análisis bacteriológico y coproparasitoscópicos. Se realizó evaluación macroscópica de las heces por medio de la escala de Bristol (anexo 9). Todas las muestras se procesaron antes de las 6 horas posteriores a su recolección. Este procedimiento se realizará en todos los grupos a los 0, 15 y 30 días del estudio.

4.3.1 DETERMINACIÓN DE CARGA PARASITARIA EN HECES.

Se tomaron muestras de 2 a 5 g de heces a los 0, 15 y 30 días de estudio a los perros participantes. Para la toma de muestra se recolectaron heces después de la defecación espontanea de los individuos. Las heces se colocaron en bolsas plásticas nuevas, se sellaron e identificaron (nombre individuo,

grupo y fecha), para su transporte al laboratorio y posterior análisis. Todas las muestras de heces para análisis parasitológico fueron procesadas antes de las 24 horas posteriores a su recolección. Si el procesamiento de la muestra no se podía realizar inmediatamente, se mantenía la muestra en refrigeración a 4°C, para evitar su deterioro.

4.3.2 DETERMINACIÓN CUALITATIVA PARASITARIA

La determinación cualitativa parasitaria se efectuó por medio de dos técnicas, la primera fue un frotis directo fecal modificado con tinción de lugol y flotación directa con sulfato de Zinc (Browman, 2011). Para realizar el frotis directo con lugol se procedió a colocar en un portaobjetos, una gota de suero fisiológico, con una pequeña cantidad de heces, con la ayuda de un hisopo o palillo de madera, se homogenizo la gota de solución con las heces, hasta conseguir una capa fina, se agregó una gota de lugol, y se volvió a homogenizar. La solución debe de tener la transparencia suficiente para que un texto colocado bajo el portaobjetos pueda ser leído. Se colocó un cubreobjetos sobre la solución, evitando la formación de burbujas. Se observó al microscopio en el objetivo 10X y 40X, recorriendo la totalidad de la laminilla.

Al finalizar esta técnica, se procedió a realizar otro examen coprológico cualitativo para asegurar que efectivamente la muestra examinada fuera negativa o positiva a parásitos, para de esta forma poder descartar o aceptar al paciente en nuestro estudio, para ello se utilizó la técnica por flotación con sulfato de Zinc (Anexo 5).

4.3.3 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA PARASITARIA

Una vez que se determinó que la muestra es positiva al examen cualitativo, se realizó la cuantificación de huevos/gr/heces por la técnica de McMaster (Anexo 6). Se pesó una muestra de heces y se mezcló vigorosamente con agua en proporción de 1g/15mL. Se realizó el mismo procedimiento que la técnica de flotación con sulfato de zinc, solo que al obtener el tubo centrifugado con el sulfato de zinc se extrajo con un gotero la solución y se colocó en la cámara de McMaster de manera cuidadosa para evitar formación de burbujas en la superficie, se dejó reposar la cámara 15 minutos. Los huevos de los parásitos flotan en este medio y vienen a confluir en la cara inferior de la cubierta de la cámara. Se procedió a realizar la cuantificación de huevecillos bajo el microscopio a 10X, solo se cuantifican los huevecillos en la cuadrícula. El número de huevos contados en esta alícuota se multiplico por 50

y proporciona una estimación de la cantidad de huevos existentes por gramo de heces (Benavides, 2013).

4.3.4 DETERMINACIÓN DE LAS UFC/G EN HECES

A todas las muestras se le realizó la determinación de las unidades formadoras de colonias por gramo de heces (UFC/g).

Se realizaron diluciones seriadas con 9 ml de agua destilada estéril y un gramo de heces con lo que se realizó la cuenta en placa de bacterias por la técnica de vertido en placa (Camacho y col., 2009) (Anexo 7), para cuantificación de las UFC/G de heces, en los medios Estándar, xilosina, lisina desoxicolato (XLD) y eosina azul de metileno (EMB). Los medios de cultivo se incubaron a 37° C en la estufa BINDER por 24 h. Las diluciones que se eligieron para este estudio, después de una previa estandarización fueron para el medio estándar 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} ; para el medio XLD y EMB se utilizaron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , de las cuales se eligió la mejor placa de cada medio para su cuantificación en base a lo descrito por Camacho y col., 2009.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la cuantificación manual de UFC/g de heces. Se realizó una descripción macroscópica de las colonias tomando en cuenta, tamaño, forma y cambios de pH en los medios.

De las colonias que se desarrollaron en la superficie de los medios XLD y EMB se tomó una muestra con un asa recta y se efectuó el aislamiento por agotamiento por estría (Gamazo Carlos, López-Goñi y Diaz, 2005) (Anexo 8) en placas solidas de XLD y EMB, y se incubaron las placas a 37° C por 24 h en una estufa BINDER. Después se tomó cada una de las colonias aisladas con un asa recta, para realizar las pruebas bioquímicas de las mismas, y se inocularon en tubos con los medios de Triple azúcar y hierro (TSI), Lisina y hierro (LIA), Movilidad, indol y ornitina (MIO), Ácido sulfúrico, Indol y motilidad (SIM) y Citrato de Sodio (Citrato de Simmons), que se incubaron a 37° C por 24 h, para su posterior lectura y determinación del género bacteriano.

4.4 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio se realizó bajo un diseño no experimental, de tipo longitudinal (Sampieri et al., 2014). Para la primera etapa que consistió en la obtención del huevo, se recibieron 60 gallinas raza Bovans White, con un peso promedio de 1.400 ± 0.150 kg, se alimentaron con 120 g de alimento diariamente, el agua ad libitum y se manejaron con periodos de luz de 16 h al día. A todas las gallinas se les aplicó un protocolo de inmunización como manejo general con Triple Aviar PM (Newcastle cepa La Sota, *Pasteurella multocida* A aviar, *Pasteurella multocida* X73), y se reforzara cada 3 meses; se seleccionaron 40 gallinas las cuales se vacunaron con *Giardia lambia*, en cuatro ocasiones a intervalos de 21 días. A partir de los 21 días posteriores a la última vacunación se inició la recolección del huevo. Se seleccionaron al azar 10 huevos los cuales fueron llevados al Laboratorio de Investigación del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes donde se realizó la extracción y purificación de la IgY. Posteriormente se elaboró la cuantificación de proteína total por medio de espectrofotometría con reactivo Biuret, donde se obtuvo una concentración de 9mg/mL de IgY. Las yemas se almacenaron a -14 °C, hasta que fueron utilizadas para la preparación de las dosis. Para la preparación de las dosis se descongelaron las yemas a 4°C por 24 h y se preparó una dilución 1:1 con agua destilada estéril, quedando de esta manera una concentración de 4.5 mg/mL de IgY para la dosis administrada a los individuos.

Para la segunda etapa se tomaron en cuenta los criterios de inclusión y exclusión. Se seleccionaron un total de 44 perros y se formaron 6 grupos totales.

A todos los grupos se les tomaron muestras de heces fecales directamente del recto, los días 0, 15 y 30, un total de 3 muestras por individuo a lo largo de 30 días. Dependiendo del resultado del análisis coproparasitoscópico, los individuos fueron asignados en los 6 diferentes grupos. En cada uno de los muestreos se realizaba un examen físico general, y evaluación macroscópica de las heces por medio de la escala de Bristol.

Los grupos a los que se les incluyó la IgY, la dosis administrada por animal fue de 20mg/kg/día durante 15 días totales. La IgY se administraba junto con el alimento, en una sola toma los días del 0 al 15, los días restantes no se administraba la IgY a los individuos.

Para los grupos que se les asignó desparasitante, se utilizó Fenbendazol a 50mg/kg una vez al día, durante los primeros 5 días del estudio.

Los grupos en que se asignaron los individuos fueron los siguientes:

I.- Control: control (C): (n=15) se asignaron perros libres de parásitos, no se les administró ningún tratamiento. Solo se realizaron los muestreos correspondientes.

II.- Hiperinmunizados (H): (n=7) animales parasitados subclínicamente. Se les administro IgY hiperinmunizada, a una dosis de 20 mg de IgY/kg de PC cada 24 h, durante los días 0 al 15.

III.- No hiperinmunizados (NH): (n=3) animales parasitados subclínicamente. Se les administro IgY no hiperinmunizada, a una dosis de 20 mg de IgY/kg de PC cada 24 h, durante los días 0 al 15.

IV.- Desparasitados (D): (n=6) animales parasitados subclínicamente. Se les administro un desparasitante a base de fenbendazol a una dosis de 50 mg/kg de PC, cada 24 h durante los primeros cinco días.

V.- Desparasitados más IgY (HD): (n=6) animales parasitados subclínicamente. Se les administro IgY hiperinmunizada a una dosis de 20 mg de IgY/kg de PC cada 24 h, durante los días 0 al 15, y fenbendazol a una dosis de 50 mg/kg de PC, cada 24 h durante los primeros cinco días.

VI.- Sanos más IgY (HS): (n=7) animales libres de parásitos, clínicamente sanos. Se les administro IgY hiperinmunizada, a una dosis de 20 mg de IgY/kg de PC cada 24 h, durante los días 0 al 15.

Las heces recolectadas en cada muestreo fueron procesadas para la cuantificación e identificación de parásitos y para la evaluación del número de UFC/g de heces. Los datos fueron recolectados, organizados y codificados para su análisis estadístico e interpretación correspondiente.

A todos los propietarios se les explico la finalidad del estudio, las muestras necesarias y el manejo que debe tener el animal dentro de casa. Todos los animales en el estudio permanecerán en su casa dándoles seguimiento durante los 30 días de duración del estudio.

4.5 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos y resultados de cada individuo fueron capturados y ordenados en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para facilitar su interpretación. El análisis estadístico se realizó con ayuda del Software Estadístico R. Considerando un nivel de significancia $p < 0.05$.

Todos los datos se compararon entre los diferentes tratamientos. A todos los datos se les ordeno para un análisis descriptivo con medias y desviaciones estándar. Los datos se analizaron mediante los procedimientos de análisis de varianza (ANDEVA) de medidas repetidas y una Prueba HSD (Diferencia honestamente significativa de Tukey) para las comparaciones múltiples.



5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

5.1.1 CUANTIFICACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) POR GRAMO DE HECES.

En el medio estándar, el grupo HS presento una disminución de los valores del día 0 al 15, presentando 8.4 ± 1.0 UFC para el día 0 y 6.4 ± 1.2 UFC en el día 15 ($P < 0.05$), con respecto al resto de los grupos, representado en la figura 8, donde también se puede observar que los grupos restantes del medio estándar (C, H, NH, HD y D) tuvieron un comportamiento diferente, sin diferencias significativas, donde la cuantificación de UFC presento ligeros incrementos para el día 15 en los grupos C, D, H Y HD y para el día 30 disminuyeron los valores ($P > 0.05$).

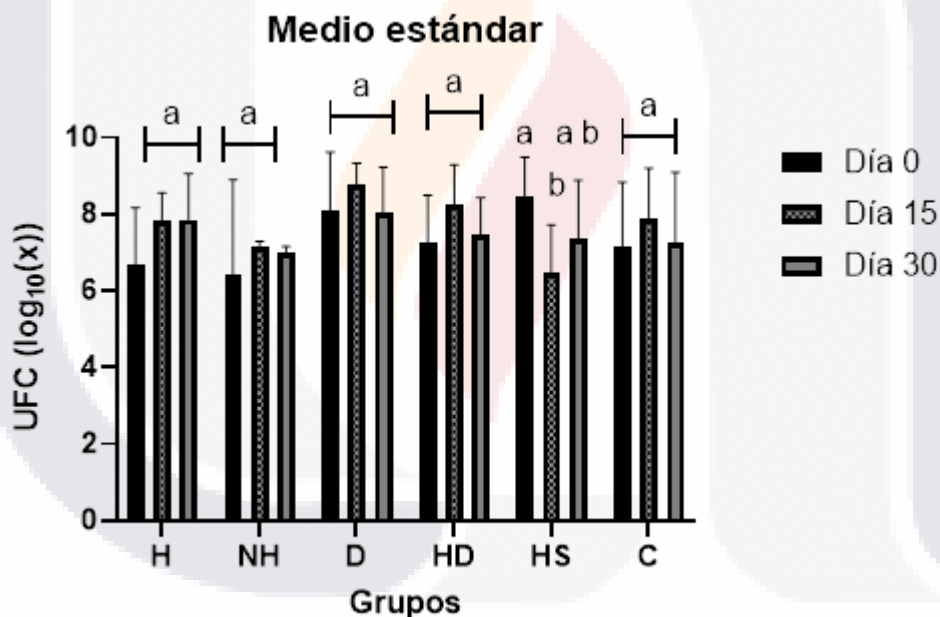


Figura 8.- Cuantificación de UFC/g de heces en Medio estándar

Hiperinmunizados (H), no hiperinmunizados (NH), desparasitante (D), hiperinmunizados y desparasitante (HD), hiperinmunizados sanos (HS) y control (C). Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En el medio EMB y XLD con los que se evaluaron las bacterias aerobias, se obtuvieron más diferencias que en el análisis de bacterias anaerobias con el medio estándar. Para el grupo H y HS no

se obtuvieron diferencias significativas. Aunque el grupo H presento una disminución de los datos para el día 15 y estos volvieron a incrementar para el día 30 ($P>0.05$) y para el HS los valores fueron disminuyendo ligeramente en cada muestreo. Mientras que para el tratamiento con IgY no hiperinmunizada (NH) se obtuvieron diferencias significativas ($p<0.05$), con valores de 6.7 ± 0.17 UFC día 0, 5.1 ± 0.6 UFC día 15 y 4.8 ± 0.05 UFC día 30, observándose una disminución de las UFC para el día 30. En el grupo D del medio EMB, se obtuvo una disminución de las UFC para los días 15 y 30, sus valores por muestreo fueron 6.6 ± 1.6 UFC/día 0, 4.4 ± 1.8 UFC/ día 15 y 5.4 ± 0.85 UFC/día 30 ($P<0.05$). Es de resaltar que para el grupo HD la cuantificación de UFC permaneció similar para el día 0 y 15, notándose una disminución al día 30, con valores de 5.6 ± 0.85 UFC día 0, 5.6 ± 1.02 UFC día 15, 5.0 ± 0.9 UFC día 30.

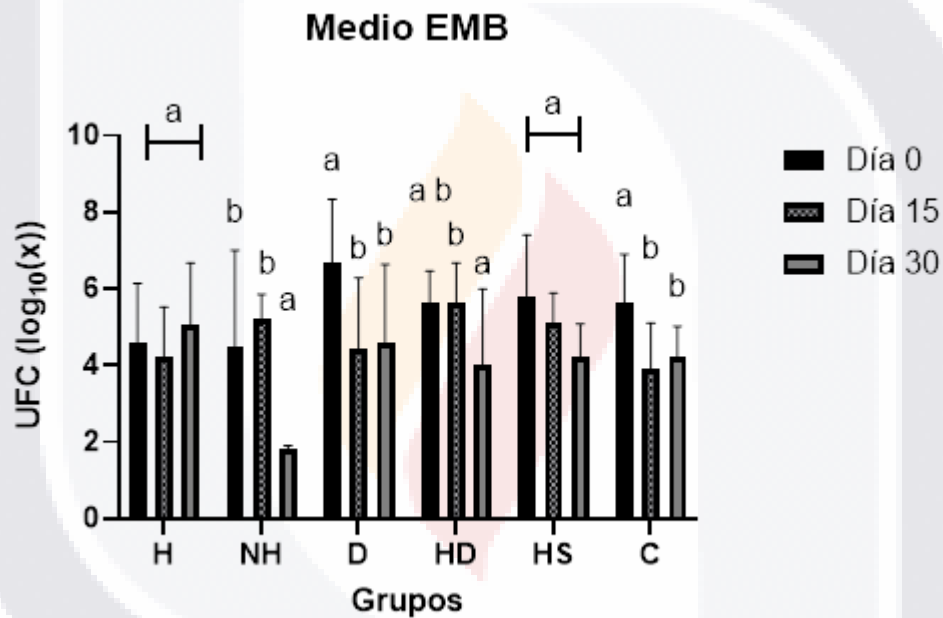


Figura 9.- Cuantificación de UFC/g de heces para medio EMB

Hiperinmunizados (H), no hiperinmunizados (NH), desparasitante (D), hiperinmunizados y desparasitante (HD), hiperinmunizados sanos (HS) y control (C). Literales diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$).

En el cultivo de agar XLD los datos mostraron un comportamiento similar al medio EMB en todos los tratamientos, excepto para el grupo HS, con un valor de 4.9 ± 1.2 UFC en el día 0 y 4.5 ± 1.0 UFC para el día 15 ($P<0.05$).

5.1.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Para el medio XLD se realizaron un total de 264 aislamientos y para el medio EMB un total de 231 aislados, por lo tanto, se hicieron 495 pruebas bioquímicas. Para el medio XLD el total de cepas aisladas positivas para las siguientes bacterias fueron de: *Escherichia coli* 158 (59.8%), *Salmonella spp.* 17 (6.4%), otras 27 (10.2%) y sin identificar 62 (23.5%). En el medio EMB el total de cepas positivas para las siguientes bacterias fueron: *Escherichia coli* 154 (66.7%), *Salmonella spp.* 10 (4.3%), otras 16 (6.9%) y sin identificar 51 (22.1%), tal y como se observa en la tabla 1. Las bacterias identificadas para ambos medios fueron: *Escherichia coli*, *Salmonella marcescens*, *Salmonella entérica*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *klebsiella pneumoniae*, *klebsiella oxytoca*, *Yersinia enterocolica* y *Shigella spp.*

Cuadro 4.- Total de bacterias identificadas por pruebas bioquímicas

DÍA	Medio XLD				Medio EMB			
	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	Otras	Sin identificar	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	Otras	Sin identificar
0	72	0	8	18	61	3	5	14
15	44	13	14	19	43	7	7	23
30	42	4	5	25	50	0	4	14
TOTAL	158	17	27	62	154	10	16	51
(%)	59.8	6.4	10.2	23.5	66.7	4.3	6.9	22.1

5.2 ANÁLISIS COPROPARASITOSCÓPICO
5.2.1 IDENTIFICACIÓN DE PARÁSITOS.

Para la identificación de parásitos en heces por medio de la técnica de flotación con sulfato de zinc, se analizaron un total de 67 muestras de las cuales 21 resultaron positivas, obteniendo los resultados que se observan en la figura 10. Se identificaron un total de 4 parásitos (*Giardia*, *Ancylostoma*, *Isospora* y *Toxocara canis*), el más prevalente en este estudio fue *Giardia lamblia* y el menos común fue la asociación de *Isospora* con *Giardia lamblia*.

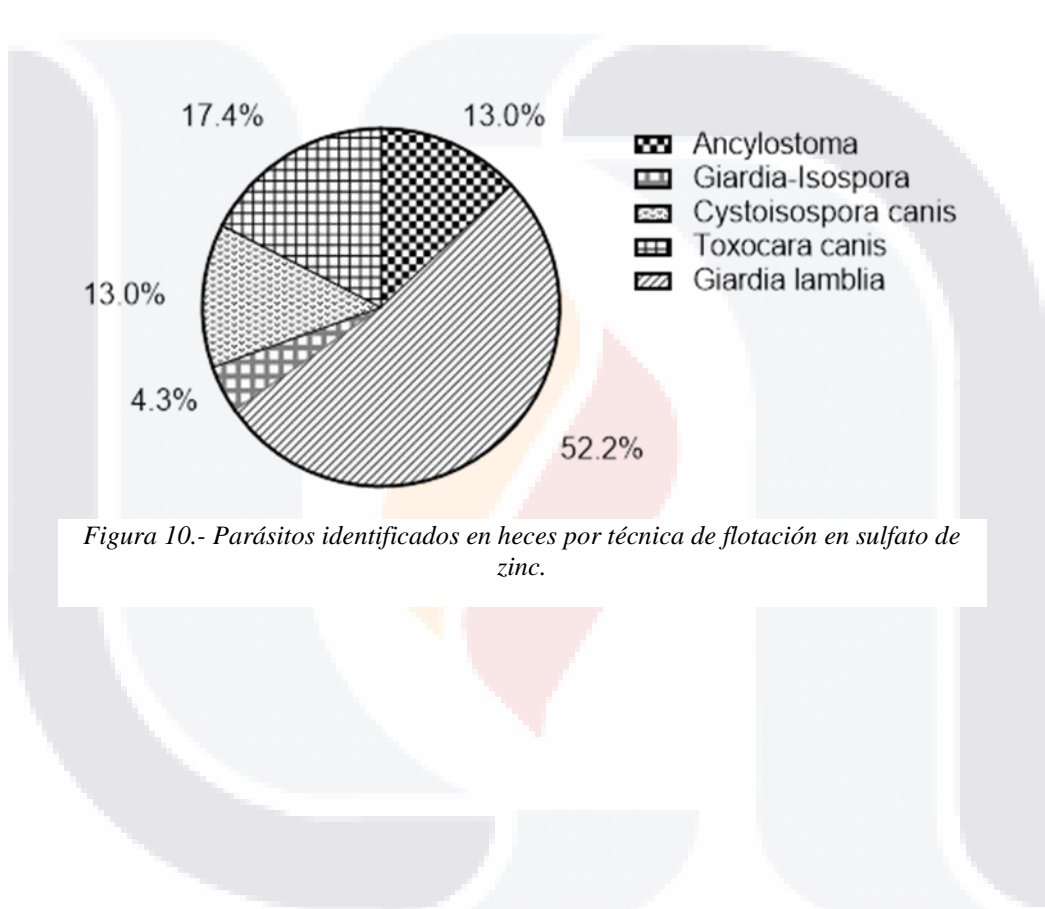


Figura 10.- Parásitos identificados en heces por técnica de flotación en sulfato de zinc.

5.2.2 CUANTIFICACIÓN DE HUEVECILLOS POR GRAMOS DE HECES

La cuantificación de huevecillos por gramo de heces se realizó mediante la técnica de MacMaster a los 21 individuos de 4 grupos: Hiperinmunizados (H), no hiperinmunizados (NH), Desparasitante (D) y Hiperinmunizados con desparasitante (HD). Se observa una clara disminución en la cantidad de huevecillos en los muestreos al día 15 y 30 en los grupos D y HD ($P < 0.05$), con respecto a los grupos H y NH. Mientras que los grupos H y NH incrementaron ligeramente la cuantificación de huevecillos a lo largo de los muestreos ($P > 0.05$), tal y como se puede observar en la figura 11 .

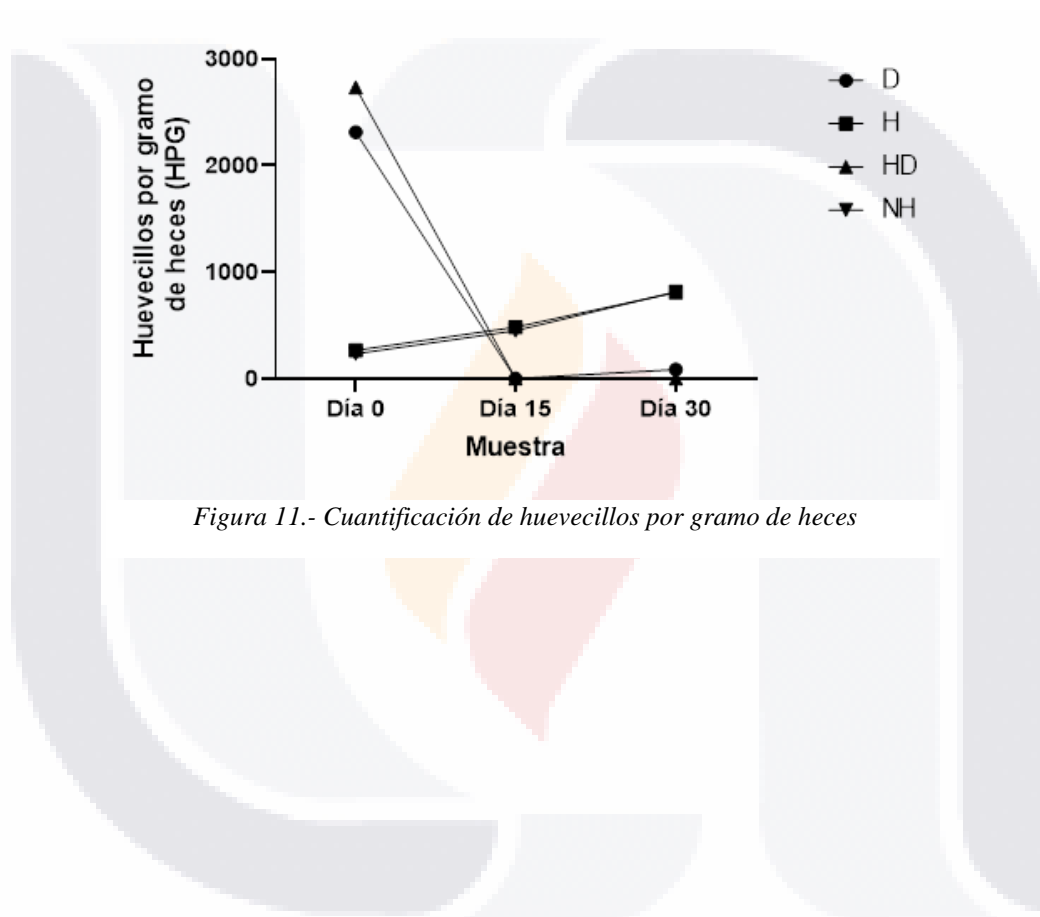


Figura 11.- Cuantificación de huevecillos por gramo de heces

6. DISCUSIÓN

6.1 CUANTIFICACIÓN DE UFC/G DE HECES

Los resultados obtenidos del cultivo de heces fecales en caninos que describen la composición del ecosistema microbiano gastrointestinal han revelado diferencias en el conteo total de UFC/g de heces a lo largo de todo el tracto digestivo, encontrando variaciones en el conteo, por edad, alimentación, estado nutricional y patologías presentes. El rango reportado en la literatura es desde $10^3 - 10^{11}$ UFC/g de heces (Suchodolski, 2011), coincidiendo con el rango encontrado en este estudio que fue de $10^2 - 10^4$ UFC/g para conteo de aerobios y $10^5 - 10^7$ UFC/g de heces para cuantificación de anaerobios en medio estándar.

El tratamiento con la IgY de yema hiperinmunizada no tuvo diferencias significativas en ninguno de los medios de cultivo. Lo que indica que la administración de IgY en perros parasitados (grupo H) no tuvo efecto significativo sobre las bacterias cultivables de la microbiota gastrointestinal. Mientras que la administración de la IgY hiperinmunizada en perros sanos, si tuvo diferencias significativas con respecto al resto de los grupos, en los días 15 y 30 con una disminución de las UFC por lo que en los individuos libres de parásitos tuvo un mejor efecto la administración de esta inmunoglobulina. En un estudio realizado por Scheraiber y col. en 2019 se adiciono a la dieta de perros sanos IgY purificada de yemas hiperinmunizadas contra los principales patógenos gastrointestinales y a otro grupo solo se le dio una dieta sin este anticuerpo, de tal manera que se encontraron diferencias significativas en la cantidad de metabolitos fecales bacterianos y bacterias identificadas en el grupo que consumió el alimento con la IgY.

El que la cuantificación de bacterias descendieran en el tratamiento NH es un hallazgo interesante, debido a que en la literatura no se ha evaluado lo suficiente los efectos de la IgY sin hiperinmunización, en este estudio se observó que descendió la carga de bacterias en los muestreos subsecuentes a su administración, a diferencia de la administración de IgY hiperinmunizada donde no tuvo un efecto significativo su administración, ni incrementando o disminuyendo los valores de colonias bacterianas, sobre el microbioma intestinal.

Para el grupo que se le administro desparasitante era un resultado esperado que la cuantificación de UFC disminuyera debido a los efectos que los desparasitantes tienen naturalmente en la microbiota (Chaitman y col., 2020); mientras que en el grupo que se administró el desparasitante y se añadió la dosis de IgY hiperinmunizada (HD) los valores de la cuantificación se mantuvieron constantes, esto lo podemos interpretar como que la IgY hiperinmunizada mantuvo estable el microbioma gastrointestinal del perro aun con la administración de la dosis de desparasitante.

El campo de investigación de la inmunoglobulina Y es muy amplio y aún queda mucho por estudiar, para futuros proyectos se sugiere evaluar la capacidad de la IgY sin hiperinmunizar en perros sanos y/o enfermos para regular y mantener el equilibrio del microbioma gastrointestinal.

6.2 IDENTIFICACION DE GENEROS BACTERIANOS

Los géneros bacterianos encontrados en este estudio coinciden con lo reportado en la literatura (Honneffer et al., 2017) donde las familias *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, y *Bacteroidetes* predominan. La identificación de *Salmonella* spp fue en los grupos de perros parasitados, lo que nos indica una predisposición del microbioma a infecciones secundarias debido a la presencia de un patógeno existente, sin embargo, a pesar de la presencia de *Salmonella* en las heces, los perros no presentaron signos de enfermedad gastrointestinal, pudiendo atribuirse a la administración de tratamientos a los mismos. Se ha descrito que la IgA participa en la regulación de la colonización bacteriana gastrointestinal de *Salmonella* (Ahmer & Gunn, 2011), la IgY al ser administrada de forma oral cumple una función similar a la IgA lo que podría explicar por qué los perros positivos a *Salmonella* no presentaron sintomatología clínica.

6.3 CUANTIFICACION HUEVECILLOS POR GRAMOS DE HECES

No se observaron diferencias estadísticas en la reducción y/o aumento de los huevecillos por gramo de heces en los grupos NH y H. aunque se pudo observar una ligera tendencia en el aumento de los huevecillos, se sugiere evaluar para futuros estudios este grupo con un control positivo a parásitos para comparar si el crecimiento de parásitos es igual a un perro que no reciba ningún tratamiento. Lo que es de resaltar es que, al no haber cambios significativos en estos dos grupos, es que la concentración por hiperinmunización de la IgY no tuvo un efecto sobre la carga parasitaria. Esto puede deberse a que los animales no solo estaban parasitados con *Giardia*, que fue la vacuna que se utilizó para la hiperinmunización.

La marcada disminución que presentaron los grupos D y HD es atribuye al uso de desparasitante en estos dos grupos, siendo este un resultado esperado para la dosis y días de administración del desparasitante.

6.4 IDENTIFICACIÓN DE PARASITOS EN HECES

En este estudio el parásito que tuvo mayor prevalencia en la población de estudio fue *Giardia spp.* (52.2%), seguido de *Toxocara canis* (17.4%), lo que difiere de un estudio realizado en 2006 en Aguascalientes, México por (Martínez R. et al., 2006) donde *Dipylidium caninum* fue el principal parásito identificado, mientras que en este estudio no se encontró ningún perro positivo a *Dipylidium caninum*, esto puede ser atribuible a que los perros estudiados por Martínez, eran perros sin hogar y sin manejos de medicina preventiva previos, mientras que los perros en este estudio tenían su cuadro de vacunas y desparasitación externa vigente realizadas por sus propietarios, por lo cual al no tener pulgas era difícil encontrar individuos positivos a dicho parásito.

CONCLUSIONES

La administración de IgY hiperinmunizada no mostro diferencias significativas con respecto al resto de los grupos en la cuantificación de UFC en perros parasitados.

La administración de IgY hiperinmunizada mostro diferencias significativas en la cuantificación de UFC/g de heces en perros sanos, mostrando una disminución de los valores para los días post administración del anticuerpo.

La administración de desparasitante a perros parasitados disminuye la cuantificación de UFC/g de heces.

La adición de IgY hiperinmunizada al tratamiento con desparasitante ayudo a mantener estable la cuantificación de UFC/g de heces y que esta no disminuyera tras la administración del desparasitante.

La administración de IgY tanto hiperinmunizada con Giardia como no hiperinmunizada en perros parasitados con helmintos y protozoarios no mostro cambios significativos en la cuantificación de huevecillos por gramos de heces.

REFERENCIAS

- Abbas, A. T., El-Kafrawy, S. A., Sohrab, S. S., & Azhar, E. I. A. (2019). IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(1), 264–275.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
- Agüero Vega, L. A. (2006). *Estudio epidemiológico retrospectivo de las principales patologías en caninos y felinos y de variables administrativas. Hospital Clínico Veterinario, Universidad de Chile* [Universidad de Chile].
<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130981/Estudio-epidemiológico-retrospectivo-de-las-principales-patologías-en-caninos-y-felinos-y-de-variables-administrativas.-Hospital-Clínico-Veterinario%2C- Universidad-de-Chile.pdf?sequence=1&isAllowe>
- Ahmer, B. M. M., & Gunn, J. S. (2011). Interaction of Salmonella spp. with the intestinal microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2, 101.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00101>
- Armstrong, P. (2011). Gastroenteric Disease: Feeding for Success. *36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA. Jeju, Korea Oct, 14–17.*
- Bae, J.-S., Park, J.-M., Lee, J., Oh, B.-C., Jang, S.-H., Lee, Y. Bin, Han, Y.-M., Ock, C.-Y., Cha, J.-Y., & Hahm, K.-B. (2017). Amelioration of non-alcoholic fatty liver disease with NPC1L1-targeted IgY or n-3 polyunsaturated fatty acids in mice. *Metabolism*, 66, 32–44.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.10.002>
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The gastrointestinal microbiome: a review. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(1), 9–25.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
- Barrett, K. E. (2008). New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Advances in physiology education*, 32(1), 25–34.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1152/advan.00092.2007>
- Benavides, E. (2013). *Técnicas para el diagnóstico de endoparasitos de importancia veterinaria* (Primera). Universidad de la Salle.
- Blagburn, B. L., & Dryden, M. W. (1999). *Pfizer Atlas of Veterinary Clinical Parasitology*. The Gloyd Group.

- Blanco, M. del M., Domenech Gomez, A., Gomez, E., Duato, L., Orden Gutierrez, J. A., Dominguez Bernal, G., Miró Corrales, G., Cutuli de Simon, M. T., Gibello Prieto, A., & Simarro Fernandez, I. (2013). *Inmunología y enfermedades infecciosas del perro y el gato* (S. editorial-G. A. B. S.L. (ed.); 1° edición). SERVET.
- Bobeck, E. A., Hellestad, E. M., Sand, J. M., Piccione, M. L., Bishop, J. W., Helvig, C., Petkovich, M., & Cook, M. E. (2015). Oral peptide specific egg antibody to intestinal sodium-dependent phosphate co-transporter-2b is effective at altering phosphate transport in vitro and in vivo. *Poultry science*, 94(6), 1128–1137. <https://doi.org/10.3382/ps/pev085>
- Browman, D. D. (2011). *Georgis: Parasitología para veterinarios*. (9° edición). Elsevier.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). Cuenta en placa de bacterias. *Técnicas para el Análisis Microbiológico Aliment*, 1–10. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf
- Carvajal, K. (2008). *Estudio comparativo de tres métodos tradicionales para el diagnóstico de Giardia spp. en caninos, frente a un ELISA de captura como prueba de oro* [Universidad Nacional de Costa Rica]. <https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/12965/Karla-Carvajal-Obando.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chacana, P., Terzolo, H., Gutierrez Calzado, E. J., & SCHADE, R. (2004). Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. En *Revista de medicina veterinaria* (Vol. 85). https://www.researchgate.net/profile/Horacio_Terzolo/publication/280741443_Tecnologia_IgY_o_aplicaciones_de_los_anticuerpos_de_yema_de_huevo_de_gallina/links/55c4fb0b08aea2d9bdc3959e.pdf
- Chaitman, J., Ziese, A.-L., Pilla, R., Minamoto, Y., Blake, A. B., Guard, B. C., Isaiah, A., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., & Unterer, S. (2020). Fecal microbial and metabolic profiles in dogs with acute diarrhea receiving either fecal microbiota transplantation or oral metronidazole. *Frontiers in veterinary science*, 7, 192.
- Chastant-Maillard, S., Freyburger, L., Marcheteau, E., Thoumire, S., Ravier, J. F., & Reynaud, K. (2012). Timing of the intestinal barrier closure in puppies. *Reproduction in domestic animals*, 47, 190–193.
- Da Silva Mello de Martinez, M. (2011). Enfermedad diarreica aguda en niños. Agentes causales más comunes en una comunidad del Chaco Central. *Pediatría (Asunción): Organó Oficial de*

la Sociedad Paraguaya de Pediatría, 38(3), 191–198.

[https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:Bf1wexjWDCoJ:scholar.google.com/+Da+Silva+Mello+de+Martinez,+M.+\(2011\).+Enfermedad+diarreica+aguda+en+niños.+Agentes+causales+más+comunes+en+una+comunidad+del+Chaco+Central.+Pediatría+\(Asunción\):+Organ](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:Bf1wexjWDCoJ:scholar.google.com/+Da+Silva+Mello+de+Martinez,+M.+(2011).+Enfermedad+diarreica+aguda+en+niños.+Agentes+causales+más+comunes+en+una+comunidad+del+Chaco+Central.+Pediatría+(Asunción):+Organ)

Davalos-Pantoja, L., Ortega-Vinuesa, J. L., Bastos-Gonzalez, D., & Hidalgo-Alvarez, R. (2000). A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11(6), 657–673.

<https://doi.org/10.1163/156856200743931>

Del Campillo, M. C., Rojo Vázquez, F. A., Martínez Fernández, A. R., Sanchez Acedo, M. C., Hernández Rodríguez, S., Navarrete López-Cozar, I., Diez Baños, P., Quiroz Romero, H., & Carvalho Varela, M. (1999). *Parasitología Veterinaria*. (1° edición). McGraw-Hill-Interamericana de España, SAU.

Delgado, O., & Rodríguez-Morales, A. J. (2009). Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. *Bol Mal Salud Amb*, 49(1), 1–33. https://www.researchgate.net/profile/Alfonso_Rodriguez-Morales/publication/242713600_Aspectos_clinico-epidemiologicos_de_la_toxocariasis_una_enfermedad_desatendida_en_Venezuela_y_America_Latina/links/5be441e64585150b2ba7ad8f/Aspectos-clinico-epidemiologic

Dryden, M. W., Payne, P. A., Ridley, R., & Smith, V. (2005). Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Vet Ther*, 6(1), 15–28. [http://vetlab.com/Dryden Comparison of Flotation Methods.pdf](http://vetlab.com/Dryden%20Comparison%20of%20Flotation%20Methods.pdf)

Encalada, L. A., Duarte-Ubaldo, E. L., Vargaz-Magaña, J. J., García-Ramírez, M. J., & Medina-Hernández, R. E. (2011). Prevalencia de parásitos gastroentéricos de canidos en la ciudad de Escárcega, Campeche, México. *Universidad y ciencia*, 27(2), 209–217. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792011000200010

Fok, E., Szatmari, V., Busak, K., & Rozgonyi, F. (2001). Epidemiology: prevalence of intestinal parasites in dogs in some urban and rural areas of Hungary. *Veterinary Quarterly*, 23(2), 96–98. <https://doi.org/10.1080/01652176.2001.9695091>

G., G. A. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751–766.

https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/7522360/gornall_etal.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DDetermination_of_serum_proteins_by_means.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=ASIATUSBJ6BAN3GY4PNY%2F20200521%2Fus-

- Gamazo Carlos, López-Goñi Ignacio, D. R. (2005). *Manual práctico de Microbiología* (Tercera Ed). MASSON, S.A.
- García-Mazcorro, J. F., Lanerie, D. J., Dowd, S. E., Paddock, C. G., Grützner, N., Steiner, J. M., Ivanek, R., & Suchodolski, J. S. (2011). Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS microbiology ecology*, 78(3), 542–554.
- García, D. A., Nicholls, R. S., Arévalo, A., Torres, O., & Duque, S. (2005). Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. *Biomédica*, 25(4), 451–463.
<https://www.redalyc.org/pdf/843/84325405.pdf>
- García, J. F., & Minamoto, Y. (2013). Microorganismos gastrointestinales en gatos y perros: una revisión breve. *Archivos de medicina veterinaria*, 45(2), 111–124.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200002>
- Goepp, J. G. (2019). *Systems and methods for altering microbiome to reduce disease risk and manifestations of disease*. Google Patents.
- Grundy, S. A. (2006). Clinically relevant physiology of the neonate. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 36(3), 443.
- Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición hospitalaria*, 22, 14–19. <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v22s2/fisiologia2.pdf>
- Herstad, H. K., Nesheim, B. B., L'Abée-Lund, T., Larsen, S., & Skancke, E. (2010). Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis—a controlled clinical trial. *Journal of small animal practice*, 51(1), 34–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2009.00853.x>
- Honneffer, J. B., Steiner, J. M., Lidbury, J. A., & Suchodolski, J. S. (2017). Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*, 13(3), 1–20.
<https://doi.org/DOI 10.1007/s11306-017-1165-3>

- Jassim, B. (2012). Glutamina, aminoácido indispensable en la recuperación de pacientes con enfermedades gastrointestinales. *Revista Colombiana de Ciencias de la Salud*, 1(1).
<http://investigaciones.uniatlantico.edu.co/revistas/index.php/ciencias-salud/article/view/774>
- Jiang, P., Zhang, X., Liu, R. D., Wang, Z. Q., & Cui, J. (2017). A human case of zoonotic dog tapeworm, *Dipylidium caninum* (Eucestoda: Dipylidiidae), in China. *The Korean journal of parasitology*, 55(1), 61. <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.1.61>
- Jiménez, C. A. (2017). *Vómitos y diarreas en perros canis domesticus sus causas consecuencias e importancia de su control* [Machala: Universidad Técnica de Machala].
http://186.3.32.121/bitstream/48000/10524/1/DE00001_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf
- Kassam, Z., Lee, C. H., Yuan, Y., & Hunt, R. H. (2013). Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 108(4), 500–508.
- Kelley, R., Levy, K., Mundell, P., & Hayek, M. G. (2012). Effects of Varying Doses of a Probiotic Supplement Fed to Healthy Dogs Undergoing Kenneling Stress. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10(3).
- Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Park, D. W., Jang, S. I., Morales, A., Garcia, D., Lucio, E., Larios, R., Victoria, G., & Marrufo, D. (2009). Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Veterinary parasitology*, 163(1–2), 123–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.020>
- Leenaars, P. P. A. M., Hendriksen, C. F. M., de Leeuw, W. A., Carat, F., Delahaut, P., Fischer, R., Halder, M., Hanly, W. C., Hartinger, J., & Hau, J. (1999). The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals: The report and recommendations of ECVAM workshop 35. *Alternatives to laboratory animals*, 27(1), 79–102.
<https://doi.org/10.1177/026119299902700106>
- Leiva, C. L., Gallardo, M. J., Casanova, N., Terzolo, H., & Chacana, P. (2020). IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: a review of patents and clinical trials. *International Immunopharmacology*, 81, 106269.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106269>
- Li, X., Wang, L., Zhen, Y., Li, S., & Xu, Y. (2015). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), 40.

<https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-015-0038-8>

López, A. R. (2018). *Prevalencia de parasitosis interna y externa de la población canina adulta de la Canera de la ciudad de San Luis*. [UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUYO].

http://fcv.uccuyosl.edu.ar/images/2019/investigacion/2bPrevalencia_de_parasitosis_interna_y_externa_de_la_poblacin_canina_adulta_-_Sofa_Galarreta.pdf

Lutgendorff, F., Akkermans, L., & Soderholm, J. D. (2008). The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage. *Current molecular medicine*, 8(4), 282–298.

Martinez, A. P., & Azevedo, G. R. de. (2012). The Bristol Stool Form Scale: its translation to Portuguese, cultural adaptation and validation. *Revista latino-americana de enfermagem*, 20(3), 583–589. https://www.scielo.br/pdf/rlae/v20n3/es_a21v20n3.pdf

Martinez R., J. D., Valdivia F., A. G., Cruz V., C., & Lamothie A., R. (2006). *Prevalencia de parásitos intestinales de perros en la ciudad de Aguascalientes*.

Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkilä, M., Westermarck, E., Rautio, M., Huovinen, P., & Könönen, E. (2005). Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4169–4175.

Mila, H., Feugier, A., Grellet, A., Anne, J., Gonnier, M., Martin, M., Rossig, L., & Chastant-Maillard, S. (2014). Inadequate passive immune transfer in puppies: definition, risk factors and prevention in a large multi-breed kennel. *Preventive veterinary medicine*, 116(1–2), 209–213.

Mila, H., Grellet, A., Mariani, C., Feugier, A., Guard, B., Suchodolski, J., Steiner, J., & Chastant-Maillard, S. (2017). Natural and artificial hyperimmune solutions: Impact on health in puppies. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 163–169.

Moretó, M., & Pérez, A. (2009). Dietary plasma proteins, the intestinal immune system, and the barrier functions of the intestinal mucosa. *Journal of animal science*, 87(suppl_14), E92–E100. <https://doi.org/https://doi.org/10.2527/jas.2008-1381>

Nelson, R. W., & Couto, C. G. (2010). *Medicina interna de pequeños animales*. (4ta ed.). Elsevier.

Olaiz, G. A., Gómez-Peña, E. G., Juárez-Flores, A., Vicuña-de Anda, F. J., Morales-Ríos, J. E., & Carrasco, O. F. (2019). Panorama histórico de la enfermedad diarreaica aguda en México y el futuro de su prevención. *salud pública de méxico*, 62(1, ene-feb), 25–35.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21149/10002>

- Oliveira, T. C. G., Amarante, A. F. T., Ferrari, T. B., & Nunes, L. C. (2002). Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary parasitology*, *103*(1–2), 19–27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00575-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00575-1)
- Overgaauw, P. A. M., & van Knapen, F. (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary parasitology*, *193*(4), 398–403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035>
- Patterson, R., Youngner, J. S., Weigle, W. O., & Dixon, F. J. (1962). Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *The Journal of Immunology*, *89*(2), 272–278. <https://www.jimmunol.org/content/89/2/272.short>
- Peña, I., Vidal, F., Arnaldo del Toro, R., Hernández, A., & Zapata, M. M. (2017). Zoonosis parasitarias causadas por perros y gatos, aspecto a considerar en Salud Pública de Cuba. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, *18*(10), 1–11.
- Pereira, E. P. V, van Tilburg, M. F., Florean, E., & Guedes, M. I. F. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International immunopharmacology*, *73*, 293–303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>
- Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2020). The role of the canine gut microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 498.
- Rangel, R., Quijano Hernández, I. A. F., Del Ángel Caraza, J., & Barbosa Mireles, M. A. (2014). *Caractrización de las enfermedades gastrointestinales en cachorros de perro*. 5. <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/58516/Ramírez-Rangel+F.pdf?sequence=1>
- Redfern, A., Suchodolski, J., & Jergens, A. (2017). Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. *Veterinary Record*.
- Rojas-Salamanca, A. C., León-Bustamante, M. C., & Bustamante-Saavedra, O. R. (2016). *Toxocara canis*: una zoonosis frecuente a nivel mundial. *Ciencia y Agricultura*, *13*(1), 19–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.19053/01228420.4803>
- Saker, K. E. (2006). Nutrition and immune function. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, *36*(6), 1199–1224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.09.001>
- Sampieri, R., Collado, C., & Baptista, M. (2014). *Metodología de la Investigación* (6ta Edición ed.).

En *DF México: Mc Graw Hill* (6° edición). Mc Graw Hill.

- Sartor, R. B. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*, *126*(6), 1620–1633.
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., & Terzolo, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals*, *33*(2), 129–154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/026119290503300208>
- Schaer, M. (2006). *Medicina clínica del perro y el gato* (1° edición). ELSEVIER-Masson.
- Scheraiber, M., Grzeskowiak, L., Zentek, J., Barbosa, F. F., Felix, A. P., & Fischer da Silva V, A. (2019). Inclusion of IgY in a dog’s diet has moderate impact on the intestinal microbial fermentation. *Journal of applied microbiology*, *127*(4), 996–1003. <https://doi.org/10.1111/jam.14378>
- Selim, A., Ibrahim, E., & Elhaig, M. M. (2017). Passive protection against *Giardia lamblia* infection by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, *130*(1/2), 78–85. <http://www.bu.edu.eg/portal/uploads/Citations/1487754748.pdf>
- Shmalberg, J. W., Montalbano, C., Morelli, G., & Buckley, G. J. (2019). A Randomized Double Blinded Placebo-Controlled Clinical Trial of a Probiotic or Metronidazole for Acute Canine Diarrhea. *Frontiers in veterinary science*, *6*, 163. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00163>
- Spillner, E., Braren, I., Greunke, K., Seismann, H., Blank, S., & du Plessis, D. (2012). Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals*, *40*(5), 313–322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.05.003>
- Suchodolski, J. S. (2011). Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, *41*(2), 261–272.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). Veterinary Parasitology. En *Veterinary parasitology* (tercera, Vol. 3). Blackwell Publishing Ltd.
- Thirumalai, D., Visaga Ambi, S., Vieira-Pires, R. S., Xiaoying, Z., Sekaran, S., & Krishnan, U. (2019). Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *136*, 755–763.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118>

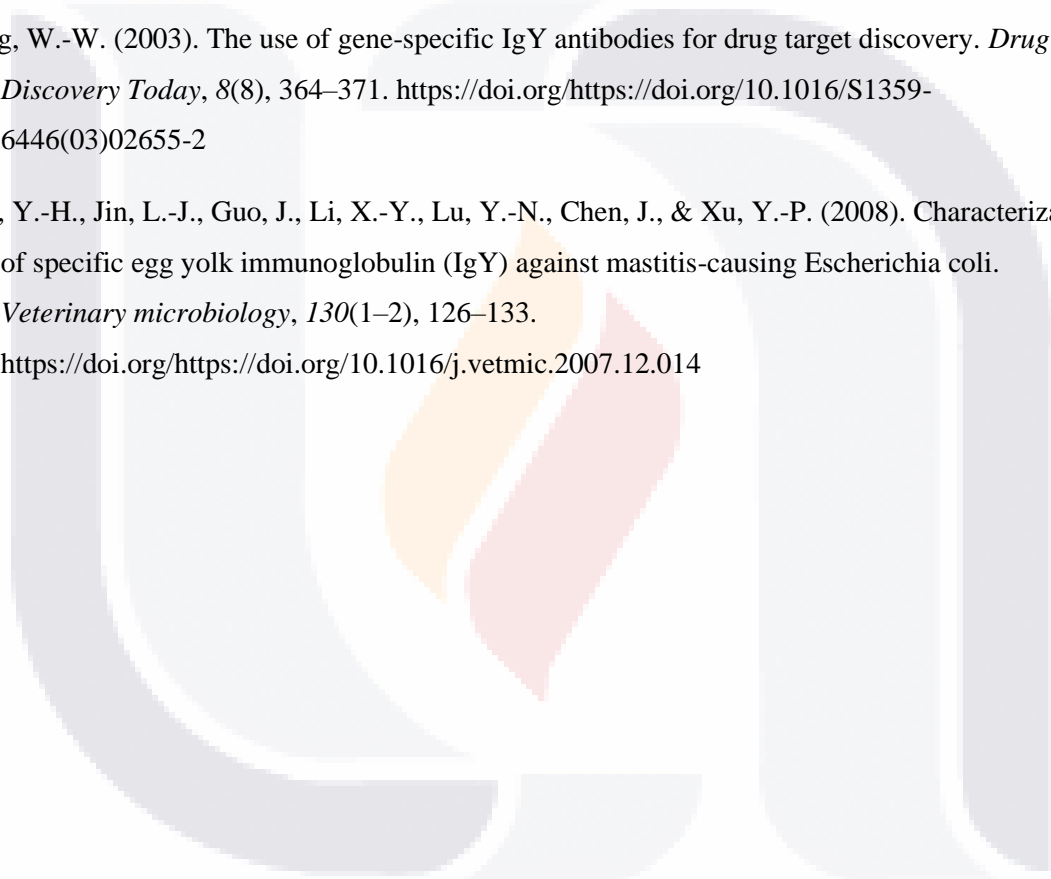
- Tini, M., Jewell, U. R., Camenisch, G., Chilov, D., & Gassmann, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00508-6)
- Tizard, I. R. (2009). *Inmunologia Veterinaria* (8° edición). Elsevier.
- Tysnes, K. R., Skancke, E., & Robertson, L. J. (2014). Subclinical Giardia in dogs: a veterinary conundrum relevant to human infection. *Trends in parasitology*, *30*(11), 520–527.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.08.007>
- Van Nguyen, S., Umeda, K., Yokoyama, H., Tohya, Y., & Kodama, Y. (2006). Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Canadian journal of veterinary research*, *70*(1), 62.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1325096/>
- Vázquez, O., & Campos, T. (2009). *Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial*. *8*(31), 75–90. <https://www.redalyc.org/pdf/342/34211305006.pdf>
- Vélez, L., Reyes, K. L., Rojas, D., Calderón, M. A., Cruz-Vázquez, J. K., & Arcos-García, J. L. (2014). Riesgo potencial de parásitos zoonóticos presentes en heces caninas en Puerto Escondido, Oaxaca. *salud pública de méxico*, *56*(6), 625–630.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=55248>
- Warr, G. W., Magor, K. E., & Higgins, D. A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology today*, *16*(8), 392–398. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)
- Washabau, R. J., & Day, M. J. (2012). *Canine and Feline Gastroenterology-E-Book* (1° edición). Elsevier Health Sciences.
- Wernimont, S. M., Radosevich, J., Jackson, M. I., Ephraim, E., Badri, D. V, MacLeay, J. M., Jewell, D. E., & Suchodolski, J. S. (2020). The effects of nutrition on the gastrointestinal microbiome of cats and dogs: impact on health and disease. *Frontiers in Microbiology*, *11*.
- Xu, Y., Li, X., Jin, L., Zhen, Y., Lu, Y., Li, S., You, J., & Wang, L. (2011). Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnology advances*, *29*(6), 860–868.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.003>

Yokoyama, H, Peralta, R. C., Umeda, K., Hashi, T., Icatlo, J. F. C., Kuroki, M., Ikemori, Y., & Kodama, Y. (1998). Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk Salmonella-specific antibodies. *American journal of veterinary research*, 59(4), 416–420. <https://europepmc.org/article/med/9563623>

Yokoyama, Hideaki, Peralta, R. C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y., & Kodama, Y. (1992). Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and immunity*, 60(3), 998–1007. <https://iai.asm.org/content/60/3/998.short>

Zhang, W.-W. (2003). The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discovery Today*, 8(8), 364–371. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02655-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02655-2)

Zhen, Y.-H., Jin, L.-J., Guo, J., Li, X.-Y., Lu, Y.-N., Chen, J., & Xu, Y.-P. (2008). Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, 130(1–2), 126–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.014>



ANEXOS

ANEXO 1

FOLLETO



REQUISITOS

PARA QUE MI MASCOTA PUEDA INGRESAR AL ESTUDIO

- Tener menos de un año de edad.
- Tener mínimo 2 vacunas polivalentes.
- No haber recibido la vacuna contra Giardia.
- No haber recibido antibióticos, desparasitantes o probióticos en el último mes.
- No presentar vómitos.
- No tener más de 4 defecaciones diarias.
- Comer exclusivamente croquetas.

VIDEO INFORMATIVO



CONTACTO
 M.V.Z. Estefany Vázquez
 Tel. 4861058688
 al285866@edu.uaa.mx

“

EFFECTO DE LA IGY DE YEMA DE HUEVO EN LA SALUD INTESTINAL DE CACHORROS CANINOS.



“

LA IGY ES UNA ALTERNATIVA VIABLE PARA EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN PERROS.

¿Qué es la IGY?

La inmunoglobulina Y (IgY), es un anticuerpo producido por las gallinas de forma natural, con el cual protegen a sus polluelos de enfermedades infecciosas. La IgY se extrae de la yema de huevo. La administración de este anticuerpo a otras especies tiene la capacidad de conferir inmunidad contra infecciones. La administración oral de este anticuerpo, protege al sistema gastrointestinal de enfermedades infecciosas (parásitos, bacterias y virus).

BENEFICIOS DE LA IGY

- Regula el crecimiento de la microbiota intestinal.
- Evita la adherencia de patógenos a la mucosa gastrointestinal.
- Ayuda a la neutralización de agentes infecciosos gastrointestinales.



¿EN QUE CONSISTE EL ESTUDIO?

Se les administrará una dosis de yema de huevo en el alimento a los caninos seleccionados, diariamente durante 30 días. Y se tomarán muestras fecales cada 15 días, para valorar su evolución con el tratamiento.

¿CUALES SON MIS OBLIGACIONES COMO PROPIETARIO?

- 1.- La administración diaria de la yema de huevo en el alimento.
- 2.- Supervisión diaria de las heces de mi mascota
- 3.- Llevarlo cada 15 días a valoración médica y toma de muestras a la clínica veterinaria



ANEXO 2

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN GALLUS IMMUNOTECH

Para la extracción y purificación de las inmunoglobulinas Y (IgY) de las yemas de huevo se utilizará un kit de la empresa GallusImmunotech (Cat. No. IK 2000 hecho en Canadá) que contiene un reactivo A (4 x 500mL) y un reactivo B (4 x 500mL). Se seguirán las siguientes indicaciones:

Nota: Es importante que los Reactivos A y B y los huevos estén a 4 °C antes de su uso.

Se separará la yema de huevo frío utilizando el separador de huevo, se enjuagará la yema con agua destilada y se secará sobre una toalla de papel para eliminar la adhesión de clara de huevo. Se puncionará la membrana de la yema con una pipeta Pasteur y se permitirá que la yema se drene en un vaso de precipitado tarado.

Nota: Es importante tomar en cuenta el peso de la yema de huevo suponiendo que 1 mL de yema es igual a 1 g.

2. Se añadirá 5 volúmenes de reactivo frío A a las yemas muy lentamente mientras se agite suavemente y de forma continua hasta que esté bien mezclado evitando la formación de espuma, se dejará la yema diluida en reposo durante al menos 2 horas o hasta 24 horas a 4°C, se mezclará suavemente antes de añadir a tubos para centrifugarlos a 4000 x g durante 15 min a 4°C.
3. Se recogerá el sobrenadante en el cilindro graduado, el sobrenadante debe ser incoloro y transparente. Si las partículas están presentes, deberá repetirse la etapa de centrifugación, y si es necesario, se filtra. (medir el volumen obtenido).
4. Se transferirá el sobrenadante a un vaso de precipitado y añadir un volumen igual de reactivo B frío mientras se agita con una varilla durante 2 min a 1 h o hasta que se observe una suspensión de la mezcla.
5. Se centrifugará a 4000 x g durante 15 minutos a 4°C y se desechará el sobrenadante.
6. Se disolverá el precipitado en volumen de PBS igual al volumen original de la yema de huevo y filtrar de forma estéril, la concentración de IgY será de entre 4 y 7 mg/mL con pureza de 90% o mayor.
7. Se guardará la IgY en el refrigerador hasta un año o más sin pérdida de su actividad.

ANEXO 3

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES BIURET (POINTE SCIENTIFIC. INC.)

La reacción de color de las moléculas de proteínas con iones cúpricos, es conocida como la reacción de color de Biuret, y es conocida desde 1878, desde las publicaciones de Riegler en 1914, se han hecho intentos de estabilizar los iones cúpricos en reactivo alcalino. Kingsley modifico el procedimiento desde 1939 y en 1942 para el uso de tratado de sodio potasio como agente complejo. Este procedimiento fue modificado por Weichselbaum y Gornall. El presente método esta basado en esta modificación.

Principio

Las proteínas del suero forman un complejo coloreado violeta cuando reacciona con iones cupronicos en solución alcalina. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de proteína presente

Procedimiento

1. Etiquetar los tubos blancos, control, estándar, muestra, etc.
2. Pipeteé 1.0 mL de reactivo de trabajo en cada tubo
3. Añadir 20 μ l de muestra a los tubos respectivos. Mezclar por inversión
4. Incubar 5 min a temperatura ambiente
5. Ajustar el espectrofotómetro a cero con blanco a 540 nm
6. Leer y anotar absorbancias

ANEXO 4

HOJA DE AUTORIZACION

Aguascalientes a _____ 2020

Por medio de la presente autorizo que mi mascota _____, de _____ meses de edad, raza _____ y sexo _____. Forme parte del estudio titulado **“EFECTO DE LA INMUNOGLOBULINA Y (IgY) DE YEMA DE HUEVO DE GALLINAS HIPERINMUNIZADAS, SOBRE LA CARGA PRASITARIA Y BACTERIANA FECAL EN CANINOS.**

El cual se está llevando a cabo por la M.V.Z. Estefany Del Carmen Vázquez Sánchez, estudiante adscrita al Programa de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes. Conozco y asumo las responsabilidades que tengo como propietario, las cuales son las siguientes:

La administración oral de la Inmunoglobulina IgY, monitorización de las excretas de mi mascota, asistir a las revisiones periódicas y permitir la toma de muestras de heces de forma quincenal durante la duración de los 60 días del estudio.

Atentamente
Nombre y firma del propietario

ANEXO 5

TECNICA DE FLOTACION CON SULFATO DE ZINC

1. Mezclar aproximadamente una cucharadita de heces con suficiente volumen de agua como para hacer una suspensión semisólida. Usar un depresor de lengua y un vaso de papel desechable.
2. Poner dos capas de gasa simple sobre un segundo vaso de papel, y vaciar sobre ella suspensión fecal. Devolver la gasa con los residuos sólidos al primer vaso de papel y desechar.
3. Transferir el contenido a tubos de centrifuga de 15 mL.
4. Centrifugar durante 3 minutos a 1500 rpm y decantar el sobrenadante que contiene grasas y pigmentos disueltos.
5. Anadir una solución de sulfato de zinc (densidad especifica 1,18) a 1 cm desde la boca del tubo y resuspender el sedimento con una varilla aplicadora. Insertar un tapón y mezclar invirtiendo el tubo cuatro o más veces. La viscosidad de la solución del azúcar dificulta la mezcla, no obstante, la solución debe quedar completamente mezclada con el sedimento.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm. Sin quitar el tubo de la centrifuga, recuperar la película superficial que contiene los huevos y los quistes tocándola suavemente con un asa de platino. Transferir la película de superficie al portaobjetos de un microscopio y colocar encima un cubreobjetos.
7. Examinar el portaobjetos a 100 aumentos en el microscopio.

ANEXO 6

TECNICA DE MCMASTER

1. Pese 3 g de heces y póngalos en un vaso de precipitados.
2. Agregue cerca de 30 mL de agua y suspenda las heces con la ayuda de un abatelenguas. Tamice la muestra a través de un colador fino, colocando el producto en otro vaso, deje escurrir bien. Ajuste el volumen a 45 mL con agua.
3. Centrifugue en tubos cónicos de 15 mL a 1500 r.p.m. por un minuto (uno o dos tubos por muestra).
4. Bote el sobrenadante y suspenda el sedimento en solución de flotación. Regrese el material a un vaso de precipitados limpio.
5. Agite la muestra en este vaso y manteniéndola agitada extraiga una muestra con una pipeta gotero o pipeta Pasteur. Llene la primera cámara de recuento sin formar burbujas, dejando que el líquido entre por capilaridad.
6. Desocupe la pipeta y volviendo a agitar el vaso, tome una segunda submuestra y llene la segunda cámara.
7. Deje la lámina en reposo sobre el mesón por cinco minutos, esto permite que los huevos floten.
8. Luego examine la muestra bajo un microscopio a una magnificación de 10X. Identifique y cuente todos los huevos que halle en las dos cámaras. Ignore los huevos que estén por fuera del cuadrado gravado en la lámina.
9. La carga parasitaria (hpg) corresponde a la suma de los huevos hallados en ambas cámaras, multiplicado por 50.

(Benavides, 2013).

ANEXO 7

CUENTA EN PLACA DE BACTERIAS/TÉCNICA DE VERTIDO EN PLACA

1. Pesar 1 g de heces y colocar en 9 mL de agua destilada estéril y homogenizar perfectamente.
2. Preparar diluciones seriadas tomando 1 mL de la primera dilución problema y transferir en 9 mL de agua destilada estéril, seguir este paso sucesivamente hasta la dilución deseada.
3. Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación y la adición de medio de cultivo se puedan realizar cómoda y libremente.
4. Marcar las bases de las cajas con los datos pertinentes antes de inocular.
5. Inocular por duplicado, 1 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril.
6. Agregar de 18 a 20 mL del medio fundido y mantenido a 45 °C.
7. Para homogenizar, mezclar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas.
8. Dejar solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.
9. Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.
10. Incubar las cajas en posición invertida a 37° C por 24 horas.

ANEXO 8

AISLAMIENTO POR AGOTAMIENTO POR ESTRÍA

Recomendaciones previas

Es importante no olvidar que el objetivo es establecer un gradiente de concentración bacteriana sobre la superficie de la placa de agar, de tal suerte que en alguna zona de la misma las células no estén lo suficientemente separadas unas de otras como para formar colonias aisladas. La placa debe colocarse en posición invertida sobre la mesa de trabajo y, tomando la parte que contiene el medio de cultivo, levantarla hasta la altura del mechero. En esta posición casi vertical, se realizarán las sucesivas series de estrías. Para llevar a cabo las estrías debe mover el asa de siembra sobre la superficie del agar mediante un balanceo sucesivo y rápido de la muñeca. No haga más presión sobre el agar que la debida al propio peso del asa y su mango para no rasgar el agar. Es muy importante emplear un asa de siembra en buen estado.

1. Esterilizar el asa flameándola en el mechero hasta conseguir un rojo incandescente.
2. Enfriar el asa en la proximidad de la llama. Tomar una porción de la muestra mediante la técnica descrita anteriormente.
3. Transferir el inóculo a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde. Extenderlo formando estrías muy juntas, cubriendo aproximadamente la primera mitad de la placa. El número de estrías debe ser prácticamente incontable.
4. Flamear el asa de nuevo y enfriarla. Tomar una muestra de los microorganismos depositados en la última zona de estrías de la primera etapa (simplemente, rozar una vez dichas estrías). Realizar sobre una Porción virgen de la placa una segunda serie de estrías que no toque la primera.
5. Flamear y enfriar el asa. Repetir exactamente la operación descrita en el punto anterior, pero rozando la segunda serie de estrías. Las nuevas series de estrías no deben tocar ninguna de las series anteriores.
6. Flamear el asa y tapar la placa de Petri. Esta se incubará en las condiciones ambientales adecuadas en posición invertida con el objeto de impedir que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del agar impidiendo la obtención de colonias aislada.

ANEXO 9

FORMATO PARA SUPERVICION DE EXCRETAS DIARIAS

El presente formato será llenado por el propietario del canino diariamente, para mantener el monitoreo de las excretas del animal. Se rellenará la siguiente tabla donde se evaluarán el número de deposiciones, consistencia, coloración, cantidad, presencia de sangre y moco en las heces.

Numero de deposiciones: se evaluarán en 24 horas y se rellenará con numero la cantidad total de excreciones fecales diarias de la mascota.

Consistencia: se valorará según la escala se Bristol, que se presenta a continuación, y se colocará en la tabla el número de la escala al cual se asemeje más la excreta del canino.



Coloración: se anotará una de las siguientes opciones en la tabla: amarillenta, amarillo-verdosa, naranja, rojiza, café claro, café oscuro, negra, blanquecina.

Cantidad: se marca con una X, en la tabla la opción que sea similar a la cantidad defecada por la mascota: Poca (p), Normal (N), Abundante (A).

Presencia de sangre y/o moco: se marca con una X, si presenta o no alguno de estos dos componentes en sus excretas

(Martinez & Azevedo, 2012)