

PICCO, NATALIA  
Tecnología de los al



2013

72656

72656

MFR.
Clasif:
T. 801

72656



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES



**TECNOLOGÍA DE LOS ANTICUERPOS  
AVIARIOS Y NANOTECNOLOGÍA APLICADA  
A LA SANIDAD BOVINA**

TESIS DOCTORAL  
MIC. NATALIA PICCO

AÑO 2013



El presente trabajo para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas fue realizado en el Departamento de Anatomía Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Doctoranda: Mic. Natalia Y. Picco

Directora: Dra. Adriana B. Vivas

Aprobado por el Jurado Evaluador de Tesis:

Dr. Horacio R. Terzolo

Dra. Silvia G. Correa

Dra. Liliana M. Pascual

AÑO 2013



*Quiero agradecer de todo corazón.....*

*A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitirme concretar mi formación profesional y como persona.*

*A mi esposo, Carlos, por su inmensa ayuda en todo momento, su interminable paciencia, su apoyo incondicional y por seguir acompañándome a lo largo de mi vida. Te Amo.*

*A mis padres, Eva y Juan Carlos, y a mi hermana Romina por acompañarme siempre, por su ayuda y por enseñarme a seguir esforzándome cada día.*

*A mi directora, Adriana Vivas, por aceptar dirigirme en esta Tesis, por recibirme con las puertas abiertas y confiar en mi.*

*A mis amigos del laboratorio, Fabri, Caro, Romi, Dani, Lucila, Vero y María, por la ayuda brindada, por su amistad, los mates compartidos y por los momentos inolvidables.*

*A mis amigas queridas Julieta y Romina, por estar siempre, por los recuerdos compartidos y por su amistad incondicional a pesar de la distancia.*

*A mis amigos María José (Pé), Armando, Irina, Emiliano, Luján, Leo, Pablo, Carlitos, Mecha, Ezequiel, Cristina, a todos los amigos de Río cuarto y de Río Tercero que están en mi corazón, por su amistad sincera y por las alegrías compartidas.*

*A mis suegros, cuñado, cuñadas, sobrina, sobrinos, abuela, tíos, tías, primas y primos, por formar parte de la gran familia que me acompaña cada día.*

*Al Dr. Horacio Terzolo, la Dra. Sivia Correa y la Dra. Liliana Pascual, por la dedicada y responsable tarea que brindaron como Comité Asesor y Evaluador de Tesis, por las correcciones y por asesorarme amablemente en cada paso realizado.*

*A Alejandro Larriestra, Claudina Vissio, Joaquín Lombardelli y Karina Tiranti por su gran ayuda en los muestreos, por brindarme su tiempo, por las correcciones y consejos.*

*A Marité Mugnaini, Nora Gorla, Vivian Martin, Guillermo Bagnis y Enzo Redondo, por su ayuda desinteresada, sus conocimientos y especialmente por seguir brindándome su cariño.*

*Al Dr. César Barbero, Diego Acevedo, Evelina Frontera, Cristina Miras, Abril Molina y a los demás integrantes del Departamento de Química (UNRC) por su colaboración y asesoramiento en la síntesis y caracterización de las nanoestructuras.*





*A Ana Rita Moreira y Enrique Louge (EEA INTA Balcarce) por su ayuda y asesoramiento en la técnica de PCR y por donarnos las cepas de referencia.*

*Al Ing. Godio y al Área de Nutrición Animal, por permitirme utilizar las instalaciones para la realización de los ensayos experimentales con terneros.*

*A Fernanda Peralta y al Área de Producción avícola, por el mantenimiento de las gallinas y por permitirme utilizar las instalaciones para la construcción del bioterio de aves.*

*A la Dra. Silvia Nates, Patricia Barril, Gisela Masachessi y Miguel Giordano del Instituto Viroológico Vanella (UNC), por su colaboración y asesoramiento en el diagnóstico de Rotavirus.*

*A los productores de la Cuenca Lechera de Villa María, por su amable predisposición y colaboración en la recolección de las muestras de campo.*

*A Nora Gorla, por sus correcciones, su cariño y su obra de arte para la tapa de tesis.*

*A Alicia, Kitty, Andrea, Damiana, Débora y Tomás por recibirme en la Cátedra de Biología Celular y Embriología y por permitirme aprender a su lado.*

*Al personal no docente de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, en especial a Nelsy Schleef y Hugo Giovanini, por su ayuda, su tiempo y su amable dedicación en la realización de este trabajo.*

*A los docentes y no docentes de los Departamentos de Anatomía Animal, Patología Animal y Microbiología, por la ayuda prestada y por permitirme la utilización de los equipos de laboratorio.*

*Al CONICET, por permitirme trabajar y concretar mi carrera de Doctorado.*

*A todas las personas que de alguna manera colaboraron con este trabajo.*

*A Dios por darme la vida y por ser mi sostén durante el camino recorrido...*

**MUCHAS GRACIAS!!!**



La diarrea neonatal bovina es una causa importante de morbilidad y mortalidad en terneros recién nacidos. *Escherichia coli* (*E. coli*) es considerada uno de los principales agentes patógenos bacterianos causantes de este síndrome en terneros menores de 10 días. Actualmente, para la prevención de diarreas infecciosas en terneros destetados y criados artificialmente en guacheras, se propone reemplazar el uso rutinario de los antibióticos por la administración de sustancias alternativas, tales como los anticuerpos aviarios (IgY) específicos, extraídos de la yema de huevo de gallinas inmunizadas contra los agentes etiológicos de la diarrea. Sin embargo, para poder utilizar la IgY como inmunoterapia pasiva, es imprescindible hallar un método efectivo para preservar su valor terapéutico y su función biológica durante el pasaje por el abomaso. Las investigaciones más recientes utilizan las aplicaciones farmacológicas de la nanotecnología para mejorar la eficiencia de la administración oral de la IgY. El objetivo de esta tesis fue evaluar la capacidad protectora de la IgY, administrada en nanoestructuras, para prevenir las diarreas neonatales causadas por *E. coli* en terneros. Se obtuvieron 620 hisopados rectales de terneros menores de 45 días de edad pertenecientes a 45 tambos de la Cuenca Lechera de Villa María, Provincia de Córdoba. Se aisló, identificó y tipificó, bioquímicamente y molecularmente, el patotipo de *E. coli* prevalente. El análisis de los genes de virulencia intestinales de *E. coli* por PCR demostró una alta prevalencia de cepas compatibles con *E. coli* enterotoxigénica (ECET). Este patotipo presentó una distribución espacial homogénea, cubriendo toda el área geográfica muestreada. Se purificó la IgY obtenida de 8 gallinas inmunizadas y 4 no inmunizadas mediante dos métodos diferentes: dilución en agua y polietilenglicol. El método de dilución en agua y su posterior precipitación con sulfato de sodio, resultó ser una técnica efectiva, práctica y económica para la purificación de la IgY. La concentración y el título de la IgY se determinaron mediante ELISA. El título de la IgY anti-ECET fue tres órdenes de magnitud mayor (1:100.000) que el de la IgY control (1:100). Se sintetizaron y caracterizaron hidrogeles de ácido acrílico/acrilamida, con el agregado de un 5% de nanotubos de carbono (NTC) funcionalizados con quitosano. El método de funcionalización de los NTC con quitosano resultó satisfactorio, dado que disminuyó el grado de aglomeración de los mismos. La unión covalente entre el quitosano y los NTC fue evidenciada por espectroscopía FTIR. Los hidrogeles con una proporción equimolar (1:1) de sus monómeros presentaron un mayor porcentaje de hinchamiento y contenido de agua a pH básicos y se mantuvieron colapsados a pH ácidos, siendo los elegidos para los ensayos posteriores. La IgY fue incorporada en hidrogeles pH-sensibles y se evaluó su estabilidad *in vitro* en condiciones gástricas e intestinales simuladas. La utilización de los compuestos hidrogel-NTC mejoró la eficiencia de incorporación de la IgY, permitió una liberación controlada y mantuvo una actividad biológica del 85% luego del pasaje por el fluido gástrico. La interacción hidrogel-NTC-IgY fue evidenciada por espectroscopía FTIR. Se desarrolló un modelo de infección experimental en 20 terneros neonatos para evaluar el efecto protector de la IgY encapsulada, frente al desafío con ECET. Se demostró que la administración oral de la IgY anti-ECET incorporada en compuestos hidrogel-NTC redujo el número de animales enfermos, la duración y la severidad de la diarrea. Los animales tratados con esta IgY tuvieron una ganancia de peso mayor que la de los animales que no fueron tratados. Mediante técnicas histológicas convencionales se comprobó que la administración oral de los compuestos hidrogel-NTC-IgY no indujo procesos inflamatorios en la mucosa del duodeno o yeyuno-íleon de ninguno de los animales que fueron desafiados. En esta tesis se han aportado resultados inéditos sobre la funcionalidad de la IgY administrada en hidrogeles pH-sensibles para prevenir las diarreas neonatales causadas por *E. coli* en terneros de tambo.



Neonatal calf diarrhea is an important cause of morbidity and mortality in newborn calves. *Escherichia coli* (*E. coli*) is considered to be one of the main bacterial pathogen agents able to cause diarrhea in calves less than 10 days of age. At present, for the prevention of infectious diarrheas in neonatal calves, which are artificially reared weaned and separated from their dams, it is proposed replacement of routine administration of antibiotics by alternative substances, such as specific avian antibodies (IgY), extracted from the egg yolk of hens that have been immunized with etiological agents of diarrhea. However, to use the IgY as passive immunotherapy, it is necessary to find an effective method to preserve the therapeutic value and the biological function of this antibody during the abomasal passage. The latest research use the pharmacological applications of nanotechnology (capture, targeted delivery and controlled release) to improve efficiency of orally administered IgY. The aim of this thesis was to evaluate the protective capacity of IgY, administered into nanostructures, to prevent calf neonatal diarrhea caused by *E. coli*. Rectal swabs from 620 calves, less than 45 days of age, were obtained from 45 dairy farms located in Villa María, (Córdoba Province). The prevalent *Escherichia coli* pathotype was isolated, identified and biochemically and molecularly typified. PCR analysis of intestinal virulence genes of *E. coli*, showed a high prevalence of strains compatible with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). This pathotype presented a homogeneous spatial distribution, covering the entire geographical area that was sampled. IgY obtained from 8 immunized and 4 non-immunized hens, was purified using two different methods: water dilution and polyethyleneglycol. The water dilution method and its subsequent precipitation with sodium sulfate proved to be an effective, practical and economical technique for large-scale purification of IgY. The IgY concentration and title were determined by means of ELISA. The anti-ETEC IgY title was three orders of magnitude higher (1:100,000) than the control IgY title (1:100). Acrylic acid/acrylamide hydrogels with the addition of 5% chitosan-functionalized carbon nanotubes (CNT) were synthesized and characterized. The functionalization method of the CNT with chitosan was found to be satisfactory because decreases its degree of agglomeration. The covalent binding between chitosan and CNT was evidenced by FTIR spectroscopy. Hydrogels synthesized with an equimolar ratio of the monomers (1:1) showed a higher percentage of swelling and water content at basic pH, but remained collapsed at acidic pH. These hydrogels were chosen for subsequent assays. IgY was incorporated into pH-sensitive hydrogels and their *in vitro* stability was evaluated in simulated gastric and intestinal conditions. The use of hydrogel-CNT compounds improved the efficiency of IgY incorporation, provided a controlled release, and showed a biological activity of 85% after passage through the gastric fluid. The hydrogel-IgY interaction was evidenced by FTIR spectroscopy. An experimental infection model in 20 neonatal calves was carried out in order to demonstrate the protective effect of encapsulated IgY against oral challenge with ETEC. It was demonstrated that oral administration of anti-ETEC IgY incorporated to hydrogel-CNT compounds reduced the percentage of sick animals, the duration and severity of diarrhea. Furthermore, the IgY-treated calves had a higher body weight gain than the untreated ones. By means of conventional histological techniques it was shown that oral administration of IgY-nanotube-hydrogels compounds did not produced inflammatory processes in the duodenum or jejunum-ileum mucosa in any of the calves that have been challenged. This thesis have contributed with unpublished results about the functionality of IgY administered into pH-sensitive hydrogels to prevent neonatal diarrhea caused by *E. coli* in dairy calves.





**AAc:** ácido acrílico  
**AAM:** acrilamida  
**ab:** antibiótico  
**ab-ad:** antibiótico-antidiarreico  
**Ac:** anticuerpos  
**ad:** antidiarreico  
**A/E:** adhesión y borrado (attaching and effacing)  
**ANOVA:** análisis de la varianza  
**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico (adenosine monophosphate cyclique)  
**BFP:** pili formador de haces (bundle-forming pilus)  
**BSA:** albúmina sérica bovina (bovine serum albumin)  
**CFA:** adyuvante de Freund completo (complete Freund's adjuvant)  
**CFA I:** factor de colonización antigénico I (colonization factor antigens I)  
**CFA II:** factor de colonización antigénico II (colonization factor antigens II)  
**dNTPs:** desoxiribonucleótidos trifosfatos (deoxyribonucleotide triphosphates)  
**DA:** dilución en agua  
**Da:** dalton  
**DAB:** diaminobenzidina  
**DO:** densidad óptica  
**eae:** gen que codifica para la intimina de *E. coli*  
**E. coli:** *Escherichia coli*  
**ECAD:** *Escherichia coli* con Adherencia Difusa  
**ECEA:** *Escherichia coli* Enteroagregativa  
**ECEH:** *Escherichia coli* Enterohemorrágica  
**ECEI:** *Escherichia coli* Enteroinvasiva  
**ECEP:** *Escherichia coli* Enteropatógena  
**ECET:** *Escherichia coli* Enterotoxigénica  
**ECST:** *Escherichia coli* productora de shigatoxina  
**ECVT:** *Escherichia coli* productora de verotoxina  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético  
**ELISA:** enzimo inmunoensayo (enzyme-linked immunosorbent assay)  
**EPDS:** sialioligosacaridos derivados del plasma del huevo (egg plasma-derived sialyoligosaccharides)  
**Fc:** fragmento constante de las inmunoglobulinas  
**FGS:** fluido gástrico simulado  
**FIS:** fluido intestinal simulado  
**FTIR:** espectroscopia infrarroja transformada de Fourier  
**F17:** fimbria 17  
**F18:** fimbria 18  
**F4:** fimbria 4 (K88)  
**F41:** fimbria 41  
**F5:** fimbria 5 (K99)  
**F6:** fimbria 6 (P987)  
**GMPC:** guanósín monofosfato cíclico (guanosine monophosphate cyclique)  
**GPS:** sistema de posicionamiento global  
**h-ab:** hidratación oral-antibiótico  
**h-ad:** hidratación oral-antidiarreico  
**h-ab-ad:** hidratación oral-antibiótico-antidiarreico  
**H/E:** hematoxilina/eosina  
**HPLC:** cromatografía líquida de alta presión (high-performance liquid chromatography)



**IFA:** adyuvante de Freund incompleto (incomplete Freund's adjuvant)  
**IgA:** inmunoglobulina A  
**IgG:** inmunoglobulina G  
**IgM:** inmunoglobulina M  
**IgY:** inmunoglobulina Y  
**IgE:** inmunoglobulina E  
**KDa:** kilodalton  
**LDAMF:** factor antimicrobiano derivado de lipoproteínas de la yema de huevo (lipoprotein-derived anti-microbial factor from hen egg yolk)  
**LT:** toxina termolábil  
**mA:** miliamperes  
**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio  
**MWCNTs:** nanotubos de carbono de pared múltiple (multi-walled carbon nanotubes)  
**ng/mL:** nanogramos/mililitro  
**nm:** Nanómetros  
**NP-*E.coli*:** *Escherichia coli* no patógena  
**NTC:** nanotubos de carbono  
**NTC-QTS:** nanotubos de carbono con quitosano  
**PBS:** solución salina tamponada con fosfato (phosphate buffered saline)  
**PBS-T:** solución salina tamponada con fosfato - Tween 20  
**pb:** pares de base  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)  
**PEG:** polietilenglicol  
**PVDF:** polivinilfluoride  
**QTS:** Quitosano  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**SDS:** dodecilsulfato sódico  
**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecilsulfato sódico  
**SH<sub>2</sub>:** ácido sulfhídrico  
**SIM:** movilidad, Indol, ácido sulfhídrico (sulfide indole motility)  
**STa:** toxina termoestable a  
**STb:** toxina termoestable b  
**SWCNTs:** nanotubos de carbono de pared simple (single-walled carbon nanotubes)  
**Stx:** shigatoxina  
**Stx1:** shigatoxina 1  
**Stx2:** shigatoxina 2  
**TAE:** tris-acetato-EDTA  
**Taq polimerasa:** polimerasa termoacuática (thermus aquaticus polimerasa)  
**TBS:** tampón tris salino (tris buffered saline)  
**TBS-T:** tampón tris salino con Tween 20 (tris buffered saline-Tween 20)  
**TMB:** tetrametilbencidina  
**TEMED:** tetrametiletlenodiamina  
**TSI:** triple azúcar hierro (triple sugar iron)  
**U/μL:** unidades/microlitro  
**UFC/mL:** unidades formadoras de colonias/mililitro  
**VT:** verotoxina  
**VT1:** verotoxina 1  
**VT2:** verotoxina 2  
**x g:** fuerza centrífuga



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1) INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1) Diarrea neonatal bovina .....	5
1.1.1) Etiología de la diarrea .....	6
1.1.2) Patogénesis de la diarrea .....	8
1.2) <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	9
1.2.1) Patotipos de <i>E.coli</i> y factores de virulencia asociados .....	10
1.3) Tratamiento de la diarrea neonatal bovina .....	16
1.4) Uso de la inmunoglobulina Y (IgY) en medicina veterinaria .....	19
1.5) Propiedades de la IgY .....	21
1.6) Nanotecnología y nanotubos .....	24
1.7) Hidrogeles pH-sensibles .....	26
1.8) Encapsulación de la IgY .....	27
<b>2) OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1) Objetivo general .....	28
2.2) Objetivos específicos .....	28
<b>3) HIPÓTESIS</b> .....	<b>28</b>
<b>4) MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1) Animales y recolección de datos .....	29
4.2) Muestreo, aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> .....	29
4.3) Extracción del ADN bacteriano .....	30
4.4) Tipificación molecular de las cepas de <i>E. coli</i> por PCR .....	30
4.5) Producción del inmunógeno bacteriano .....	32
4.6) Inmunización de las gallinas .....	33
4.7) Obtención y purificación de la IgY .....	35
4.7.1) Método con polietilenglicol 6000 .....	35
4.7.2) Método de dilución en agua .....	35
4.7.3) Diálisis del producto precipitado .....	36
4.7.4) Liofilización de la IgY .....	36
4.8) Determinación de la pureza y cuantificación de la IgY .....	37
4.8.1) Determinación de proteínas totales .....	37
4.8.2) Determinación de la pureza de la IgY por SDS-PAGE .....	37
4.8.3) Determinación de la concentración de la IgY por densitometría .....	38
4.8.4) Determinación de la concentración de la IgY por espectrofotometría .....	39
4.8.5) Cuantificación de la concentración de la IgY total por ELISA .....	39
4.8.6) Determinación del título de la IgY por ELISA .....	40
4.9) Funcionalización de los nanotubos con quitosano y su caracterización .....	41
4.10) Síntesis y caracterización de los hidrogeles pH-sensibles .....	41
4.11) Incorporación de la IgY en los hidrogeles pH-sensibles .....	43
4.12) Estabilidad <i>in vitro</i> de la IgY en los fluidos simulados .....	44
4.13) Liberación de la IgY de los hidrogeles pH-sensibles .....	44
4.14) Evaluación de la capacidad protectora de la IgY en un modelo ternero .....	45
4.15) Histología de los cortes de intestino para observar procesos inflamatorios .....	47
4.16) Análisis estadísticos y mapeo .....	48
<b>5) RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>



5.1) Animales y recolección de datos .....	49
5.2) Muestreo, aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> .....	50
5.3) Extracción del ADN bacteriano.....	51
5.4) Tipificación molecular de las cepas de <i>E. coli</i> por PCR.....	51
5.5) Producción del inmunógeno bacteriano.....	53
5.6) Inmunización de las gallinas.....	54
5.7) Obtención y purificación de la IgY por ambos métodos .....	55
5.8) Determinación de la pureza y cuantificación de la IgY.....	56
5.8.1) Determinación de la pureza de IgY por SDS-PAGE y su concentración por densitometría .....	56
5.8.2) Determinación de la concentración y la actividad de la IgY por ELISA .....	57
5.9) Funcionalización de los nanotubos con quitosano y su caracterización .....	57
5.10) Síntesis y caracterización de los hidrogeles pH-sensibles.....	58
5.11) Incorporación de la IgY en los hidrogeles pH-sensibles .....	59
5.12) Estabilidad <i>in vitro</i> de la IgY en los fluidos simulados.....	60
5.13) Evaluación de la capacidad protectora de la IgY en un modelo ternero.....	62
5.14) Histología de los cortes de intestino para observar procesos inflamatorios .....	67
<b>6) DISCUSIÓN .....</b>	<b>70</b>
6.1) Prevalencia de diarrea, agentes etiológicos y factores de riesgo asociados.....	70
6.2) Aislamiento, identificación y tipificación molecular por PCR de <i>E. coli</i> patógena ..	71
6.3) Obtención, purificación y caracterización de la IgY anti- <i>E. coli</i> enterotoxigénica ..	74
6.4) Funcionalización de los nanotubos con quitosano y su caracterización .....	76
6.5) Caracterización de los hidrogeles pH-sensibles y encapsulación de la IgY.....	77
6.6) Estabilidad de la IgY en condiciones gástricas e intestinales simuladas.....	79
6.7) Evaluación de la capacidad protectora de la IgY en un modelo ternero .....	80
<b>7) CONCLUSIONES .....</b>	<b>84</b>
<b>8) BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>
<b>9) ANEXOS.....</b>	<b>106</b>





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Interrelaciones complejas entre los diferentes patotipos de *E. coli* .....10

Figura 2: Mecanismos de patogenicidad de los patotipos intestinales de *E. coli*.. .....11

Figura 3: Patogenia de *E. coli* enterotoxigénica en bovinos.....13

Figura 4: Comparación entre la estructura de la IgG de mamíferos y la IgY aviar . ....21

Figura 5: Transferencia de la IgY, IgM e IgA al huevo durante su formación .....22

Figura 6: Mapa de la Cuenca Lechera de Villa María, Córdoba, Argentina .....29

Figura 7: Esquema de inmunización de las gallinas con la bacterina de ECET.....34

Figura 8: Extracción de sangre y pesaje de las gallinas en el bioterio de aves.....34

Figura 9: Estructura química de los monómeros utilizados en los hidrogeles. ....41

Figura 10: Preparación de las pastillas a partir del hidrogel polimerizado.....42

Figura 11: Esquema de manejo de los animales durante los ensayos.....46

Figura 12: Parámetros clínicos asociados con la diarrea de terneros. ....47

Figura 13: Muestras obtenidas de los terneros en el día de la necropsia. ....47

Figura 14: Prevalencia de diarrea (%) en los rodeos muestreados.....49

Figura 15: Localización de los establecimientos y distribución espacial. *E. coli*.....53

Figura 16: Gallinas de alta postura, mantenidas en condiciones de bioterio.....54

Figura 17: SDS-PAGE y Western blot de la IgY purificada por ambos métodos.....56

Figura 18: Funcionalización y caracterización de los nanotubos de carbono.....58

Figura 19: Caracterización por FTIR del sistema hidrogel-IgY.....60

Figura 20: Porcentaje máximo de IgY liberada en los fluidos simulados.....61

Figura 21: Infección concomitante de *E. coli* y *Cryptosporidium* spp.en un ternero. ....66

Figura 22: Observación de los animales diarreicos y características de la diarrea .....66

Figura 23: Necropsia y observación macroscópica de los intestinos bovinos. ....67

Figura 24: Microfotografías de la mucosa duodenal teñida con H/E. ....67

Figura 25: Microfotografías de la mucosa yeyunal y del colon teñidas con H/E.....68

Figura 26: Microfotografías de la mucosa duodenal teñida con azul de toluidina. ....68

Figura 27: Microfotografías de la mucosa yeyunal teñida con azul de toluidina.....69

Figura 28: Microfotografías de la lámina propia intestinal y los mastocitos con AT.....69





### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales causas no infecciosas de la diarrea neonatal bovina.....	6
Tabla 2: Principales causas infecciosas de la diarrea neonatal bovina.....	7
Tabla 3: Genes amplificados por PCR y características de la amplificación.....	31
Tabla 4: Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas como control (+) para los genes de virulencia.....	32
Tabla 5: Variables asociadas con la prevalencia de diarrea en los establecimientos...	50
Tabla 6: Prevalencia de Enterobacterias en los terneros y rodeos muestreados.....	51
Tabla 7: Frecuencias de los genes de virulencia para las cepas de <i>E. coli</i> (+).....	52
Tabla 8: Distribución de los genes de virulencia de <i>E. coli</i> en los terneros.....	52
Tabla 9: Tasa de postura y peso de las gallinas inmunizadas y no inmunizadas.....	54
Tabla 10: Valores de proteínas, IgY y pureza en la fracción soluble.....	55
Tabla 11: Valores de proteínas, IgY y pureza en la fracción liofilizada.....	55
Tabla 12: Concentración y actividad específica de IgY determinadas por ELISA.....	57
Tabla 13: Tamaño de los hidrogeles en soluciones tampones a diferentes pH.....	58
Tabla 14: Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles.....	59
Tabla 15: Incorporación de la IgY en los hidrogeles pH-sensibles.....	59
Tabla 16: Variación de los hidrogeles incubados con distintas concentraciones de IgY....	61
Tabla 17: Porcentaje de incorporación y liberación de la IgY de los hidrogeles.....	62
Tabla 18: Parámetros asociados a la diarrea observados en cada grupo experimental....	63
Tabla 19: Ganancia de peso en cada grupo experimental.....	64
Tabla 20: Recuento leucocitario en la sangre de los terneros sacrificados.....	65



*Mic. Natalia Picco*

## **INTRODUCCIÓN**



## **1) INTRODUCCIÓN**

### **1.1) DIARREA NEONATAL BOVINA**

Una producción bovina rentable se basa en un buen manejo sanitario, reproductivo y nutricional. Para mantener esta rentabilidad se deben controlar determinados problemas derivados del hacinamiento de los animales, entre los cuales se puede destacar el control del crecimiento post-natal y la prevención de patologías digestivas tales como las diarreas neonatales y el post-destete (Carbonero y cols., 2007).

Los mecanismos de defensa en el bovino recién nacido no están completamente desarrollados. El período comprendido entre el nacimiento y el desleche constituye una situación altamente estresante para el ternero, haciéndolo muy susceptible a un amplio espectro de microorganismos patógenos, lo que provoca que la morbilidad y mortalidad sean muy elevadas en esta etapa inicial (Constable, 2004; Jasper y cols., 2008). Numerosos estudios han demostrado que entre las principales causas de muerte de los terneros durante este período se encuentran las diarreas (Bilbao y cols., 2007). Se estima que la incidencia promedio de las diarreas neonatales en terneros es de un 20%. Este valor es altamente variable entre diferentes estudios y entre los establecimientos dentro de un mismo relevamiento, pudiendo existir rodeos libres y otros endémicos donde el porcentaje de animales afectados puede superar el 70%. (Parreño, 2008). En nuestro país la diarrea neonatal de los terneros es una enfermedad grave y frecuente, que afecta tanto a los establecimientos de cría como a los tambos, limitando la producción de carne y leche respectivamente. Las pérdidas económicas ocasionadas en el ganado bovino por las diarreas son cuantiosas, incluyendo pérdidas directas (gastos de prevención, gastos por tratamientos medicamentosos y mortalidad asociada) y pérdidas indirectas (disminución del peso y retraso en el crecimiento de los terneros afectados, pérdida de mejora genética, tiempo que el personal dedica a atender a los animales enfermos) (Parreño, 2008).

La diarrea neonatal bovina es una enfermedad multifactorial que involucra la interacción de microorganismos patógenos con el estado inmune-nutricional del ternero y los diferentes factores medioambientales y de manejo (crianza, alimentación y condiciones de higiene) (Bendali y cols., 1999; Lorenz, 2006; Bartels y cols., 2010). La severidad y duración de la diarrea dependen de la virulencia del agente patógeno implicado, de la dosis infectante, de la edad del huésped, de la eficiencia de la inmunidad pasiva y del grado de estrés ambiental. Entre los principales factores de riesgo que contribuyen a la aparición de una elevada incidencia de diarrea neonatal se



encuentran: fallas en la vacunación; carencia de suplementación vitamínica y mineral de las madres gestantes; fallas de transferencia de inmunidad pasiva al ternero; alta densidad de animales susceptibles en determinadas épocas del año; falta de higiene en los sistemas de crianza artificial; y, en general, las fallas de manejo (Margueritte y cols., 2007).

### 1.1.1) ETIOLOGÍA DE LA DIARREA

Las causas de la diarrea neonatal bovina pueden ser de origen no infeccioso o infeccioso (Bilbao, 2013). Las diarreas no infecciosas suelen ser temporales y pueden ocurrir debido a factores ambientales, nutricionales o de manejo, que ocasionan estrés en el animal. Dado que no hay daños en las vellosidades intestinales la condición del ternero puede mejorar, incluso sin tratamiento, una vez que se retira la fuente de estrés (tabla 1).

Tabla 1: Principales causas no infecciosas de la diarrea neonatal bovina

CAUSAS DE ORIGEN NO INFECCIOSO	
FACTORES AMBIENTALES	FACTORES NUTRICIONALES Y DE MANEJO
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Componentes físicos como la hidrografía, la topografía y el clima (cambios de temperatura, viento y lluvias).</li> <li>- Componentes biológicos como la flora y la fauna que pueden actuar transportando los agentes infecciosos presentes en el medio ambiente.</li> <li>- Componentes económico-sociales, tales como la higiene ambiental, la tecnificación, la comercialización y la estructura de producción.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Administración de leches con proteínas poco digeribles o sustitutos lácteos con alto contenido de grasa.</li> <li>- Suministro de leches mal conservadas o mastíticas con presencia de antibióticos.</li> <li>- Sobrealimentación y cambios repentinos en la dieta o en el número de tomas diarias.</li> <li>- Administración de la dieta a temperaturas inadecuadas o en diferentes horarios.</li> <li>- Suministro de antibióticos orales que alteran la microbiota intestinal normal.</li> <li>- Estrés por traslado de los animales.</li> </ul>

En las diarreas infecciosas están involucrados diversos agentes patógenos (virus, bacterias o parásitos). La infección puede ocurrir por el contacto de un ternero sano con otros terneros enfermos, a través de los trabajadores que alimentan y manipulan los animales, o a través del medio ambiente (tabla 2).





Tabla 2: Principales causas infecciosas de la diarrea neonatal bovina

CAUSAS DE ORIGEN INFECCIOSO		
VIRUS	BACTERIAS	PROTOZOOS
Rotavirus bovino (A, B y C)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Coronavirus bovino	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Eimeria</i> spp.
Virus de la diarrea viral bovina	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Giardia</i> spp.

Entre los agentes etiológicos infecciosos, Rotavirus, Coronavirus, *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigénica, *Cryptosporidium parvum* y *Salmonella* spp. han sido reportados en el 75-95% de los casos de infecciones intestinales en terneros jóvenes (Torsein y cols., 2011; Gulliksen y cols., 2009; Bartels y cols., 2010; Luginbuhl y cols., 2005; García y cols., 2000). La prevalencia relativa de estos agentes varía bastante entre los estudios realizados, posiblemente por diferencias en la ubicación geográfica, el clima, las técnicas diagnósticas y otros factores (Navarre 2000, Heinrichs y Radostits 2001, Scott y cols., 2004). La mayoría de los virus se hallan ampliamente distribuidos en la población bovina y sólo bajo ciertas circunstancias, la infección es lo suficientemente grave como para producir lesiones y diarrea. Los virus pueden actuar como un factor predisponente para infecciones bacterianas secundarias. Rotavirus bovino Grupo A es el principal agente causal de diarrea neonatal en rodeos de cría. Por su parte, *Cryptosporidium parvum*, *E. coli* y *Salmonella* spp. predominan en las explotaciones tamberas de nuestro país posiblemente debido a los sistemas de manejo. En un estudio previo realizado en Argentina, Bellinzoni y cols., (1990) investigaron el rol de cepas patógenas de *E. coli* aisladas de terneros sanos y diarreicos. No se encontraron cepas patógenas pues solamente se realizó la serología de *E. coli* portadoras de la fimbria K99 (F5), sin estudiar genes de patogenicidad u otros atributos de virulencia. Estudios realizados sobre las diarreas neonatales en terneros, en establecimientos de cría o tambo, en diferentes países, indican la participación simultánea de varios agentes y se registra en algunos casos, un elevado porcentaje de infecciones mixtas. La asociación de *E. coli* con otros agentes que causan diarrea, como Rotavirus, es motivo de importantes pérdidas en terneros en los primeros días de vida (Costantini y cols., 2002).



### 1.1.2) PATOGÉNESIS DE LA DIARREA

Bajo condiciones normales, una gran cantidad de agua, electrolitos y nutrientes entran al intestino para ser absorbidos por las células de las vellosidades. Cuando ocurre alguna alteración en estas funciones, se pueden generar fallas en la absorción y diarrea (Radostits y cols., 2007). El volumen fecal total puede llegar a ser entre 22 a 40 veces mayor que lo normal en terneros con diarrea. Clínicamente, la diarrea se puede presentar de dos maneras:

- Forma entérica-enterotoxigénica: generalmente se caracteriza por una mayor secreción intestinal, período de incubación de unas 6 horas, aumento del pH de las heces, diarrea acuosa, amarillenta y profusa, temperatura corporal normal, distensión abdominal moderada, deshidratación progresiva, acidosis y en los casos más severos, provoca la muerte del animal a las pocas horas de comenzar los síntomas (Stordeur y cols., 2000; Dos Santos y cols., 2007).

- Forma septicémica: generalmente ocurre cuando los terneros padecen alguna inmunodeficiencia o bien cuando las cepas son muy virulentas; estas cepas enteroinvasivas son capaces de atravesar la pared del tracto gastrointestinal y alcanzar el torrente circulatorio, ingresar a los vasos sanguíneos de la lámina propia provocando cuadros septicémicos, debilidad, depresión intensa, anorexia, taquicardia, taquipnea, hipertermia y muerte en los casos más severos (Campero, 1998).

La compleja fisiopatología de la diarrea neonatal bovina está mediada por diferentes mecanismos que dependen del agente causal (Pardo-Mora, 2012):

- Diarrea por mala absorción: Ocurre como resultado de un acortamiento, atrofia y fusión de las vellosidades disminuyendo la capacidad y superficie de absorción intestinal, provocando la retención de solutos y agua en el lumen intestinal. Se produce una dificultad para absorber nutrientes a través de la pared intestinal. El alimento es parcialmente digerido en el intestino grueso, promoviendo el desarrollo bacteriano con la subsiguiente fermentación y, adicionalmente, ejerciendo un efecto osmótico que moviliza agua hacia el intestino y contribuye a la diarrea. Por ejemplo: Rotavirus, Coronavirus y *Cryptosporidium parvum*.

- Diarrea osmótica: Resulta como consecuencia de una enfermedad que causa mala digestión y/o mala absorción. Se asocia con la ingestión de una cantidad suficiente de un soluto osmóticamente activo que genera un aumento de agua en el lumen intestinal capaz de sobrepasar la capacidad de absorción o digestión del intestino.



- Diarrea por hipersecreción: Es debida a una hipersecreción que puede ser producto de células intactas del epitelio intestinal o de una absorción disminuida por daño estructural de las superficies del intestino. Algunas bacterias producen enterotoxinas que estimulan un aumento en la secreción intestinal. La integridad de la célula no se afecta, pero se altera la actividad de las bombas de membrana y hay incremento neto del transporte del cloro, sodio y potasio hacia el lumen intestinal. Este es el mecanismo más importante en neonatos. Por ejemplo: enterotoxinas producidas por *E. coli* y *Salmonella* spp.
- Diarrea por alteración de la permeabilidad: Ocurre debido a una pérdida o reducción en la integridad de la mucosa o a un aumento de la presión hidrostática intestinal. Se asocia con movimientos retrógrados de solutos y fluidos desde el espacio lateral intercelular hacia el lumen intestinal, que resultan del aumento de los poros vasculares. Por ejemplo: *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. y Coccidias.
- Incremento en la motilidad intestinal: el incremento en la motilidad del intestino contribuye al desarrollo de la diarrea, produciendo un tránsito más rápido en un tiempo más corto, lo que no permite una absorción normal.

## 1.2) *ESCHERICHIA COLI* (*E. coli*)

Entre los agentes infecciosos bacterianos involucrados en las diarreas, *E. coli* es considerada uno de los principales patógenos causantes de este síndrome, ocasionando a nivel mundial el 20% de las pérdidas en terneros menores de 10 días (China y cols., 1998). Esta bacteria es un habitante normal del tracto digestivo de los animales y del hombre. A pesar de estar presente en grandes concentraciones en la microbiota intestinal, representa una muy pequeña proporción del contenido total de bacterias. Sin embargo, la presencia regular de *E. coli* en el intestino y en las heces, ha dado lugar al seguimiento de la bacteria en la naturaleza como un indicador de contaminación fecal del agua y de los alimentos (Todar, 2008). *E. coli* puede sobrevivir en el medio ambiente, en heces, polvo y agua durante semanas o meses. El tipo de interacción resultante entre la *E. coli* y el huésped permite clasificar las cepas como comensales o como patógenas. La mayoría de las cepas comensales coexisten en armonía con el hospedador, lo benefician sintetizando co-factores y lo protegen de otros microorganismos patógenos. Sin embargo, un número reducido de cepas pueden causar diarrea aguda, actuando como enteropatógenos primarios (Kaper y cols., 2004; Paiva De Sousa y cols., 2006). Estas cepas patógenas pueden actuar tanto a nivel entérico (enfermedades intractables como la diarrea, la disentería, la



colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico) como a nivel sistémico (enfermedades extraintestinales como las infecciones urinarias, las septicemias, las meningitis, la peritonitis y las infecciones pulmonares) y revisten gran importancia, no sólo por las enfermedades que causan en seres humanos y animales, sino también por las grandes pérdidas económicas que ocasionan.

### 1.2.1) PATOTIPOS DE *E. coli* Y FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes factores de virulencia que no son necesarios para la replicación vegetativa, pero que le permiten colonizar superficies específicas del huésped, evadir la respuesta inmune y causar daño en células y tejidos, lo que resulta en el establecimiento de la enfermedad (Chakraborty y cols., 2001; Blanco y cols., 2002; Johnson, 2002; Younis y cols., 2009; Croxen y Finaly, 2010). Esos factores incluyen antígenos de colonización o adhesión (fimbrias F4 [K88], F5 [K99], F6 [P987], F17, F18, F41 y la intimina [*eae*] y enterotoxinas (toxina termolábil [LT], toxina termoestable [STa y STb] y verotoxina [VT]). La expresión de los factores de virulencia depende de factores ambientales (como el estrés de competición con otros microorganismos en la comunidad) y de factores del huésped (como el sistema inmune y los receptores para adhesinas y enterotoxinas). Dicha expresión le confiere a la bacteria una creciente capacidad de adaptación a nuevos nichos y le permite causar un largo espectro de enfermedades (Kaper y cols., 2004). Las cepas patógenas están frecuentemente divididas en patotipos, de acuerdo con el tipo de enfermedad que causan y con los factores de virulencia que poseen (Sousa, 2006). Se han descrito un gran número de patotipos de *E. coli* y existe una interrelación compleja entre ellos (figura 1).

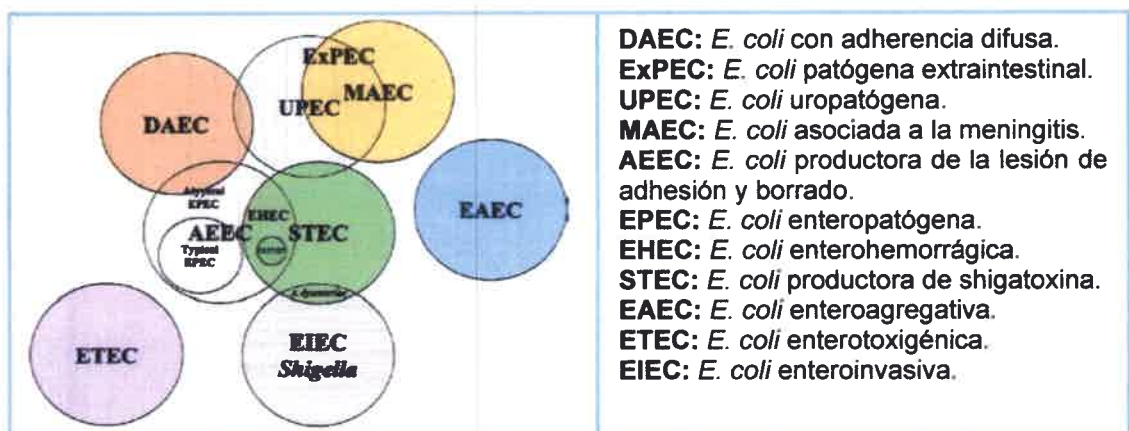


Figura 1: Interrelaciones complejas entre los diferentes patotipos de *E. coli* que causan enfermedad (Donnenberg, 2002).





Las enfermedades diarreicas en los animales de granja y en el hombre se deben, frecuentemente, a la infección causada por uno o más patotipos intestinales de *E. coli*: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica/ productora de verotoxina/ productora de shigatoxina (ECEH/ECVT/ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* con adherencia difusa (ECAD) (Mainil, 2012). Estos seis patotipos intestinales tienen características únicas en sus interacciones con las células eucarióticas diana (figura 2).

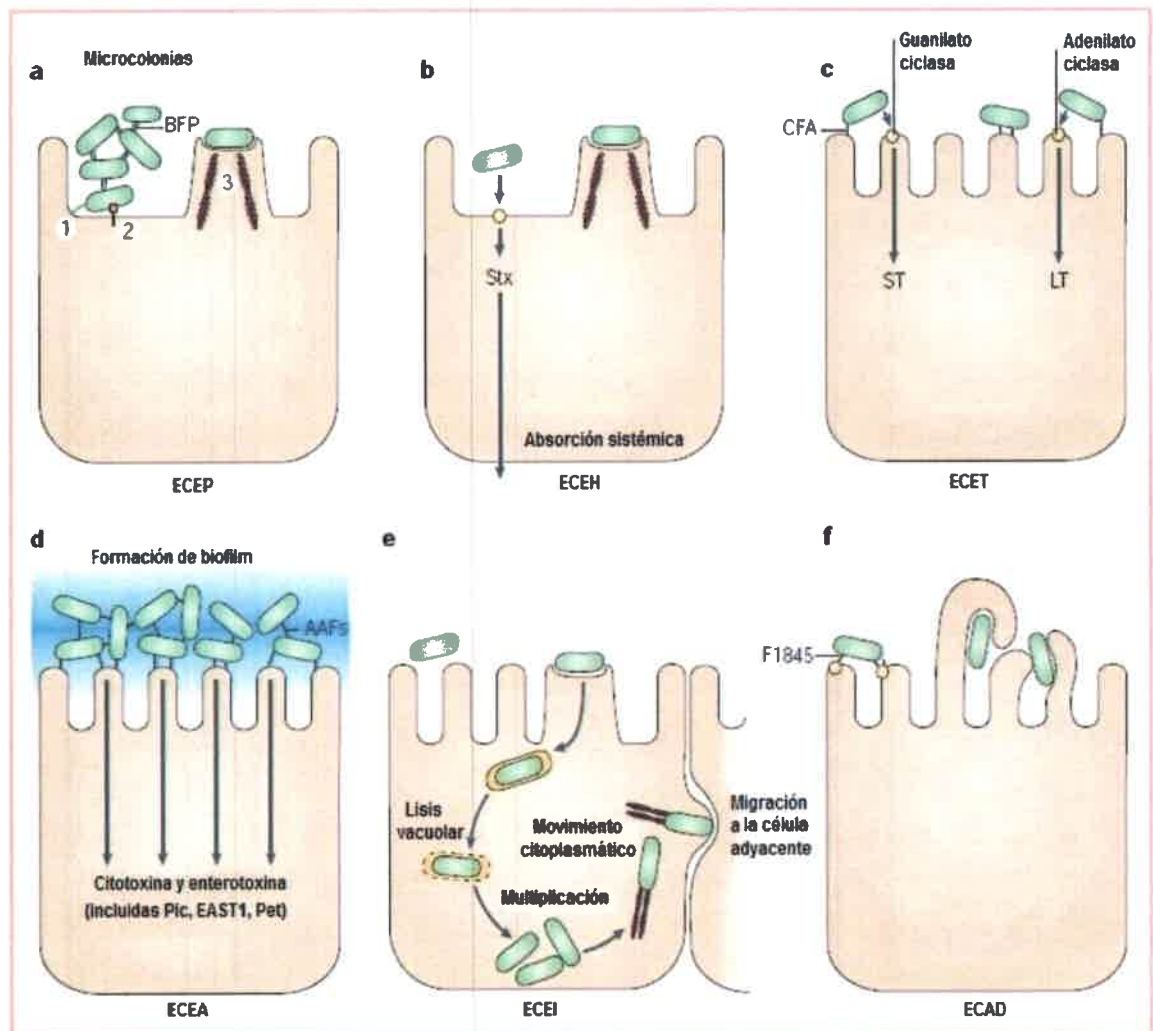


Figura 2: Mecanismos de patogenicidad de los diferentes patotipos intestinales de *E. coli*. ECEP: *E. coli* enteropatógena. BFP: pili formador de haces. ECEH: *E. coli* enterohemorrágica. Stx: toxina Shiga. ECET: *E. coli* enterotoxigénica. ST: toxina termoestable. LT: toxina termolábil. ECEA: *E. coli* enteroagregativa. AAF: fimbria de adhesión agregativa. Pic: proteína involucrada en la colonización intestinal. EAST1: toxina termoestable enteroagregante 1. Pet: toxina codificada en plásmido. ECEI: *E. coli* enteroinvasiva. ECAD: *E. coli* con adherencia difusa. F1845: fimbria 1845 (Kaper y cols., 2004).



La infección por ECET es el tipo de colibacilosis más común que se presenta en animales jóvenes (principalmente terneros y lechones) (Nagy y Fekete, 2005; Younis y cols., 2009; Moxley y Smith, 2010). ECET tiene la mayor tasa de mortalidad generando un impacto económico más alto (Navarre 2000, Constable 2002). La enfermedad requiere una colonización previa y la elaboración posterior de una o más enterotoxinas, ambos rasgos codificados en plásmidos. Mediante fimbrias y factores de colonización (F4, F5, F6, F17, F18) la ECET se adhiere al epitelio del intestino delgado sin inducir cambios morfológicos significativos. Las adhesinas de ECET se adhieren a receptores específicos en los enterocitos del intestino delgado proximal y están limitadas a un reducido número de especies animales emparentadas. Por ejemplo, F4 (K88) se encuentra en las cepas de lechones; F5 (K99) se encuentra en las cepas de terneros y corderos; CFA I y II se han encontrado en las cepas del hombre. Se ha reportado que el antígeno fimbrial F5 está asociado con la mayoría de las cepas ECET aisladas de casos de diarrea neonatal en terneros (Varshney y cols., 2007). Debido a la alta especificidad de los receptores para las adhesinas, las cepas ECET que están adaptadas para determinadas especies animales no representan una amenaza real para el ser humano y no pueden considerarse como zoonóticas (Qadri y cols., 2005). Luego de colonizar el íleon y la parte baja del yeyuno, la ECET secreta 2 enterotoxinas que alteran la función de los enterocitos incrementando su secreción y reduciendo su absorción. La enterotoxina LT es lábil al calor y es similar en tamaño molecular (86kDa), secuencia, antigenicidad y función a la toxina colérica (del *Vibrio cholerae*). La enterotoxina ST es estable al calor y debido a su bajo peso molecular (4kDa) no se inactiva por el calor y resiste a la ebullición durante 30 minutos. Existen variantes de ST, de las cuales STa se encuentran en cepas aisladas de humanos y animales, mientras que STb predomina mayormente en cepas porcinas, especie animal que sufre la enfermedad de los edemas por los efectos de esta toxina. Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de AMPc y GMPc respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y de iones (Navarre, 2000). El cuadro clínico se caracteriza por diarrea hipersecretora aguda, acuosa, heces amarillentas o blancas, generalmente sin sangre, sin moco, con fiebre y vómito en algunos casos. La diarrea producida puede presentarse como leve, breve y autolimitada, o también puede causar cuadros graves con deshidratación severa, shock y muerte (Rodríguez, 2002). En la figura 3 se observa un esquema que resume la patogenia de ECET en bovinos.

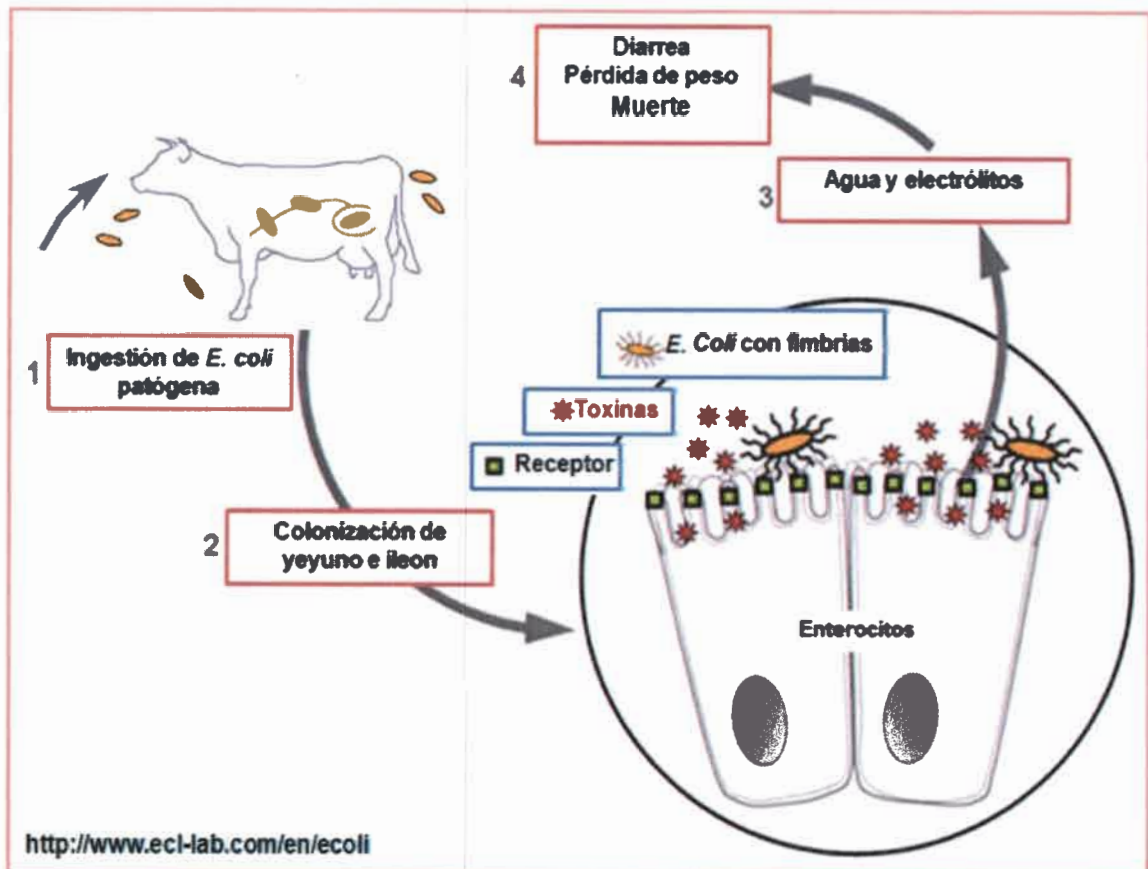


Figura 3: Las bacterias patógenas que contaminan el medio ambiente ingresan al animal susceptible por ingestión y llegan hasta el tracto gastrointestinal. Estas bacterias poseen antígenos fimbriales de colonización que median la adhesión a receptores específicos de los enterocitos. La multiplicación y colonización bacteriana se dan principalmente en la mucosa yeyunal e ileal. Se producen enterotoxinas que estimulan la salida de agua y electrolitos hacia el lumen intestinal, lo que lleva a la deshidratación y posible muerte del animal y a una disminución de la ganancia de peso en los animales supervivientes.

Un segundo tipo de *E. coli* implicada en la diarrea neonatal bovina es ECEP, capaz de interactuar con las células del huésped de una manera compleja y coordinada y producir lesiones histopatológicas de adherencia y borrado de las vellosidades intestinales (A/E: attaching and effacing) (Paiva de Sousa, 2006). El proceso de adherencia íntimo entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal es seguido por la destrucción de las microvellosidades y polimerización de la actina, lo que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria y la formación de una lesión típica en forma de copa o pedestal (Rodríguez, 2002). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias llamados BFP (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido por el gen *bfpA* y por la síntesis de una proteína de membrana externa llamada intimina, codificada en el gen cromosomal *eae* y que sirve como señal en la lesión A/E. Las cepas ECEP se





consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la intimina y *bfpA*; se dice que son atípicas cuando sólo presentan el gen *eae* para intimina, pero no el *bfpA*. El cuadro clínico que produce ECEP se manifiesta con diarrea aguda, leve o grave que puede ir acompañada con sangre, vómitos, fiebre baja y mala absorción. Muchas cepas atípicas de ECEP han sido aisladas de diferentes especies animales, principalmente de rumiantes, incluyendo el ganado vacuno, ovino y caprino (Trabulsi y cols., 2002; Orden y cols., 2003; Blanco y cols., 2005; Cortés y cols., 2005).

ECET al igual que ECEP son consideradas importantes agentes primarios, siendo la causa más común de diarrea bacteriana en terneros recién nacidos y menores de 10 días. La alta circulación de este tipo de cepas afecta la capacidad y eficiencia productiva de los terneros en sistemas de crianza artificial. Los animales infectados son importantes reservorios del patógeno y sus heces son la mayor fuente de contaminación medioambiental con la bacteria.

Algunas cepas que han sido aisladas de bovinos tienen la capacidad de infectar al ser humano, tal como es el caso de cepas **ECEH/ECVT/ECST**. Si bien se encuentran en el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de especies animales, el bovino es el principal reservorio. Se transmiten al hombre a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados y a través del contacto directo con dichos animales o con su medio ambiente (Caprioli y cols., 2005; Rangel y cols., 2005). Son consideradas cepas zoonóticas y pueden ejercer un gran impacto sobre la salud pública (Mercado, 2006; 2007). Estas cepas son reconocidas como la causa primaria de la colitis hemorrágica o diarrea con sangre, que puede progresar al síndrome urémico hemolítico fatal. Se caracterizan por la producción de verotoxina (VT) o toxinas Shiga (Stx1 y Stx2). Existen muchos serotipos de *E. coli* productores de Stx, pero sólo aquellos que han sido clínicamente asociados con la colitis hemorrágica se designan como EHEC. De éstos, O157: H7 es el serotipo más implicado en la enfermedad a nivel mundial (Paiva de Sousa, 2006). Las bacterias no invaden células de la mucosa, pero producen una toxina que juega un papel importante en la respuesta inflamatoria intensa producida y puede explicar la capacidad de las cepas de causar el síndrome urémico hemolítico. La síntesis de la toxina está relacionada con la presencia del bacteriófago STX que está insertado en el genoma y su producción se ve incrementada por la deficiencia de hierro. Las cepas de ECEH poseen, además, otro mecanismo de patogenicidad conocido como adherencia y borrado de las vellosidades intestinales (A/E: attaching and effacing), para el cual presentan el gen cromosomal *eae* cuya expresión es regulada por plásmidos. Un último factor de patogenicidad es el plásmido pO157 que



codifica para la enterohemolisina. Actualmente existen al menos dos clasificaciones de ECEH (Rodríguez, 2002). Una es en función de la presencia de sus factores de patogenicidad: son cepas típicas cuando tienen el fago STX, el plásmido pO157 y presentan el fenómeno de A/E. Son cepas atípicas cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido pO157. La otra clasificación es en función del serotipo: pudiendo ser cepas *E. coli* O157:H7 o cepas *E. coli* no-O157:H7, diferenciadas por pruebas bioquímicas y serológicas y por el cuadro clínico que ocasionan.

La ECEI se parece mucho a *Shigella dysenteriae* por sus mecanismos patogénicos y por el tipo de enfermedad clínica que produce. ECEI se adhiere a las células epiteliales (principalmente las del colon), ingresa por endocitosis y se multiplica, causando dentro del enterocito una destrucción celular generalizada con diseminación a las células sanas adyacentes. El cuadro clínico incluye disentería (diarrea acuosa grave con mucus y sangre) y fiebre (Paiva de Sousa, 2006). Este tipo de cepas carecen de adhesinas fimbriales y la adhesión estaría mediada por una proteína de membrana externa. Los genes necesarios para la invasión celular se encuentran codificados en un plásmido de alto peso molecular (140 MDa) llamado Pnlv (Rodríguez, 2002). No se conocen reservorios animales de ECEI, siendo los seres humanos infectados la principal fuente de contaminación.

La característica distintiva de las cepas de ECEA es su capacidad para adherirse a las células de cultivo de tejidos en una forma de agregación entre las mismas bacterias. Producen una hemolisina que está relacionada con las hemolisinas de las cepas de *E. coli* productoras de infección urinaria. La adherencia y la hemaglutinación de estas cepas se deben a la presencia de una adhesina flexible llamada fimbria de adherencia agregativa (AAF), codificada en un plásmido de 60 MDa. Este plásmido también codifica para una enterotoxina llamada toxina termoestable enteroagregante (EAST) (Paiva de Sousa, 2006). Otros factores de virulencia son una proteína de alto peso molecular llamada Pet (plasmid-encoded toxin), la cual es codificada en un plásmido de 65MDa y produce efecto citopático en cultivos celulares y una proteína de alto peso molecular llamada Pic (protein involved in intestinal colonization), la cual es codificada en el genoma y tiene actividad de proteasa. ECEA tiene la capacidad de incrementar la producción y secreción del mucus intestinal, reteniendo más bacterias que se autoaglutinan en una fina película sobre el epitelio intestinal. El cuadro clínico se caracteriza por una diarrea líquida con mucus, que suele ser crónica, con calambres abdominales pero cursa sin fiebre (Rodríguez, 2002).



La ECAD se define por la presencia de un patrón de adherencia difuso en cultivo de células. La mayoría de las cepas expresan una fimbria llamada F1845 que puede ser codificada por el cromosoma o por un plásmido. Se demostró que ECAD podría inducir proyecciones alargadas características de la superficie de las células epiteliales en cultivo (Paiva de Sousa, 2006). El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100KDa, pero que sólo se ha encontrado en una minoría de las cepas aisladas. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez, 2002).

El conocimiento de la prevalencia de los distintos patotipos de *E. coli* y sus factores de virulencia son datos de suma importancia pues podrían orientar hacia el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento.

### 1.3) TRATAMIENTO DE LA DIARREA NEONATAL BOVINA

Los productores de bovinos, especialmente aquellos dedicados al tambo, se enfrentan a retos únicos para lograr la crianza exitosa de los terneros, sobrellevando los problemas que acarrea el destete precoz de dichos animales. La comprensión de estos problemas debe llevar a considerar el conocimiento básico de los factores de riesgo asociados con la diarrea, para poder aplicar de forma adecuada prácticas de manejo eficaces para mejorar la salud y el crecimiento del ternero. Es importante identificar la causa de la diarrea ya que, según los resultados, se podrá decidir sobre los tratamientos a establecer y plantear futuras estrategias de vacunación con los inmunógenos adecuados. La compleja fisiopatología de la diarrea neonatal causa alteraciones en el medio interno del ternero que conducen a hipoglucemia, deshidratación severa con acidosis metabólica y finalmente al shock hipovolémico. La comprensión de los mecanismos fisiopatológicos causantes de la diarrea es de suma importancia para instaurar un tratamiento apropiado (Odeón, 2001).

Aunque existen varias alternativas para tratar las diarreas, algunas muy eficaces y otras de cuestionable valor, lo primordial para reducir la mortalidad por diarrea es prevenirla (Bilbao y cols., 2007). El primer paso para establecer un correcto programa de prevención y control de las diarreas en los terneros, es identificar los factores de riesgo. Las tasas de incidencia y de mortalidad dependerán del grado de exposición de los animales a los agentes infecciosos y del nivel de resistencia individual de cada ternero. Como medidas importantes, se debería reducir el grado de exposición de los terneros neonatos a los agentes infecciosos a través de prácticas de higiene y manejo, permitiendo que los animales permanezcan en un ambiente con reducida





contaminación; proporcionar resistencia no específica a través de un adecuado consumo de calostro; y aumentar la resistencia específica de los neonatos mediante la vacunación de todas las hembras gestantes del rodeo (Odeón, 2001). Los terneros que presenten diarrea deben ser separados del rodeo y trasladados junto con sus madres a otro potrero para el tratamiento y convalecencia, ya que eliminan una gran cantidad de microorganismos patógenos al medio ambiente, resultando de ese modo una importante fuente potencial de infección para los otros terneros. Esta práctica es de fundamental importancia para evitar la difusión de la enfermedad (Campero, 1998). El camino lógico para lograr la prevención de las diarreas, es intentar optimizar la capacidad de defensa del animal, especialmente en aquellas situaciones de inmunodepresión o inmunosupresión causadas por diversos factores de estrés que muchas veces ocurren como consecuencia de acciones de manejo (destetes precoces, transporte de animales, cambio de densidad poblacional, restricciones nutritivas), debido a cambios ambientales (temperaturas, ventilaciones, humedades relativas), o por alteraciones debidas a agentes infecciosos (Santomá, 1998). Cabe destacar que en muchos casos de diarrea neonatal de los terneros, los resultados obtenidos con la vacunación fueron variables. Entre las posibles causas de la "falla de vacunación" se podrían mencionar varias: la vacuna no fue administrada correctamente y por lo tanto no generó una adecuada inmunidad (debido a que la dosis del antígeno vacunal fue insuficiente o bien fue administrada fuera del período de parto o sea entre 60 y 15 días previos al inicio de la parición); el ternero no tuvo acceso al calostro a tiempo y no pudo mamar lo suficiente como para quedar protegido; la vaca no produjo calostro en cantidad adecuada; el agente causante de la diarrea no fue incluido en la formulación de la vacuna administrada; o bien el nivel de desafío que sufrió el ternero fue tan alto que superó la protección pasiva transferida por el calostro (Margueritte y cols., 2007).

La fluidoterapia es la terapéutica esencial en toda diarrea, debido a que la mayoría de las muertes de terneros con diarrea severa no ocurren como resultado directo de la multiplicación de los agentes infecciosos, sino por la deshidratación y el desequilibrio de electrolitos (Bilbao y cols., 2012). La fluidoterapia consiste en la reposición de fluidos, electrolitos y nutrientes, para restablecer las pérdidas de los mismos, mantener un equilibrio ácido base y un balance calórico positivo. Si la diarrea es severa y hay excesivas pérdidas de fluidos, asociada con desbalances electrolíticos profundos, el animal requiere una terapia hidroelectrolítica con urgencia. Las pérdidas de fluidos y electrolitos ocasionadas por las diarreas secretorias (causadas por enterotoxinas



bacterianas) generalmente son masivas (Odeón, 2001). En general, se sostiene que los terneros diarreicos pierden, parcial o totalmente, la habilidad para digerir la leche. La leche indigerida pasa al intestino generando un aumento de la presión osmótica en el lumen intestinal y estimulando el crecimiento bacteriano y la fermentación bacteriana de la lactosa. En estas circunstancias, la movilización de agua hacia el intestino para restablecer el equilibrio osmótico, agrava el cuadro de la diarrea, por lo tanto es una buena medida sustituir parcialmente la leche con una solución oral hidratante. El tratamiento de los terneros afectados con soluciones electrolíticas orales suele ser satisfactorio si el grado de deshidratación es moderado. Cuando las pérdidas de líquidos superan el 8% del peso corporal, el tratamiento por vía oral resulta insuficiente, por lo que éste debería acompañarse con un tratamiento parenteral. La vía de administración elegida (intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral) y la velocidad de aplicación dependerán del grado de deshidratación y de la urgencia para instaurar el tratamiento (Alonso Díez y Rejas López, 2008). La fluidoterapia en rumiantes se considera en muchas ocasiones muy difícil, ya que se necesita un gran volumen de líquido y mucho tiempo para su administración y monitorización. Por esta razón, la fluidoterapia se aplica en pocas ocasiones en ganado vacuno.

Las complicaciones bacterianas que pueden acompañar a los cuadros diarreicos justifican, en algunos casos, el empleo de antimicrobianos y es importante la elección del antibiótico, según tenga o no absorción intestinal (Odeón, 2001). Puede ocurrir que la causa de la diarrea no sea inicialmente bacteriana pero luego las heces diarreicas favorezcan el crecimiento de un gran número de bacterias patógenas. Entonces la aplicación de antibióticos administrados por vía parenteral, una vez restablecida la volemia, será necesaria para que el animal se recupere (Alonso Díez y Rejas López, 2008). Por otro lado, la permanente presencia de enterobacterias patógenas en los sistemas de producción animal intensivos ha provocado que, generalmente, se utilicen antibiótico-terapias preventivas a lo largo del período de crianza, dificultando la comercialización del producto cárnico debido a su alta concentración de residuos lo que, además, genera una alta presión selectiva que beneficia a las bacterias que son resistentes a los antibióticos. Asimismo, como se ha incrementado vertiginosamente la práctica de adicionar en forma constante dosis subterapéuticas de antibióticos en la ración de los animales para mejorar la eficiencia de la producción, disminuir las pérdidas por enfermedades y evitar las zoonosis, también se ha incrementado en forma paralela el aumento de las bacterias resistentes (Pugh, 2002; Wegener, 2003; Berge y cols., 2005; Venglovsky y cols., 2009). El uso rutinario de antibióticos





administrados a los animales de producción pecuaria constituye un grave problema de salud pública, especialmente cuando se administran a los animales los mismos grupos de antimicrobianos que se utilizan para el tratamiento de los seres humanos. La prohibición o la reducción del uso de algunos antibióticos ha proporcionado a los investigadores una oportunidad única para investigar otras alternativas para la prevención y el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Wegener, 2003).

#### 1.4) USO DE LA INMUNOGLOBULINA Y (IgY) EN MEDICINA VETERINARIA

Actualmente para la prevención de las diarreas infecciosas en terneros destetados, criados artificialmente en guacheras, se busca desplazar o cambiar el uso rutinario de los antibióticos por la administración de otras sustancias alternativas, tales como los anticuerpos aviares (IgY) específicos, obtenidos de la yema de huevo de gallinas inmunizadas contra el o los microorganismos patógenos causantes de la diarrea (Bilbao y cols., 2006). La administración oral de IgY permitiría por un lado mejorar la eficiencia de la producción y, por el otro, al no ser administrados los antibióticos, se podría disminuir el nivel de residuos en la carne y leche y se evitaría la selección de cepas resistentes que pudiesen afectar a la salud humana. Los tratamientos que proporcionan los anticuerpos específicamente dirigidos contra los principales agentes infecciosos causantes de diarrea, disminuyen la mortalidad y morbilidad bovina, mejorando las metas de las producciones animales y permiten lograr un mejor producto final, como por ejemplo carnes libres de agentes patógenos que en algunos casos podrían afectar gravemente al ser humano que consume estos alimentos cárnicos procesados (tal es el caso del Síndrome Urémico Hemolítico y las hamburguesas) (Chase-Topping y cols., 2007). Los mecanismos de acción de las IgY en el tracto entérico de los mamíferos continúa en estudio, pero es muy probable que sólo actúen en forma local impidiendo la adhesión de los agentes patógenos a la pared intestinal.

Existen varios ejemplos en el mundo en donde se ha logrado la elaboración de productos industriales basados en la administración oral de la IgY, la mayor parte de ellos relacionados con la prevención y tratamiento de enfermedades víricas y bacterianas de los animales (particularmente se han desarrollado productos contra las diarreas de los terneros y lechones) y algunas enfermedades humanas (como diarreas, caries dentales y úlceras gástricas, entre muchas otras) (Jin y cols., 1998; Amaral y cols., 2002; Schade y cols., 2007). Se ha demostrado que la IgY específica administrada por vía oral es efectiva, segura y posee una actividad inmuno-protectora



local contra determinados agentes patógenos con actividades biológicas similares a la de los anticuerpos colostrales que la madre proporciona a su descendencia. Con el uso de IgY administrada pasivamente se ha obtenido una protección efectiva contra *Salmonella entérica* serovar Enteritidis y serovar Typhimurium, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, Rotavirus murinos y bovinos y Coronavirus bovino, entre otros (Chalghoumi y cols., 2009). Inclusive la administración oral de yema de huevos, procedente de gallinas no inmunizadas reduce la colonización de microorganismos patógenos del tracto gastrointestinal, indicando que la yema de huevo *per se* contiene factores anti-infecciosos adicionales además de los anticuerpos específicos. Entre los factores antibacterianos inespecíficos que están presentes en la yema de huevo se ha identificado un factor antimicrobiano derivado de lipoproteínas de la yema de huevo (LDAMF) y los sialoligosacáridos derivados del plasma del huevo (EPDS). Los LDAMF inhiben *in vitro* el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, mientras que los EPDS previenen las infecciones por *Salmonella entérica* serovar Enteritidis (Sugita-Konishi y cols., 2002; Gürtler y cols., 2004). La utilización de aves para la obtención de IgY específica ha aumentado considerablemente, tanto para pruebas diagnósticas como para su uso terapéutico (Schade y Hlinak, 1991; Schade y cols., 1991; Ikemori y cols., 1992; Larsson y cols., 1993; Montes Perez y cols., 1994; Schade y cols., 1996; Yokoyama y cols., 1998; Schade y cols., 2001; Vivas, 2002; Schade y cols., 2003; Narat, 2003; Terzolo y cols., 2003; Grosso y cols., 2004; Zhang y cols., 2004a; Schade y cols., 2005). En numerosos trabajos científicos se ha demostrado la aplicabilidad de la tecnología IgY, tanto en escala experimental como industrial (Vivas y cols., 2003; Henning-Pauka y cols., 2003; Kitaguchi y cols., 2008; Grosso y cols., 2008).

Debido a la distancia filogenética que existe entre aves y mamíferos, los anticuerpos (Ac) aviarios presentan múltiples ventajas sobre los Ac mamíferos (Gassmann y cols., 1990; Larsson y cols., 1993; Larsson y cols., 1998; Tini y cols., 2002; Narat, 2003; Pauly y cols., 2008). Al utilizar Ac aviarios en reemplazo de Ac mamíferos se evita el maltrato de los animales dado que se reemplaza el sangrado por la recolección de huevos (Schade y cols., 2001; Narat, 2003). Además, es posible la producción de IgY en gran escala con costos relativamente bajos (pues de cada yema se obtienen aproximadamente 100-250 mg de IgY purificada lo que permite su aplicación a escala industrial (Warr y cols., 1995; Mine y Kovacs-Nolan, 2002). Además, las gallinas pueden ser utilizadas como una fuente continua de producción de Ac durante todo su período de postura mientras que los niveles de Ac se pueden mantener constantemente altos mediante la aplicación de dosis de refuerzo periódicas. En la



gallina, la cantidad de Ac específicos contra un determinado antígeno constituye cerca del 10% de las inmunoglobulinas totales, con algunas variaciones dependiendo del animal, del procedimiento de inmunización y de la propia inmunogenicidad del antígeno utilizado. Cuando los antígenos bacterianos son reconocidos como extraños por las gallinas, se produce una buena respuesta inmunológica de anticuerpos (Chacana y cols., 2003). De esta manera, el huevo se presenta como un alimento funcional que presenta propiedades nutritivas y farmacológicas, proporcionando un valor económico agregado (Huopalahti y cols., 2007).

Por otro lado, la producción nacional de bovinos se encuentra en pleno desarrollo, particularmente con la crianza intensiva de terneros de tambo en guacheras, en donde la diarrea constituye una seria limitación para su expansión. La adopción de esta tecnología para prevenir las diarreas neonatales de los animales, es sólo una etapa inicial de futuros proyectos que podrían involucrar otras múltiples aplicaciones de la IgY para el agro en general, incluyendo también nuevas técnicas de diagnóstico y usos prácticos para la medicina, tanto veterinaria como humana (Schade y cols., 2007). La aplicación de la biotecnología IgY permitirá mejorar distintos aspectos de los sistemas productivos intensivos, disminuyendo la incidencia de enfermedades bacterianas, víricas o parasitarias en las etapas críticas del sistema de la producción.

### 1.5) PROPIEDADES DE LA IgY

La IgY es el anticuerpo que se halla en mayor proporción en la yema de huevos de gallinas. Está molecularmente constituida por dos cadenas livianas (L) y dos pesadas (H). Posee una region variable (V) y cuatro regiones constantes (C) (figura 4). El peso molecular es de 167.250 Da (~160 KDa) (Sun y cols., 2001).

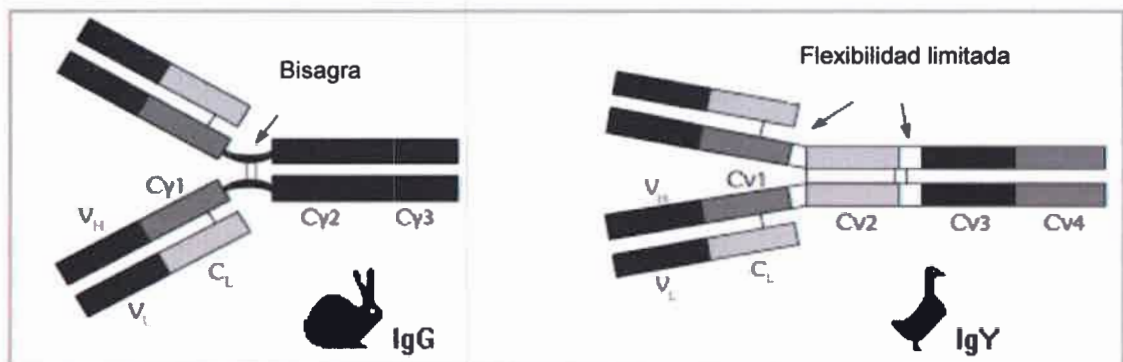


Figura 4: Comparación entre la estructura de la IgG de mamíferos y la IgY de aves. VH: dominio variable de la cadena pesada. VL: dominio variable de la cadena liviana. CL: dominio constante de la cadena liviana. C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3: dominios constantes de la cadena pesada de IgG. C $\nu$ 1, C $\nu$ 2, C $\nu$ 3 y C $\nu$ 4: dominios constantes de la cadena pesada de la IgY (Narat, 2003).





La región Fc de la IgY es la mediadora de la mayoría de los efectos biológicos similares a la Inmunoglobulina G (IgG) de mamíferos, pero también puede mediar reacciones anafilácticas, función que es análoga a la de la Inmunoglobulina E en los mamíferos (Carlander, 2002; Dias Da Silva y Tambourgui, 2010). El transporte de la IgY desde la sangre de la gallina hasta el óvulo es un proceso activo, mediado por receptores, que ocurre en dos pasos: 1º) Según Rose y cols., (1974) y Losch y cols., (1986) la IgY es transportada al ovario desde la circulación sanguínea, de manera similar a la transferencia transplacentaria en los mamíferos; 2º) luego es transferida desde el saco de la yema al embrión y cuando el pollito eclosiona constituye el vitelo que es un saco conteniendo la yema del huevo remanente que está unida al intestino medio por un pedúnculo; una vez que la yema se reabsorbe, el saco residual se denomina divertículo de Meckel. De este modo la IgY, junto con el alimento proporcionado por la yema, son directamente volcados en la mitad del íleon (intestino medio) del pollito. En las aves, la transferencia pasiva de la IgY es mucho más directa que la transferencia pasiva de IgG a través del calostro en los mamíferos, pues la IgY es directamente vertida dentro del intestino, evitando así la acción deletérea de la acidez del estómago glandular. Por otro lado, tanto la Inmunoglobulina A (IgA) como la Inmunoglobulina M (IgM) son transferidas desde las células plasmáticas del oviducto hacia la clara del huevo (figura 5).

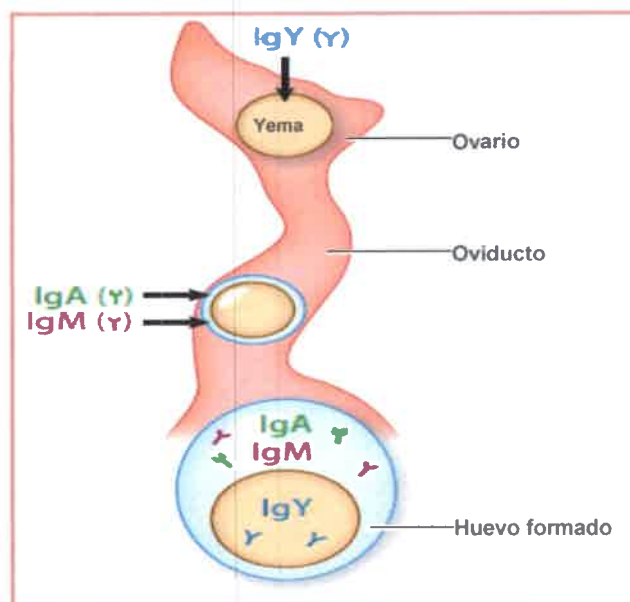


Figura 5: Transferencia de la IgY, durante la formación del huevo, desde la sangre materna a la yema a través de receptores específicos para la translocación de IgY. La IgA y la IgM son posteriormente depositadas dentro de la clara en el oviducto (Kovacs-Nolan y Mine, 2012).



En general, se considera que la IgY es la inmunoglobulina predominante en la yema mientras que la IgA e IgM prevalecen en la clara del huevo (Tizard, 1992). Durante la maduración de los oocitos, la concentración de IgY en la yema es constante (10-20 mg/mL), pudiendo hallarse en el huevo una concentración total de IgY/yema que varía entre 100-250 mg. Sin embargo, Yamamoto y cols., (1975) también pudieron demostrar la existencia de considerables cantidades de IgM e IgA en la yema, así como también IgY en la clara de los huevos. Probablemente, la demostración de diferentes clases de inmunoglobulinas en los distintos compartimentos del huevo es un problema de concentración y de los métodos de cuantificación empleados. De acuerdo con información reciente, la IgY se transfiere exclusivamente a la yema por un proceso activo mediado por receptores y la cantidad de IgY transferida se relaciona con su concentración en el suero sanguíneo de las gallinas (Morrison y cols., 2001).

La IgY no activa moléculas del Sistema de Complemento de mamífero; posee alta afinidad; no presenta reacción cruzada con proteínas y receptores para la porción Fc de los anticuerpos mamíferos; no se une al Factor Reumatoideo ni activa la producción de citoquinas; no interactúa con la proteína G estreptocócica ni con la proteína A estafilocócica (Dias da Silva y Tambourgi, 2010). De esta manera se eliminan los resultados falsos positivos en los inmunoensayos (Gassmann y cols., 1990; Larsson y cols., 1993; Larsson y cols., 1998; Tini y cols., 2002; Narat, 2003; Pauly y cols., 2008).

Un punto importante para tener en cuenta en los productos basados en la IgY son las características tecnológicas, tales como la resistencia a la temperatura, la presión y la humedad, la presencia de minerales y la resistencia a la digestión gástrica (Margueritte y cols., 2007). La IgY es una proteína y como tal es sensible a la desnaturalización, es bastante estable a las altas temperaturas (se destruye sólo luego de 15 minutos a 70°C) y su actividad no se ve afectada por la pasteurización a 60°C por 3,5 minutos (Carlander, 2002). El punto isoeléctrico de la IgY varía entre 5,7 y 7,6 siendo menor que el de la IgG (Polson y cols., 1980). Como el fragmento Fc de la IgY es mayor que el de la IgG, la molécula de IgY es más hidrofóbica (Davalos y cols., 2000). Se encontró que la IgY es resistente a un rango de pH entre 4 y 8, es altamente estable frente a la digestión con tripsina y quimiotripsina, así como también existen subpoblaciones de la IgY que son resistentes a la papaína (Carlander, 2002). Sin embargo, la actividad de la IgY disminuye a un  $\text{pH} \leq 3,5$  y se pierde casi completamente con cambios irreversibles a un  $\text{pH} = 3$  (Shimizu y cols., 1993a, Hatta y cols., 1993; Lee y cols., 2002). La administración oral de IgY está condicionada a la degradación ácida



en el estómago y a la degradación proteolítica de proteasas tales como la pepsina (Shimizu y cols., 1988).

La secreción de ácido clorhídrico en el abomaso del ternero recién nacido es baja y se incrementa rápidamente a medida que avanza la edad del animal. El pH del abomaso vacío se encuentra entre 2-2,8 y aumenta rápidamente hasta alcanzar valores de 4,5-6,0 unos 30 minutos posteriores a la ingestión de leche (Garzón Quintero, 2007). La variación en los rangos de pH depende de la composición de la dieta líquida ingerida por el ternero (Vajda y cols., 2007). Se ha visto que luego de la ingestión de 2 litros de leche o de sustituto lácteo, el pH luminal abomasal permanece constante durante 2 horas, disminuyendo gradualmente a los valores preprandiales entre las 7-9 horas (Ahmed y cols., 2002; Constable y cols., 2005). Debido a esto, para poder utilizar la IgY como inmunoterapia pasiva, es necesario hallar un método efectivo para preservar el valor terapéutico y la función biológica de este anticuerpo durante el pasaje gástrico.

#### 1.6) NANOTECNOLOGÍA Y NANOTUBOS

Las investigaciones más modernas utilizan las aplicaciones farmacológicas de la nanotecnología (captura, transporte dirigido y liberación controlada) para mejorar la eficiencia en la administración de algunas drogas (Gaoa y Xua, 2009). La nanotecnología es un campo interdisciplinario muy amplio de investigación que involucra partículas de menos de 100 nanómetros (nm) de diámetro ( $10^{-9}$  m). Las nanoestructuras son pequeñas partículas con propiedades físicas, químicas y biológicas que dependen del material con el que se construyen (Pettinari, 2003; Li y cols., 2009). Pueden adoptar diferentes formas: tubular (nanotubos), esféricas, lineales irregulares y muchas otras; además, todas ellas pueden coexistir como formaciones de agregados. La utilización de nanoestructuras favorece la farmacocinética de las drogas puesto que se pueden sensibilizar con antirreceptores específicos de células diana, incrementando el efecto terapéutico de las mismas y minimizando los efectos colaterales (Kovacs-Nolan y Mine, 2005; Alonso, 2006; Soberanis, 2006; Li y cols., 2009). Muchas nanoestructuras son utilizadas en la ingeniería de productos destinados al consumo humano, como por ejemplo aditivos para cosméticos, protectores solares, emulsiones o cremas, entre otros. Son numerosos los sistemas de transporte y liberación dirigida que están disponibles en la actualidad; estos productos se han desarrollado de acuerdo con la molécula bioactiva que se desea liberar (ej. péptidos, proteínas, ácidos nucleicos o moléculas orgánicas pequeñas) y según las características de los tejidos diana. Los liposomas, emulsiones, polímeros catiónicos,





micro y nanopartículas son los vehículos más estudiados (Kostarelos, 2003). Muchos de los problemas encontrados cuando se administra una droga libre (como limitada solubilidad, pobre biodistribución, falta de selectividad, farmacocinética desfavorable, daño en tejidos sanos), pueden ser superados o disminuídos mediante el uso de sistemas de liberación (“delivery systems”) basados en nanoestructuras.

Los nanotubos de carbono (NTC) son nanopartículas que han generado una gran expectativa pues pueden ser utilizadas para una diversidad de aplicaciones. Están compuestos sólo por átomos de carbono, dispuestos en anillos de benceno de modo que se asocian para formar láminas de grafeno, las que se enrollan para formar cilindros (Bianco y cols., 2005). Hay dos tipos de nanotubos de carbono: de pared simple (SWCNTs) y de pared múltiple (MWCNTs), este último está formado por numerosas capas de NTC concéntricas. Los NTC poseen propiedades importantes como gran fuerza de tensión (100 veces más que lo que se ha reportado para el hierro), alta conductividad, alta reactividad, gran área superficial y propiedades eléctricas únicas. Son materiales innovadores que pueden utilizarse en aplicaciones biológicas tanto a nivel celular como molecular (Pantarotto y cols., 2003; Bianco y cols., 2005; Cui, 2007; Wei y cols., 2007; Jain y cols., 2007; Yang y cols., 2007; Liu y cols., 2009). Sin embargo, la principal barrera que debe ser vencida en lo que se refiere a la aplicación biológica de los NTC es su biocompatibilidad y solubilidad en las soluciones acuosas (Pantarotto y cols., 2003 y 2004; Georgakilas y cols., 2002). Estas propiedades pueden ser mejoradas funcionalizando a los NTC, es decir, modificándolos mediante el agregado de diferentes moléculas o grupos funcionales en su superficie. Los NTC funcionalizados pueden dirigirse hacia una población celular determinada para su reconocimiento inmune, servir como translocadores para moléculas terapéuticas en la liberación controlada de drogas, o bien ser utilizados para diferentes efectos terapéuticos sin afectar la actividad funcional de los diferentes tipos de células inmunoregulatorias (Chen y cols., 2006; Dumortier y cols., 2006; Kam y cols., 2006; Kostarelos y cols., 2007; Prato y cols., 2008; Rosen y Elman, 2009; Zhang y cols., 2011). La gran relación superficie/volumen de los NTC permite su funcionalización con una amplia variedad de moléculas. Diferentes biomateriales incluyendo biomoléculas, biopolímeros y bionanoestructuras han sido unidos exitosamente a los NTC para su funcionalización (Katz y Willner, 2004).

El quitosano es un biopolímero de origen natural ampliamente utilizado en la funcionalización de los NTC, en aplicaciones comerciales y biomédicas y en la liberación controlada de antígenos y fármacos (Illum, 1998; Van der Lubben y cols.,



2003; Liu y cols., 2005; Kang y cols., 2006). El quitosano, también llamado chitosán (del griego χιτών "coraza"), es un polisacárido catiónico lineal obtenido de la quitina y está compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). Gracias a su biocompatibilidad y biodegradabilidad ha sido administrado en la mucosa de los seres humanos, sin presentar toxicidad (Porporatto y cols., 2005; Borges y cols., 2006; Canali y cols., 2010; Canali y cols., 2012). Posee abundantes grupos funcionales -NH<sub>2</sub> y -OH que pueden reaccionar con moléculas bioactivas y modificarlas (Wu y cols., 2007). El grupo amino en el quitosano tiene un valor pKa que ronda los 6,5, razón por la cual posee una ligera carga positiva y es soluble en medios ácidos o en soluciones neutras con dependencia de la carga del pH y del grado de desacetilación. Presenta buenas propiedades mucoadhesivas en ambientes ácidos y puede ligarse eficientemente a las superficies cargadas negativamente, como por ejemplo los NTC. Al combinarse las propiedades de los NTC y la versatilidad y biocompatibilidad del quitosano, se obtienen NTC revestidos con quitosano en su superficie, los cuales podrían tener potenciales aplicaciones químicas y biológicas en biosensores (Zhan y cols., 2004b; Luo y cols., 2005; Zhang and Gorski, 2005; Yang y cols., 2011), liberación de drogas y genes (Katz y Willner, 2004; Castillo León y cols., 2011), entre otras.

### 1.7) HIDROGELES pH-SENSIBLES

Los hidrogeles son polímeros tridimensionales en los cuales las cadenas poliméricas están interconectadas por entrecruzadores químicos (Pourjavadi y cols., 2010). Estas redes están compuestas por homopolímeros o copolímeros y son insolubles en todas las soluciones acuosas pero, dependiendo del solvente, pueden absorber y mantener un volumen considerable de líquidos. La mayoría de los hidrogeles comunes son geles polielectrolíticos: su alto grado de hinchamiento en agua es debido a la presión osmótica ejercida por los contra-iones. Dichos geles pueden absorber más de 100 partes de agua por cada parte de polímero seco. Sin embargo, algunos geles neutros (ej. los basados en poliacrilamida o poli-óxido de etileno) poseen alta afinidad por el agua, aunque su grado de hinchamiento es mucho menor que el de los geles cargados (Bajpai y Giri, 2003; Branca y cols., 2006).

Los hidrogeles son ampliamente utilizados como sustancias superabsorbentes, para reducir la humedad de medicamentos, o productos higroscópicos envasados, etc. Para esta aplicación la alta capacidad de retención del agua es la propiedad más



importante. Existe también un gran número de aplicaciones en otras áreas en donde se utilizan los hidrogeles como materiales funcionales: transportadores para la liberación controlada de drogas (Peppas y cols., 2000), cápsulas artificiales (Lee y Mooney, 2001), membranas con permeabilidad regulada (Dole y cols., 2004) y dispositivos sensores (Yew y cols., 2007). Para todos estos propósitos se requiere una alta cooperatividad entre la respuesta al cambio de las condiciones externas y el desarrollo interno de la microestructura del gel.

Otra propiedad importante de los hidrogeles es su respuesta a estímulos externos como la temperatura, el pH o la presencia de solutos y los campos eléctricos y magnéticos que permiten la absorción y la liberación del agua y los solutos (Peppas y cols., 2000; El-Naggar y cols., 2006). Usualmente, estos hidrogeles están preparados por la copolimerización de monómeros ácidos o básicos y un entrecruzador como la N,N'-metilenbis-acrilamida (Omidian y cols., 2005).

#### 1.8) ENCAPSULACIÓN DE LA IgY

Se han desarrollado diversas técnicas de microencapsulación para proteger a la IgY de la inactivación gástrica: liposomas (Shimizu y cols., 1993b), cápsulas de gelatina con cubierta entérica (Akita y Nakai, 2000), microcápsulas de ciclodextrina y goma arábiga (Chang y cols., 2001), emulsiones múltiples (Cho y cols., 2005), copolímeros de ácido acrílico-metacrílico (Kovacs-Nolan y Mine, 2005), microesferas de ácido láctico y glicólico (Torché y cols., 2006) y microcápsulas de quitosano-alginato (Li y cols., 2007; Li y cols., 2009). Sin embargo, la utilización de estas técnicas ha presentado numerosas desventajas entre las cuales se pueden mencionar: destrucción de la actividad del anticuerpo por el proceso de encapsulación, gran tamaño de las microcápsulas, dificultad de la producción a gran escala y disolución completa de la cápsula lo que conlleva a un mayor número de administraciones.

Nuestro grupo de trabajo ha diseñado una estructura para proteger a la IgY del pH gástrico teniendo en cuenta estas consideraciones. La elaboración de esta estructura se realizó con la colaboración de los Dres. César Barbero y Diego Acevedo (Grupo de Materiales Avanzados, Dpto. Química, UNRC). Para lograr protección gástrica, la IgY se incorporó en hidrogeles pH-sensibles que fueron sintetizados con nanotubos de carbono funcionalizados con quitosano.



*Mic. Natalia Picco*

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**



## **2) OBJETIVOS**

### **2.1) OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la capacidad protectora de anticuerpos aviarios policlonales (IgY), administrados en nanoestructuras, para prevenir diarreas neonatales causadas por *Escherichia coli* en terneros.

### **2.2) OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Aislar, identificar y tipificar, mediante PCR convencional, bacterias patógenas entéricas pertenecientes a la especie *Escherichia coli* en terneros de tambo de la Cuenca Lechera de Villa María (Córdoba).
- Obtener, purificar y caracterizar anticuerpos aviarios (IgY) específicos contra las cepas de *Escherichia coli* patógenas prevalentes en las guacheras estudiadas.
- Funcionalizar los nanotubos de carbono con quitosano y caracterizarlos.
- Incorporar la IgY en nanoestructuras pH-sensibles y evaluar su estabilidad *in vitro* en condiciones gástricas simuladas.
- Desarrollar un modelo de infección oral en terneros para demostrar el efecto protector *in vivo* de la IgY encapsulada frente al desafío con cepas patógenas de *Escherichia coli*.
- Evaluar la presencia de procesos inflamatorios en respuesta a la administración oral de estos anticuerpos heterólogos, mediante técnicas histológicas convencionales.

## **3) HIPÓTESIS**

La IgY anti-ECET, administrada por vía oral en nanoestructuras pH-sensibles para su protección durante el pasaje gástrico, actúa como inmunoterapia pasiva previniendo diarreas neonatales de terneros de tambo causadas por *E. coli* enterotoxigénica.



*Mic. Natalia Picco*

## **MATERIALES Y MÉTODOS**





#### **4) MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **4.1) ANIMALES Y RECOLECCIÓN DE DATOS**

Se estudiaron un total de 620 terneros neonatos diarreicos y no diarreicos menores de 45 días de edad, desde febrero hasta octubre de 2008. Estos terneros fueron criados en 45 establecimientos lecheros de producción extensiva en la Cuenca Lechera de Villa María (Córdoba, Argentina) (figura 6). La identificación, edad y sexo de cada animal, sus condiciones sanitarias y de crianza, incluyendo las medidas preventivas y de manejo aplicadas en cada caso, fueron los datos que se recopilaban mediante cuestionarios efectuados al encargado de cada establecimiento (Anexo 1). Se realizó también el examen clínico de cada ternero muestreado para observar los parámetros clínicos relacionados con la diarrea neonatal bovina. Se analizaron diferentes factores de riesgo hipotetizados como incrementadores de la prevalencia de diarrea. Los factores testeados en el análisis univariado derivaron de los datos recogidos en los cuestionarios y fueron seleccionados puesto que representan las prácticas de manejo más comunes recomendadas a los productores para disminuir el riesgo de diarrea.

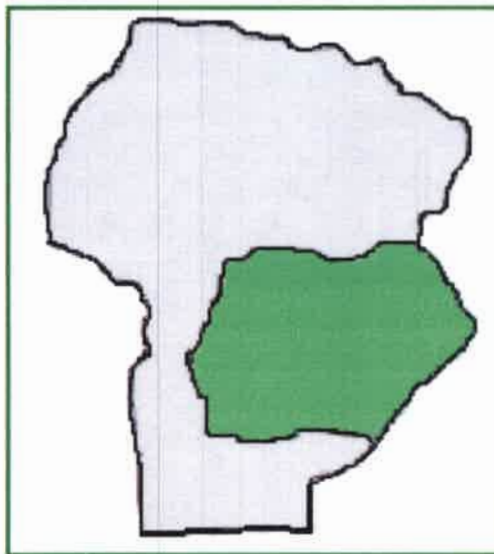


Figura 6: Mapa de la Cuenca Lechera de Villa María, Córdoba (verde). Área territorial de 1.581.000 hectáreas.

##### **4.2) MUESTREO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE E. coli**

Se obtuvieron hisopados rectales de los terneros menores de 45 días que estaban disponibles en cada establecimiento en el momento de la visita. Los hisopos fueron colocados en tubos cónicos con medio de transporte Stuart (Britania®, Argentina)



(Anexo 2), transportados al laboratorio y mantenidos en refrigeración (4 °C) hasta su procesamiento. Luego se sembraron en placas de petri con agar MacConkey (Oxoid, UK.) (Anexo 2), las cuales fueron incubadas a 37 °C, por 24-48 horas. A partir de las colonias lactosa positivas aisladas, se realizó coloración de Gram (Britania®, Argentina) (Anexo 3). Aquellos microorganismos que se observaron como bacilos Gram negativos se tipificaron mediante las pruebas bioquímicas correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae* (fermentación de glucosa, producción de oxidasa, reducción de nitratos), género *Escherichia* (SIM, TSI, citrato, decarboxilación de lisina, urea, fenilalanina) según el Manual de Bergey (Holt y cols., 1994) (Anexo 4). Las colonias compatibles con *E. coli* fueron sembradas en tubos con medio para conservación de cepas (Lazo Pérez y cols., 2009) (Anexo 2) e incubadas a 37 °C, por 24-48 horas. De este modo se obtuvo un cepario con las bacterias de mayor interés para este trabajo.

#### 4.3) EXTRACCIÓN DEL ADN BACTERIANO

Se realizó la extracción del ADN por calentamiento a partir de las cepas de *E. coli* crecidas en placas de petri con agar MacConkey. El protocolo de extracción se basó en la metodología utilizada por Lazo Pérez y cols., (2009) con leves modificaciones. El conjunto de colonias de la zona de confluencia de cada placa de agar fueron suspendidas, en un tubo Eppendorf, con 300 µL de agua bidestilada estéril. Esta suspensión fue calentada a 100 °C por 5 minutos y luego centrifugada a 6.700 x g por 2 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó como ADN templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los templados permanecieron en heladera y durante todo su procesamiento fueron mantenidos en condiciones libres de DNasas y RNasas contaminantes.

#### 4.4) TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *E. coli* POR PCR

Para diferenciar las cepas patógenas de *E. coli* de aquellas comensales (microbiota intestinal normal) se realizó la tipificación molecular por PCR convencional. El protocolo elaborado para la optimización de la técnica de PCR se basó en estudios previos (Lazo Pérez y cols., 2009; Siqueira y cols., 2009). Se seleccionaron al azar cuatro cepas de *E. coli* de cada establecimiento lechero y se determinaron los genes que codifican para factores de virulencia intestinales de *E. coli* (tabla 3).



Tabla 3: Genes amplificados en la reacción de PCR y principales características de la amplificación

Gen de virulencia	Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño Ampliación (pb)	Temperatura hibridación (°C)	Referencias
VT	VTg VT-F VTg VT-R	GAGCGAAATAATTTATATGT CGAAATCCCCTCTGTATTTGCC	322	48	Read y cols., (1992)
LT	LT LT-B LT LT-FN	CCGAATTCTGTTATATATGTC GGCGACAGATTATACCGTGC	696	55	Blanco y cols., (1997)
Stb	STb STb-F STb STb-R	ATCGCATTCTTCTTGCATC GGGCGCCAAAGCATGCTCC	175	55	Blanco y cols., (1997)
Sta	Sta Sta-A Sta Sta-B	ATTTTTATTTCTGTATTGTCTTT GGATTACAACACAGTTCACAGCAGT	176	48	Franck y cols., (1998)
eeae	eeaeA-F eeaeA-R	AGGCTTCGTCACAGTTG CCATCGTCACCAGAGGA	570	55	China y cols., (1996)
F17	F17 F17-F F17 F17-R	GGGCTGACAGAGGAGGTGGGGC CCCGGCGACAACCTCATCACCGG	411	60	Van Bost y cols., (2001)
F5 (K99)	K99 K99-A K99 K99-B	CCAGCGCCCGGCAGTAATGACTGC CCACCATTAGACGGAGCGCGG	278	60	Franck y cols., (1998)
F41	F41 F41-A F41 F41-RN	GGCTATGGAAGACTGGAGAGGG GGGGTGACTGAGGTCATCCC	551	55	Franck y cols., (1998)

La reacción de amplificación fue llevada a cabo con 7  $\mu$ L de ADN templado, 6  $\mu$ L de tampón de reacción pH= 8,5 (5X Green Go Taq® buffer, Promega, cód. M7911) que incluye MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 0,6  $\mu$ L de mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs, 10 mM, Promega, cód. U1240), 0,5  $\mu$ L de cada cebador (300 ng/ $\mu$ L, Ruralex Fago) y 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerasa (5 U/ $\mu$ L, Promega, cód. M3005). Se llevó a un volumen final de 30  $\mu$ L con agua bidestilada estéril. Las condiciones de ciclado de la PCR consistieron en: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, temperatura de hibridación de 48-60 °C por 1 minuto dependiendo de cada cebador (tabla 3), extensión a 72 °C por 1 minuto) y extensión final a 72 °C por 7 minutos. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un Termociclador "MJ Research- Bio Rad modelo PTC 220". A partir de los productos de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (Biodynamics S.R.L., cód. B030-500) conteniendo 4  $\mu$ L de una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL, 95% HPLC, Sigma-Aldrich®, cód. E8751). Para la corrida se utilizó la solución tamponada TAE (Tris-acetato-EDTA, Sigma-Aldrich®, cód. T8280) y un marcador de peso molecular de 100-1000 pb (CienMarker, Biodynamics SRL, cód. B040-50). Se corrieron también cepas controles de *E. coli* positivas para cada gen de virulencia, gentilmente cedidas por el Grupo de Sanidad Animal de la EEA INTA Balcarce (originariamente provenientes del cepario del grupo de investigación del Dr. Blanco,





Lugo, España) (tabla 4) y agua destilada (como control negativo). Los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta (transiluminador UV “Cole-Parmer, modelo 97500”) a 302 nm de longitud de onda.

Tabla 4: Características de las cepas de *E. coli* utilizadas como control positivo para los genes de virulencia analizados por PCR

Código de la cepa	Origen	Genes de virulencia intestinales
FV- 10185	OVINO	VT1, VT2
FV- 10186	PORCINO	<i>Eae</i>
FV- 10187	PORCINO	VT2, STa, STb, F18
FV- 10188	PORCINO	LT, STb, F4
FV- 10189	PORCINO	LT, STa, STb, F18
FV- 10190	PORCINO	STa, F6
FV- 10191	BOVINO	STa, F41, F5
FV- 10192	OVINO	F17

#### 4.5) PRODUCCIÓN DEL INMUNÓGENO BACTERIANO

Se elaboró una bacterina polivalente incluyendo dos cepas regionales de *E. coli* enterotoxigénicas (ECET) con los genes de virulencia prevalentes en las guacheras muestreadas. La cepa 42/1163 poseía el gen para la fimbria F17 y la cepa 42/284 poseía los genes para F5, STa y F41. Inicialmente, cada cepa se sembró en agar Minca (Guinee y cols., 1977) (Anexo 2) a 37 °C por 6-8 horas para permitir la expresión de las diferentes fimbrias. Luego cada cepa fue cultivada en caldo cerebro-corazón (Britania®, Argentina) (Anexo 2) e incubada a 37 °C por 24 horas. Se sembró una alícuota de cada caldo en placas de petri con agar sangre (Oxoid, UK.) (Anexo 2) y agar MacConkey (Anexo 2). Se realizaron coloraciones de Gram (Anexo 3) de los caldos post-crecimiento para observar que los inóculos estuvieran puros. Una vez comprobada la pureza de los cultivos, los caldos se inactivaron adicionando 0,5 % (v/v) de formalina (Pro-análisis, Cicarelli®, cód. 706110) y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Luego de la incubación se verificó la inactivación de los microorganismos sembrando los caldos formolados en placas de petri con agar sangre y agar MacConkey. Cada caldo se centrifugó 3 veces a 8000 x g por 15 minutos y se lavó con solución salina tamponada con fosfatos (PBS) pH= 7,4 estéril entre cada centrifugación. Las dos cepas resuspendidas en PBS pH= 7,4 fueron mezcladas para





obtener una concentración final de  $2 \times 10^9$  UFC/mL. Luego se adicionó el adyuvante (gel de hidróxido de aluminio al 2 %) al 7 % (v/v). El inmunógeno bacteriano fue alicuotado en frascos ampollas y se mantuvo a 4 °C hasta el momento de la inmunización.

#### 4.6) INMUNIZACIÓN DE LAS GALLINAS

Se utilizaron 12 gallinas de la línea comercial de alta postura Lohmann Brown-Classic (Cabaña Avícola Jorju SACIFyA, Buenos Aires), las cuales fueron mantenidas en condiciones estándar de bioterio (Área de Producción Avícola- Departamento Producción Animal- UNRC). Para el cuidado y manejo de las aves, se siguieron los protocolos de la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales del Canadian Council of Animal Care (CCAC, 1993). Las gallinas ingresaron al bioterio con 13 semanas de vida y fueron alimentadas *ad libitum* con agua y alimento balanceado de recría (Nutriarte S.R.L., Río Cuarto) hasta la semana 16. Luego por 4 semanas fueron alimentadas con alimento balanceado de pre-postura (Nutriarte S.R.L., Río Cuarto). Desde la semana 20 y hasta finalizar los ensayos recibieron alimento balanceado para postura (Nutriarte S.R.L., Río Cuarto). En cuanto al tiempo de exposición a la luz diaria, inicialmente se utilizó un fotoperíodo controlado de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad. Dicho fotoperíodo se modificó aumentando 1 hora luz por semana, hasta llegar a 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad en la semana 19 de vida, edad en que las aves rompen postura (Guía de manejo para ponedoras Lohmann Brown-Classic, LOHMANN TIERZUCHT GMBH, Edición Latinoamericana). Se mantuvieron condiciones ambientales adecuadas de temperatura (22-24 °C), humedad (50-60 %) y aireación, la que se logró mediante ventilación forzada. Las gallinas fueron alojadas en jaulas y divididas al azar en dos grupos experimentales: grupo inmunizadas con la bacterina polivalente de ECET (n= 8) y grupo no inmunizadas (n= 4).

La inmunización se realizó a partir de la semana 20<sup>o</sup> de edad según el protocolo de Chacana y cols., (2003). Para inmunizar las gallinas se aplicaron un total de 3 dosis, utilizando una concentración del inmunógeno de  $2 \times 10^9$  UFC/mL. Para cada inoculación se separaron las plumas y se desinfectó la piel con alcohol etílico (Bialcohol, Porta®). Las aplicaciones de la bacterina se realizaron por vía intramuscular en el músculo pectoral, con jeringas de tuberculina, distribuyendo equitativamente el volumen total (1 mL) en ambas pechugas (izquierda y derecha). El esquema de inmunización utilizado fue: Día 0: 1<sup>o</sup> dosis; Día 15: 2<sup>o</sup> dosis; Día 30: 3<sup>o</sup>



dosis. Se realizaron dos refuerzos adicionales para elevar la antigenicidad, a los 60 y 80 días. Los huevos se recolectaron diariamente durante todo el período de ensayo y se mantuvieron a 4 °C en heladera durante 4 días hasta su procesamiento (figura 7).

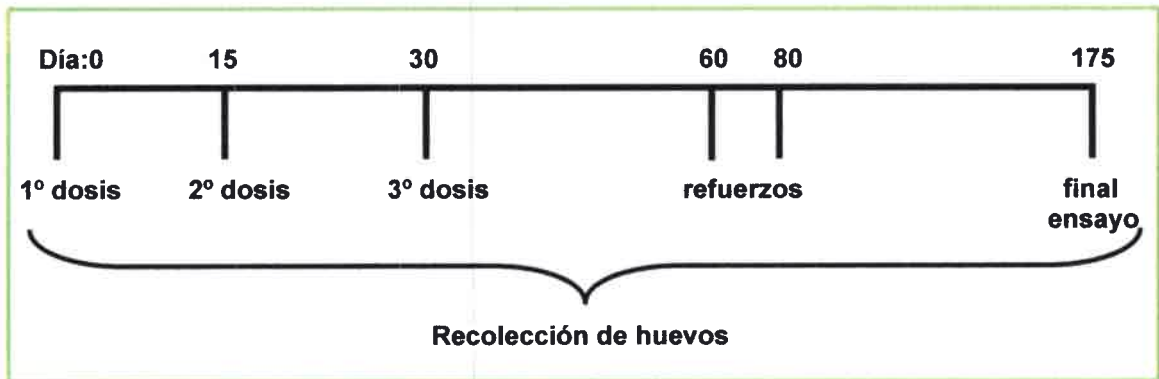


Figura 7: Esquema de inmunización de las gallinas con la bacterina polivalente de ECET.

Paralelamente, y respetando el mismo esquema de inoculación, se pesaron las gallinas y se extrajeron muestras de sangre de la vena radial (alar), desplumando el área y desinfectando bien la piel con alcohol etílico (figura 8). El suero obtenido se mantuvo congelado con el fin de determinar posteriormente la concentración de IgY. Se registraron los pesos y las tasas de postura de las gallinas durante 11 semanas posteriores a la primera inmunización, para evaluar si la administración del inmunógeno afectaba dichos parámetros.



Figura 8: Extracción de sangre y pesaje de las gallinas en el bioterio de aves.



#### 4.7) OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA IgY

Para la obtención de IgY se procesaron tanto los huevos de las gallinas inmunizadas (IgY anti-ECET) como los de las gallinas sin inmunizar (IgY control). A partir de los huevos recolectados, se separó cuidadosamente la yema de la clara y se la depositó sobre un papel absorbente donde se la hizo rodar para extraer los restos de clara adheridos. Luego, se punzó la membrana de la yema con una aguja y su contenido fue vertido dentro de una probeta. A partir de allí se realizaron dos procedimientos diferentes de purificación:

##### 4.7.1) MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGUA

Se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente por Akita y Nakai (1992) con algunas modificaciones. Las yemas se mezclaron con 6 volúmenes de agua destilada a 4 °C y acidificada con ácido clorhídrico 0,1 M (Merck®, concentrado 37 %, cód. 100317) hasta lograr un pH= 2. Se homogenizó la mezcla, se ajustó el pH alrededor de 5,0-5,2 con hidróxido de sodio 0,1 M (Merck®, en lentejas, cód. 6498) y se incubó a 4 °C por 12 horas. La fracción soluble en agua (conteniendo la IgY) se obtuvo por centrifugación a 12000 x g, a 4 °C, por 20 minutos.

Posteriormente se realizó la precipitación de la IgY según Woolley y Landon (1995) con leves modificaciones. Se añadió sulfato de sodio (pro-análisis, Cicarelli®, cód. 833212) para producir una solución al 20 % (p/v) y se agitó a 25 °C por 1 hora. Se centrifugó a 5.000 x g, por 1 hora, a 25 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con PBS pH= 7,4 hasta alcanzar el volumen inicial de yema. Finalmente, la solución conteniendo la IgY fue neutralizada con hidróxido de sodio 0,1M (Merck®, en lentejas, cód. 6498) hasta pH= 7 (para que la acidez no interfiera con los resultados).

##### 4.7.2) MÉTODO CON POLIETILENGLICOL 6000

Se siguió el protocolo de Polson y cols., (1980) modificado por Pauly y cols., (2011). Las yemas se mezclaron con cuatro volúmenes de agua destilada a 4 °C. La emulsión se congeló a -20 °C durante la noche, se descongeló lentamente a 4 °C y se centrifugó a 10.000 x g, durante 15 minutos, manteniendo la temperatura a 10 °C. El líquido sobrenadante se mezcló con polietilenglicol (PEG) 6000 (Roth® -Art.0158.1) al 3,5 % (p/v) y se agitó por 20 minutos a temperatura ambiente. La solución fue centrifugada a 14.000 x g, a 10 °C, durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró con papel de filtro cualitativo de 15 cm de diámetro (Carl Schleicher & Schüll, Alemania, N° 0859), se





añadió PEG 6000 al 12 % (p/v) y se agitó a temperatura ambiente por 20 minutos. Se centrifugó nuevamente a 10 °C, 14000 x g, por 15 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en 10 mL de PBS pH= 7,4, se añadió PEG 6000 al 12 % (p/v) y se agitó nuevamente por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó del mismo modo a 14.000 x g. El pellet se resuspendió en PBS pH= 7,4 hasta llegar al volumen inicial de yema.

#### 4.7.3) DIÁLISIS DEL PRODUCTO PRECIPITADO

Para eliminar los restos de sales que pudieran haber quedado de las precipitaciones realizadas en ambos métodos de purificación, se procedió a la diálisis de las muestras según Pauly y cols., (2011). Se cortaron trozos de membranas para diálisis (Visking dialysis membranes, Roth®) de 30 cm de longitud y se colocaron en un vaso de precipitado de vidrio de 2.000 mL. Se agregaron 1.750 mL de una solución de EDTA disódica 5 mM (Pro-análisis, Cicarelli®, cód. 857212). Se colocó un embudo de vidrio por encima de las membranas para que permanecieran cubiertas por la solución de EDTA. El vaso de precipitado fue colocado sobre un agitador magnético con platina térmica, y se hirvió la solución durante 5 minutos. Luego se descartó la solución y se lavaron las membranas 3 veces con agua destilada. Las membranas se cubrieron nuevamente con una solución de EDTA disódica y se hirvió la solución durante 5 minutos. Se descartó la solución y se lavaron las membranas 3 veces con agua destilada. Finalmente, se hirvieron las membranas durante 10 minutos en agua destilada y se almacenaron en heladera a 4 °C hasta el momento de utilizarlas. Se retiraron las membranas utilizando pinzas estériles y se sellaron en uno de sus extremos anudándolas con hilo de algodón. La solución conteniendo la IgY se transfirió a las membranas por medio de una micropipeta y se sellaron los extremos libres del mismo modo con hilo de algodón. Dicha solución se dializó durante la noche en 1.600 mL de solución salina al 0,1 % con agitación suave en heladera. A la mañana siguiente, la solución salina se sustituyó por PBS pH= 7,4 y se dializó durante 3 horas más.

#### 4.7.4) LIOFILIZACIÓN DE LA IgY

Las soluciones con IgY obtenidas de la diálisis fueron transferidas, por medio de una micropipeta, a recipientes plásticos y congeladas a -20 °C. Posteriormente se liofilizaron durante 48 horas en liofilizador Labconco Stoppering Tray Dryer, para obtener IgY en polvo.



#### 4.8) DETERMINACIÓN DE LA PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DE LA IgY

##### 4.8.1) DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La determinación de proteínas totales se efectuó mediante el método BCA (basado en la reacción de Biuret) con el equipo comercial Pierce® BCA protein Assay (Thermo Scientific®, TecnoLab, Argentina, cód. 23225). Inicialmente se añadió BCA a una solución de sulfato de cobre pentahidratado en proporción 1:50. Se cubrió cada pocillo de la placa de ELISA (NUNC, MaxiSorp®) con 200  $\mu$ L de este reactivo y 20  $\mu$ L de la muestra de IgY. Se destinaron seis pocillos dentro de la misma placa, para elaborar la curva estándar de calibración que permitió relacionar las medidas de absorbancia obtenidas con concentraciones predeterminadas de la proteína albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich®, cód. A7030). Diluciones seriadas de BSA fueron tratadas de igual manera que las muestras. Como control negativo del estándar de calibración se adicionaron 20  $\mu$ L de agua destilada en dos pocillos. Se realizó una agitación suave de la placa durante 1 minuto y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se efectuó la lectura en un lector de microplacas de ELISA (Biolatin CPD Reader 212) a 450 nm de longitud de onda.

##### 4.8.2) DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA IgY POR SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para determinar la pureza de las muestras de IgY. La preparación del gel de poro fino o de separación fue realizada de la siguiente manera:

- Agua (2010  $\mu$ L).
- Tris-ClH, 1,5 M, pH= 8,8 (1500  $\mu$ L).
- Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10 % (p/v) (Ultra Pure, Carl Roth, cód. 2326.2) (60  $\mu$ L).
- Acrilamida/Bisacrilamida (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth, cód. 3029.1) (2400  $\mu$ L).
- Persulfato de amonio al 14 % (p/v) (Carl Roth, cód. 9592.2) (30  $\mu$ L).
- Temed (Carl Roth, cód. 2367.2) (3  $\mu$ L).

Se añadió la solución preparada al casete de acrílico descartable, evitando la formación de burbujas. Se esperó hasta su polimerización y se procedió a la preparación del gel de poro grueso o de apilamiento de la siguiente manera:

- Agua (1830  $\mu$ L)
- Tris-ClH 0,5 M, pH= 6,8 (750  $\mu$ L)
- Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10 % (p/v) (Ultra Pure, Carl Roth, cód. 2326.2) (30  $\mu$ L)



- Acrilamida/Bisacrilamida (Rotiphorese® Gel 30, Carl Roth, cód. 3029.1) (390  $\mu$ L)
- Persulfato de amonio al 14 % (p/v) (Carl Roth, cód. 9592.2) (15  $\mu$ L)
- Temed (Carl Roth, cód. 2367.2) (1,5  $\mu$ L)

Se añadió la solución preparada al casete de acrílico, evitando la formación de burbujas, hasta 1mm por debajo de la línea horizontal. Se colocó un peine para la formación de las calles y se esperó hasta su polimerización. Finalmente, se retiró el peine, se lavaron las calles con tampón de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, 0,1% p/v de SDS 10 %, pH= 8,3) y se sembraron las muestras. Se utilizó un pequeño volumen de las muestras (5-10  $\mu$ L) conteniendo cada una de ellas 20  $\mu$ g de proteínas totales. Este volumen se diluyó 1:1 en solución tampón muestra, la cual consistió en: agua (4,8 mL), buffer Tris-ClH 0,375 M pH= 6,8 (1,2 mL), SDS al 10% (p/v) (2 mL), glicerol (Sintorgan) (1 mL), azul de bromofenol al 0,5 % (p/v) (Carl Roth, cód. A512.1) (0,5 mL) y 5% (p/v) de 2-mercaptoetanol agregado al momento de usar (Sigma®, cód. M-7154). Se calentó por 3 minutos a ebullición, se enfrió y centrifugó a 2000 x g, durante 5 minutos. Se llenó la cuba con solución tampón de corrida. Además de las muestras, se corrieron un marcador de PM de amplio rango de 6,5-205 KDa (Sigma®, cód. M-4038) y un estándar comercial de IgY (Sigma-Aldrich®, cód. GW11010). La corrida electroforética se realizó a 95 voltios y se detuvo una vez que el frente de corrida llegó al final del gel. Se coloreó el gel con una solución 0,1 % de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Ultra-Pure™, Gibco BRL, cód. 5528UA) en metanol (Pro-análisis, Cicarelli®, cód.711110) (40 mL): ácido acético glacial 99,5 % (Pro-análisis, Cicarelli®, cód. 1025110) (10 mL): agua (50 mL), durante 30-40 minutos. Luego el gel fue decolorado dejándolo aproximadamente 1 hora en una Solución A (metanol (40 mL): ácido acético (10 mL): agua (50 mL)) y luego en una Solución B (metanol (20 mL): ácido acético (7 mL): agua (73 mL)) hasta que se observaron las bandas. Se utilizó un equipo "Xcell SureLock™ Mini Cell/ PowerEase® 500" Invitrogen Life Technologies. El gel obtenido fue secado y escaneado para su análisis.

#### 4.8.3) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IgY POR DENSITOMETRÍA

Se realizó Western blot utilizando un estándar comercial de IgY (Sigma-Aldrich®, cód. GW11010) como control de carga. Para ello inicialmente se realizó el SDS-PAGE tal como se describió anteriormente, pero en este caso se utilizó un marcador de peso molecular pre-teñido de amplio rango de 240-17 kDa (Roti®-Mark, cód. T852.1, Roth). Al finalizar la corrida, se retiró el gel del casete y se equilibró en solución tampón de



transferencia (Tris Base 25 mM, glicina 14,41 g (Invitrogen™, cód. 15527-013), agua destilada 1000 mL, 0,01 % de SDS agregado al momento de usar) durante 15 minutos. Se cortó una membrana de Polivinilfluoride (PVDF, Millipore Immobilon P™, poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) del tamaño del gel, se activó en metanol por 30 segundos, se enjuagó en agua destilada y se dejó en remojo en solución tampón de transferencia junto con 4 piezas de almohadillas extra delgadas y 4 piezas de filtro Whatman 3 mm. Se ensambló la unidad de transferencia de la siguiente manera: Polo (-) / almohadilla / filtro / GEL / IMMOBILON P / filtro / almohadilla / Polo(+). Se realizó la transferencia durante al menos 45 minutos, a 200 mA y 25 voltios. La membrana obtenida de la transferencia se incubó con anti-IgY de pollo marcada con peroxidasa (Sigma-Aldrich® cód. A9046) diluida 1/100 en solución de bloqueo, durante 90 minutos a temperatura ambiente. La solución de bloqueo consistió en 10 % (p/v) de leche descremada en polvo diluida en solución tampón Tris Salino-Tween 20 (TBS-T: Tris Base 20 mM, NaCl 137 mM, 0,1 % (v/v) de Tween 20 (Merk, cód. 8.22184), pH= 7,6. Se lavó 3 veces con TBS-T durante 5 minutos cada una. Se reveló con 3,3'- diaminobenzidina (DAB Tabletas, Sigma Fast™, cód. D4418) en agitación hasta que se hicieron visibles las bandas. Las membranas se enjuagaron con agua deionizada para detener la reacción, se escanearon y digitalizaron. Se utilizó el programa para procesamiento de imágenes "ImageJ" (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Se determinó la intensidad de color relativa de cada banda de IgY patrón y las correspondientes a las muestras de IgY purificada por ambos métodos.

#### 4.8.4) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA IgY POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Se determinó, por triplicado, el valor de la densidad óptica de la IgY (dilución 1/50) a 280 nm. Se multiplicó el promedio de los tres valores por el factor de dilución y se dividió por el coeficiente de extinción molar de la IgY disuelta en PBS 0,01 M que es de 13,2 (Leslie y Cleam, 1969).

#### 4.8.5) CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA IgY TOTAL POR ELISA

Para cuantificar la concentración de IgY total, se desarrolló un test de ELISA siguiendo los protocolos de Gutiérrez Calzado y cols. (2007) con algunas modificaciones. Para preparar la curva de calibración, se cubrió cada pocillo de la placa de ELISA (NUNC, MaxiSorp®) con 50  $\mu\text{L}$  de diluciones seriadas de un patrón comercial de IgY (Chicken IgG, 1 mg/mL, Sigma®, I-4881) en tampón carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH= 10,5). En la misma placa, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de soluciones liofilizadas de IgY anti-ECET e





IgY control (2 mg/mL) reconstituidas en tampón carbonato-bicarbonato. La placa fue incubada toda la noche a 4 °C y se lavó 4 veces con PBS-Tween 20 (PBS-T, 0,05 % v/v, Merck, cód. 8.22184) entre cada paso de los descriptos a continuación: se añadieron 150 µL de leche descremada (Sweety, Nestle®, 5 % p/v) en PBS-T a cada pocillo de la placa y se incubó a 37 °C por 1 hora en cámara húmeda. Se agregaron 150 µL de anti-IgY conjugado con peroxidasa (Rabbit anti-chicken IgG, Sigma®, A-9046) diluido 1:1000 en leche descremada al 2 % (p/v) (en PBS-T) y se incubó a 37 °C por 2 horas en cámara húmeda. Se agregaron 100 µL de solución sustrato recién preparada: 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB, Sigma®, T-3405) en tampón citrato fosfato (0,05 M a pH= 5,0) conteniendo 6 µL de peróxido de hidrógeno (Pro-análisis, Cicarelli®, cód 1028110) cada 10 mL de solución y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, con agitación. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (Pro-análisis, Cicarelli®, cód. 759110, 3 M) y se midió en un lector de microplacas de ELISA (Biolatin CPD Reader 212) a 450 nm de longitud de onda.

#### 4.8.6) DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE LA IgY POR ELISA

Para determinar el título de la IgY, se desarrolló un test de ELISA siguiendo los protocolos de Gutiérrez Calzado y cols. (2007) con algunas modificaciones. Los pocillos de la placa de ELISA (NUNC, MaxiSorp®) se cubrieron con 50 µL de una suspensión concentrada de ECET inactivada ( $>10^{10}$  UFC/mL) en tampón carbonato bicarbonato (0,05 M, pH= 10,5) y se incubó toda la noche a 4 °C. Se realizaron 4 lavados con 150 µL de PBS-T (pH= 7,4) entre cada paso descrito a continuación: para bloquear los sitios de unión inespecíficos se utilizó leche descremada al 5 % (p/v) disuelta en PBS-T (150 µL/pocillo). Se incubó la placa 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Las muestras de IgY anti-ECET e IgY control liofilizadas fueron reconstituidas en PBS-T con leche descremada al 2 % (p/v). Se realizaron diluciones seriadas de ambos anticuerpos ( $1/10^1$  a  $1/10^{15}$ ), se agregaron 100 µL de cada dilución a la placa y se incubó por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Se adicionaron 150 µL de anti-IgY conjugado con peroxidasa, desarrollado en conejo (Rabbit anti-chicken IgG, Sigma®) diluido 1:1000 en leche descremada al 2 % (en PBS-T). Se incubó la placa por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Se agregaron 100 µL de solución sustrato recién preparada: 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB, Sigma®, T-3405) en tampón citrato fosfato (0,05 M, pH= 5,0) conteniendo 6 µL de peróxido de hidrógeno (Pro-análisis, Cicarelli®, cód 1028110) cada 10 mL de solución y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, con agitación. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (Pro-



análisis, Cicarelli®, cód. 759110, 3 M) y se midió en un lector de microplacas de ELISA (Biolatin CPD Reader 212) a 450 nm de longitud de onda.

#### 4.9) FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO CON QUITOSANO Y SU CARACTERIZACIÓN

Para la funcionalización de los nanotubos de carbono se siguió el protocolo de Liu y cols., (2005). Se dispersaron 100 mg de nanotubos de carbono multipared (MWNTs, SUNNANO®) en 100 mL de una solución de quitosano (Chitosan, Sigma-Aldrich®, cód. 448875) (0,1 g de quitosano disueltos en 100 mL de una solución de ácido acético 1 % (v/v), pH= 2). Posteriormente, la mezcla fue tratada con un campo ultrasónico por 10 minutos y fue agitada por 1 hora. Durante este paso las moléculas de quitosano fueron adsorbidas sobre la superficie de los nanotubos, actuando como un agente tensioactivo catiónico para estabilizar a los nanotubos y permitir su dispersión en la solución acuosa ácida.

Para la caracterización de los nanotubos funcionalizados, se realizó espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) del quitosano, de los nanotubos de carbono y de los nanotubos-quitosano. Debido a que las muestras eran sólidas, se utilizaron pastillas de bromuro de potasio (Sigma-Aldrich®, cód. 221864). Para ello se tomaron alícuotas de los nanotubos en polvo y se mezclaron con bromuro de potasio al 1% (p/p) en un mortero de ágata, hasta lograr una mezcla homogénea. Se formaron pastillas mediante un dispositivo de presurización a una presión de 15 toneladas/pastilla y vacío dinámico. Luego se midieron en un espectrómetro "FTIR Nicolet Impact 400", con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  (espectroscopía de masas en Infrarrojo cercano).

#### 4.10) SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES pH-SENSIBLES

Para la síntesis de los hidrogeles se utilizaron dos monómeros (figura 9): ácido acrílico (Sigma-Aldrich®, cód. 147230) y acrilamida (Rotiphorese, Roth®, Art. 3029.1).

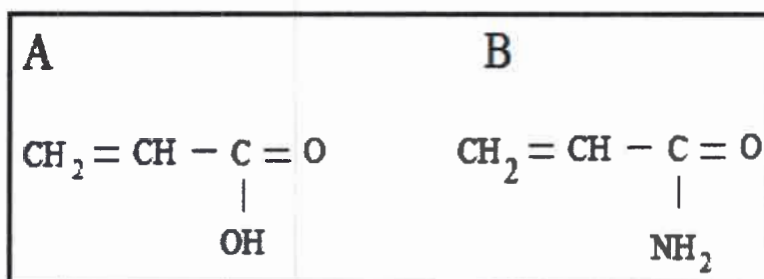


Figura 9; Estructura química de los monómeros utilizados para la síntesis del hidrogel: ácido acrílico (A) y acrilamida (B).



Como agente entrecruzador se empleó N',N'-metilen-bisacrilamida (Rotiphorese, Roth®, Art. 3029.1). Como iniciador de la reacción se utilizó persulfato de amonio (Roth®, Art. 9592.2) y como catalizador tetrametiletilenodiamina (TEMED, Roth®, Art. 2367.2).

Se tomaron 370  $\mu$ L de Rotiphorese 1,4 M (acrilamida:N',N'-metilen-bisacrilamida, en proporción 37,5:1) y 710  $\mu$ L de ácido acrílico 1,4 M y se llevaron a un volumen final de 4 mL con agua destilada. Se ajustó la solución a un pH=5 con hidróxido de sodio 0,1 M (Merck®, en lentejas, cód. 6498). Se burbujeó el sistema con nitrógeno gaseoso por 5 minutos. Luego se colocaron 0,004 g de iniciador (persulfato de amonio) y 40  $\mu$ L de catalizador (TEMED). La solución de síntesis fue cargada en una jeringa de tuberculina (1 mL), el extremo abierto de la jeringa fue sellado con parafilm y se dejó por 3 horas a temperatura ambiente. Se realizó también la síntesis de hidrogeles variando la concentración de los monómeros (ácido acrílico y acrilamida) y con el agregado de una solución de nanotubos de carbono al 5 % funcionalizados con quitosano. Una vez polimerizada la solución, se extrajo el polímero mediante la remoción del extremo anterior de la jeringa y presionando suavemente el émbolo hacia adelante (figura 10). El polímero se fragmentó en secciones pequeñas (5 mm), las cuales se lavaron durante 7 días con agua destilada cambiando el agua 2 veces/día. La finalidad de este proceso fue eliminar los restos de monómeros que no polimerizaron y que pudieran resultar tóxicos. Finalizado el proceso de lavado, los geles fueron secados en estufa a 37 °C hasta lograr un peso constante.



Figura 10: Preparación de las pastillas a partir del hidrogel polimerizado.

Para la caracterización de los hidrogeles, los mismos se incubaron individualmente (por triplicado) en soluciones tampones a diferentes pH y durante diferentes periodos de tiempo. Las soluciones tampones utilizadas fueron: pH= 2,2 (solución de cloruro de





potasio 0,2 M/ ácido clorhídrico 0,2 M), pH= 5,5 (solución de acetato de sodio 0,2 M/ ácido acético 0,2 M), pH= 7,4 (PBS), pH= 10 (solución de bicarbonato de sodio 0,1 M/ hidróxido de sodio 0,1 M). Para cada tiempo de incubación, los hidrogeles se retiraron de las soluciones, se escurrieron en papel absorbente y se pesaron. Además se determinaron los siguientes parámetros:

- tamaño de la partícula: se midieron el diámetro y la altura de los hidrogeles mediante un calibre manual. Se tomó el promedio de las tres mediciones.

- porcentaje de hinchamiento: se calculó mediante la siguiente ecuación

$$\% = \left[ \frac{(\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco})}{\text{Peso húmedo}} \right] \times 100$$

- contenido de agua: se calculó mediante la siguiente ecuación

$$\% = \left[ \frac{(\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco})}{\text{Peso seco}} \right] \times 100$$

#### 4.11) INCORPORACIÓN DE LA IgY EN LOS HIDROGELES pH-SENSIBLES

La cantidad de IgY incorporada se determinó por un método indirecto. Se colocaron 3 hidrogeles secos a hinchar individualmente, protegidos de la luz, en un recipiente cerrado cada uno que contenía 2,5 mL de una solución de IgY anti-ECET (100 mg IgY/mL, pH= 10). El estudio se realizó a temperatura ambiente y durante 72 horas, tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de hinchamiento. Al iniciar el ensayo, se pesaron los hidrogeles, se determinaron sus dimensiones (altura y diámetro) y se determinó la  $DO_{280\text{nm}}$  de la solución de IgY. Al finalizar el ensayo, los hidrogeles se secaron en estufa hasta peso constante (aproximadamente 24 horas), se determinaron sus dimensiones (altura y diámetro) y se determinó  $DO_{280\text{nm}}$  de la solución de IgY. El porcentaje de incorporación de la IgY se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% = \left[ \frac{(\text{Peso hidrogel con IgY seco} - \text{Peso hidrogel solo seco})}{\text{Peso hidrogel solo seco}} \right] \times 100$$





Para completar la caracterización de la incorporación de la IgY en los hidrogeles se realizó espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) de los hidrogeles solos, la IgY sola y los hidrogeles-IgY. Se tomaron alícuotas de los hidrogeles en polvo y se mezclaron con bromuro de potasio (Sigma-Aldrich®, cód. 221864) al 1 % (p/p) en un mortero de ágata, hasta lograr una mezcla homogénea. Se formaron pastillas mediante un dispositivo de presurización a una presión de 15 toneladas/pastilla y vacío dinámico. Se midieron en un espectrómetro "FTIR Nicolet Impact 400", con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  (espectroscopía de masas en Infrarrojo cercano).

#### 4.12) ESTABILIDAD *IN VITRO* DE LA IgY EN LOS FLUIDOS SIMULADOS

Se evaluó la estabilidad de la IgY incorporada en el hidrogel, en condiciones gástricas simuladas. Se siguieron los protocolos de Li y cols., (2009) y Kovacs-Nolan y Mine (2005). Inicialmente, se utilizó fluido gástrico simulado (FGS), el cual consistió en 3,2 mg/mL de pepsina (Parafarm®, 1:10000 NF) en cloruro de sodio 0,03 M (Pro-análisis, Cicarelli®, cód. 750212) a pH= 1,2 según lo descrito en la Farmacopea de los EEUU (United States Pharmacopeial Convention Council of Experts, 2004). Se añadieron las pastillas de hidrogel-IgY al fluido en una proporción enzima:substrato de 1:20 y se incubaron en agitación a 37 °C por 2 horas. La IgY libre se neutralizó con Tris-HCl (2M, pH= 8). Posteriormente, se utilizó fluido intestinal simulado (FIS), el cual consistió en 10mg/mL de pancreatina (Sigma-Aldrich®, cód. P-1750) en fosfato monobásico de potasio 0,05 M pH= 7,4 (Pro-análisis, Cicarelli®, cód.782211) a pH= 7,4, según lo descrito en la Farmacopea de los EEUU (United States Pharmacopeial Convention Council of Experts, 2004). Las pastillas de hidrogel-IgY se transfirieron al fluido en una proporción enzima:substrato de 1:50 y se incubaron en agitación a 37 °C por 3 horas. Se tomaron alícuotas de cada fluido simulado, cada media hora, para evaluar la actividad del anticuerpo mediante ELISA. Las actividades se expresaron como un porcentaje relativo a una muestra control no tratada (100 %).

#### 4.13) LIBERACIÓN DE LA IgY DE LOS HIDROGELES pH-SENSIBLES

Se añadieron pastillas de hidrogel-IgY a 50 mL de FGS sin pepsina y se incubó a 37°C, en agitación. Luego de 2 horas, los hidrogeles se filtraron y fueron transferidos a 50 mL de FIS sin pancreatina. Se incubó a 37 °C por 3 horas. Se tomaron alícuotas (200  $\mu\text{L}$ ) de cada fluido simulado, cada media hora, para cuantificar la concentración de proteínas totales y de IgY liberada.



#### 4.14) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LA IgY FRENTE A LA DIARREA POR *E. coli* EN UN MODELO TERNERO

Se trabajó con 20 terneros machos de raza Holando Argentino, que fueron separados de sus madres luego de calostroar durante 24 horas. Los animales ingresaron a la zona de desafío experimental y fueron alimentados con un sustituto lácteo comercial (Booster®). La zona de desafío se mantuvo en condiciones libres de microorganismos patógenos específicos para la especie, con temperatura y luz controlada. Los terneros se dividieron en boxes y fueron distribuidos al azar en 5 grupos experimentales de 4 terneros cada uno:

Grupo 1: Terneros alimentados con sustituto lácteo, tratados con IgY anti-ECET incorporada en nanoestructuras y desafiados con ECET.

Grupo 2: Terneros alimentados con sustituto lácteo, tratados con IgY control incorporada en nanoestructuras y desafiados con ECET.

Grupo 3: Terneros alimentados con sustituto lácteo, tratados con IgY anti-ECET sin encapsular y desafiados con ECET.

Grupo 4: Terneros alimentados con sustituto lácteo, sin ningún tratamiento con IgY y desafiados con ECET.

Grupo 5: Terneros alimentados con sustituto lácteo, sin ningún tratamiento con IgY y sin desafío con cepas ECET.

El sustituto lácteo (Booster®, código 03-06-01-06) fue preparado siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 5). Los terneros fueron alimentados individualmente con mamaderas, recibiendo dos tomas diarias de dos litros cada una. En todos los casos se respetaron los horarios y la temperatura (37-39 °C) de entrega del sustituto.

Para los desafíos se utilizaron 5 mL de una suspensión de ECET (concentración de  $10^{10}$  UFC/mL) en PBS estéril. La suspensión se administró oralmente mediante jeringa y el momento en que se desafiaron los animales se consideró como “tiempo cero” de inoculación.

La concentración de la IgY utilizada en los tratamientos fue determinada mediante estudios previos *in vitro* (ensayo de inhibición del crecimiento de *E. coli* y ensayo de inhibición de la adhesión de *E. coli* sobre cultivos celulares) realizados por nuestro grupo de investigación (Bellingeri y cols., 2013). Para los tratamientos con IgY encapsulada, se administraron oralmente hidrogeles conteniendo una concentración de 40 mg/mL de IgY anti-ECET (título de 1:100.000) ó 40 mg/mL de IgY control (título de 1:100). Para los tratamientos con IgY libre, se administró oralmente mediante



jeringa una concentración de 40 mg/mL de IgY anti-ECET (título de 1:100.000). En todos los casos se tuvo en cuenta que la administración de la IgY fuera realizada con al menos una hora de separación con respecto a la entrega del sustituto lácteo. El esquema de manejo de los animales, inoculación, administración del sustituto lácteo y los tratamientos con IgY, se describen en la figura 11.

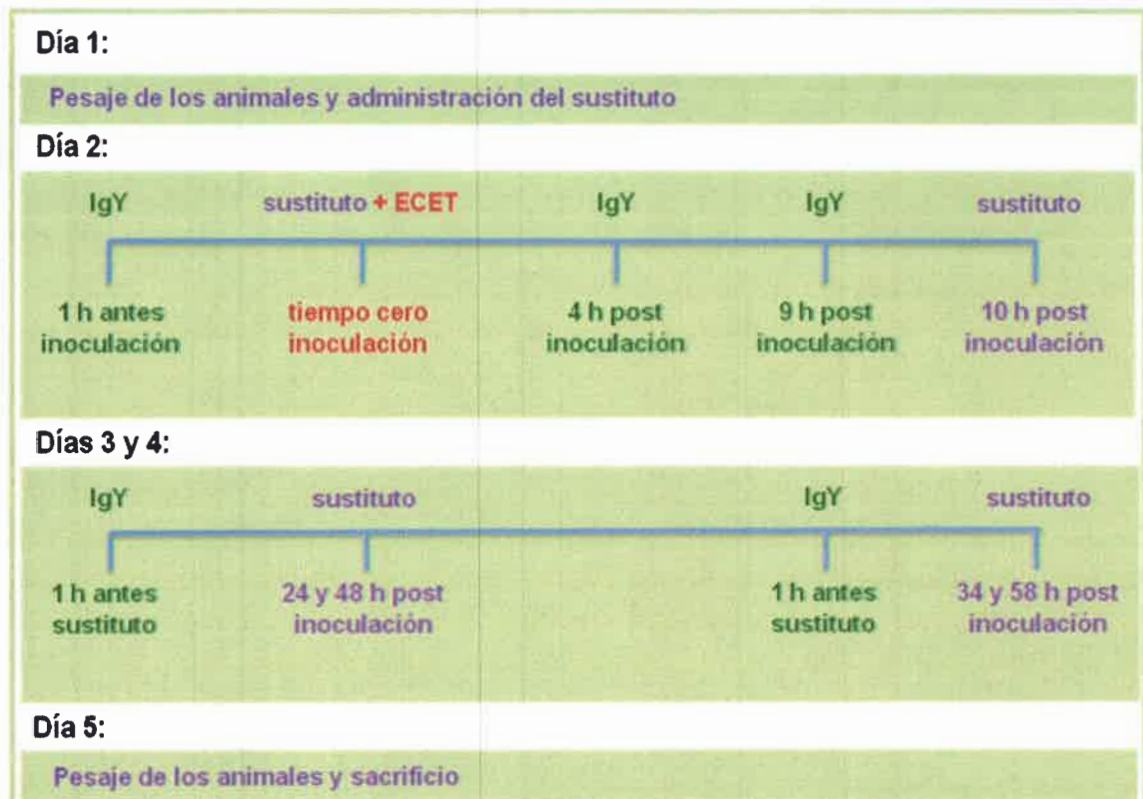


Figura 11: Esquema de manejo de los animales, inoculación, administración del sustituto lácteo y tratamientos con IgY.

Se realizó el monitoreo clínico de todos los animales siguiendo los protocolos de ética y bienestar animal de la UNRC. Se observaron todos los grupos diariamente, registrándose los parámetros clínicos asociados con la diarrea de terneros (Sherman y cols., 1983) (figura 12) (Anexo 6).

Algunos animales de cada grupo fueron sacrificados al quinto día de inicio del ensayo *in vivo*. Se tomaron diferentes muestras biológicas para el reaislamiento y la caracterización de la cepa ECET inoculada, muestras de sangre para las determinaciones clínicas y muestras de tejidos intestinal para la realización de cortes histológicos (figura 13) (Anexo 7).





Aspecto general	Diarrea	Deshidratación
Peso inicial (Kg)	Consistencia materia fecal (normal, pastosa, semiliq, liq)	Ojos hundidos (SI/NO)
Ingesta agua (SI/NO)	Color materia fecal (amarilla, verde, gris, blanco)	Postración (SI/NO)
Ingesta leche (SI/NO)	Presencia sangre/fibrina/mucus	Emaciación (SI/NO)
Reflejo succión (SI/NO/POCO)	Número deposiciones por día	Aspecto de las mucosas
Postura erguida (SI/NO)	Duración diarrea (días)	Cuerpo (FRÍO/CALIENTE)
Pelo brillante (SI/NO)		Miembros (FRÍO/CALIENTE)
Peso final (Kg)		Prueba del pliegue cutáneo
Ganancia/pérdida de peso		
Temperatura (°C)		

Figura 12: Parámetros clínicos asociados a la diarrea observados diariamente en los terneros

Sangre	Materia Fecal
Recuento de hematíes y leucocitos totales	Bacteriología (enterobacterias)
Fórmula leucocitaria	Factores de virulencia de <i>E. coli</i> por PCR (F5, F17, STa, F41)
Separación del suero	Parasitología ( <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> )
Contenido estomacal e intestinal	Tejidos para cortes histológicos
Bacteriología y parasitología	Intestino delgado (duodeno, yeyuno-íleon) y grueso (colon)
Determinación de pH	

Figura 13: Diferentes muestras obtenidas de los terneros el día de la necropsia.

#### 4.15) HISTOLOGÍA DE LOS CORTES DE INTESTINO PARA OBSERVAR PROCESOS INFLAMATORIOS

Se tomaron muestras de tejidos de diferentes porciones intestinales (duodeno, yeyuno-íleon, colon). Se observó la presencia de procesos inflamatorios luego de la administración de los complejos hidrogel-IgY, mediante técnicas histológicas convencionales. Las muestras de tejidos fueron procesadas de la siguiente manera:

La fijación se realizó en formol tamponado pH= 7,4. Luego cada muestra fue deshidratada mediante pasaje por sucesivos alcoholes de graduación creciente (30°, 50°, 70°, 96°, 100°, 100°- xilol, xilol y xilol) empleando aproximadamente unos 5 minutos en cada uno de ellos. Una vez deshidratados los tejidos se incluyeron en





parafina (Parafina en escamas, 66 Luis Marsan) a 56-58 °C durante al menos 3 horas. Posteriormente se prepararon los tacos para realizar cortes finos de 3-4  $\mu\text{m}$  en micrótomo Leica (Mod. JUNG RM 2065) y se montaron en portaobjetos. Se desparafinó la muestra inmediatamente antes de usar por sucesivos pasajes en xilol (10 minutos), xilol (10 minutos), alcohol/xilol (10 minutos), alcohol 100° (5 minutos), alcohol 95° (5 minutos) y alcohol 80° (5 minutos). Se lavó con agua destilada y se teñeron los cortes con hematoxilina-eosina. Falta protocolo Algunos de los cortes fueron teñidos con el colorante diferencial azul de toluidina para observar la existencia de degranulación de los mastocitos en la lámina propia (Lewis, 2008). Falta protocolo Finalmente, se deshidrataron los cortes por sucesivos pasajes en alcohol de graduación creciente y xilol. Se montaron y se observaron al microscopio óptico (Carl Zeiss Axiostar Plus) acoplado con cámara digital (Canon PowerShot G6 de 7,1 MegaPíxeles).

#### 4.16) ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y MAPEO

Los datos se analizaron estadísticamente mediante Análisis de Varianza (ANOVA), utilizando el software INFOSTAT® versión 2009. Para considerar diferencias significativas se fijó un valor de  $p \leq 0,05$ .

Se evaluó la asociación entre los factores de riesgo y la prevalencia de la diarrea en el rodeo mediante análisis univariado. Se determinó la mediana de prevalencia y el rango intercuartil para cada factor y se utilizó el test de Kruskal-Wallis (INFOSTAT® versión 2009) fijando un valor de  $p \leq 0,05$  como significativo.

La prevalencia de los patotipos de *E. coli* fue descripta espacialmente utilizando las coordenadas geográficas de los rodeos registradas por GPS. El mapa de puntos fue realizado utilizando el software ArcView 3.2 (ESRI, Redlands, CA, EE.UU.).



**RESULTADOS**



## 5) RESULTADOS

### 5.1) ANIMALES Y RECOLECCIÓN DE DATOS

Todos los terneros muestreados ( $n=620$ ) fueron menores de 45 días de edad y de la raza Holando Argentino. El número promedio de terneros muestreados por rodeo fue  $14 (\pm 7,95)$ . Del total, 395 terneros (63,7 %) no presentaron diarrea al momento de la visita, mientras que los 225 terneros restantes (36,3 %) fueron animales diarreicos. Con respecto al sexo, 435 terneros (70,1 %) fueron hembras y 185 (29,9 %) machos. La prevalencia de diarrea encontrada en cada uno de los establecimientos muestreados varió marcadamente de 0 a 71,4 %, con una mediana de 35,7 % (Percentil 25: 20,0 % y Percentil 75: 50,0 %) (figura 14). Dos establecimientos no presentaron ningún caso de diarrea, mientras que ocho de ellos mostraron una prevalencia de diarrea mayor al 50%.

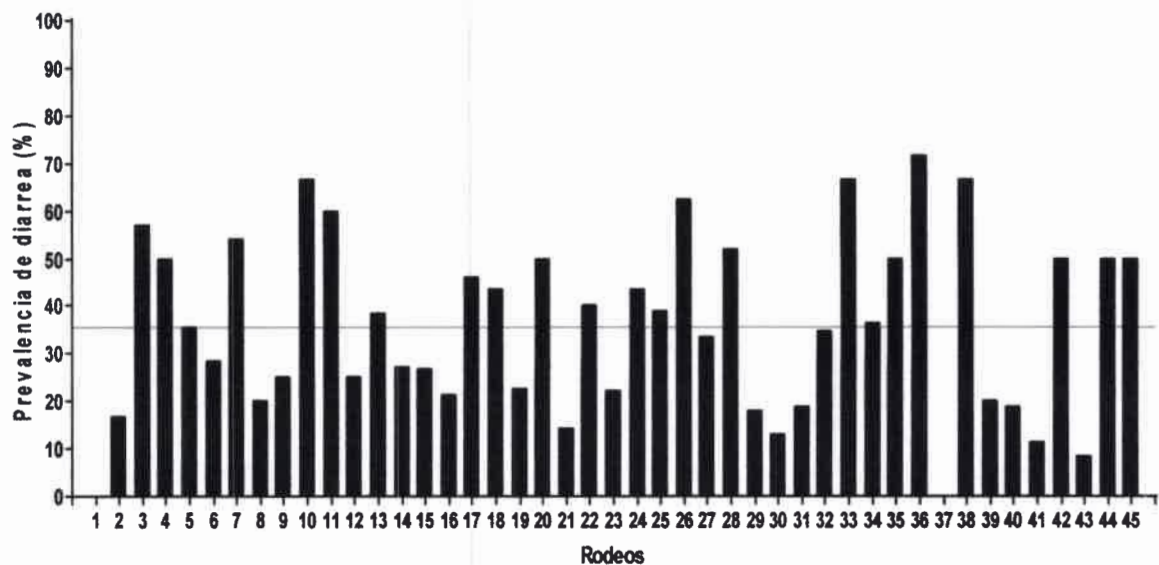


Figura 14: Prevalencia de diarrea (%) en los rodeos muestreados ( $n=45$ ), Cuenca Lechera de Villa María, Córdoba, Argentina. La línea de corte indica la mediana de prevalencia (35,7 %).

El análisis de los factores de riesgo hipotetizados como incrementadores de la diarrea demostró que ninguna de las variables del rodeo estuvo significativamente asociada con la prevalencia de diarrea (tabla 5).



Tabla 5: Variables asociadas con la prevalencia de diarrea en los establecimientos muestreados

Variables	Exposición	Prevalencia de diarrea (%) <sup>*</sup>	Valor P
Sistema individual	Si No	37,4 (20,0- 50,0) 26,7 (20,4- 51,8)	0,69
Disponibilidad de sombra	Si No	36,0 (19,7- 50,0) 33,3 (21,1- 51,0)	0,95
Tipo de terreno	Tierra Pasto Mixto	33,3 (21,4- 43,7) 37,4 (19,1- 55,3) 43,7 (22,6- 50,0)	0,71
Tratamiento de la diarrea	ab, ad, ab-ad <sup>#</sup> h-ab, h-ad, h-ab-ad <sup>#</sup>	33,3 (20,7- 48,1) 38,5 (18,2- 50,0)	0,78
Administración del calostro	Durante una semana Más de una semana	33,3 (20,0- 50,0) 37,1 (19,1- 57,5)	0,74
Edad del destete	A la semana Más de una semana	35,5 (21,7- 50,5) 26,7 (18,5- 48,1)	0,45
Tipo de dieta líquida	Leche, sustituto lácteo, vaca nodriza Leche de descarte	40,0 (26,7- 56,9) 27,3 (18,7- 50,0)	0,19
Duración de la dieta líquida	Hasta las 8 semanas Más de 8 semanas	35,7 (20,0- 50,0) 22,6 (18,5- 44,4)	0,31
Entrenamiento del ternero para beber la dieta líquida	Si No	35,2 (20,0- 50,0) 43,7 (21,7- 55,0)	0,72
Limpieza de los utensillos para la dieta líquida	Nunca Al menos una vez a la semana	28,6 (18,2- 35,7) 38,5 (20,7- 50,0)	0,30
Asistente del rodeo	Si No	36,4 (20,0- 50,0) 22,0 (17,0- 49,0)	0,39
Trabaja sólo con terneros	Si No	27,3 (18,5- 55,5) 37,4 (21,9- 50,0)	0,86

<sup>\*</sup>Los datos son expresados como la mediana (%) y el rango intercuartil. <sup>#</sup>ab: antibiótico; ad: antidiarreico; h: hidratación oral.

## 5.2) MUESTRAS, PROCESAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Los aislamientos bacteriológicos fueron bioquímicamente compatibles con *E. coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* y *Citrobacter spp.* La tabla 6 muestra la prevalencia de enterobacterias aisladas de los terneros y establecimientos muestreados. Las pruebas bioquímicas que permitieron la tipificación de *E. coli* fueron: fermentación de la glucosa (+), oxidasa (-), reducción de nitratos (+), indol (+), movilidad (+), SH<sub>2</sub> (-), TSI ácido/ácido con producción de gas (+), citrato (-), decarboxilación de la lisina (+), urea (-), fenilalanina (-).



Tabla 6: Prevalencia de enterobacterias aisladas de los terneros (n= 620) y rodeos (n= 45) muestreados

Enterobacterias Aisladas	Terneros Positivos (%)	Rodeos Positivos (%)
<i>E. coli</i>	363 (58,6)	42 (93,3)
<i>Proteus spp.</i>	204 (32,9)	40 (88,8)
No Desarrollaron	26 (4,2)	14 (31,1)
<i>Enterobacter spp.</i>	20 (3,2)	15 (33,3)
<i>Citrobacter spp.</i>	7 (1,1)	7 (15,5)

### 5.3) EXTRACCIÓN DEL ADN BACTERIANO

El método de extracción del ADN bacteriano por calentamiento fue un procedimiento sencillo y rápido que permitió procesar muchas muestras al mismo tiempo y con muy bajos costos.

### 5.4) TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *E. coli* POR PCR

De las 156 cepas de *E. coli* seleccionadas al azar y caracterizadas por PCR, un 69,9% (n= 109) fueron cepas no patógenas para los genes de virulencia estudiados y un 30,1% (n= 47) fueron positivas para al menos uno de los genes de virulencia. Las cepas patógenas fueron compatibles con *E. coli* enterotoxigénica (22,4 %) (n= 35), *E. coli* verotoxigénica (4,5 %) (n= 7) y *E. coli* enteropatógena (3,2 %) (n= 5).

Con respecto a los genes de virulencia analizados, se encontraron 17 patrones diferentes de acuerdo a las distintas formas de presentación de los genes (tabla 7). La mayoría de las muestras presentaron un único gen individual. Los genes para las fimbrias F17 y F5 fueron los prevalentes, mientras que STa fue el único gen para enterotoxina observado. Los genes para LT y STb no fueron detectados en ninguna cepa, mientras que los genes para VT y F41 fueron encontrados solamente en combinación con otros genes. El 33,9 % de las cepas mostraron combinaciones de genes para fimbrias y toxinas. Sin embargo, ninguna combinación fue prevalente.



Tabla 7: Frecuencias individuales y combinadas de los genes de virulencia para las cepas de *E. coli* positivas (n= 47) tipificadas por PCR

Genes de Virulencia	Nº de cepas positivas	Frecuencia (%)
F17	19	40.4
F5	6	12.8
Eae	4	8.6
STa	2	4.3
F17 STa	2	4.3
F17 VT	2	4.3
eae VT	2	4.3
F17 F5	1	2.1
F17 eae	1	2.1
eae STa	1	2.1
F17 VT F5	1	2.1
F17 eae F5	1	2.1
F17 eae STa	1	2.1
F17 eae VT	1	2.1
STa eae VT	1	2.1
STa F5 F41	1	2.1
STa F17 VT F5	1	2.1

Los resultados de la asociación entre la diarrea y la presencia de los genes de virulencia se observan en la tabla 8. El 67,3 % de los terneros diarreicos no presentaron ningún gen de virulencia, indicando que la diarrea podría deberse a otras causas no estudiadas. El 28,7 % de los terneros sanos fueron portadores asintomáticos, es decir, que no desarrollaron diarrea pero presentaron al menos uno de los genes de virulencia analizados.

Tabla 8: Distribución de los genes de virulencia de *E. coli* en los terneros muestreados con diarrea (n= 55) y sin diarrea (n= 101)

Cantidad de genes de virulencia presentes	Terneros diarreicos		Terneros no diarreicos	
	N	%	N	%
0	37	67.3	72	71.3
1	11	20.0	20	19.8
2	3	5.5	6	5.9
3	3	5.5	3	3.0
4	1	1.8	0	0
	55	100	101	100



### 5.6) INMUNIZACIÓN DE LAS GALLINAS

El inmunógeno producido fue seguro y bien tolerado por las gallinas vacunadas. Las aves no manifestaron ninguna reacción alérgica o necrótica en el área de inyección. No se observó ningún tipo de lesión inflamatoria que pudiera haber ocasionado el adyuvante o la inoculación del antígeno. Los animales no mostraron signos clínicos de distrés y las condiciones sanitarias de las aves y la bioseguridad mantenida en el bioterio fueron óptimas a lo largo de todo el ensayo. Todas las gallinas rompieron postura entre las semanas 19 y 20 de vida. Se obtuvo 1 huevo diario por gallina alojada, observándose una óptima producción (figura 16). No se encontraron diferencias significativas entre las medias de las tasas de postura ni las medias del peso de las gallinas a lo largo de las 11 semanas evaluadas (tabla 9).



Figura 16: Gallinas de alta postura, mantenidas bajo condiciones óptimas de bioterio.

Tabla 9: Tasa de postura y peso promedio de las gallinas inmunizadas y no inmunizadas a lo largo del período evaluado (11 semanas)

Semana	Tasa de postura promedio/gallina		Peso promedio/gallina (Kg)	
	Inmunizadas	No inmunizadas	Inmunizadas	No inmunizadas
1	6,38	5,50	1,53	1,41
2	7,00	7,00	1,56	1,43
3	7,00	6,50	1,55	1,48
4	7,00	6,00	1,60	1,52
5	6,88	6,00	1,64	1,53
6	5,25	6,50	1,72	1,64
7	7,00	5,75	1,73	1,64
8	7,00	7,00	1,71	1,69
9	7,00	5,75	1,82	1,75
10	6,88	7,00	1,91	1,81
11	6,88	6,25	1,89	1,80





## 5.7) OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA IgY POR AMBOS MÉTODOS

La concentración de proteínas, IgY total y pureza relativa en la fracción soluble obtenida por ambos métodos se observa en la tabla 10.

Tabla 10: Valores de proteínas, IgY y pureza en la fracción soluble

Método de purificación de la IgY	Proteínas (mg/mL yema)	IgY (mg/mL yema)	Pureza relativa (%)
IgY anti- ECET (DILUCION EN AGUA)	2,76 ± 1,63 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,78 <sup>a</sup>	58,19
IgY CONTROL (DILUCION EN AGUA)	2,19 ± 0,87 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,05 <sup>b</sup>	46,81
IgY anti- ECET (PEG 6000)	0,68 ± 0,78 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,07 <sup>b</sup>	28,38
IgY CONTROL (PEG 6000)	0,94 ± 0,63 <sup>b</sup>	0,44 ± 0,59 <sup>b</sup>	17,21

Los resultados están expresados como la media ± desvío estándar de tres ensayos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Mediante el método de dilución en agua se logró una concentración de proteínas totales significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ) a la obtenida por el método de PEG 6000. La concentración de IgY anti-ECET por el método de dilución en agua fue significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) que la obtenida utilizando PEG (1,6 y 0,19 mg IgY/mL de yema respectivamente). La IgY obtenida por el método de dilución en agua presentó una pureza relativa superior (58,19 %) que la alcanzada con el método de PEG (28,38 %) (tabla 10).

La concentración de proteínas, IgY total y pureza relativa en la fracción liofilizada obtenida por ambos métodos se observa en la tabla 11.

Tabla 11: Valores de proteínas, IgY y pureza en la fracción liofilizada

Método de purificación de la IgY	Proteínas (mg/mL yema)	IgY (mg/mL yema)	Pureza relativa (%)
IgY anti- ECET (DILUCION EN AGUA)	754,43 ± 14,5 <sup>a</sup>	330,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	43,78
IgY CONTROL (DILUCION EN AGUA)	530,21 ± 24,5 <sup>b</sup>	154,92 ± 0,1 <sup>b</sup>	29,22
IgY anti- ECET (PEG 6000)	724,86 ± 21,3 <sup>a</sup>	60,02 ± 0,1 <sup>c</sup>	8,02
IgY CONTROL (PEG 6000)	146,37 ± 9,8 <sup>c</sup>	9,87 ± 0,6 <sup>d</sup>	6,74

Los resultados están expresados como la media ± desvío estándar de tres ensayos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).



Como puede observarse en la tabla 11 la concentración de proteínas totales en la muestra de IgY anti-ECET fue similar con los dos métodos de purificación utilizados. Sin embargo, la concentración de IgY total para la muestra de IgY anti-ECET obtenida por el método de dilución en agua fue significativamente mayor ( $330,3 \pm 0,7$  mg/g) comparada con la IgY específica obtenida por el método de PEG. Se puede observar también una diferencia marcada en la concentración de proteínas entre la IgY anti-ECET y la IgY control purificadas por el método de dilución en agua.

Otro hecho notable es que luego del proceso de liofilización se altera de alguna manera la IgY, disminuyendo la pureza del producto. La pureza para el método de dilución en agua fue de 58,19 % en la fracción soluble, mientras que en la fracción liofilizada fue de 43,78 %.

## 5.8) DETERMINACIÓN DE LA PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DE LA IgY

### 5.8.1) DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE IgY POR SDS-PAGE Y DE LA CONCENTRACIÓN DE IgY POR DENSITOMETRÍA

Con respecto a la evaluación de pureza, ambos métodos de purificación probaron ser efectivos. Esto pudo evidenciarse a través del SDS-PAGE y Western blot (figura 17) donde se observan la cadena pesada (67 KDa) y la cadena liviana (28 KDa) de la IgY. La densitometría de bandas reveló un valor de 0,13 mg de IgY/mg proteína para la IgY purificada por el método de dilución en agua y 0,16 mg IgY/mg proteína para la IgY purificada por el método de PEG.

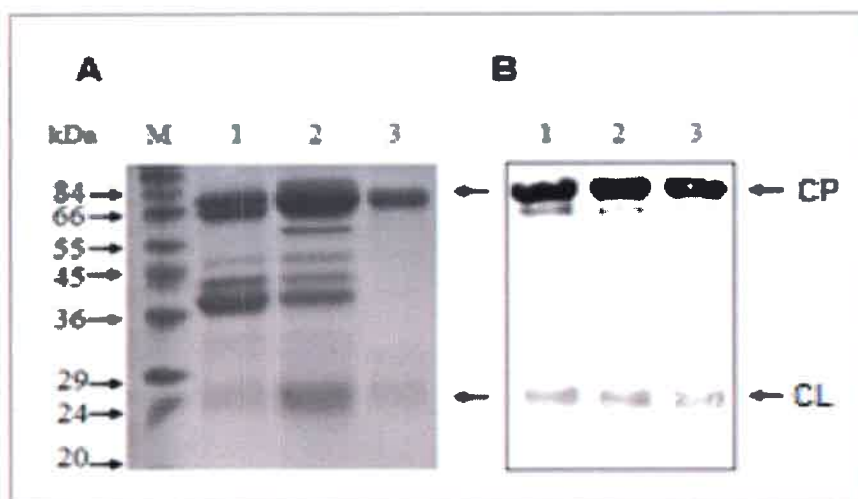


Figura 17: A) SDS-PAGE de la IgY purificada por dos métodos diferentes. Calles: M: marcador de peso molecular, 1: IgY purificada por el método de dilución en agua, 2: IgY purificada por el método de polietilenglicol, 3: IgY patrón. B) Western blot de la IgY purificada por ambos métodos. CP: cadena pesada de la IgY (67kDa), CL: cadena liviana de la IgY (28kDa).

### 5.8.2) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y ACTIVIDAD DE LA IgY POR ELISA

Los resultados de la concentración y actividad específica de la IgY determinadas por ELISA se observan en la tabla 12.

Tabla 12: Concentración y actividad específica de IgY determinadas por ELISA

IgY	Proteínas (mg/g)	IgY total (mg/g)	Título de la IgY
IgY anti-ECET	686,2 ± 58,6	195,3 ± 1,7*	1:100000*
IgY control	556,1 ± 42,4	114,2 ± 3,4	1:1000

Los resultados están expresados como la media ± desvío estándar de tres ensayos independientes. \* Indica diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre ambos grupos.

Con respecto a la concentración, no se encontraron diferencias significativas para las proteínas entre ambas muestras. Sin embargo, la muestra de IgY anti-ECET presentó una concentración significativamente mayor de IgY total. El límite de detección para la IgY total fue de 12,54 ng/mL.

Con respecto a la actividad específica, el título de la IgY anti-ECET fue tres órdenes de magnitud mayor (1:100000) que el de la IgY control (1:100)

### 5.9) FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO CON QUITOSANO Y SU CARACTERIZACIÓN

La funcionalización de los nanotubos de carbono con quitosano permitió su dispersión en la solución acuosa ácida, mejorando las propiedades de solubilidad (figura 18-A).

En la figura 18-B se puede observar la caracterización, mediante espectros FTIR, de los nanotubos funcionalizados con quitosano (NTC-QTS), de los nanotubos solos (NTC) y del quitosano solo (QTS). Se puede observar la aparición de bandas adicionales en el espectro de los nanotubos funcionalizados con quitosano (NTC-QTS). La banda de absorción fuerte alrededor de  $1410 \text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento C=O simétrico del ácido carboxílico desprotonado, y el fuerte pico que aparece a  $1654 \text{ cm}^{-1}$  es debido al tramo C=O de la amida. Estos resultados demuestran que los grupos -COOH de los NTC oxidados reaccionaron con los grupos -NH<sub>2</sub> del quitosano para formar -NHCO.

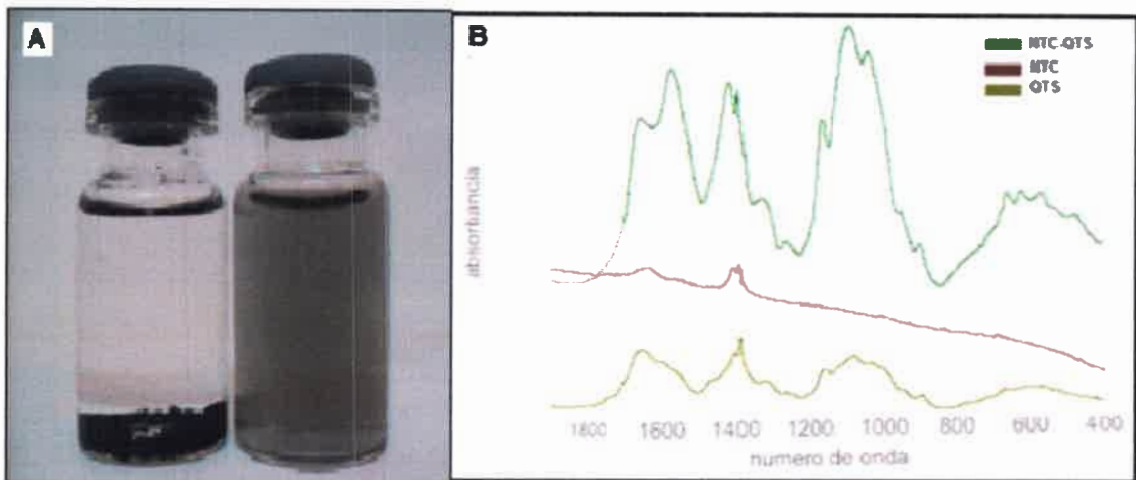


Figura 18: (A) Nanotubos de carbono sin funcionalizar (izquierda) y funcionalizados con quitosano (derecha). (B) Espectros FTIR de nanotubos funcionalizados con quitosan (NTC-QTS: verde), nanotubos solos (NTC: rojo) y quitosan sólo (QTS: marrón).

### 5.10) SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES pH-SENSIBLES

Las variaciones del tamaño de los hidrogeles a los diferentes pH se observan en la tabla 13. Los hidrogeles del grupo B y C no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de la partícula a los diferentes pH. Los hidrogeles del grupo A (relación equimolar de los monómeros), en cambio, presentaron una altura y diámetro significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) cuando se incubaron en la solución tampón a  $\text{pH} = 2,2$  en comparación con los otros pH.

Tabla 13: Tamaño de los hidrogeles incubados en soluciones tampones a diferentes pH

	Hidrogel (AAc:AAM)	pH= 2,2	pH= 5,5	pH= 7,4	pH= 10
Altura (mm)	A (1:1)	1,8 ± 0,6*	4,1 ± 0,3	4,3 ± 0,6	5,7 ± 0,8
	B (0,5:1)	3,0 ± 0,3	5,1 ± 0,3	5,3 ± 0,6	6,3 ± 1,2
	C (2:1)	3,2 ± 0,6	5,2 ± 1,2	5,7 ± 1,5	6,0 ± 1,0
Diámetro (mm)	A (1:1)	3,5 ± 0,2*	9,1 ± 0,3	9,3 ± 0,6	11,8 ± 0,3
	B (0,5:1)	4,6 ± 0,1	10,1 ± 0,9	10,3 ± 1,2	11,5 ± 0,9
	C (2:1)	6,3 ± 0,6	9,8 ± 0,1	10,0 ± 0,1	11,5 ± 0,1

Los datos son presentados como la media ± desvío estándar. \* Indica diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). AAc: ácido acrílico. AAm: acrilamida.



Con respecto al porcentaje de hinchamiento, se observó que los hidrogeles de los 3 grupos se comportaron de manera similar en las soluciones tampones a pH= 5,5 - 7,4 y 10,0. Sin embargo, dicho porcentaje fue significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) en los hidrogeles del grupo A (relación 1:1 de los monómeros) luego de la incubación en la solución tampón a pH= 2,2 (tabla 14).

Tabla 14: Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles.

Tipo de hidrogel (AAm: AAC)	pH= 2,2	pH= 7,4	pH= 10
<b>A (0,5:1)</b>	66,82 $\pm$ 1,46 <sup>b</sup>	99,33 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	99,50 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
<b>B (1:1)</b>	57,05 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>	99,19 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	99,31 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
<b>C (2:1)</b>	89,56 $\pm$ 9,50 <sup>c</sup>	99,57 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	99,50 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>

Los datos son presentados como media  $\pm$  desvío estándar ( $n = 3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Test de Kruskal-Wallis, Infostat, 2009.

#### 5.11) INCORPORACIÓN DE IgY EN LOS HIDROGELES pH-SENSIBLES

Luego de la incubación de los hidrogeles con la solución de IgY se apreció un aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) en el peso y la altura de los mismos (tabla 15). La concentración de proteínas en la solución fue menor y la concentración de IgY disminuyó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) al finalizar el ensayo. Estos resultados indicarían que la IgY se incorporó eficientemente al hidrogel. El porcentaje de incorporación fue de 75,9% (es decir que el hidrogel incorporó el 75,9% de su peso en IgY)

Tabla 15: Características de los hidrogeles y de la solución de IgY durante el ensayo de incorporación

Hidrogeles	$t_{0hs}$	$t_{96hs}$
<b>Peso (g)</b>	0,0300 $\pm$ 0,0076	0,0528 $\pm$ 0,0081*
<b>Altura (mm)</b>	4,13 $\pm$ 0,63	7,41 $\pm$ 1,20*
<b>Diámetro (mm)</b>	3,00 $\pm$ 0,11	3,43 $\pm$ 0,28
Solución de IgY	$t_{0hs}$	$t_{96hs}$
<b>Proteínas (mg/mL)</b>	99,3 $\pm$ 0,30	93,2 $\pm$ 13,2
<b>IgY (mg/mL)</b>	89,6 $\pm$ 0,10	80,3 $\pm$ 1,1*

Los datos son presentados como media  $\pm$  desvío estándar de tres ensayos independientes. \*Indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Para completar la caracterización de la incorporación de la IgY en los hidrogeles se realizó espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR). La figura 19 muestra los espectros FTIR de los hidrogeles conteniendo IgY (hidrogel-IgY), hidrogeles solos





(hidrogel) e IgY sola (IgY). En el espectro FTIR del hidrogel solo es posible observar una banda amplia a  $3437\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento N-H de las amidas secundarias. Las bandas a  $2974$  y  $2881\text{ cm}^{-1}$  se asignan al estiramiento simétrico y asimétrico de  $-\text{CH}_3$ . La banda a  $1670\text{ cm}^{-1}$  es debido a la vibración del estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  de la banda amida I, mientras que la banda a  $1576\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al movimiento de flexión N-H de la banda amida II. El espectro FTIR del hidrogel-IgY muestra un pico amplio en  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  y un pico intenso en  $1130\text{ cm}^{-1}$  en comparación con los picos respectivos del hidrogel solo y de la IgY sola. Esto evidenciaría que la IgY interactúa con el hidrogel mediante enlaces de hidrógeno prolongados.

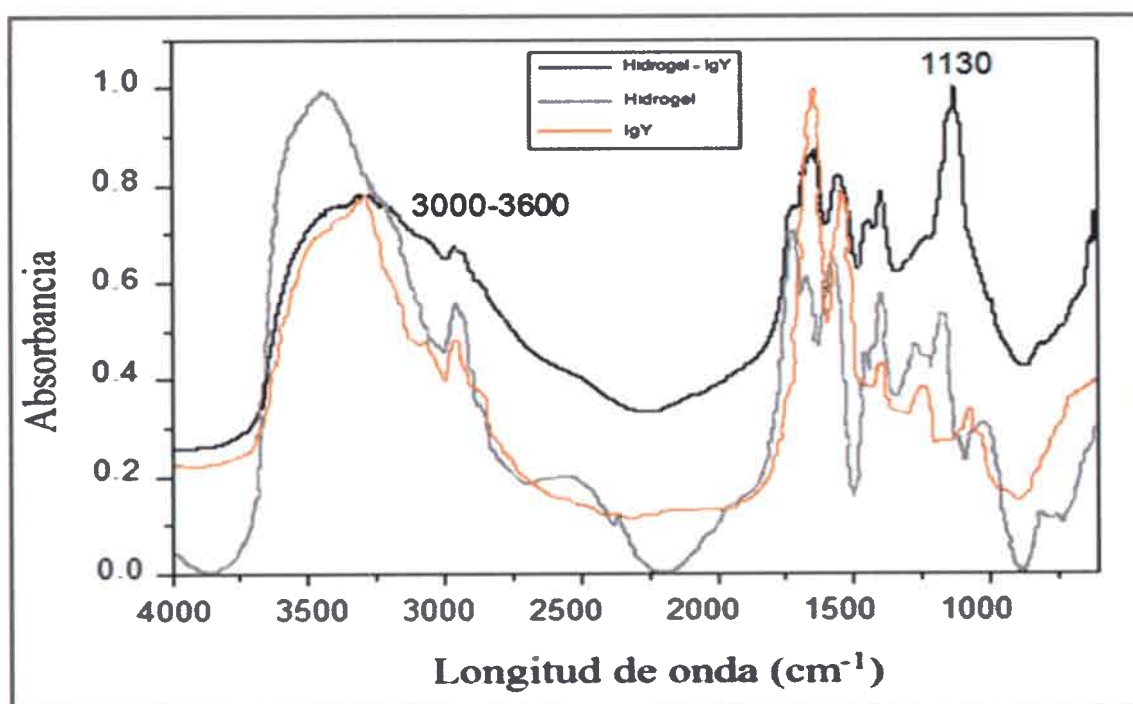


Figura 19: Espectros FTIR correspondientes al hidrogel-IgY (negro), al hidrogel sólo (gris) y a la IgY sola (naranja).

#### 5.12) ESTABILIDAD *IN VITRO* DE LA IgY EN LOS FLUIDOS SIMULADOS

Los hidrogeles, con la IgY en su interior, aumentaron levemente su volumen cuando fueron incubados en el fluido gástrico simulado (FGS) y liberaron parte de su contenido. Sin embargo, la liberación de la IgY específica durante la incubación en el FGS (3,6 %) fue menor a la encontrada durante la incubación en fluido intestinal simulado (FIS) (26,6 %) (figura 20). La velocidad de liberación de la IgY fue de  $0,03\text{ mg IgY/mL.h}$  en el FGS y de  $0,19\text{ mg IgY/mL.h}$  en el FIS.

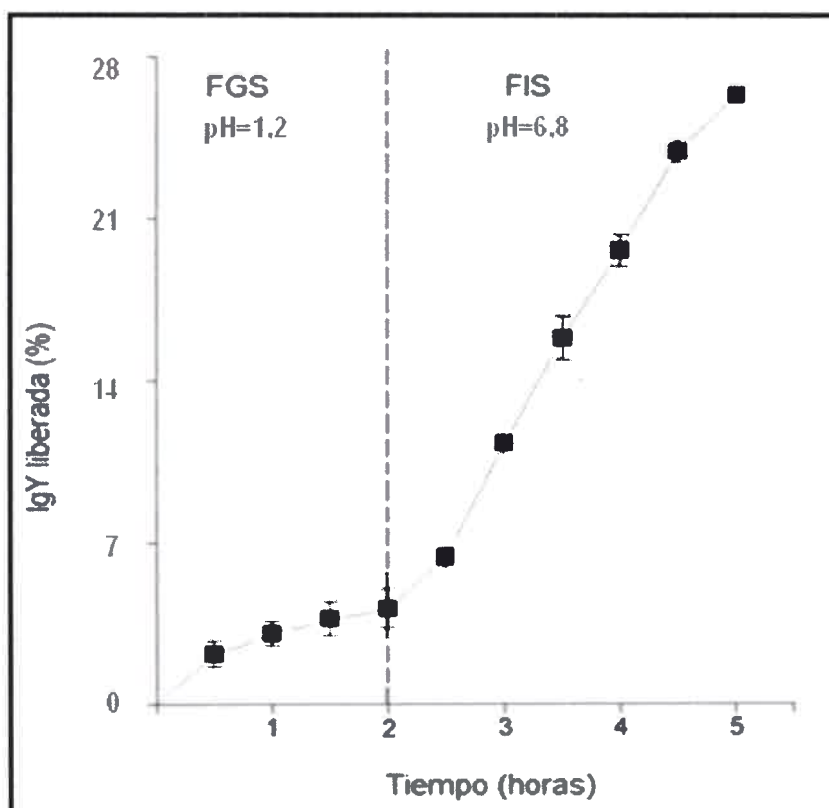


Figura 20: Porcentaje máximo de IgY liberada en el fluido gástrico simulado (FGS): 3,6 % (0,73 mg IgY/ mL) y en el fluido intestinal simulado (FIS): 26,6 % (5,32 mg IgY/ mL).

Para analizar si la concentración influía en la incorporación y liberación de la IgY, se repitieron dichos ensayos con diferentes concentraciones de IgY. El porcentaje de hinchamiento y el contenido de agua de los hidrogeles fueron evaluados en soluciones con 1- 5 y 10 mg IgY/mL. Se observó que los hidrogeles incubados en la solución de 1 mg IgY/mL presentaron un mayor porcentaje de hinchamiento y contenido de agua (tabla 16).

Tabla 16: Variaciones en el porcentaje de hinchamiento y contenido de agua de los hidrogeles incubados con distintas concentraciones de IgY

Concentración de IgY (mg/mL)	Porcentaje de hinchamiento (%)	Contenido de agua (%)
1	99,43 ± 0,08 <sup>b</sup>	17504,07 ± 2145,14 <sup>b</sup>
5	99,20 ± 0,02 <sup>ab</sup>	12391,25 ± 331,05 <sup>ab</sup>
10	99,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	11067,18 ± 703,23 <sup>a</sup>

Los datos son presentados como media ± desvío estándar de tres ensayos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas (p< 0,05).

Con respecto al porcentaje de incorporación y liberación de la IgY, se observó que estos parámetros fueron mayores cuando los hidrogeles fueron incubados en la solución con mayor concentración de IgY (10 mg/mL) (tabla 17).

Tabla 17: Porcentaje de incorporación y liberación de la IgY en hidrogeles incubados con distintas concentraciones de IgY.

Concentración de IgY (mg/mL)	Porcentaje de incorporación (%)	mg IgY/pastilla de hidrogel	Porcentaje de liberación (%)	mg IgY/pastilla de hidrogel
1	15,32 ± 3,17 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,21 <sup>a</sup>	11,15 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>b</sup>
5	45,79 ± 4,70 <sup>b</sup>	3,13 ± 0,15 <sup>b</sup>	7,19 ± 1,44 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,21 <sup>a</sup>
10	88,90 ± 8,92 <sup>c</sup>	5,53 ± 0,57 <sup>c</sup>	12,82 ± 2,68 <sup>c</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>c</sup>

Los datos son presentados como media ± desvío estándar de tres ensayos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.13) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE IgY FRENTE A LA DIARREA POR *E. coli* EN UN MODELO TERNERO

Los resultados de los diferentes parámetros clínicos asociados a la diarrea observados diariamente en cada grupo experimental de terneros, se resumen en la tabla 18. Después de la inoculación con ECET, el 50 % de los terneros tratados con IgY anti-ECET encapsulada fueron protegidos contra la diarrea. Los animales que desarrollaron diarrea lo hicieron de una forma leve y sin mostrar ningún grado de deshidratación. En dichos animales, los hidrogeles conteniendo la IgY no llegaron al intestino, sino que fueron encontrados en los pre-estómagos. La duración y la gravedad de la enfermedad se redujo significativamente en comparación con el grupo de animales inoculados que no recibieron tratamiento con IgY. El 100 % de los animales inoculados que recibieron tratamientos con la IgY control encapsulada y la IgY anti-ECET libre no presentaron diarrea. Por otra parte, el 100 % de los terneros inoculados que no recibieron ningún tratamiento desarrollaron diarrea, con inicio rápido de los signos clínicos, con mayor duración y grado de deshidratación leve. En el grupo control sin inocular, sólo un animal (25 %) presentó diarrea leve y sin ningún grado de deshidratación.



Tabla 18: Parámetros asociados a la diarrea observados en cada grupo experimental

Grupos (n=4)			Diarrea				Grado de deshidratación
			(SI/NO)	Duración	Consistencia	Deposic/día	
Inoculados	IgY anti-ECET Encapsulada	1	No	-	-	1	Ninguno
		2					
		3	Si	2 días	Líquida/ Semi-líquida	2	
		4					
	IgY control Encapsulada	1	No	-	-	1	Ninguno
		2					
		3					
		4					
	IgY anti-ECET Libre	1	No	-	-	1	Ninguno
		2					
		3					
		4					
	Sin IgY	1	Si	3 días	Líquida/ Semi-líquida	3 - 5	Leve
		2					
		3					
		4					
Control	1	No	-	-	1	Ninguno	
	2						
	3						
	4	Si	2 días	Líquida/ Semi-líquida	2	Ninguno	

La relación entre la presencia de diarrea y la ganancia de peso observada en cada grupo experimental de terneros, se observa en la tabla 19. Los terneros inoculados y tratados con IgY mostraron un aumento en el peso corporal en comparación con los animales que no fueron tratados. El grupo control presentó la mayor ganancia de peso.





Tabla 19: Ganancia de peso en cada grupo experimental

Grupos (n=4)		Diarrea	Ganancia de peso (gramos)			
Inoculados	IgY anti-ECET Encapsulada	1	No	+650	675,00 ± 35,36 b,c	
		2		+700		
		3	Si	-300		-525,00 ± 318,20 a,b
		4		-750		
	IgY control Encapsulada	1	No	+700	162,50 ± 573,55 a,b,c	
		2		+600		
		3		-200		
		4		-450		
	IgY anti-ECET Libre	1	No	+300	50,00 ± 479,58 a,b,c	
		2		+600		
		3		-300		
		4		-400		
	Sin IgY	1	Si	-300	-612,50 ± 317,21 a	
		2		-500		
		3		-600		
		4		-1050		
Control	1	No	+1300	1016,67 ± 275,38 c		
	2		+1000			
	3		+750			
	4	Si	-1600	-1600,00 ± 0,00 a		

Los datos se expresan como la media ± el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p= 0,0185$ ).

El recuento de leucocitos totales y la fórmula relativa (%) de cada ternero fue determinado en muestras de sangre tomadas en el momento del sacrificio de los animales (tabla 20). La mayoría de los terneros presentaron predominio de linfocitos en el análisis de las muestras de sangre y sólo algunos animales mostraron una marcada neutrofilia.



Tabla 20: Recuento leucocitario en sangre tomada al momento del sacrificio de los terneros

Grupo/ Ternero	Leucocitos totales/cm <sup>3</sup>	Fórmula Relativa (%)						Predominio			
		Linfocitos*		Neutrófilos*		Eo	Mo		Ba		
Inoculados	IgY anti-ECET Encapsulada	1	7550	39	38,00 ± 2,58 a	57	60,00 ± 2,94 b	3	1	0	Neutrófilos
		2	11650	35		63		0	2	0	
		3	7350	41		58		0	1	0	
		4	11450	37		62		1	0	0	
	IgY control Encapsulada	1	11350	68	60,00 ± 6,48 b	30	38,25 ± 6,65 a	0	2	0	Linfocitos
		2	8300	53		45		0	2	0	
		3	7350	57		42		0	1	0	
		4	10450	62		36		2	0	0	
	IgY anti-ECET Libre	1	11050	44	52,50 ± 8,19 b	55	45,75 ± 9,07 a	0	1	0	Linfocitos
		2	8350	47		52		1	0	0	
		3	7650	59		37		1	3	0	
		4	11000	60		39		0	1	0	
	Sin IgY	1	7350	56	48,75 ± 11,56 ab	41	49,00 ± 11,11 ab	1	2	0	Linfocitos
		2	7850	61		38		0	1	0	
		3	10450	37		60		0	3	0	Neutrófilos
		4	8350	41		57		2	0	0	
Control	1	11350	54	56,00 ± 5,48 b	44	42,00 ± 4,32 a	1	1	0	Linfocitos	
	2	11800	50		46		1	3	0		
	3	7350	57		42		0	1	0		
	4	8150	63		36		0	1	0		

\*Los datos se expresan como la media ± el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p=0,0185$ ). Eo: eosinófilos. Mo: monocitos. Ba: basófilos.

Se recuperó la ECET en todos los animales de los grupos inoculados. Un ternero inoculado con *E. coli*, que no recibió tratamiento con IgY, presentó además una infección concomitante con *Cryptosporidium* spp (figura 21). En todos los animales diarreicos se observaron la cola y los cuartos posteriores manchados con materia fecal, y la diarrea fue amarillenta líquida y semilíquida (figura 22).

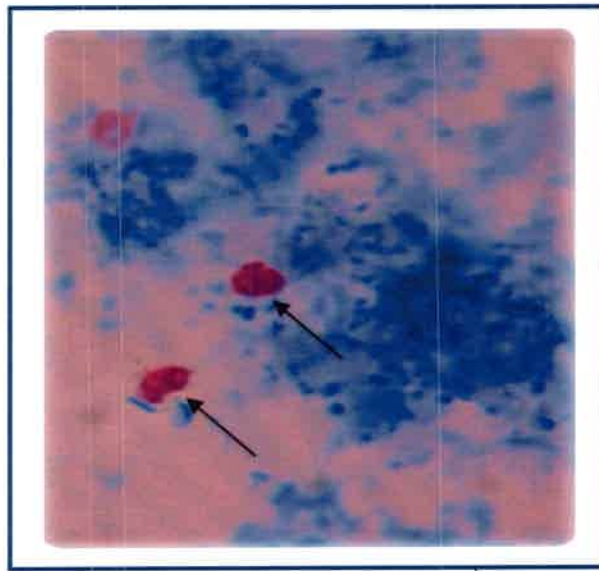


Figura 21: Infección concomitante de *E. coli* y *Cryptosporidium* spp. (flecha) en un ternero que no recibió tratamiento con IgY.

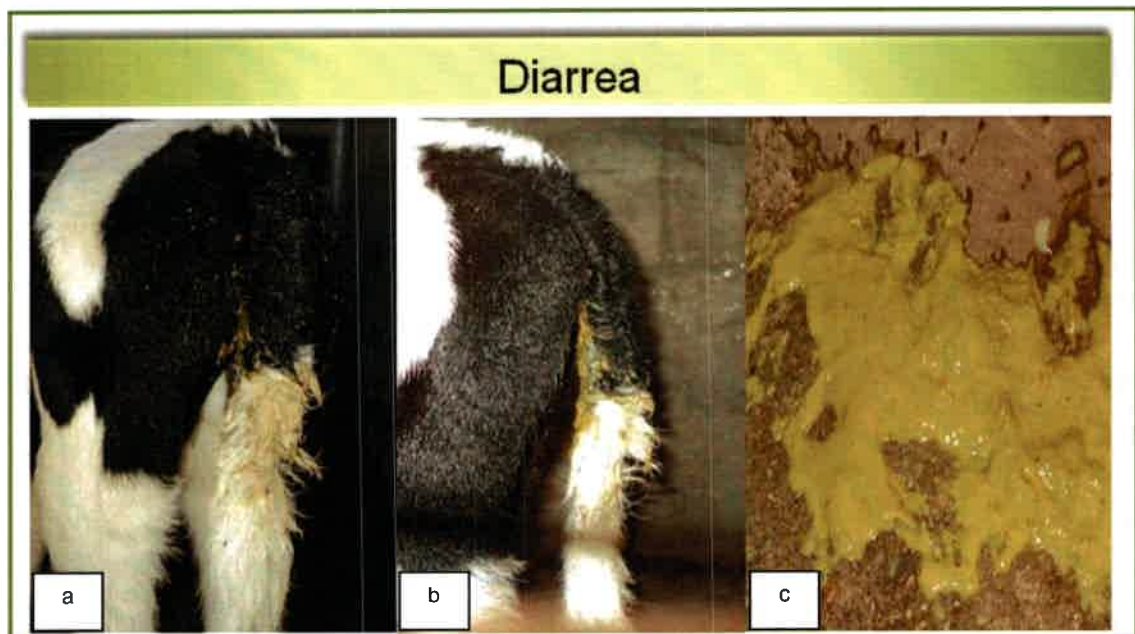


Figura 22: Cola y cuartos posteriores de los animales diarreicos manchados con materia fecal (a y b). Materia fecal amarillenta líquida- semilíquida observada en los animales con diarrea (c).

Los hallazgos encontrados en la necropsia mostraron órganos macroscópica y morfológicamente normales en aquellos animales que no presentaron diarrea, e intestinos con mucosas congestivas, contenido amarillento y presencia abundante de gas en los animales con diarrea (figura 23).



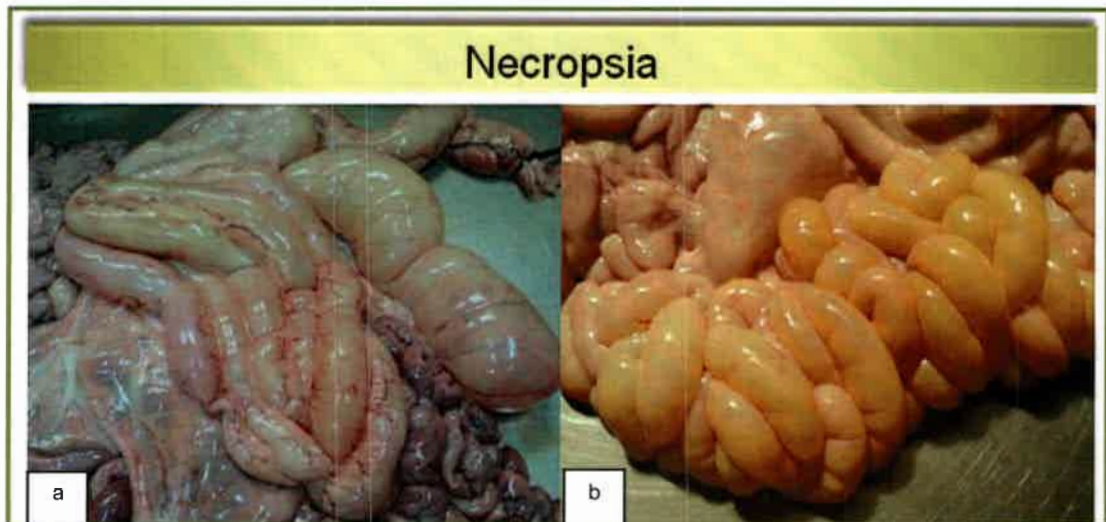


Figura 23: Intestinos de terneros con diarrea, donde se observan las mucosas congestivas, el contenido intestinal amarillento y la presencia de abundante gas (a y b).

#### 5.14) HISTOLOGÍA DE LOS CORTES DE INTESTINO PARA OBSERVAR PROCESOS INFLAMATORIOS

En el análisis microscópico de los preparados histológicos de intestino teñidos con hematoxilina/eosina (H/E), no se observó atrofia o necrosis de las vellosidades, ni aumento de las células inflamatorias, ni presencia de reacción inflamatoria en ninguno de los grupos estudiados. En las figuras 24 y 25 se observa que las mucosas del duodeno y yeyuno-íleon del grupo desafiado con ECET y tratado con IgY anti-ECET encapsulada presentaron una histología normal, aún en aquellos animales con diarrea, no encontrándose diferencias con los demás grupos estudiados.

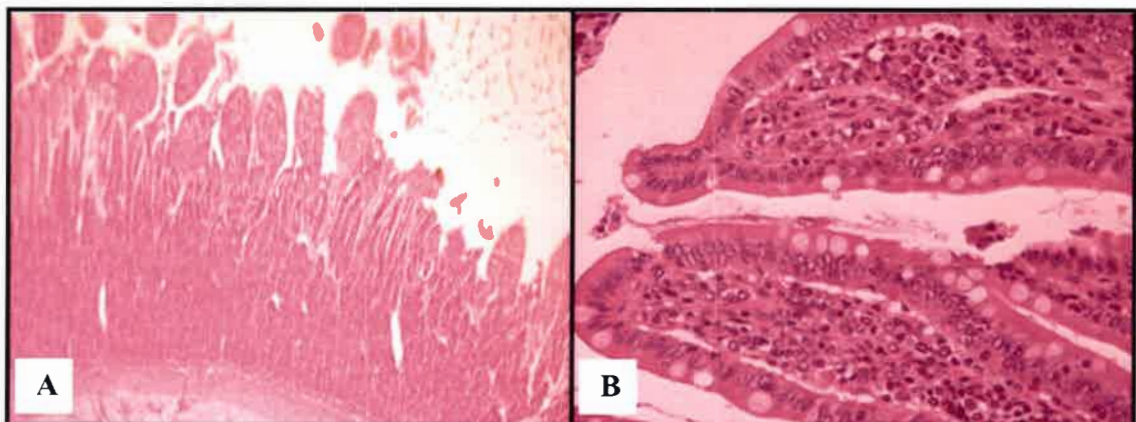


Figura 24: Microfotografías representativas de la mucosa duodenal de los terneros desafiados con ECET y tratados con IgY anti-ECET. Hematoxilina-Eosina 40x (A) y 400x (B).



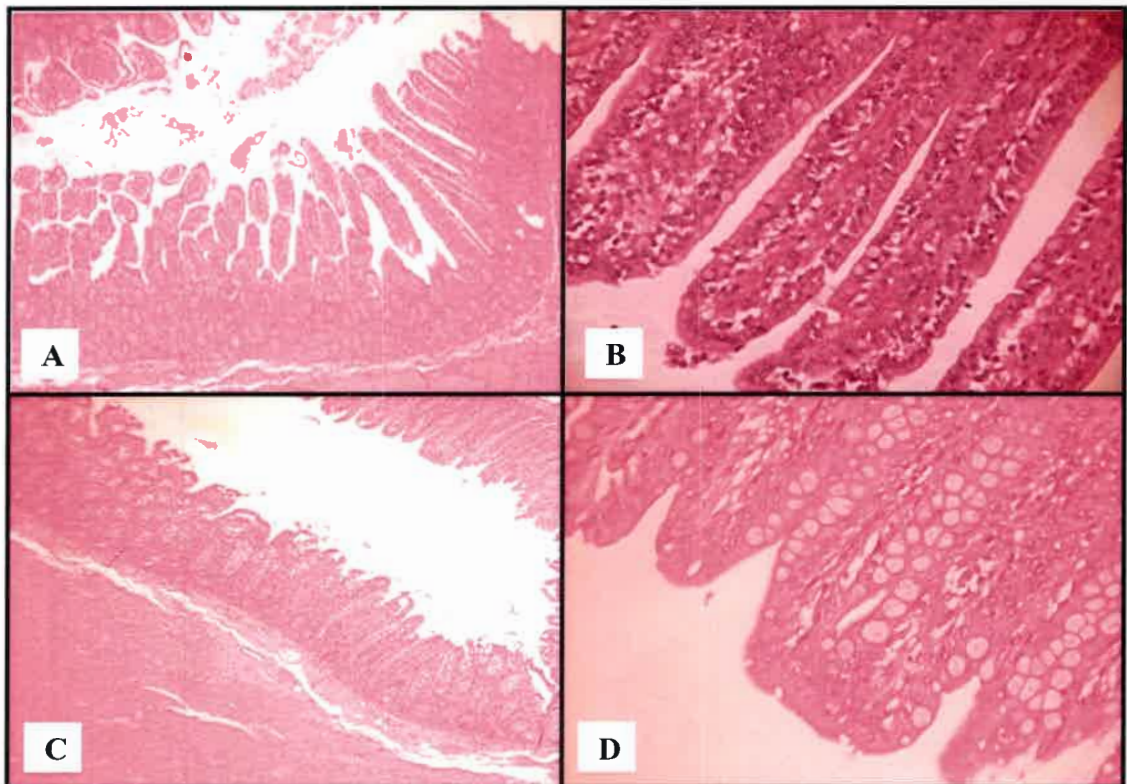


Figura 25: Microfotografías representativas de la mucosa del yeyuno-íleon 40x (A) y 400x (B) y del colon 40x (C) y 400x (D) de los terneros desafiados con ECET y tratados con IgY anti-ECET. Hematoxilina-Eosina.

Con respecto a la evaluación de la degranulación de mastocitos realizada en los preparados histológicos de intestino teñidos con azul de toluidina (figura 26), el grupo desafiado con ECET y tratado con IgY anti-ECET encapsulada no presentó diferencias en cuanto al porcentaje de mastocitos degranulados y no degranulados con respecto a los demás grupos estudiados (figura 27).

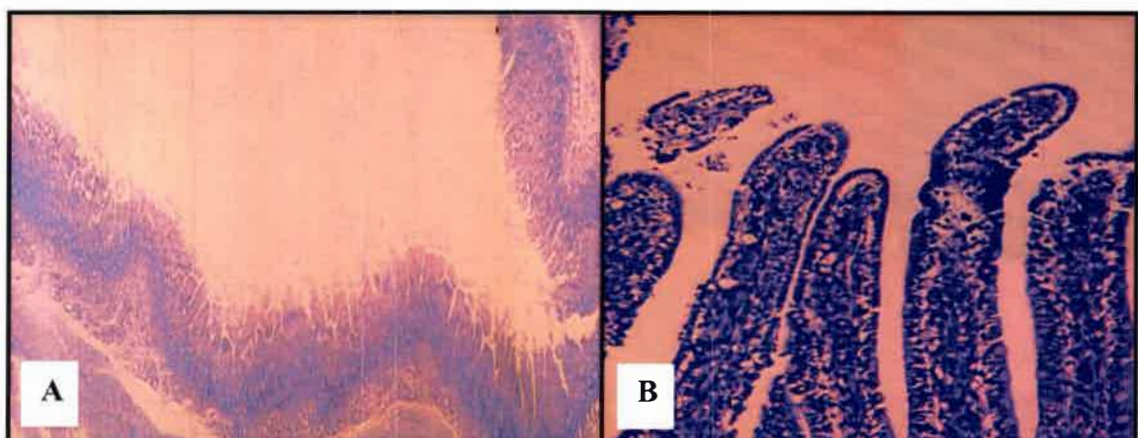


Figura 26: Microfotografías representativas de la mucosa duodenal de los terneros desafiados con ECET y tratados con IgY anti-ECET 40x (A) y 400x (B). Azul de toluidina.



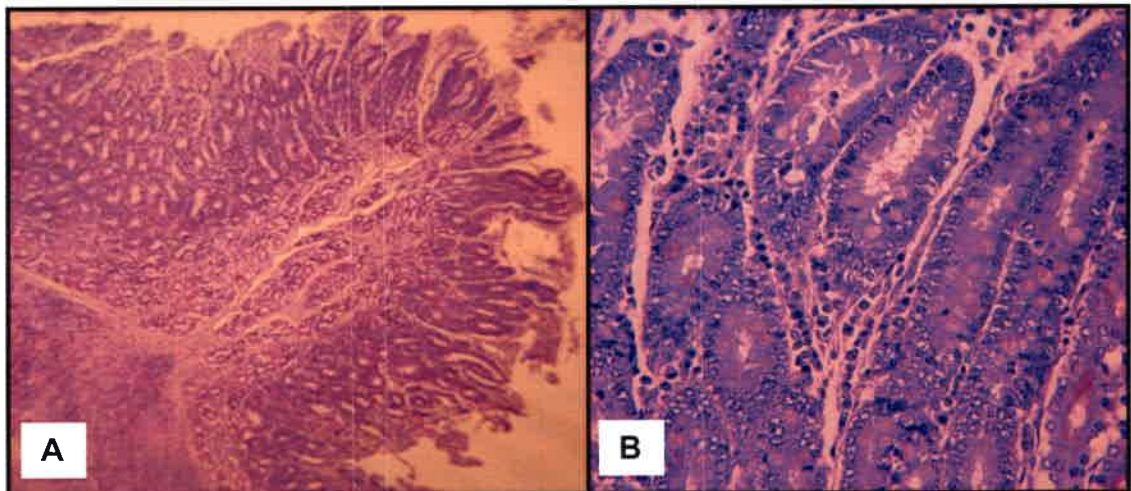


Figura 27: Microfotografías representativas de la mucosa del yeyuno-íleon de los terneros desafiados con ECET y tratados con IgY anti-ECET 100x (A) y 400x (B). Azul de toluidina

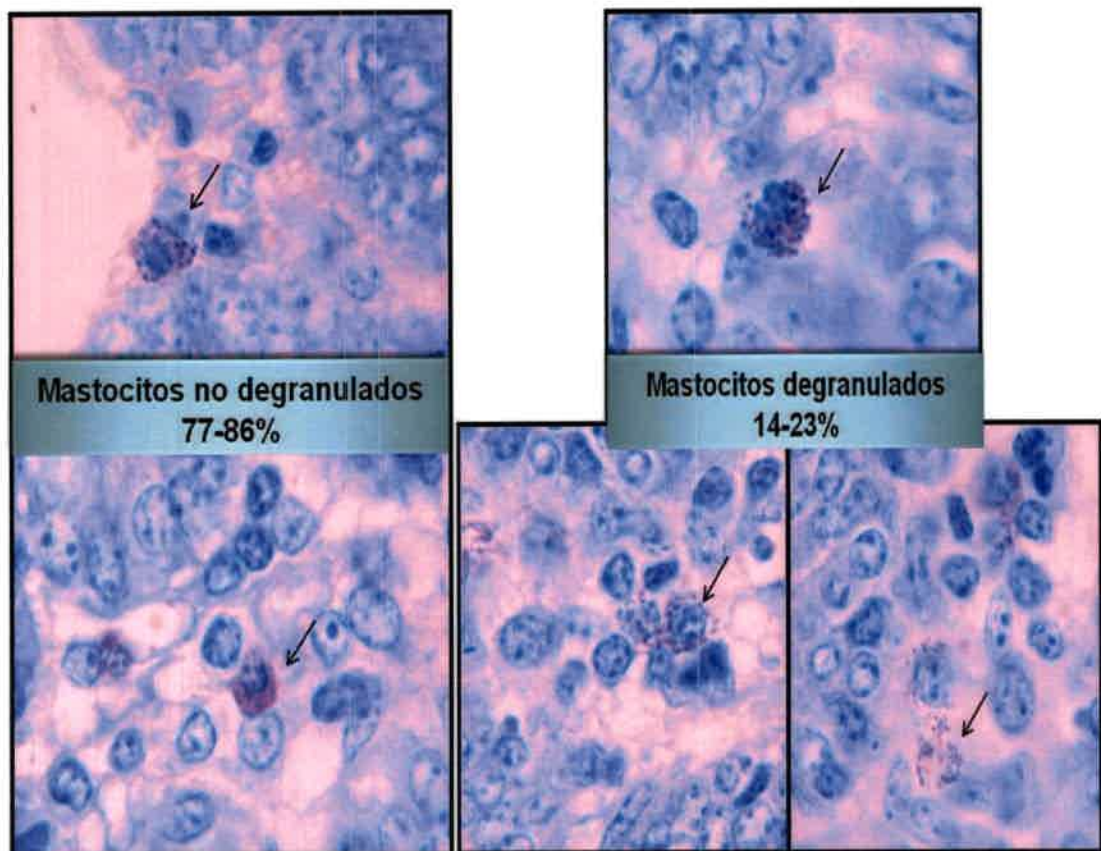


Figura 28: Microfotografías representativas de la lámina propia intestinal de terneros desafiados con ECET y tratados con IgY anti-ECET. Mastocitos (flecha) no degranulados (izquierda) y degranulados (derecha). Azul de toluidina (1000x).



## **DISCUSIÓN**



## **6) DISCUSIÓN**

### **6.1) PREVALENCIA DE DIARREA, AGENTES ETIOLÓGICOS Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS**

La diarrea es un problema frecuente y creciente en terneros jóvenes, sobre todo durante las primeras semanas de vida. No sólo causa enfermedad y mortalidad, sino que también puede producir disminución en el crecimiento y desarrollo de los terneros y en las hembras retrasos en la edad de la primera parición. En este estudio, la prevalencia de diarrea varió marcadamente entre un 0 % y 74 % en los distintos establecimientos muestreados, con una mediana de 35,7 %. En un trabajo anterior realizado en Argentina se demostró una prevalencia promedio de diarrea del 27,9 % (Barrandeguy y cols., 1988), mientras que en otros países se reportaron prevalencias del 19,1 % (Dohoo y cols., 2003), 28,5 % (Wieler y cols., 2002), 39,1 % (Bartels y cols., 2010) y 90 % (Von Buenau y cols., 2005). Las variaciones de estos valores podrían deberse a características de la región geográfica, a las condiciones de manejo y a los parámetros diagnósticos que definen la diarrea en cada estudio.

Los factores de riesgo que están implicados en la etiología de la diarrea neonatal bovina son diversos, incluyendo condiciones de manejo y ambientales (Lundborg y cols., 2005). La identificación de estos factores es importante para comprender las variables que pueden ser controladas para reducir la propagación de agentes patógenos. Estudios previos (Schumman y cols., 1990; Clement y cols., 1995; Sivula y cols., 1996; Svensson y cols., 2003; Lorino y cols., 2005) han demostrado la asociación entre la diarrea y los diferentes factores de riesgo. En este estudio se analizaron diferentes factores (prácticas de manejo específicas, características de los animales y del rodeo) hipotetizados como incrementadores de la prevalencia de diarrea. En contraste con lo reportado por otros autores, ninguna de las variables analizadas se asoció significativamente con la diarrea. Como consecuencia de ello, no fue posible construir un análisis multivariado. Estos resultados sugieren que tanto el microorganismo patógeno como el huésped podrían estar más influenciados por la transmisión que por las condiciones ambientales y de manejo.

Con respecto a los principales agentes enteropatógenos que causan diarrea, *E. coli*, Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium parvum* y *Salmonella* spp. se han reportado en el 75-95 % de los casos de infecciones intestinales en terneros jóvenes (García y cols., 2000; Luginbühl y cols., 2005; Gulliksen y cols., 2009; Bartels y cols., 2010; Tiranti y cols., 2011; Torsein y cols., 2011). *E. coli* patógena parecería tener menor importancia en las poblaciones investigadas cuando es comparada con otros





enteropatógenos, ya que es diseminada durante un corto período de tiempo con una baja prevalencia. Sin embargo, juega un papel importante en la aparición de la diarrea neonatal, y su incidencia e impacto sobre la morbilidad y/o mortalidad del ternero recién nacido suelen ser relativamente altas (Bendali y cols., 1999; Bartels y cols., 2010). En este trabajo, se encontró una prevalencia de *E. coli* patógena del 30,1 %. La presencia de *E. coli* fue alta tanto a nivel de los terneros individuales como a nivel de los tambos muestreados. En Argentina se ha investigado anteriormente el rol de cepas patógenas de *E. coli* aisladas de terneros sanos y diarreicos, encontrándose algunos resultados similares a nuestro trabajo (Odeón 1981; Barrandeguy y cols., 1988), mientras que en otro trabajo (Bellinzoni y cols., 1990) no se encontraron cepas patógenas pues solamente se buscaron por serología cepas de *E. coli* portadoras de la fimbria F5 (K99), sin estudiar genes de patogenicidad u otros atributos de virulencia. En general estas investigaciones se han limitado al estudio de pocos animales y rodeos, fueron realizados hace más de 20 años y no se llevaron a cabo encuestas sobre los factores de riesgo asociados a la diarrea. Al contrario, este estudio de tesis implicó el análisis más detallado de un mayor número de tambos y terneros, registrándose los factores de riesgo asociados con la diarrea neonatal mediante un cuestionario realizado al encargado de cada uno de los tambos visitados.

Por otro lado, estudios previos realizados en los mismos establecimientos reportaron bajas prevalencias de *Cryptosporidium* spp. y Rotavirus, con un 19,3 % y 2,1 % respectivamente (Picco y cols., 2011; Tiranti y cols., 2011). Los resultados de esta tesis demostrarían la importancia de *E. coli* como agente bacteriano productor de diarrea en terneros neonatos de la Cuenca Lechera de Villa María, Córdoba. Cabe señalar que en esta tesis no se emplearon técnicas bacteriológicas de enriquecimiento selectivo ni agares específicos para la búsqueda de animales portadores de salmonelas, de modo que con los métodos empleados su presencia no puede ser descartada.

## 6.2) AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR POR PCR DE *ESCHERICHIA coli* PATÓGENA

En general, las cepas diarreicas de *E. coli* no pueden ser identificadas solamente sobre la base de criterios bioquímicos, ya que son indistinguibles de las cepas de *E. coli* no patógenas. La diferenciación de los patotipos de *E. coli* requiere el uso de técnicas moleculares como la PCR. En este trabajo de tesis, el análisis de los genes de virulencia intestinales de *E. coli* por PCR demostró que el patotipo de *E. coli* más



prevalente en los terneros neonatos muestrados fue ECET (22,4 %). Estos datos concuerdan con lo reportado por otros investigadores (Bendali y cols., 1999; Martin y cols., 2003; Achá y cols., 2004; Nagy y Fekete, 2005; Singh y cols., 2007) quienes consideran a la ECET como el tipo de colibacilosis más frecuente en animales jóvenes, sobre todo en lechones y terneros, lactantes y destetados. La alta circulación de este tipo de cepas afecta la capacidad y la eficiencia productiva de los terneros manejados en condiciones de crianza artificial. Los animales infectados son importantes reservorios de estas cepas patógenas de *E. coli* y sus heces son la mayor fuente de contaminación medioambiental con esta bacteria. ECET es ampliamente diseminada por los animales adultos infectados y es adquirida por los terneros recién nacidos. Existe una inmunidad natural hacia ECET en los terneros neonatos debida a la ingestión del calostro materno (Acres, 1985). Sin embargo, esta inmunidad puede fallar en la protección del animal cuando se aplican ciertas prácticas agrícolas modernas como es por ejemplo el destete precoz. En el hombre, ECET es reconocida como una de las causas más frecuentes de diarrea infantil en los países en desarrollo y como un importante agente causal de la diarrea del viajero (Bouckenooghe y cols., 2002; Dalton y cols., 1999). Sin embargo, debido a la unión especie-específica de las adhesinas, las cepas ECET de los animales no representan un peligro real para el ser humano y no pueden ser consideradas como agentes zoonóticos (Wasteson, 2001; Quadri y cols., 2005).

Los principales factores de colonización o adhesión descritos en cepas bovinas de ECET son F5 (K99), F17 y F41. Se ha informado que el antígeno fimbrial F5 se asocia con la mayoría de cepas ECET responsables de los casos de infección en terneros recién nacidos (Jay y cols., 2004; Varshney y cols., 2007). En este estudio, la prevalencia de ECET F5+ fue de 12,8 %. Younis y cols., (2009) reportaron resultados similares (10,4 %) en Egipto y Pourtaghi y cols., (2013) encontraron que la prevalencia de genes F5, F41 y Sta fue del 14,1 % en Irán. Prevalencias más altas fueron informadas en Francia (Bendali y cols., 1999), en Egipto e Israel (Perka y cols., 2000), y en Mozambique (Achá y cols., 2004) con tasas del 20,3 %, 23 % y 25 % respectivamente. Por el contrario, se reportaron prevalencias menores (3,8 %, 5,8 % y 5,3 %) en la India (Kanwar y cols., 2007), en Brasil (Oliveira, 2007) y en Irán (Shams y cols., 2010) respectivamente. Las diferencias en las prevalencias podrían ser debidas a las variaciones regionales, las condiciones de manejo y de higiene, las técnicas de diagnóstico, el tiempo de muestreo, el número de aislamientos de cada ternero, y la edad de los animales.



Las cepas de *E. coli* productoras de fimbrias F17 causan enfermedad intestinal en animales y seres humanos (Cid y cols., 1999). Contrepois y cols., (1998) informaron que las fimbrias F17 fueron identificadas en cepas bovinas de ECET que también portaban los antígenos fimbriales F5 y F41, y en cepas de *E. coli* no enterotoxigénicas. Además, este autor también reportó que en Francia y Bélgica, la frecuencia de cepas ECET F17+ aisladas de los terneros diarreicos disminuyeron en 1990 en comparación con la década de 1980. Contrariamente a estos resultados, en este trabajo de tesis se encontró que el gen de virulencia más prevalente en los terneros sanos y diarreicos muestreados fue F17 (40,4 %). Ghanbarpour y Oswald (2009) informaron, en Irán, un porcentaje similar (47,4 %) y una prevalencia más baja (20,5 %) en el 2010. Cepas de ECET F17+ se han asociado también con enfermedad extraintestinal, y por lo general muestran otros factores de virulencia asociados con la capacidad de causar septicemia (Cid y cols., 1999). Para confirmar la presencia de cepas ECET septicémicas en los terneros muestreados sería necesario un estudio adicional, por PCR, de los factores de virulencia extraintestinales de *E. coli*.

Las cepas ECET también producen enterotoxinas termolábiles (LT) y termoestables (STa y STb) responsables de la hipersecreción en el lumen intestinal (Andrade y cols., 2012). En este estudio, se encontró que el único gen para enterotoxinas detectado fue el que codifica para STa, mientras que los genes que codifican para LT y STb no se detectaron en ninguna cepa. Estos resultados concuerdan con Nagy y Fekete (2005) y con Vu-Khac y cols., (2007) quienes informaron que STa se expresa en cepas ECET porcinas y bovinas, mientras que LT y STb se expresan predominantemente en cepas ECET porcinas, especie en la que causa la enfermedad de los edemas. Sin embargo, también existen reportes de aislamientos pocos frecuentes de cepas LT+ y STb+ detectadas en vacas y terneros. En China, Huasai y cols., (2012) observaron que el 15,5 % de las cepas ECET aisladas de vacas sanas fueron positivas para LT y ST. En Brasil, Salvadori y cols., (2003) registraron que el 3,9 % de las cepas ECET de terneros diarreicos poseía los genes para ST y LT. Rigobelo y cols., (2006) informaron una tasa de prevalencia de ECET ST+ (25,4 %) y LT+ (13,2 %) en terneros diarreicos. Borriello y cols., (2012) encontraron que todas las cepas ECET aisladas de terneros de búfalo diarreicos, en Italia, poseían el gen LT pero fueron negativos para la detección de ST. Achá y cols., (2004) no detectaron genes para STa en ninguna de las cepas de *E. coli* F5+ que fueron aisladas de terneros diarreicos en Mozambique. La variación entre lo reportado para las enterotoxinas, podría explicarse por el intercambio genético



debido a la presencia de plásmidos de conjugación, los que están ampliamente distribuidos entre las cepas ECET bovinas.

Con respecto a la descripción espacial de los patotipos de *E. coli*, se observó que la alta prevalencia de cepas ECET se encuentra homogéneamente distribuida en el área estudiada. Este patrón de distribución espacial fue similar al reportado por Tiranti y cols., (2011). para *Giardia* spp. en los mismos establecimientos lecheros. Sin embargo, a diferencia de lo reportado por estos autores para *Cryptosporidium* spp., la distribución de las cepas ECET no mostró un agrupamiento principal (cluster) en el área mostrada.

Debido a que las cepas ECET fueron prevalentes en los tambos muestreados, se realizó la inmunización de gallinas con este patotipo.

### 6.3) OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA IgY ANTI- *E. coli* ENTEROTOXIGÉNICA

La utilización de los anticuerpos de yema de huevo (IgY), *in vitro* e *in vivo*, como una alternativa a la terapia antibiótica es un aspecto muy estudiado. La producción de IgY a partir de una baja cantidad de antígeno, la simple recolección de huevos y la fácil purificación, hacen que el uso de este anticuerpo sea cada vez más promisorio (Carlander, 2002). Para lograr que la inmunización de las aves y la obtención de la IgY sean efectivas, se han evaluados diferentes aspectos como son el tipo de adyuvante, la vía de inoculación y el antígeno (Levesque y cols., 2007).

Con respecto al adyuvante utilizado en la inmunización de las gallinas, se sabe que el adyuvante de Freund es uno de los inmunoestimulantes más poderosos, pero es muy reactogénico para ser usado rutinariamente en la producción industrial de IgY. Bollen y Hau (1996) observaron que la capacidad de postura de las gallinas disminuía significativamente cuando eran inmunizadas con adyuvante de Freund completo (CFA). Wanke y cols., (1996) reportaron que la utilización de CFA en aves produce inflamación severa, necrosis y ulceración del tejido en el sitio de inmunización. Aunque el adyuvante de Freund incompleto (IFA) se ha utilizado como sustituto de CFA, el hecho de que se hayan eliminado los componentes micobacterianos para suprimir la necrosis de los tejidos, ha resultado en la disminución de su efecto inmunoestimulante.

Es por ello que los geles con sales de aluminio (hidróxidos o fosfatos) surgen como los adyuvantes más empleados en vacunas utilizadas para inmunizar seres humanos y animales, ya que permiten prolongar el tiempo de interacción entre el antígeno soluble





atrapado, las células presentadoras de antígenos y los linfocitos, sin presentar reacciones adversas pronunciadas (Aguilar Rubido y Leal Angulo, 2000; Marrack y cols., 2009; Ljutic y cols., 2012). En este trabajo se observó que el adyuvante utilizado (gel de hidróxido de aluminio al 7 %) no produjo ningún tipo de alteración en el sitio de inoculación y no afectó la capacidad de postura ni el peso de las gallinas inmunizadas. Con respecto a la vía de inoculación y al antígeno, en este estudio la inmunización se realizó por vía intramuscular y con bacterinas polivalentes inactivadas con formalina. Trampel y Griffith, (1997) encontraron que la administración de bacterinas de *E. coli* con hidróxido de aluminio como adyuvante, no afectó la ganancia de peso en pollos jóvenes. Chang y cols., (1999) demostraron que la inoculación intramuscular del antígeno resultó en niveles más altos de IgY anti-ECET comparado con la inyección por vía subcutánea. Finalmente, Amaral y cols., (2002) observaron que la inactivación de *E. coli* con formalina permitió mantener los antígenos de superficie intactos, y provocó una respuesta inmune eficiente contra muchas fracciones antigénicas.

Para lograr una purificación eficiente de la IgY es necesario poder separarla de las lipoproteínas presentes en la yema del huevo (Hatta y cols., 2008). La concentración de IgY en la yema puede variar y verse afectada por los diferentes métodos de purificación y de cuantificación (Sunwoo y cols., 1996, Sunwoo y cols., 2002; Li y cols., 1998). Los métodos utilizados para la purificación de IgY en este trabajo fueron: el método de polietilenglicol 6000 (PEG) y el método de dilución en agua (DA). La concentración de IgY anti-ECET, de proteínas totales y la pureza obtenidas en la fracción soluble por el método de DA fueron significativamente mayores ( $p \leq 0,05$ ) a las obtenidas por el método de PEG 6000. El grado de pureza de la IgY por el método de DA (58,19 %) fue similar a los resultados obtenidos por Akita y Nakai (1993), demostrando que con este método se obtiene IgY de más alta pureza. El porcentaje restante de la fracción soluble serían  $\alpha$  y  $\beta$ -livetinas y lipoproteínas (Sunwoo y cols., 2002).

La adición de sales como el sulfato de amonio o el sulfato de sodio, ha sido utilizada en estudios previos para precipitar la IgY y mejorar su purificación (Akita and Nakai, 1992; 1993; Woolley and Landon, 1995; Zhen y cols., 2008). En este trabajo de tesis, la IgY fue precipitada con sulfato de sodio posteriormente a su purificación por el método de DA. Como se visualizó en el SDS-PAGE, estos dos procesos permitieron reducir el nivel de impurezas comparado con la purificación por el método de PEG. El método de DA resultó ser un procedimiento simple, rápido y económico. La ventaja de



no utilizar químicos agregados que dejen residuos, hace que este método sea apropiado para la extracción de IgY y permite su producción en gran escala.

Con respecto a la IgY anti-ECET en el polvo liofilizado, la concentración de proteínas totales obtenidas por los dos métodos fue similar. Sin embargo, la concentración de IgY total y la pureza obtenidas por el método de DA fueron significativamente mayores ( $p \leq 0,05$ ) a las obtenidas por el método de PEG 6000. A su vez, la pureza obtenida en el polvo liofilizado fue menor que la encontrada en la fracción soluble. Resultados similares fueron reportados por Mahdavi y cols., (2010) quienes encontraron que la concentración de IgY total y la pureza en el polvo de IgY anti-ECET fueron aproximadamente un 30 % mayor que en el polvo de IgY control, mientras que la pureza fue un 9 % menor que la obtenida en la fracción soluble. Esta disminución en la pureza de IgY podría deberse a la aplicación del propio proceso de liofilización, como lo informó Chansarkar (1998). Sin embargo, la liofilización parece ser el proceso más adecuado para la preparación de IgY en polvo, alcanzando concentraciones más altas y menor humedad en el polvo, si se compara con otros métodos como el secado en spray (Yokoyama y cols., 1992). A su vez, Fu y cols., (2006) reportaron que el proceso de liofilización mostró ser adecuado para conservar la IgY, preservando sus propiedades físicas, su estabilidad térmica y su actividad biológica.

Con referencia a la actividad específica, se encontró que el título de la IgY anti-ECET fue tres órdenes de magnitud mayor (1:100.000) que el de la IgY control (1:100), lo que demuestra el neto efecto logrado mediante la inmunización. También la IgY anti-ECET presentó una concentración significativamente mayor de IgY total, lo que señala que la inmunización no sólo incrementa las IgY específicas sino que genera en el ave una mayor producción de IgY en general debido a la inmuno-estimulación inespecífica lograda por la combinación de los antígenos bacterianos combinados con el gel de hidróxido de aluminio.

#### 6.4) FUNCIONALIZACIÓN DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO CON QUITOSANO Y SU CARACTERIZACIÓN

Los nanotubos de carbono (NTC) son materiales innovadores que pueden utilizarse en sistemas biológicos, pero deben ser funcionalizados para mejorar su biocompatibilidad y solubilidad (Wu y cols., 2008). La mayoría de los métodos de funcionalización de los NTC se logran bajo condiciones fuertemente oxidantes, introduciendo defectos en los nanotubos y comprometiendo las propiedades electrónicas y mecánicas de los mismos. Por el contrario, el método de funcionalización elegido en este trabajo (Liu y



cols., 2005) está basado en el entrecruzamiento de las moléculas de quitosano depositadas sobre la superficie de los NTC y permite preservar las propiedades originales de los NTC. Asimismo esta funcionalización no covalente de los NTC con quitosano permitió su fácil manipulación y aumentó significativamente su dispersión en la solución acuosa. Resultados similares fueron obtenidos en trabajos donde se utilizó el quitosano para funcionalizar a los NTC (Zhang y cols., 2004b; Takahashi y cols., 2005; Castillo León y cols., 2011; Castillo y cols., 2012).

La espectroscopía FTIR permitió corroborar la interacción entre las nanopartículas y el biopolímero, la cual fue evidenciada previamente por Wu y cols., (2007). Los resultados mostraron que los grupos  $-\text{COOH}$  de los NTC oxidados reaccionaron con los grupos  $-\text{NH}_2$  del quitosano para formar  $-\text{NHCO}$ . Es decir que los NTC se solubilizaron e incorporaron sobre su superficie grupos funcionales correspondientes a quitosano, lo cual permitió su dispersión en la solución.

#### 6.5) CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES pH-SENSIBLES Y ENCAPSULACIÓN DE LA IgY

Como se señaló en la introducción, en el pollito la IgY es directamente vertida en el lumen de su íleon de modo que esta inmunoglobulina no está naturalmente preparada para resistir la acción de los jugos estomacales del abomaso del ternero. Por ello para que la IgY tenga una actividad biológica eficiente, debe estar protegida de la inactivación gástrica y ser administrada en un sistema que posea una alta eficiencia de encapsulación y una óptima liberación en el intestino (Li y cols., 2007). Los hidrogeles representan un importante grupo de biomateriales y son considerados sistemas inteligentes, ya que tienen una respuesta selectiva de hinchamiento dependiendo de las condiciones del medio (Qiu y Park, 2001; Elliott y cols., 2004; García y cols., 2004). En este trabajo se sintetizaron y caracterizaron hidrogeles con tres concentraciones diferentes de monómeros (AAm: acrilamida y AAc: ácido acrílico). Se encontró que a pH cercanos a la neutralidad y básicos, los tres tipos de hidrogeles presentaron un porcentaje de hinchamiento similar. Sin embargo, los hidrogeles que tenían una proporción equimolar (1:1) de ambos monómeros presentaron el menor porcentaje de hinchamiento a pH ácido. Molina y cols., (2010) estudiaron el comportamiento de hidrogeles sintetizados con AAm y AAc y encontraron que las diferencias en el grado de hinchamiento se deben a una ionización/deionización de los grupos carboxílicos. A pH bajos ( $pK_a > pH$ ), los grupos carboxílicos están no-ionizados y el hidrogel se encuentra en un estado colapsado. A pH altos ( $pK_a < pH$ ), los grupos carboxílicos se





repelen entre ellos, causando el hinchamiento del sistema. Estos datos concuerdan con estudios realizados en otras clases de hidrogeles (Zhang y cols., 2005).

Rojas de Gáscue y cols., (2010) evaluaron la velocidad de hinchamiento de hidrogeles de AAm-AAc y demostraron que a medida que aumentó la concentración de ácido acrílico, también aumentó la velocidad de hinchamiento del hidrogel y la capacidad de absorción de agua. Esto se debería a la presencia de un mayor número de grupos hidrófilos provenientes del AAc, los cuales generan un mayor número de interacciones secundarias con el agua y favorecen el incremento de absorción de agua por los hidrogeles. Resultados similares fueron reportados por Li y cols., (2006) luego de estudiar hidrogeles de goma guar y ácido acrílico. Contrariamente a los resultados obtenidos en estos trabajos, en esta tesis se encontró que los hidrogeles que tenían una proporción equimolar (1:1) de ambos monómeros presentaron la mayor velocidad de hinchamiento. Esto demuestra que la caracterización físico-química de un sistema es un requisito necesario para su posterior aplicación biológica y depende de las características propias del sistema evaluado. Katime y cols., (2004) observaron que las características de los monómeros utilizados en la síntesis y el grado de entrecruzamiento determinan las propiedades de hinchamiento del hidrogel y, por tanto, su campo de aplicación.

Los hidrogeles con la proporción de monómeros 1:1 fueron los escogidos para la realización de los ensayos de incorporación y liberación, debido a que su comportamiento de permanecer colapsados a bajos pH y expandirse a pH más altos resulta útil para la administración pasiva de la IgY por vía oral.

Debido a su capacidad de hinchamiento, los hidrogeles pueden ser fácilmente lavados para eliminar residuos de los reactivos de síntesis. Sin embargo, el mismo contenido de agua que hace de los hidrogeles una clase especial de materiales, también es responsable de su mayor desventaja: poseer pobres propiedades mecánicas (Li y cols., 2004). Estudios previos (Li y cols., 2004; Haider y cols., 2007) reportaron que los NTC incorporados a hidrogeles de gelatina, mejoraron sus propiedades mecánicas, mantuvieron su estabilidad a 37°C y evitaron los efectos tóxicos residuales que podrían causar otros agentes entrecruzantes. Estrada y cols., (2011) observaron que los hidrogeles de gelatina-ácido (poli)acrílico modificados con nanotubos de carbono de pared simple y múltiple, absorbieron aproximadamente el triple de su peso en agua. A su vez, presentaron en su superficie la formación de circunvoluciones o cavidades porosas que aumentaron el área superficial del hidrogel provocando un aumento en la capacidad de absorción de agua. Para este tipo de hidrogeles, la formación de las





porosidades fue dependiente de la concentración de los nanotubos de carbono y no del tipo de nanotubos empleado. Parthasarathy y cols., (2011) caracterizaron un sistema basado en hidrogeles de poli(acrilamida)-NTC para aplicaciones electroforéticas con SDS-PAGE. Dichos autores observaron una mejora en el perfil de bandeo y una eficientización de las propiedades mecánicas del sistema con la incorporación del 55% de NTC multipared o del 35 % de NTC de pared simple. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación (Bellingeri, 2012) demostraron que los hidrogeles de AAc-AAm con 5 % de NTC mejoraron significativamente las propiedades mecánicas del sistema. La incorporación de esta concentración de nanotubos reveló una ventaja evidente en lo que respecta al porcentaje de hinchamiento y al contenido de agua. A su vez los hidrogeles con 5% de NTC mostraron un porcentaje de incorporación significativamente mayor que aquellos sintetizados sin NTC. Li y cols., (2007) reportaron resultados similares (73,93 %) de encapsulación de la IgY en cápsulas de quitosano-alginato. Debido a ello en este trabajo de tesis se utilizó como método de protección de la IgY, la encapsulación en hidrogeles pH-sensibles conteniendo un 5 % de NTC funcionalizados con quitosano.

#### 6.6) ESTABILIDAD DE LA IgY EN CONDICIONES GÁSTRICAS E INTESTINALES SIMULADAS.

Una vez encapsulada la IgY, se evaluó su liberación en fluidos gástricos simulados (FGS) y fluidos intestinales simulados (FIS). En el FGS, la IgY liberada (3,6 %) mantuvo sólo un 14 % de su actividad biológica, mientras que en FIS se liberó el 26,6%. La incorporación de la IgY a los hidrogeles con 5 % de NTC, aumentó la actividad biológica a un 85%. Estudios previos donde se encapsuló la IgY en microcápsulas de quitosano-alginato (Li y cols., 2007) o en copolímeros de ácido acrílico-metacrílico (Kovacs-Nolan y Mine, 2005), mostraron un porcentaje de liberación del 100 %. Esto es debido a que dichos métodos de encapsulación presentaron una disolución completa de la microcápsula. En este trabajo, la liberación de IgY desde los hidrogeles siguió una cinética prolongada en el tiempo, es decir que la cantidad de IgY liberada durante las 3 horas de permanencia en el SIF aumentó con el paso del tiempo pero de forma gradual. En terneros lactantes donde el tránsito intestinal es de 2 - 5 horas (Smith, 1964), este tipo de liberación controlada favorecería el mantenimiento de los niveles de IgY mientras ocurre el proceso digestivo.

En trabajos anteriores (Lowman y cols., 1999; Morishita y cols., 2002; Molina y cols., 2010; Rojas de Gáscue y cols., 2010) se han utilizado hidrogeles para la liberación



controlada de drogas modelo. La principal ventaja de utilizar este tipo de drogas radica en su pequeño tamaño, menor densidad de carga electrostática, menor número de interacciones con la matriz polimérica y mayor capacidad de detección de la misma. La IgY utilizada en esta tesis posee una estructura altamente compleja de aminoácidos y glúcidos, además de un gran tamaño molecular (160 KDa), lo que generaría mayores interacciones con la microcápsula y una menor liberación.

El tipo de interacción entre la IgY y el hidrogel fue estudiada por FTIR. La comparación entre los espectros de la IgY sola, el hidrogel solo y el hidrogel-IgY reveló que la IgY interactúa con la red polimérica mediante numerosos puentes hidrógenos, lo cual dificulta su liberación en el FIS. El espectro FTIR hallado para la IgY en este estudio coincide con el reportado por Wang y cols., (2012) quienes evaluaron la estabilidad de la IgY modificada con polietilenglicol. A su vez, Picquart y Poniatowski (1999) estudiaron el espectro de la IgG2a murina, mostrando una notable similitud con el espectro de la IgY.

Los hidrogeles pH-sensibles lograron incorporar la IgY y liberarla en medio básico, sugiriendo que los mismos podrían ser utilizados para la protección de IgY durante la administración oral en inmunoterapia animal.

#### 6.7) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE IgY FRENTE A LA DIARREA POR *E. coli* EN UN MODELO TERNERO

La administración oral de IgY en inmunoterapia pasiva ha sido ampliamente estudiada en varias especies animales (Yokoyama y cols., 1992; Hatta y cols., 1993; Imberechts y cols., 1997; Marquardt y cols., 1999; Carlander y cols., 2000; Vega y cols., 2011; Kovacs-Nolan y Mine, 2012). Se ha logrado la elaboración de productos industriales basados en IgY, la mayor parte de ellos relacionados con la prevención y tratamiento de enfermedades víricas y bacterianas de los animales (particularmente contra las diarreas de los terneros y lechones). El efecto protector de la IgY contra *E. coli* ha sido reportado por diferentes autores. Li y cols., (2009) demostraron que la IgY encapsulada anti-*E. coli* K88 aumentó la protección y mejoró la ganancia de peso en lechones. Mahadavi y cols., (2010) observaron que el tratamiento con IgY mejoraba la salud intestinal y la respuesta inmune en pollos desafiados con *E. coli* O78:K80. Wang y cols., (2010) reportó que se redujo la unión de *E. coli* O157:H7 en humanos y protegió a ratones desafiados con toxinas. Zhen y cols., (2008) observó que el tratamiento con IgY anti-*E. coli* inhibió *in vitro* el crecimiento e internalización de *E. coli* O111 y mejoró la captura por parte de los macrófagos en bovinos.



Uno de los inconvenientes que posee la administración oral de IgY es que su actividad está condicionada a la degradación ácida en el estómago y a la degradación proteolítica de proteasas en el duodeno (Shimizu y cols., 1988; 1992; 1993a; Hatta y cols., 1993; Lee y cols., 2002). Debido a esto, para poder utilizar la IgY como inmunoterapia pasiva, es necesario hallar un método efectivo para preservar el valor terapéutico y la función biológica de este anticuerpo durante el pasaje gástrico. En este trabajo la IgY (40 mg/mL) (Bellingeri y cols., 2013) fue incorporada en hidrogeles pH-sensibles sintetizados con 5 % de NTC (Bellingeri y cols., 2012) funcionalizados con quitosano. Para lograr la caracterización completa de la IgY a utilizar en los ensayos *in vivo*, en la etapa final de esta tesis se logró desarrollar y poner a punto la técnica de ELISA, tanto para IgY total como para el título de IgY anti-ECET. Las modificaciones introducidas en la técnica basada en el protocolo de Gutiérrez Calzado y cols., (2007) incluyeron la utilización de TMB como sustrato, la tindalización del antígeno para el ELISA específico y utilización de leche en polvo descremada al 2 % en PBS-T para la dilución del anticuerpo marcado con peroxidasa. Esta caracterización final optimizó la utilización de la IgY en los ensayos.

En cuanto a la acción protectora de la IgY frente al desafío con ECET, se observó que los animales inoculados con la bacteria que no recibieron tratamiento con IgY desarrollaron diarrea semilíquida y líquida, con una mayor duración de días, disminución significativa del peso corporal y grado de deshidratación leve. Por el contrario, aquellos animales que recibieron tratamiento con la IgY anti-ECET libre y con IgY control encapsulada no presentaron diarrea. En el grupo tratado con la IgY anti-ECET encapsulada, 2 animales desarrollaron diarrea. Estos hallazgos coincidieron con el hecho de que los hidrogeles fueron encontrados en los pre-estómagos de los animales sin llegar al intestino, indicando que el efecto protector de la IgY no se habría logrado ya que los hidrogeles no llegaron a liberar su contenido a un pH más básico.

La IgY fue administrada como tratamiento pasivo inmediatamente después de la ingesta del calostro. Sin embargo, una condición importante del diseño experimental fue la de administrar la primera dosis después del cierre de absorción inespecífica de proteínas calostrales del tubo digestivo (que naturalmente ocurre luego de las primeras 24 horas de vida) para evitar de este modo la absorción de IgY y su pasaje al torrente circulatorio.

Estudios previos realizados *in vivo* con lechones (Li y cols., 2009; Alustiza, 2013) y terneros (Vega y cols., 2011) reportaron que un mayor número de animales fueron protegidos de la diarrea por un tratamiento con IgY. Sin embargo, en el primero de los





casos, la IgY fue administrada en microcápsulas de quitosano-alginato cuya disolución es total, liberando todo el contenido de IgY. En el segundo caso, se administró leche suplementada con yema de huevo, la cual protegió a la IgY contra el efecto deletéreo de la acidez estomacal durante el pasaje gástrico. Cabe mencionar que a diferencia de nuestro trabajo, en los dos casos anteriores se debieron administrar mayores dosis de IgY para lograr la protección deseada. Por otro lado, los ensayos con monogástricos son mucho más fáciles de realizar y no son comparables con los rumiantes que son animales poligástricos.

Con respecto a la ganancia de peso, se observó que ésta fue mayor en el grupo control y en los grupos tratados con IgY en comparación con el grupo inoculado que no recibió tratamiento de IgY. A su vez, el grupo tratado con IgY anti-ECET presentó una ganancia de peso superior comparado con el grupo tratado con IgY control. Por otro lado, la pérdida de peso fue notablemente mayor en los animales inoculados con ECET que no recibieron ningún tratamiento y en el ternero del grupo control que presentó la infección concomitante con *Cryptosporidium* spp., todos ellos con diarrea. Li y cols., (2009) reportaron que lechones inoculados con ECET K88+ desarrollaron diarrea durante todo el período experimental, la cual estuvo asociada a una pérdida de peso significativa. El grupo inoculado con ECET K88+ y tratado con IgY anti-ECET K88+ microencapsulada presentó una ganancia de peso significativamente mayor que los grupos inoculados y tratados con IgY anti-ECET K88+ no encapsulada o con antibiótico. Vega y cols., (2011) observaron que la ganancia de peso de terneros alimentados con leche suplementada con yema de huevo enriquecida en IgY anti-Rotavirus, aumentó significativamente en comparación con los terneros alimentados con leche suplementada con yema de huevos controles.

Resultados similares han sido reportados en terneros en condiciones de campo (Kuroki y cols., 1997). Estos resultados indican que el efecto de la yema de huevo crudo en sí sobre la ganancia de peso corporal se mejora por la presencia de IgY anti-Rotavirus bovino, que indujo altas tasas de protección contra la diarrea por Rotavirus bovino.

Los valores observados en los recuentos leucocitarios mostraron predominio de linfocitos en la mayoría de los animales, coincidiendo con el hecho de que los bovinos son una especie linfocitaria. Se ha reportado que los neutrófilos son las células dominantes en los recuentos de terneros recién nacidos debido al estrés del nacimiento durante el parto. Alrededor de la primera semana de vida, los neutrófilos comienzan a decrecer y los linfocitos aumentan conforme avanza la edad (Kramer,



2006). Sin embargo, se ha demostrado que el destete abrupto, la separación maternal y el transporte tienen efectos significativos en las respuestas comportamentales y en el sistema inmune de los terneros (Barrington, 2001). Una marcada neutrofilia (aumento en el número de neutrófilos) puede producirse como consecuencia del miedo o excitación (leucocitosis fisiológica), del dolor, del estrés emocional prolongado, de la temperatura corporal anormal y del ambiente en cautiverio (Meyer y Harvey, 2000; Latimer y cols, 2005) o bien por la presencia de una moderada inflamación, en respuesta a procesos infecciosos bacterianos y por daño tisular (Jones, 2007; Aceña y cols., 2008). Coppo (2007) también reportó que se produce un aumento de los neutrófilos en los recuentos leucocitarios de animales altamente estresados. En este trabajo de tesis, algunos terneros presentaron una marcada neutrofilia y esto coincidió con el hecho de que fueron los primeros animales en ser retirados de sus boxes y los que tuvieron más tiempo de espera en la sala de necropsia antes del sacrificio.

Los hallazgos observados durante la necropsia revelaron presencia de abundante gas y contenido intestinal color amarillento en aquellos animales que presentaron diarrea, coincidiendo con lo reportado por Mainil (2012).

En los animales que no presentaron diarrea, independientemente del tipo de tratamiento con IgY que recibieron, se observó una morfología macroscópica normal. En conjunto, los resultados demostraron que el tratamiento con IgY causó una reducción significativa en el número de animales afectados, la duración y la severidad de la diarrea. Esto indicaría que la IgY confiere tasas de protección contra la diarrea por *E. coli* en terneros, y lo haría de una manera local.



**CONCLUSIONES**





## **7) CONCLUSIONES**

- El análisis de los genes de virulencia intestinales de *E. coli* por PCR demostró una alta prevalencia de cepas ECET sobre los otros patotipos estudiados, revelando su importante participación en la etiopatogenia de la diarrea en los terneros de las guacheras muestreadas.
- La inmunización de gallinas permitió la obtención de anticuerpos policlonales específicos en grandes cantidades. El método de dilución en agua combinado con la precipitación con sulfato de sodio resultó ser la técnica más efectiva, práctica y económica para la purificación de IgY, siendo además una técnica de elección por ser aplicable en la producción industrial a gran escala.
- La utilización de los compuestos hidrogel-NTC mejoró la eficiencia de incorporación de la IgY, permitió su liberación controlada y la protegió de la inactivación gástrica. Estas nanoestructuras podrían ser utilizadas como un vehículo eficaz para la administración oral de IgY.
- La administración de la IgY anti-ECET en un modelo ternero desafiado con ECET, disminuyó el número de animales afectados, la severidad y duración de la diarrea. Los compuestos hidrogel-NTC-IgY no produjeron procesos inflamatorios en la mucosa intestinal de los terneros evaluados.
- Es necesario realizar nuevos ensayos administrando los compuestos hidrogel-NTC-IgY junto con un sustituto lácteo acidificado, para que la vía oral sea directa hacia el duodeno a través de la gotera esofágica del ternero lactante.
- Mediante las investigaciones de esta tesis se han aportado resultados inéditos sobre la funcionalidad de la IgY administrada en hidrogeles pH-sensibles para prevenir diarreas neonatales por *E. coli* en terneros de tambo.
- En conjunto, los resultados de esta tesis indican que la administración de IgY anti-ECET resulta eficaz para controlar la diarrea por ECET. La tecnología de IgY representa una solución alternativa especialmente en aquellas guacheras donde la diarrea neonatal de los terneros causa importantes problemas económicos.



**BIBLIOGRAFÍA**



## **8) BIBLIOGRAFÍA**

- Achá, S.; Kühn, I.; Jonsson, P.; Mbazima, G.; Katouli, M.; Möllby, R. (2004). Studies on calf diarrhea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica* 45:27-36.
- Aceña, C.; Fernández, A.; Ferrer, L.; Gáscon, M.; Gómez, P.; Loste, A.; Marca, M.; Navarro, L.; Ortín, A.; Ramos, J.; Verde, M. (2008). *Manual de prácticas de Patología General*. Zaragoza: Prensas Universitarias de Zaragoza. 121 pp.
- Acres, S. (1985). Enterotoxigenic *E. coli* infections in newborn calves: a review. *Journal of Dairy Science* 68: 229-256.
- Aguilar Rubido, J.; Leal Angulo, M. (2000). Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biología Aplicada* 17: 147-160.
- Ahmed, A.; Constable, P.; Misk, N. (2002). Effect of feeding frequency and route of administration on abomasal luminal pH in dairy calves fed milk replacer. *Journal of Dairy Science* 85:1502-1508.
- Akita, E. and Nakai, S. (1992). Immunoglobulin's from egg yolk: isolation and purification. *Journal of Food Science* 57: 629-634.
- Akita, E.; Nakai, S. (1993). Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulin's from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods* 160: 207-214.
- Akita, E.; Nakai, S. (2000). Preparation of enteric-coated gelatin capsules of IgY with cellulose acetate phthalate. In *Egg Nutrition and Biotechnology*: Sim, S.; Nakai, S.; Guenter, W. Eds. CABI Publishing Press: Wallingford, UK. pp 301-310.
- Alonso Díez, A; Rejas López, J. (2008). Fluidoterapia práctica en rumiantes. *Revista Electrónica de Clínica Veterinaria (RECVET)* 3: 1-18.
- Alonso, J. (2006). Neuropharma en la carrera hacia los fármacos selectivos *Revista electrónica Neuropharma*. Disponible en: <http://www.nanopharma.com>
- Alustiza, F. (2013). Tecnología de anticuerpos aviares administrados en nanoestructuras, aplicados a la sanidad porcina. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Amaral, J.; Tino de Franco, M.; Carneiro-Sampaio, M.; Carbonare, A. (2002). Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. *Research in Veterinary Science* 72: 229-234.
- Andrade, G.; Coura, F.; Santos, E.; Ferreira, M.; Galinari, G.; Facury Filho, E.; de Carvalho, A.; Lage, A.; Heinemann, M. (2012). Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 44: 1783–1790.



- Bajpai, A.; Giri, A. (2003). Water sorption behavior of highly swelling (carboxyl methylcellulose-g-polyacrylamide) hydrogels and release of potassium nitrate as agrochemical. *Carbohydrate Polymers* 53: 271-279.
- Barrandeguy, M.; Cornaglia, E.; Gottschalk, M.; Fijtman, N.; Pasini, M.; Yafal, A.; Parraud, J.; Schudel, A. (1988). Rotavirus, Enterotoxigenic *Escherichia coli* and other agents in the feces of dairy calves with and without diarrhea. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 30: 239-245.
- Barrington, G.; Parish, S. (2001). Bovine Neonatal Immunology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 17: 463-472.
- Bartels, Ch.; Holzhauer, M.; Jorritsma, R.; Swart, W.; Lam, T. (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine* 93: 162-169.
- Bellingeri, R.; Busso, L.; Alustiza, F.; Picco, N.; Molinero, D.; Grosso, C.; Motta, C.; Vivas, A. (2013). Characterization of egg yolk immunoglobulin (IgY) against enterotoxigenic *Escherichia coli* and evaluation of its effects on bovine intestinal cells. *African Journal of Microbiology Research* 7: 398-405.
- Bellingeri, R.; Picco, C.; Alustiza, F.; Grosso, C.; Motta, C.; Acevedo, D.; Vivas, A. (2012). Caracterización de hidrogeles ph-sensibles modificados con nanotubos de carbono multipared funcionalizados con quitosan. Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas. En: <http://morfovirtual2012.sld.cu/index.php/morfovirtual/2012/paper/view/84>
- Bellinzoni, R.; Blackhall, J.; Terzolo, H.; Moreira, A.; Auza N.; Mattion N.; Micheo G.; La Torre, J.; Scodeller, E. (1990). Microbiology of diarrhea in beef and dairy calves in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 22: 130-137.
- Bendali, F.; Bichet, H.; Schelcher, F.; Sanaa, M. (1999). Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Veterinary Research* 30: 61-74.
- Berge, A.; Atwill, E.; Sischo, W. (2005). Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine* 69: 25-38.
- Bianco, A.; Kostarelos, K.; Partidos, C.; Prato, M. (2005). Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes. *Chemical Communications* 5: 571-577.
- Bilbao, G.; Chacana, P.; Mendiburu, A.; Rodríguez, E.; Blackhall, J.; Terzolo, H. (2006). Profilaxis de la diarrea neonatal de terneros de tambo mediante suplementación con inmunoglobulinas de yema de huevo de gallina. *Revista de Medicina Veterinaria* 87, 4: 135-139.
- Bilbao, G.; Chacana, P.; Parreño, V.; Terzolo, H. (2007). Diarrea de los terneros: una solución proporcionada por la gallina. *Visión Rural* 14 (68). En: [http://produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/cria\\_amamantamiento/13-huevo.pdf](http://produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_amamantamiento/13-huevo.pdf)





- Bilbao, G.; Pinto de Almeida, A.; Badaracco, A. Rodriguez, D.; Monteavaro, E.; Parreño, V. (2012). Diarrea neonatal del ternero. En: [http://produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_leche/70-diarrea.pdf](http://produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/70-diarrea.pdf)
- Bilbao, G. (2013). Diarrea en los terneros: pautas de manejo para reducir la mortandad en la guachera. En: [http://produccion-animal.com.ar/produccion\\_bovina\\_de\\_leche/cria\\_artificial/34-Diarrea\\_terneros.pdf](http://produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/cria_artificial/34-Diarrea_terneros.pdf)
- Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, JE.; Mora, A.; Alonso, M.; González, E.; Bernardez, M. (2002). Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. En: Manual de Microbiología Veterinaria, Vadillo, S.; Piriz, S.; Mateos, E. Eds. McGraw-Hill Interamericana España p. 301-325.
- Blanco, M.; Blanco, JE.; Blanco, J.; Mora, A.; Prado, C.; Alonso, M.; Mouriño, M.; Madrid, C. Balsa Lobre, C.; Juarez, A. (1997) Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology* 54: 309-319.
- Blanco, M.; Schumacher, S.; Tasara, T.; Zweifel, C.; Blanco, JE.; Dhahi, G.; Blanco, J.; Stephan, R. (2005). Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-η2). *BMC Microbiology* 5: 23.
- Bollen, L.; Hau, J. (1996). Freund's complete adjuvant has a negative impact on egg laying frequency in immunized chickens. *In Vivo* 13: 107–108.
- Borges, O.; Cordeiro da Silva, A.; Romeijn, S.; Amidi, M.; de Sousa, A.; Borchard, G.; Junginger, H. (2006). Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *Journal of Controlled Release* 114: 348-358.
- Borriello, G.; Lucibelli, M.; De Carlo, E.; Auriemma, C.; Cozza, D.; Ascione, G.; Scognamiglio, F.; Iovane, G.; Galiero, G. (2012). Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Research in Veterinary Science* 93: 18–22.
- Bouckenooghe, A.; Jiang, Z.; De La Cabada, F.; Ericsson, C.; DuPont, H. (2002). Enterotoxigenic *Escherichia coli* as cause of diarrhea among Mexican adults and US travelers in Mexico. *Journal of Travel Medicine* 9: 137–140.
- Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Auditore, L.; Barnà, R.; De Pasquale, D. (2006). Synthesis of polyethylene oxide hydrogels by electron radiation. *Journal of Applied Polymer Science* 102:820-824.
- Campero, C. (1998). Pérdidas perinatales y neonatales en terneros de rodeos de cría. *Therios: Revista de Medicina Veterinaria y Producción Animal*. 27: 130-148.
- Canadian Council on Animal Care (CCAC). (1993). Guide to the Care and Use of Experimental Animals, Volumen 1, 2º edición. Eds. Olfert, E.; Cross, B.; McWilliam, A. Ontario, Canadá 211 pp.



- Canali, M.; Pedrotti, L.; Balsinde, J.; Ibarra, C.; Correa, S. (2012). Chitosan enhances transcellular permeability in human and rat intestine epithelium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80: 418-425
- Canali, M.; Porporatto, C.; Aoki, M.; Bianco, I.; Correa, S. (2010). Signals elicited at the intestinal epithelium upon chitosan feeding contribute to immunomodulatory activity and biocompatibility of the polysaccharide. *Vaccine* 28: 5718-5724.
- Caprioli, A.; Morabito, S.; Brugere, H. and Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research* 36: 289-311.
- Carbonero, A.; Maldonado, A.; Perea, A.; Astorga, R.; Luque, I.; Huerta, B.; Arenas, A. (2007). Caracterización productiva y sanitaria de la cría de terneros lactantes en Córdoba y Santa Fe (Argentina). *Archivos de Zootecnia* 56: 851-862.
- Carlander, D.; Kollberg, H.; Wejaker, P.; Larsson, A. (2000). Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunology Research* 21: 1-6.
- Carlander, D. (2002). Avian IgY antibody. *In vitro* and *in vivo*. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala. Dissertation from the Faculty of Medicine 1119, Uppsala, 53 pp., ISBN 91-554-5227-2.
- Castillo León, J.; Novoa, I.; Martínez Ortega, F.; Escobar Rivero, P. (2011). Nanotubos de carbono-chitosan en células HOS y THP-1. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud* 43: 21-26.
- Castillo, J.; Torres, M.; Molina, D.; Castillo-León, J.; Svendsen, W.; Escobar, P.; Martínez, F. (2012). Monitoring the functionalization of single-walled carbon nanotubes with chitosan and folic acid by two-dimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Carbon* 50: 2691-2697.
- Chacana, P.; Terzolo, H. (2003). IgY-Technology. Egg yolk derived antibodies. *Modern Aspects of Immunobiology* 3: 58.
- Chakraborty, S.; Deokule, J.; Garg, P.; Bhattacharya, S.; Nandy, R.; Nair, G.; Yamasaki, S.; Takeda, Y.; Ramamurthy, T. (2001). Concomitant infection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in an outbreak of cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Ahmadabad, India. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3241-3246.
- Chalghoumi, R.; Beckers, Y.; Portetelle, D.; Thewis, A. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13: 295-308.
- Chang, H.; Ou-Yang, R.; Chen, Y.; Chen, C. (1999). Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype C in chicken egg yolk (IgY). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 7: 61-66.



- Chang, H.; Lee, Y.; Chen, C.; Tu, Y. (2001). Microencapsulation protects immunoglobulin in yolk (IgY) specific against *Helicobacter pylori* urease. *Journal of Food Science* 67: 15-20.
- Chansarkar, N. (1998). Studies on structural stability of hen's egg yolk immunoglobulin (IgY). [MSc thesis. Vancouver, BC, Canadá: University of British Columbia.
- Chase-Topping, M.; McKendrick, I.; Pearce, M.; MacDonald, P.; Mattheus, L.; Halliday, J.; Allison, L.; Fenlon, D.; Low, J.; Gunn, G.; Wollhouse, M. (2007). Risk factors for the presence of high-level shedders of *Escherichia coli* O 157 on Scottish farms. *Journal of Clinical Microbiology* 45:1594-603.
- Chen, X.; Tam, U.; Czapinski, J.; Lee, G.; Rabuka, D.; Zettl, A.; Bertozzi, C. (2006). Interfacing carbon nanotubes with living cells. *Journal of the American Chemical Society* 128: 6292-6293.
- China, B.; Pirson, V.; Mainil, J. (1996). Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex *in vitro* amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3462-3465.
- China, B.; Pirson, V.; Mainil, J. (1998) Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf population in Belgium. *Veterinary Microbiology* 63: 249-259.
- Cho, Y.; Lee, J.; Park, I.; Huh, C.; Baek, Y.; Park, J. (2005). Protective effect of microencapsulation consisting of multiple emulsification and heat gelation processes on immunoglobulin in yolk. *Journal of Food Science* 70: 148-151.
- Cid, D.; Sanz, R.; Marín, I.; De Greve, H.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.; Amils, R.; De la Fuente, R. (1999). Characterization of Nonenterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Producing F17 Fimbriae Isolated from Diarrheic Lambs and Goat Kids. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1370- 1375.
- Constable, P. (2002). The Treatment of the Diarrheic calf: an update. *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine. XXII World Buiatrics Congress. Hannover, Alemania.* 132-143.
- Constable, P. (2004). Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18: 8-17.
- Constable, P.; Ahmed, A.; Misk, N. (2005). Effect of suckling cow's milk or milk replacer on abomasal luminal pH in dairy calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 97-102.
- Contrepolis, M.; Bertin, Y.; Pohl, P.; Picard, B.; Girardeau, J. (1998). A study of relationship among F17-a producing enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic calves. *Veterinary Microbiology* 64: 75-81.



- Coppo, J. (2007). ¿El destete precoz produce estrés en los terneros cruza cebú? REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 3: 1-40. En: <http://veterinaria.org/revistas/redvet/n020207/020719.pdf>
- Cortés, C.; De la Fuente, R.; Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, JE.; Dhabi, G.; Mora, A.; Justel, P.; Contreras, A.; Sánchez, A.; Corrales, J.; Orden, J. (2005). Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairygoats in Spain. *Veterinary Microbiology* 110: 67–76.
- Costantini, V.; Parreño, V.; Barrandeguy, M.; Combessies, G.; Bardón, J.; Odeón, A.; Leunda, M.; Saif, L.; Fernández, F. (2002). Rotavirus bovino Grupo A: Diagnóstico y caracterización antigénica de cepas circulantes en la República Argentina, 1994-1999. *Revista Argentina de Microbiología*, 34: 110-116.
- Croxen, M.; Finlay, B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8: 26–38.
- Cui, D. (2007). Advances and prospects on biomolecules functionalized carbon nanotubes. *Journal for Nanoscience and Nanotechnology* 7: 1298-1314.
- Dalton, C.; Mintz, E.; Wells, J.; Bopp, C.; Tauxe, R. (1999). Outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in American adults: a clinical and epidemiologic profile. *Epidemiology and Infection* 123: 9-16.
- Davalos, L.; Ortega-Vinuesa, J.; 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: 657-673.
- Dias da Silva, W.; Tambourgi, D. (2010). IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135: 173-180.
- Dohoo, I.; Martin, W.; Stryhn, H. (2003). *Veterinary Epidemiologic Research*, 1st edition. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.
- Dole, P.; Joly, C.; Espuche, E.; Alric, I.; Gontard, N. (2004). Gas transport properties of starch based films. *Carbohydrate Polymers* 58: 335-343.
- Donnenberg, M. (2002). Introduction. In: *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Elsevier Science Inc. USA, pp xxi-xxv.
- Dos Santos, L.; Gonçalves, E.; Vaz, T.; Irino, K.; Guth, B. (2007). Distinct pathotypes of O113 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2028-2030.
- Dumortier, H.; Lacotte, S.; Pastorin, G.; Marega, R.; Wu, W.; Bonifazi, D.; Briand, J.; Prato, M.; Muller, S.; Bianco, A. (2006). Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Letters* 6: 1522–1528.





- Elliott, J.; Macdonald, M.; Nie, J.; Bowman, C. (2004). Structure and swelling of poly (acrylic acid) hydrogels: effect of pH, ionic strength, and dilution on the crosslinked polymer structure. *Polymer* 45: 1503-1510.
- El-Naggar, A.; Abd Alla, S.; Said, H. (2006). Temperature and pH responsive behaviors of CMC/AAc hydrogels prepared by electron beam irradiation. *Materials Chemistry and Physics* 95:158-163.
- Estrada Guerrero, R.; Lemus Torres, D.; Mendoza Anaya, D.; Rodríguez Lugo, V. (2011). Hidrogeles biopoliméricos potencialmente aplicables en agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 12: 76-87.
- Franck, S.; Bosworth, B.; Moon, H. (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1795-1797.
- Fu, C.; Huang, H.; Wang, X.; Liu, Y.; Wang, Z.; Cui, S. (2006). Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. *Journal of Virological Methods* 133: 112-115.
- Gaoa, J.; Xua, B. (2009). Applications of nanomaterials inside cells. *Nanotechnology Today* 4: 37-51.
- García, A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.; Orden, J.; Cid, D.; Sanz, R.; Gómez-Bautista, M.; De la Fuente, F. (2000). Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 23: 175–183.
- García, D.; Escobar, J.; Bada, N.; Casquero, J.; Hernáez, E.; Katime, I. (2004). Synthesis and characterization of poly (methacrylic acid) hydrogels for metoclopramide delivery. *European Polymers Journal* 40: 1637-1643.
- Garzón Quintero, B. (2007). Sustitutos lecheros en la alimentación de terneros. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria* 3: 1-39. ISSN 1695-7504. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507/050701.pdf>
- Gassmann, M.; Thommes, P.; Weiser, T.; Hubscher, U. (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *The FASEB Journal* 4: 2528-2532.
- Georgakilas, V.; Kordatos, K.; Prato, M.; Guldi, D.; Holzinger, M.; Hirsch, A. (2002). Organic functionalization of carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* 124: 760–761.
- Ghanbarpour, R.; Oswald, E. (2009). Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran. *Tropical Animal Health and Production* 1: 1091-1099.
- Ghanbarpour, R.; Oswald, E. (2010). Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. *Research in Veterinary Science* 88: 6–10.



- Grosso, M.; Cuello, M.; Martínez, R.; Schade, R.; Greco, C.; Vivas, A. (2004). Inmunoglobulinas aviares en la detección de proteínas específicas de la preñez en porcinos. *Medicina* 64: 203.
- Grosso, M.; Cuello, M.; Martínez, R.; Greco, C.; Henklein, P.; Schade, R.; Vivas, A. (2008). "Evaluación de la especificidad de anticuerpos policlonales aviares y mamíferos anti-Factor Precoz de Preñez porcino". *Inmunología* 27: 1-10.
- Guinée, P.; Veldkamp, J.; Jansen, W. (1977). Improved Minca Medium for the detection of K99 Antigen in Calf Enterotoxigenic Strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 15: 676-678.
- Gulliksen, S.; Jor, E.; Lie, K.; Hamnes, I.; Löken, T.; Åkerstedt, J.; Österås, O. (2009). Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *Journal of Dairy Science* 92: 5057-5066.
- Gürtler, M.; Methner, U.; Kobilke, H.; Fehlhaber, K. (2004). Effect of orally administered egg yolk antibodies on *Salmonella enteritidis* contamination of hen's eggs. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 51:129-134.
- Gutiérrez Calzado, E.; Samón Chávez, T.; Sierra González, G.; Higginson Clarke, D.; Rodríguez Silva, G.; Schade, R. (2007). Desarrollo de un Sistema ELISA para cuantificar IgG de ratón tomando como base la tecnología IgY. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 38: 75-83.
- Haider, S.; Park, S.; Saeed, K.; Farmer, B. (2007). Swelling and electroresponsive characteristics of gelatin immobilized onto multi-walled carbon nanotubes. *Sensors and Actuators B* 124: 517-528.
- Hatta, H.; Tsuda, K.; Akachi, S.; Kim, M.; Yamamoto, T. (1993). Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 57: 450-454.
- Hatta, H.; Kapoor, M.; Juneja, L. (2008). Bioactive components in egg yolk. In: *Egg Bioscience and Biotechnology*, Ed. Mine Y, New York: John Wiley Sons, pp. 185 - 237.
- Heinrichs, J.; Radostits, O. (2001). Health and production management of dairy calves and replacement heifers. In: *Radostits O, Ed. Herd health food animal production medicine. 3º edition. WB Saunders Company. Philadelphia pp. 333-395.*
- Henning-Pauka, I.; Stelljes, I.; Waldmann, K. (2003). Studies on the effect of specific egg antibodies against *Escherichia coli* infections in piglets. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 110: 49-54.
- Holt, J.; Krieg, J.; Sneath, P.; Staley, P. and Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9º Edition. Group 5: Facultatively anaerobic gram-negative rods. pp. 179-180 y 209-210. Ed. William & Wilkins. Baltimore. ISBN 0-683-00603-7*
- Huopalahti, R.; López-Fandiño, R.; Antón, M.; Schade, R. (2007). *Bioactive Egg Compounds. Ed. Springer.*



- Huasai, S.; Chen, A.; Wang, Ch.; Li, Y.; Tongrige, B. (2012). Occurrence and characteristics of virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cows in Inner Mongolia, China. *Brazilian Journal of Microbiology* 528-534.
- Ikemori, Y.; Kuroki, M.; Peralta, C.; Yokoyama, H.; Kodama, Y. (1992). Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *E. coli*. *American Journal of Veterinary Research* 53: 2005-08.
- Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research* 15: 326-331.
- Imberechts, H.; Deprez, P.; Van Driessche, E.; Pohl, P. (1997). Chicken egg-yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology* 54: 329-341.
- Jain, A.; Mehra, N.; Lodhi, N.; Dubey, V.; Mishra, D.; Jain, P.; Jain, N. (2007). Carbon nanotubes and their toxicity. *Nanotoxicology* 1: 167-197.
- Jasper, J.; Budzynska, M.; Weary, D. (2008). Weaning distress in dairy calves: Acute behavioural responses by limit-fed calves. *Applied Animal Behaviour Science* 110: 136-143.
- Jay, C.; Bhaskaran, S.; Rathore, K.; Waghela, S. (2004). Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. *Veterinary Microbiology* 101: 153-160.
- Jin, L.; Baidoo, S.; Marquardt, R.; Frolich, A. (1998). *In vitro* inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 21: 313-321.
- Johnson, J. (2002). Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Donnenberg M, Ed. Elsevier Science Inc. USA pp. 55-77.
- Jones, M.; Allison, R. (2007). Evaluation of the Ruminant Complete Blood Cell Count. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 23:377-402.
- Kam, N.; Liu, Z.; Dai, H. (2006). Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angewandte Chemie International Edition* 45: 577-581.
- Kang, M.; Kang, S.; Jiang, H.; Shin, S.; Lee, D.; Ahn, J.; Rayamahji, N.; Park, I.; Shin, S.; Cho, C.; Yoo, H. (2006). *In vivo* induction of mucosal immune responses by intranasal administration of chitosan microspheres containing *Bordetella bronchiseptica* DNT. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63: 215-220.
- Kanwar, R.; Randhir, S.; Folia, G.; Arora, A.; Sandhu, K. (2007). Virulence factors of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolated from diarrhoeic calves and their antibiogram pattern. *Indian Journal of Animal Sciences* 77: 1069-1073.



- Kaper, J.; Nataro, J.; Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Review Microbiology 2: 123-140.
- Katime, D.; Katime, O.; Katime, I. (2004). Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio Editorial de la Universidad del país Vasco. Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228.
- Katz, E.; Willner, I. (2004). Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: Applications in nanobioelectronics. Chem Phys Chem 5:1084-104.
- Kitaguchi, K.; Osada, K.; Horio, F.; Murai, A. (2008). "Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles". Veterinary Immunology and Immunopathology 121: 290-299.
- Kostarelos, K. (2003). Rational design and engineering of delivery systems for therapeutics: biomedical exercises in colloid and surface science. Journal of Colloid and Interface Science 106: 147-168.
- Kostarelos, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Luangsivilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A. (2007). Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. Nature Nanotechnology 2: 108–113.
- Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y. (2005). Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. Journal of Immunological Methods 296: 199-209.
- Kovacs-Nolan, J. and Mine, Y. (2012). Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. Annual Review of Food Science and Technology 3: 163-182.
- Kuroki, M.; Ohta, M.; Ikemori, Y.; Icatlo, F.; Kobayashi, C.; Yokoyama, H.; Kodama, Y. (1997) Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves. Archive Virology 142: 843-851.
- Kramer, J. (2006). Normal Hematology of Cattle, Sheep and Goats. Veterinary Clinics of North America Vol. 12 N° 1.
- Larsson, A.; Ballou R Liindahl T, Forsberg P. (1993). Chicken antibodies: Taking advantage of evolution. A review. Poultry Sciences 72: 1807-1812.
- Larsson, A.; Carlander, D.; Wilhelmsson, M. (1998) Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. Food and Agricultural Immunology 10: 29-36.
- Latimer, K.; Mahaffey, E.; Prasse, K. (2005). Patología Clínica Veterinaria. 4º Edición. Ed. Multimédica. Madrid. España.
- Lazo Pérez, L.; Dahbi, G.; Blanco Álvarez, M.; Blanco Álvarez, JE.; Blanco Álvarez, J.; Llorens Blanco, F. (2009). Aplicación de técnicas moleculares en la caracterización de aislados de *Escherichia coli* procedentes de cerdos con síndrome diarreico en la provincia de Villa Clara. Revista de Salud Animal 31: 93-104.





- Lee, K.; Chang, S.; Lee, Y.; Lee, J.; Koo, N. (2002). Acid stability of anti-Helicobacter pylori IgY in aqueous polyol solution. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35: 488-493.
- Lee, K.; Mooney, D. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews* 101: 1869-1879.
- Lee, K.; Chang, S.; Lee, Y.; Lee, J.; Koo, N. (2002). Acid stability of anti-Helicobacter pylori IgY in aqueous polyol solution. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35: 488-493.
- Leslie, G.; Clem, L. (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *The Journal of Experimental Medicine* 130: 1337-1352.
- Levesque, S.; Martinez, G.; Fairbrother, J. (2007). Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. *Poultry Science* 86: 630-635.
- Lewis, S. (2008). *Dacie y Lewis Hematología Práctica*. 10ª edición. Ed. ELSEVIER ES. ISBN: 9788480862295.
- Li, X.; Jin, L.; Uzonna, J.; Li, S.; Liu, J.; Li, H.; Lu, Y.; Zhen, Y.; Xu, Y. (2009). Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): *In vivo* evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 129:132-136.
- Li, X.; Jin, L.; McAllister, T.; Stanford, K.; Xu, J.; Lu, Y.; Zhen, Y.; Sun, Y.; Xu, Y. (2007). Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2911-2917.
- Li, X.; Nakano, H.; Sunwoo, H.; Paek, B.; Chae, J. (1998). Effects of egg yolk weights yolk antibody (IgY) production in laying chicken. *Poultry Science* 77:266-270.
- Li, H.; Wang, D.; Liu, B.; Gao, L. (2004). Synthesis of a novel gelatin-carbon nanotubes hybrid hydrogel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 33: 85-88.
- Li, Y.; Wu, W.; Wang, J.; Duan, Y. (2006). The swelling behavior and network parameters of guar gum/poly(acrylic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogels. *Carbohydrate Polymers* 66: 473-479.
- Liu, Y.; Tang, J.; Chen, X.; Xin, J. (2005). Decoration of carbon nanotubes with chitosan. *Carbon* 43: 3178-3180.
- Liu, Z.; Tabakman, S.; Welsher, K.; Dai, H. (2009). Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: *In vitro* and *in vivo* detection, imaging and drug delivery. *Nano Research* 2: 85-120.
- Ljutic, B.; Ochs, M.; Messham, B.; Ming, M.; Dookie, A.; Harper, K., Ausar, S. (2012). Formulation, stability and immunogenicity of a trivalent pneumococcal protein vaccine formulated with aluminum salt adjuvants. *Vaccine* 30: 2981-2988.



- Lorenz, I. (2006). Diarrhoea of the young calf: an update. In: Proceedings of the XXIV World Buiatrics Congress, Nice, France, pp. 130–138.
- Lorino, T.; Daudinb, J.; Robinb, S.; Sanaa, M. (2005). Factors associated with time to neonatal diarrhoea in French beef calves. *Preventive Veterinary Medicine* 68: 91-102.
- Lösch, U.; Schraner, I.; Wanke, R.; Jürgens, L. (1986) The chicken egg, an antibody source. *Journal of Veterinary Medicine B* 33: 609-619.
- Lowman, A.; Morishita, M.; Kajita, M.; Nagai, T.; Peppas, N. (1999). Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels. *Journal of Pharmaceutical Science* 88: 933-937.
- Lüginbühl, A.; Reitt, K.; Metzler, A.; Kollbrunner, M.; Corboz, L.; Deplazes, P. (2005). Field study of the prevalence and diagnosis of diarrhea-causing agents in the newborn calf in a Swiss veterinary practice area. *Schweiz Arch Tierheilkd* 147: 245–252.
- Lundborg, G.; Svensson, E.; Oltenacu, P. (2005). Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0–90 days. *Preventive Veterinary Medicine* 68: 123-143.
- Luo, X.; Xu, J.; Wang, J.; Chen, H. (2005). Electrochemically deposited nanocomposite of chitosan and carbon nanotubes for biosensor application. *Chemical Communications* 16: 2169-2171.
- Mahdavi, A.; Rahmani, H.; Nili, N.; Samie, A.; Soleimanian-Zad, S.; Jahanian, R. (2010). Effects of dietary egg yolk antibody powder on growth performance, intestinal *Escherichia coli* colonization, and immunocompetence of challenged broiler chicks. *Poultry Science* 89 :484-494.
- Mainil, J. (2012). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152: 2-12.
- Margueritte, J.; Mattion, N.; Blackhall, J.; Fernández, F.; Parreño, V.; Vagnozzi, A.; Odeón, A.; Combessies, G. (2007). Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y control. En: [http://produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_en\\_general/54-diarrea\\_neonatal.pdf](http://produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/54-diarrea_neonatal.pdf)
- Marquardt, R.; Jin, L.; Kim, J.; Fang, L.; Frohlich, A.; Baidoo, S. (1999). Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early weaned piglets. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 23: 283-288.
- Marrack, P.; McKee, A.; Munks, M. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology* 9: 287-293.
- Martin, M.; Martín-Sosa, S.; Alonso, J.; Hueso, P. (2003). Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains bind bovine milk gangliosides in a ceramide-dependent process. *Lipids* 38: 761-768.



- Mercado, E. (2006). Control of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in cattle. *Medicina* 66: 33-36.
- Mercado, E (2007). Síndrome Urémico Hemolítico: ¿Por qué Argentina?. *Revista Argentina de Microbiología* 39: 191-192.
- Meyer, D.; Harvey, J. (2000). *El Laboratorio en Medicina Veterinaria. Interpretación y Diagnóstico*. 2º edición. Ed. Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina. 397 pp.
- Mine, Y.; Kovacs-Nolan, J. (2002) Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *Journal of Medicinal Food* 5: 159-169.
- Molina, M.; Rivarola, C.; Barbero, C. (2010). Evidence of hydrophobic interactions controlling mobile ions release from smart hydrogels. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 521: 265-271.
- Montes Perez, R.; Murcia Meija, C.; Zarco Quintero, L. (1994). Production of antibodies against progesterone from the egg yolk of hens and from rabbit blood serum, to be used in radioimmunoassay. *Revista Veterinaria México* 25: 117-125.
- Morishita, M.; Lowman, A.; Takayama, K.; Nagai, T.; Peppas, N. (2002). Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin in controlled release systems based on complexation polymers. *Journal of Controlled Release* 81: 25-32.
- Morrison, S.; Mohammed, S.; Wims, L.; Trinh, R.; Etches, R. (2001). Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology* 38: 619-625.
- Moxley, R.; Smith, D. (2010). Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 26: 29-56.
- Nagy, B.; Fekete, P. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology* 295: 443-454.
- Narat, M. (2003). Production of Antibodies in Chickens. *Food Technology and Biotechnology* 41: 259-267.
- Navarre, C. (2000). Differentiation of Gastrointestinal Diseases of Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 6: 37-57.
- Odeón, A. (1981). Diarrea neonatal de los terneros en el sudeste de la Provincia de Buenos Aires (Argentina), aspectos epidemiológicos, etiológicos, inmunológicos y patológicos. *Revista Argentina de Producción Animal* 1: 51.
- Odeón, A. (2001). Diarrea neonatal de los terneros: Etiopatogenia, tratamiento y control. En: [http://produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infeciosas/bovinos\\_en\\_general/35-diarrea\\_neonatal\\_de\\_terneros.pdf](http://produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_en_general/35-diarrea_neonatal_de_terneros.pdf)
- Oliveira Filho, J.; Silva, D.; Pacheco, M.; Mascarini, L.; Ribeiro, M.; Alfieri, A.; Alfieri, A.; Stipp, D.; Barros, B.; Borges, A. (2007). Diarrhea in Nelore calves: clinical and etiologic study. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 27: 419-424.



- Omidian, H.; Rocca, J.; Park, K. (2005). Advances in superporous hydrogels. *Journal of Controlled Release* 102: 3-12.
- Orden, J.; Yuste, M.; Cid, D.; Piacesi, T.; Martinez, S.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.; De la Fuente, R. (2003). Typing of the eae and espB genes of attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from ruminants. *Veterinary Microbiology* 96: 203–215.
- Paiva De Sousa, C. (2006). *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. *Revista de biologia e ciências da terra*, 6: 341-352.
- Pantarotto, D.; Partidos, C.; Graff, R.; Hoebeker, J.; Briand, J.; Prato, M.; Bianco, A. (2003). Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. *Journal of the American Chemical Society* 125: 6160-6164.
- Pantarotto, D.; Singh, R.; McCarthy, D.; Erhardt, M.; Briand, J.; Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. (2004). Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angewandte Chemie International Edition in English* 43: 5242-5246.
- Parreño, V. (2008). Diarrea neonatal bovina: protegerlos desde la panza. *Revista Angus* 241: 61-65.
- Pardo-Mora, D. (2012). Determinación de los factores de riesgo y de los agentes etiologicos asociados con la presentación de diarrea neonatal bovina (DNB) en fincas de la sabana de Bogotá. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- Parthasarathy, M.; Debgupta, J.; Kakade, B.; Ansary, A.; Khan, M.; Pillai, V. (2011). Carbon nanotube-modified SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for molecular weight determination of proteins. *Analytical Biochemistry* 409: 230-235.
- Pauly, D.; Dorner, M.; Zhang, X.; Hlinak, A.; Dorner, B.; Schade, R. (2008). Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over two-year period. *Poultry Science* 88: 281-290.
- Peppas, N.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50: 27-46.
- Perka, K.; Moussa, A.; Tromp, A.; Reda, I.; Refai, M.; Friedman, A.; Farid, A.; Gallily, O.; Salah, S.; Saif, L. (2000). Neonatal diarrheal disease of dairy cattle in Egypt and Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 55: 13–18.
- Pettinari, J. (2003). Oro y luz: un posible tratamiento para el cáncer. En: [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Novedades/nanoparticulas/nanoparticulas](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Novedades/nanoparticulas/nanoparticulas).
- Picquart, M.; Haro-Ponialowski, E. (1999). Study of a murine IgG2a monoclonal antibody by vibrational spectroscopies. *Revista Mexicana de Física* 45:459-465.
- Picco, N.; Alustiza, F.; Bellingeri, R.; Motta, C.; Grosso, MC.; Busso, L.; Molinero, D.; Vivas, A. (2011). Molecular screening of pathogenic *E. coli* and Rotavirus strains in dairy neonatal calves. *Biocell* 35 (3): A281.





- Polson, A.; Von Wechmar, M.; Van Regenmortel, M. (1980). Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunology Communications* 9:475-493.
- Porporatto, C.; Bianco, I.; Correa, S. (2005). Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 62-69.
- Pourjavadi, A.; Eftekhar Jahromi, P.; Seidi, F.; Salimi, H. (2010). Synthesis and swelling behavior of acrylatedstarch-g-poly (acrylic acid) and acrylatedstarch-g-poly (acrylamide) hydrogels. *Carbohydrate Polymers* 79: 933-940.
- Pourtaghi, H.; Dahpahlavan, V.; Momtaz, H. (2013). Virulence genes in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhoea in Iran. *Comparative Clinical Pathology* 22: 513-515.
- Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. (2008). Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Accounts of Chemical Research* 41: 60-68.
- Pugh, M. (2002). The EU precautionary bans of animal feed additive antibiotics. *Toxicology Letters* 128: 35-44.
- Qadri, F.; Svennerholm, A.; Faruque, A.; Bradley Sack, R. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 465-483.
- Qiu, Y.; Park, K. (2001). Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 53: 321-339
- Radostits, O.; Gay, C.; Hinchcliff, K.; Constable, P. (2007). Diseases of the alimentary tracts. In: *Veterinary Medicine* 10<sup>o</sup> edition. Saunders Elsevier. pp262.
- Rangel, J.; Sparling, P.; Crowe, C.; Griffin, P.; Swerdlow, D. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases* 11: 603-609.
- Read, S.; Clarke, R.; Martin, A.; De Grandis, S.; Hill, J.; McEwen, S.; Gyles, C. (1992). Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Molecular and Cellular Probes* 6: 153-161.
- Rigobelo, E.; Gamez, H.; Marin, J.; Macedo, C.; Ambrosin, J.; Avila, F. (2006). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58: 305-310.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* 44: 464-475.
- Rojas de Gáscue, B.; Ramírez, M.; Prin, J.; Torres, C.; Bejarano, L.; Villarroel, H.; Rojas, L.; Murillo, M.; Katime, I. (2010). Hidrogeles de acrilamida/ácido acrílico y de acrilamida/poli(ácido acrílico): estudio de su capacidad de remediación en efluentes industriales. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 30: 28-39.



- Rose, M.; Orlans, E.; Buttress, N. (1974). Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology* 4: 521-523.
- Rosen, Y.; Elman, N. (2009). Carbon nanotubes in drug delivery: focus on infectious diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery* 6: 1-14.
- Salvadori, M.; Valadares, G.; Leite, D.; Blanco, J.; Yano, T. (2003). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 230-235.
- Santomá, G. (1998). Estimuladores de la inmunidad. XIV Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. p117-140.
- Schade, R.; Pfister, C.; Halatsch, R.; Henklein, P. (1991). Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *ATLA* 19: 4033-419.
- Schade, R.; Hlinak, A. (1991). Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *Altex* 13. Supplement 96: 5-8.
- Schade, R.; Gutierrez Calzado, E.; Sarmiento, R.; Chacana, P.; Porankiewicz-Asplund, J.; Terzolo, H. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and in human and veterinary medicine. *ATLA* 33: 129-154.
- Schade, R.; Staak, C.; Hendriksen, C. (1996). The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. *ATLA* 24: 925-934.
- Schade, R.; Behn, I.; Erhard, M.; Hlinak, A.; Staak, C. (2001). Chicken Egg Yolk Antibodies. Production and application. Ed. Springer.
- Schade, R.; Chacana, P.A.; Terzolo, H.R.; Calzado, E. (2003) IgY-technology. A review *ALTEX* 20: 195.
- Schade, R.; Zhang, X.; Terzolo, H. (2007). Use of IgY Antibodies in Human and Veterinary Medicine. In: *Bioactive Egg Compounds*. Huopalahti, R.; López-Fandiño, R.; Anton, M. & Schade, R. (Eds.). Springer, Germany. pp 213-219.
- Schumman, F.; Townsend, H.; Naylor, J. (1990). Risk factors for mortality from diarrhoea in beef calves in Alberta. *Canadian Journal of Veterinary Research* 54: 336-372.
- Scott, P.; Hall, G.; Jones, P.; Morgan, J. (2004). Calf Diarrhoea. In *Bovine Medicine. Diseases and Husbandry of Cattle*. Edited by Andrews. 2<sup>o</sup> Edition. Blackwell Science Ltd. Oxford. 185-214.
- Shams, Z.; Tahamtan, Y.; Pourbakhsh, A.; Hosseiny, M.; Kargar, M.; Hayati, M. (2010). Detection of enterotoxigenic K99 (F5, F41) from fecal sample of calves by molecular and serological methods. *Comparative Clinical Pathology* 2: 123-126.
- Sherman, D.; Acres, S.; Sadowski, P.; Springer, J.; Bray, B.; Raybould, T.; Muscoplat, C. (1983). Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally



- administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infectology Immunology* 42: 653-658.
- Shimizu, M.; Fitzsimmons, S.; Nacai, S. (1988). Anti- *E. coli* Immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *Journal of Food Science* 53: 1360-1366.
  - Shimizu, M.; Hagashima, H.; Sano, K.; Hashimoto, K.; Ozeki, M.; Tsuda, K.; Hatta, H. (1992). Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56: 270-274.
  - Shimizu, M.; Nagashima H, Sano K, Hashimoto K. (1993a) Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comparative Physiology and Biochemistry* 106: 255-261.
  - Shimizu, M.; Miwa, Y.; Hashimoto, K.; Goto, A. (1993b). Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57: 1445-1449.
  - Singh, M.; Singh, R.; Arora, A.; Sandhu, K. (2007). Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic neonatal calves. *Indian Journal of Animal Sciences* 77: 1063–1068.
  - Siqueira, A.; Ribeiro, M.; Leite, D.; Tiba, M.; de Moura, C.; Lopes, M.; Prestes, N.; Salerno, T.; da Silva, A. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science* 86: 206-210.
  - Sivula, N.; Ames, T.; Marsh, W. (1996). Management practices and risk factors for morbidity and mortality in Minnesota dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine* 27: 173-182.
  - Smith, H. (1964). Passage of digesta through the calf abomasum and small intestine. *Journal of Physiology* 172: 305-320.
  - Soberanis, B. (2006). Sistemas de administración de drogas a nivel nanométrico. *Episteme* N° 8-9 año 2.
  - Sousa, C. (2006). The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: A mini review. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 12: 363-373.
  - Stordeur, P.; China, B.; Charlier, G.; Roels, S.; Mainil, J. (2000). Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesion, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves. *Microbes and Infection* 2:17-24.
  - Sugita-Konishi, Y.; Sakanaka, S.; Sasaki, K.; Juneja, L.; Noda, T.; Amano, F. (2002). Inhibition of bacterial adhesion and Salmonella infection in BALB/c mice by sialyoligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3607-3613.



- Sun, S.; Mo, W.; Ji, Y.; Liu, S. (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15: 708-712.
- Sunwoo, H.; Lee, E.; Menninen, K.; Suresh, M.; Sim, J. (2002). Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* 0157:H7. *Journal of Food Science* 67: 1486-1494.
- Sunwoo, H.; Nakano, T.; Dixon, W.; Sim, J. (1996). Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science* 75: 342-345.
- Svensson, C.; Lundborg, K.; Emanuelson, U.; Olsson, S. (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine* 58: 179-97.
- Takahashi, T.; Luculescu, C.; Uchida, K.; Ishii, T.; Yajima, H. (2005). Dispersion behaviour and spectroscopic properties of single-walled carbon nanotubes in chitosan acidic aqueous solutions. *Chemistry Letter* 34: 1516 -1517.
- Terzolo, H.; Chacana, P.; Vivas, A.; Greco, C.; Goya, R.; Schade, R. (2003) IgY technology in Argentina. *ALTEX* 20: 202.
- Tini, M.; Jewell, U.; Camenisch, G.; Chilov, D.; Gassmann, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 131: 569–574.
- Tiranti, K.; Larriestra, A.; Vissio, C., Picco, N.; Alustiza, F.; Degioanni, A.; Vivas, A. (2011). Prevalence of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.*, spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 20: 65-72.
- Tizard, I. (1992). The phylogeny of the immune system. En: *Veterinary Immunology an introduction*, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, p.465-466
- Todar, K. (2008). Pathogenic *E. coli* in: *Online textbook of bacteriology*. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>
- Torché, A.; Le Dimna, M.; Le Corre, P.; Mesplede, A.; Le Gal, S.; Cariolet, R.; Le Potier, M. (2006). Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109: 209–217.
- Torsein, A.; Lindberg, A.; Hallén Sandgren, C.; Persson Waller, K.; Törnquist, M.; Svensson, C. (2011). Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 99: 136–147.
- Trabulsi, L.; Keller, R.; Tardelli Gomes, T. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* 8: 508–513.
- Trampel, D.; Griffith, R. (1997). Efficacy of aluminum hydroxide-adjuvanted *Escherichia coli* bacterin in turkey poults. *Avian Diseases* 41: 263-268.





- United States Pharmacopeial Convention Council of Experts (2004). Simulated gastric and intestinal fluid, TS. In: Board of Trustees (Eds.), The United States Pharmacopeia 27, The National Formulary 22. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, p. 2728.
- Vajda, V.; Maskařová, I.; Tesfaye, A. (2007). Acid-base homeostasis of blood and pH of abomasum in calves fed non-acidified and acidified milk replacer Czech Journal of Animal Science 52: 96–102.
- Van Bost, S.; Bâbe, M.; Jacquemin, E.; Mainil, J. (2001). Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. Veterinary Microbiology 82: 311-320.
- Van Der Lubben, I.; Kersten, G.; Fretz, M.; Beuvery, C.; Coos, V.; Junginger, H. (2003). Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. Vaccine 21: 1400-1408.
- Varshney, B.; Ponnanna, N.; Sarkar, P.; Rehman, P.; Shah, J. (2007). Development of a monoclonal antibody-based coagglutination test to detect Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. Journal of Veterinary Science 8: 57-64.
- Vega, C.; Bok, M.; Chacana, P.; Saif, L.; Fernandez, F.; Parreño, V. (2011). Egg Yolk IgY: protection against Rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. Veterinary Immunology and Immunopathology 142: 156-169.
- Venglovsky, J.; Sasakova, N.; Placha, I. (2009). Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. Bioresource Technology 100: 5386-5391.
- Vivas A. (2002). Use of IgY-technology in the Universidad Nacional de Río Cuarto. MEETING ON IgY. Institute Karolinska de Stocolm, Suecia.
- Vivas A. (2003) Evaluation of polyclonal avian and mammals EPF-antibody to develop a method to detect early pregnancy in pigs. Reproductive physiology & embryo transfer. Conferencia Mundial en Producción Animal y IX Congreso Mundial de Producción Animal.
- Von Buenau, R.; Jaekel, L.; Schubotz, E.; Schwarz, S.; Stroff, T.; Krueger, M. (2005). *Escherichia coli* Strain Nissle 1917: Significant Reduction of Neonatal Calf Diarrhea. American Dairy Science Association. 88: 317-323.
- Vu-Khac, H. (2007). Serotypes, virulence genes, intimina types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. The Veterinary Journal. 174: 176-187.
- Wang, Q.; Hou, X.; Cai, K.; Li, T.; Liu, Y.; Tu, W.; Xiao, L.; Bao, S.; Shi, J.; Gao, X.; Liu, H.; Tian, R.; Wang, H. (2010). Passive protection of purified yolk immunoglobulin administered against Shiga toxin 1 in mouse models. Canadian Journal of Microbiology 56: 1003-1010.



- Wang, L.; Ma, M.; Huang, Q.; Shi, Z. (2012). Study on the Stability of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Modified with mPEG. *Spectroscopy and Spectral Analysis* 32: 2501-2507.
- Wanke, R.; Schmidt, P.; Erhard, M.; Sprick-Sanjose Messing, A.; Stangassinger, M.; Schmahl, W.; Hermanns, W. (1996). Freund's complete adjuvant in the chicken: Efficient immunostimulation with severe local inflammatory reaction. *Zentralbl Veterinarmed A* 43: 243–253.
- Warr, G.; Magor, K.; Higgins, D. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today* 16: 392-398.
- Wasteson, Y. (2001). Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica Suplemento* 95: 79– 84.
- Wegener, H. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology* 6: 439-445.
- Wei, W.; Sethuraman, A.; Jin, C.; Monteiro-Riviere, N.; Narayan, R. (2007). Biological properties of carbon nanotubes. *Journal for Nanoscience and Nanotechnology* 7: 1284-1297.
- Wieler, L.; Jores, J.; Lubke-Becker, A. (2002). Role of *E. coli* and other bacterial Pathogens in Calf Diarrhea: An update. *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine. XXII World Buiatrics Congress*. pp 126-131.
- Woolley, J.; Landon, J. (1995). Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *Journal of Immunology Methods* 178: 253-265.
- Wu, P.; Chen, X.; Hu, N.; Tam, U.; Blixt, O.; Zettl, A.; Bertozzi, C. (2008). Biocompatible carbon nanotubes generated by functionalization with glycodendrimers. *Angewandte Chemie International Edition in English* 47: 5022-5025.
- Wu, Z.; Feng, W.; Feng, Y.; Liu, Q.; Xu, X. (2007). Preparation and characterization of chitosan grafted multiwalled carbon nanotubes and their electrochemical properties. *Carbon* 45: 1212-1218.
- Yamamoto, H.; Watanabe, H.; Sato, G.; Mikami, T. (1975) Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Japanese Journal of Veterinary Research* 23: 131-140.
- Yang, H.; Yuan, R.; Chai, Y.; Zhuo, Y. (2011). Electrochemically deposited nanocomposite of chitosan and carbon nanotubes for detection of human chorionic gonadotrophin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82: 463 - 469.
- Yang, W.; Thordarson, P.; Gooding, J.; Ringer S.; Braet, F. (2007). Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology* 18: 1-12.



- Yew, Y.; Ng, T.; Li, H.; Lam, K. (2007). Analysis of pH and electrically controlled swelling of hydrogel-based micro-sensors/actuators. *Biomedical Microdevices* 9: 487-499.
- Yokoyama, H.; Peralta, C.; Umeda, K.; Hashi, T.; Icatlo, F.; 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: 416-420.
- Yokoyama, H.; Peralta, R.; 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: 998-1007.
- Younis, E.; Ahmed, A.; El-Khodery, S.; Osman, S.; El-Naker, Y. (2009). Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt. *Research in Veterinary Science* 87: 373–379.
- Zhang, X.; Zheng, L.; Schade, R.; Terzolo, H.; Chacana, P.; Porankiewicz-Asplund, J. (2004a) Technological aspects of egg yolk immunoglobulin. *Chinese Pharmacological Bulletin* 20: 1102-06.
- Zhang, M.; Smith, A. and Gorski, W. (2004b). Carbon nanotube–chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes. *Analytical Chemistry* 76: 5045-5050.
- Zhang, M.; Gorski, W. (2005). Electrochemical sensing platform based on the carbon nanotubes/redox mediators-biopolymer system. *Journal of the American Chemical Society* 127: 2058-2059.
- Zhang, W.; Zhang, Z.; Zhang, Y. (2011). The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies. *Nanoscale Research Letters* 6: 555.
- Zhen, Y.; Jin, L.; Guo, J.; Li, X.; Lu, Y.; Chen, J.; Xu, Y. (2008). Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 130: 126-133.



**ANEXOS**



**9) ANEXOS**

**ANEXO 1: CUESTIONARIOS**

❖ **SOBRE EL ESTABLECIMIENTO**

Nº de terneros totales:.....Machos:.....Hembras:.....

Nº de terneros menores de seis semanas.....

**ASESORAMIENTO VETERINARIO:**

Veterinario: .....

Frecuencia de visitas:.....

Motivo de visita:    Reproducción                      Sanidad                      Nutrición                      Producción

Terneros nacidos el año pasado (2007).....

Terneros muertos el año pasado (2007).....por neumonía.....por diarrea.....

¿A qué edad tienen mayor mortalidad?

Menores de un mes de vida                      Entre 1 y 2 meses                      Mayores a 3 meses

Problemas sanitarios más comunes:

Diarreas                      Neumonías                      Onfaloflebitis

Queratoconjuntivitis                      Piel (sarna o piojo)                      Muerte súbita

Nerviosos                      Artritis                      Insolación

¿Utiliza algún Programa para Registros de sanidad y producción?                      NO                      SI

¿Cuál?.....

**DIARREAS:**

¿Cuántos casos de diarrea tuvo la semana pasada?.....

Diarreas durante el calostrado:                      SI                      NO

Diarreas en la guachera:                      SI                      NO

Diagnóstico de diarreas:    Sintomático                      Laboratorio                      Resultado:.....

Tratamiento para diarreas:

Hidratación: Oral                      Parenteral

Antidiarreico: SI                      NO                      Tipo.....                      Forma.....

Antibiótico: SI                      NO                      Tipo.....                      Forma.....

Otros:.....

**OTRAS PRÁCTICAS:**

¿Cuánto tiempo están los terneros con las vacas?.....

¿Los terneros calostran?                      NO                      SI                      ¿Cuántos días?.....

Higiene del ombligo al nacimiento                      NO                      SI                      ¿Cómo?.....



Tratamientos al nacimiento: Minerales      Vitaminas      Otros.....

**ALIMENTACION**

Alimento líquido:

Sustituto lácteo:      ¿Cuál?.....      ¿Cuánto?.....

¿Cómo lo prepara?.....

Leche:      De vacas con mastitis      De vacas con tratamiento antibiótico  
                    De vacas sanas      ¿Cuánto tiempo?.....

¿Le enseña a tomar el alimento líquido?      NO      SI      ¿Cómo?.....

Utensillos:      Balde sin chupete      Balde con chupete      Mamadera  
                    Batea colectiva      Otros.....

¿Cómo realiza la higiene?.....

Alimento sólido

Tipo:      Balanceado iniciador      Ruter      Fardo

¿Cómo es el esquema de uso?.....

¿Tiene incorporado antibiótico?      NO      SI      ¿Cuál?.....

Utensillos:      Balde      Batea colectiva      Otros.....

¿Cómo realiza la higiene?.....

**PARTOS**

¿Dónde paren las vacas?      Corral separado      Corral con vacas secas

Características del corral de parto (foto).....

¿Los partos están concentrados en el año?      NO      SI      ¿En qué época?.....

**PLAN DE VACUNACIÓN DE MADRES**

¿Se efectúa?      SI      NO

¿Desde cuándo realizan vacunaciones a las madres?.....

Tipo de vacunas:      Comerciales (Nombre y Laboratorio).....  
                    Autovacuna.....

¿Contra qué agente?.....

¿Cuántas dosis?.....Intervalo de cada dosis.....

Observaciones:.....

**PLAN DE VACUNACIÓN TERNEROS**

¿Se efectúa?      SI      NO

¿Desde cuándo realizan vacunaciones a los terneros?.....

Tipo de vacunas:      Comerciales (Nombre y Laboratorio).....  
                    Autovacuna.....

¿Contra qué agente?.....



¿Cuántas dosis?.....Intervalo de cada dosis.....

Observaciones:.....

**OBSERVACIÓN ESTABLECIMIENTO**

Tipo de guachera:

Individual                  Jaula                          Estaca                          Otros.....

Colectiva                  Suelos                          Atados                          Otros.....

Características del Terreno:

Sobreelevado                  Llano                          Depresión                          Pasto                          Tierra

Cemento                          Otros.....

Tipo de sombra:                  Natural                          Artificial

❖ **SOBRE EL ENCARGADO**

Propietario:.....

Nombre del encargado:.....

Teléfono:.....

Edad:.....

¿Cuántos años hace que está realizando esta actividad?.....

¿Cuántos tiempo hace que esta en este establecimiento?.....

¿Cómo aprendió esta actividad?.....

¿Acredita especialización formal para la actividad?                  SI                  NO

    ¿Quién la otorgo?.....

¿Previamente trabajó en otras guacheras?                  SI                  NO

¿Alguien lo asiste en su labor?                  SI                  NO

    ¿Cuántos?.....

    ¿Quiénes?.....

    ¿Con qué frecuencia?.....

¿Realiza otras actividades en el establecimiento?                  SI                  NO

    ¿Cuáles?.....

Nivel de instrucción:

Primario:                  Completo                  Incompleto

Secundario:                  Completo                  Incompleto

Terciario:                  Completo                  Incompleto

Observaciones:.....

.....

.....



**FICHA CLÍNICA DEL TERNERO**

Fecha: Guachera N°:

**TERNERO**

N° Caravana:..... Sexo:..... Raza:.....

N° Muestra:..... Edad (días o semanas).....

**Aspecto del ternero:**

- **Pelo:** Brilloso                      Hirsuto
- **Depresión de sensorio grado:**      1              2              3
- **Reflejo de succión:** Presente      Disminuido      Ausente
- **Mucosas:** Normal      Pálidas      Congestivas      Ictéricas      Cianóticas
- **Prueba del pliegue cutáneo:**      Normal              Anormal
- **Emaciación:**                              SI              NO
- **Ojos hundidos:**                              SI              NO
- **Midriasis:**                                      SI              NO
- **Postración:**                                      SI              NO
- **Disnea:**    SI              NO
- **Tos/estornudos:**                              SI              NO
- **Secreciones nasales:**                              SI              NO
- **Respiración a contragolpe:**              SI              NO
- **Cuerpo:**              frío                      caliente
- **Miembros:**              fríos                      calientes
- **Otros:**.....

**Diarrea:**      SI      NO

- **Consistencia:**              Acuosa              Semisólida
- **Presencia de:**              Sangre              Fibrina              Mucus              Transparente
- **Color:** Amarilla      Roja              Marrón              Verde              Gris              Otra
- **Temperatura rectal:**.....

**Tratamiento:** SI      NO      ¿Cuál?.....

**MADRE**

N° caravana:.....

Fecha de parto:.....

N° ordinal de parto:.....

**Parto:** Normal                      Ayudado                      Cesárea



**ANEXO 2: MEDIOS DE CULTIVO****❖ MEDIO DE TRANSPORTE STUART (BRITANIA®, ARGENTINA)**

FÓRMULA	GRAMOS POR LITRO
TIOGLICOLATO DE SODIO	0,9
GLICEROFOSFATO DE SODIO	10,0
CLORURO DE CALCIO	0,1
AZUL DE METILENO	0,002
AGAR	3,0
AGUA DESTILADA	ENRASAR VOLUMEN HASTA 1 LITRO
pH FINAL: 7,4 ± 0.2	

**PREPARACIÓN:**

Suspender 14,1 gramos del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos. Calentar a ebullición hasta disolución total. Distribuir en tubos con tapa a rosca llenándolos hasta  $\frac{3}{4}$  del volumen del tubo. Dejar solidificar en posición vertical. Conservar entre 2-8°C. Los microorganismos más resistentes pueden permanecer viables durante períodos mayores a 72 horas. Se recomienda que las muestras transportadas se cultiven sin demora luego de ser recibidas en el laboratorio. Característica del medio preparado: ligeramente opalescente con tonalidad azul.

CÓDIGO: B02-136-06. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.

**❖ AGAR MAC CONKEY LACTOSA (OXOID, UK)**

FÓRMULA	GRAMOS POR LITRO
PEPTONA	20,0
LACTOSA	10,0
MEZCLA DE SALES BILIARES	5,0
CLORURO DE SODIO	5,0
ROJO NEUTRO	0,075
AGAR	12,0
AGUA DESTILADA	ENRASAR VOLUMEN HASTA 1 LITRO
pH FINAL: 7,4 ± 0.2	

**PREPARACIÓN:**

Suspender 52 gramos del polvo por litro de agua destilada y mezclar hasta homogeneizar. Hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Distribuir en placas de petri y dejar solidificar. Conservar entre 2-8°C. Característica del medio preparado: tonalidad rojo púrpura.

CÓDIGO: CM0007. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.

**❖ MEDIO PARA CONSERVACIÓN DE CEPAS (Lazo Pérez *et al.*, 2009)**
**COMPOSICIÓN:**

AGAR NUTRITIVO (Difco, EE.UU, Código 213000, medio deshidratado por 500 gramos).

CALDO NUTRITIVO (Difco, EE.UU, Código: 234000, medio deshidratado por 500 gramos).

**PREPARACIÓN:**

Suspender 11,5 gramos de Agar Nutritivo y 4,0 gramos de Caldo Nutritivo en 1 litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta disolución total. Distribuir en tubos con tapa a rosca llenándolos hasta  $\frac{3}{4}$  del volumen del tubo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar solidificar en posición vertical. Conservar entre 2-8°C. Característica del medio preparado: ligeramente opalescente con tonalidad ámbar.

**❖ AGAR MINCA (MINIMAL CASEIN MEDIUM) (Guinee *et al.*, 1977)**

FÓRMULA	GRAMOS POR LITRO
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MERCK)	1,4
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (MERCK)	10,1
GLUCOSA (BDH)	1,0
HIDROLIZADO DE CASEÍNA (DIFCO)	1,0
AGAR (DIFCO)	12,0
SOLUCION DE SALES TRAZAS*	1 mL
AGUA DESTILADA	ENRASAR VOLUMEN HASTA 1 LITRO
pH FINAL: 7,5 ± 0.2	

\* La solución de sales trazas contiene (por litro):

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (MERK)	10 gramos
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O (MERK)	1 gramos
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O (MERK)	0,135 gramos
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (MERK)	0,4 gramos

**PREPARACIÓN:**

Suspender los componentes del medio en un litro de agua destilada y mezclar hasta homogeneizar. Hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y agregar asépticamente la solución de sales trazas (previamente esterilizadas por filtración). Homogeneizar, distribuir en placas de petri y dejar solidificar. Conservar entre 2-8°C. Característica del medio preparado: ligeramene opalescente tonalidad ámbar.

**❖ CALDO CEREBRO-CORAZÓN (BRITANIA®, ARGENTINA)**

FÓRMULA	GRAMOS POR LITRO
INFUSIÓN DE CEREBRO DE TERNERA	200,0
INFUSIÓN DE CORAZÓN VACUNO	250,0
PEPTONA	10,0
CLORURO DE SODIO	5,0
GLUCOSA	2,0
FOSFATO DISÓDICO	2,5
AGUA DESTILADA	ENRASAR VOLUMEN HASTA 1 LITRO
pH FINAL: 7,4 ± 0.2	

**PREPARACIÓN:**

Suspender 37 gramos de l polvo en 1 litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta disolución total. Distribuir en tubos con tapa a rosca llenándolos hasta  $\frac{3}{4}$  del volumen del tubo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los tubos que no se usen inmediatamente deberán calentarse en un baño hirviendo para la eliminación del oxígeno retenido. Enfriar rápidamente sin agitar. Conservar entre 2-8°C. Característica del medio preparado: con tonalidad ámbar claro.

CÓDIGO: B02-146-06. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.

**❖ AGAR SANGRE BASE (OXOID, UK)**

FÓRMULA	GRAMOS POR LITRO
TRIPTONA	14,0
PEPTONA NEUTRALIZADA	4,5
EXTRATO DE LEVADURA	4,5
CLORURO DE SODIO	5,0
AGAR	12,0
AGUA DESTILADA	ENRASAR VOLUMEN HASTA 1 LITRO
pH FINAL: 7,3 ± 0.2	

**PREPARACIÓN:**

Suspender 40 gramos del polvo por litro de agua destilada y mezclar hasta homogeneizar. Hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-150°C y agregar asépticamente la sangre de carnero desfibrinada al 7%. Homogeneizar, distribuir en placas de petri y dejar solidificar. Conservar entre 2-8°C. Característica del medio preparado: tonalidad rojo cereza luego del agregado de la sangre de carnero.

CÓDIGO: CM8554B. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.



### ANEXO 3: COLORACIONES

#### ❖ COLORACIÓN DE GRAM (BRITANIA, ARGENTINA)

##### COMPOSICIÓN:

- 1 frasco por 100 mL de VIOLETA PARA GRAM
- 1 frasco por 100 mL de DECOLORANTE PARA GRAM
- 1 frasco por 100 mL de SAFRANINA
- 1 ampolla por 10 mL de LUGOL

**PREPARACIÓN:** Cubrir con Violeta para Gram las zonas del portaobjeto que tienen la preparación previamente fijada con alcohol metílico (1 minuto) o calor. Dejar actuar 20 seg. Lavar suavemente con agua durante 10 seg. Cubrir con Lugol y dejar actuar 30 seg. Decolorar durante 10 seg con Decolorante para Gram y lavar suavemente con agua por 10 seg. Cubrir con Safranina y dejar actuar durante 20 seg. Lavar suavemente con agua durante unos 10 seg. Secar y observar al microscopio. Tiempo total de la coloración: 2 minutos.

**CÓDIGO:** B14-460-82. **PRESENTACIÓN:** Equipo Gram Britania x 100 mL.

---

#### ❖ COLORACIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

##### REACTIVOS:

- Hematoxilina de Harris (hematoxilina: 5 g, alcohol 100%: 50 mL, alumbre de potasio: 100 g, agua destilada: 1000 mL y óxido de rojo de mercurio: 2,5 g).
- Eosina (eosina Y: 0,25 g y Floxina B: 0,25 g en relación 1:1, agua destilada 100 mL).

**INSTRUCCIONES:** Introducir el preparado en una cubeta o cestillo con hematoxilina de Harris por 2 minutos. Lavar con agua destilada. Eliminar el exceso de tinción con alcohol ácido al 1 % y cubrir con un agente de azuleamiento (carbonato de litio). Lavar con agua destilada por 5 minutos. Introducir el preparado en una cubeta o cestillo con eosina por 1 minuto. Lavar con agua destilada.

**RESULTADO:** núcleos celular de color azul-púrpura y citoplasma de color rojo-rosa.

---

#### ❖ COLORACIÓN CON AZUL DE TOLUIDINA

##### REACTIVOS:

- Azul de toluidina O (código 115930) Certistain® Merck

**INSTRUCCIONES:** Disolver 0,1 g de azul de toluidina O en 100 mL de agua destilada. Cubrir el preparado con el colorante preparado por 1-2 minutos o con una solución del colorante al 0,01% por 5-10 minutos. Lavar con agua destilada por 1 minuto.

**RESULTADO:** Núcleos y citoplasma en azul (ortocromático). Diversos hidratos de carbono ácidos, mucosidades, sustancias básicas de cartílagos, gránulos de mastocitos, sustancias mucínicas epiteliales en rosa, rojo o violeta (metacromático).



**ANEXO 4: PRUEBAS BIOQUÍMICAS****❖ AGAR CITRATO DE SIMMONS (BRITANIA)**

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Citrato de sodio	2,0	Suspender 24,2g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir 4 ml en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada. Color del medio preparado: verde.
Cloruro de sodio	5,0	
Fosfato dipotásico	1,0	
Fosfato monoamónico	1,0	
Sulfato de magnesio	0,2	
Azul de bromotimol	0,08	
Agar	15,0	
pH final: 6,9 ± 0,2		

Siembra: A partir de un cultivo puro de 18-24 horas sembrar en superficie el inóculo, utilizando un ansa recta o en rulo, sin arrastrar el agar. Incubar a 35-37 °C durante 24-48 horas, en aerobiosis. Algunos microorganismos pueden requerir hasta 4 días de incubación.

Resultados:

-Positivo: crecimiento y color azul en el pico, alcalinidad.

-Negativo: el medio permanece de color verde debido a que no hay desarrollo bacteriano.

Limitaciones: Si se usa un inóculo denso para sembrar el medio de cultivo, puede variar el color del pico del verde al amarillo-amarronado. Esto no afecta el color verde del resto del medio de cultivo, pero puede afectar la visualización azul de un resultado positivo. Inóculos muy densos, pueden originar resultados falsos positivos.

CÓDIGO: B02-132-06. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.

**❖ AGAR FENILALANINA (BRITANIA)**

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Extracto de levadura	3,0	Suspender 23g del polvo en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta disolución total. Distribuir en tubos de hemólisis y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en pico de flauta alargado. Color del medio preparado: ámbar.
DL-Fenilalanina	2,0	
Fosfato disódico	1,0	
Cloruro de sodio	5,0	
Agar	12,0	
pH final: 7,3 ± 0,2		

Siembra: A partir de un cultivo puro, sembrar un inóculo denso estriando la superficie del medio. Incubar de 18 a 24 horas a 35-37°C, en aerobiosis. Revelar agregando 3-5 gotas del reactivo de fenilalanina (código B15-504-61).

Resultados:

-Positivo: desarrollo de color verde pálido a intenso en el pico de flauta.

-Negativo: El medio permanece amarillo debido al color del reactivo cloruro férrico.

Limitaciones: No realizar la lectura de la prueba después de los 5 minutos, debido a que disminuye la intensidad del color verde.

CÓDIGO: B02-127-06. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.



## ❖ AGAR GLUCOSA NITRATO (BRITANIA)

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	10,0	Suspender 33g de polvo/litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta disolver. Distribuir en tubos de hemólisis y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Si no se usa de inmediato, hervir el medio antes de usarlo, a fin de eliminar el oxígeno. Enfriar en posición vertical. Color del medio preparado: verde.
Cloruro de sodio	5,0	
Extracto de carne	3,0	
Glucosa	10,0	
Agar	4,0	
Azul de bromotimol	0,01	
Nitrato de potasio	1.0	
pH final: 7,4 ± 0,2		

Siembra: A partir de un cultivo puro de 24-48 horas, sembrar con ansa recta en punta. Incubar a 35-37°C durante 48 horas, en aerobiosis. Algunos microorganismos requieren hasta 4 días, y otros hasta 14 días de incubación. Para revelar el nitrato, agregar 3 gotas del reactivo de Griess A (B15-501-61) y 3 gotas del reactivo de Griess B (B15-502-61).

## Resultados

## Metabolismo de la glucosa:

- Microorganismos oxidativos: color amarillo en la parte superior del tubo.
- Microorganismos fermentadores: color amarillo en todo el medio de cultivo.
- Microorganismos que no fermentan y no oxidan la glucosa: el medio permanece verde o adquiere un color azulado.

## Movilidad:

- Positiva: presencia de turbidez que se extiende más allá de la línea de siembra.
- Negativa: solo se observa turbidez en la línea de siembra.

## Reducción de nitratos:

- Positiva: desarrollo de color rosado-rojo luego del agregado de los reactivos Griess.
  - Negativa: ausencia de color rosado rojo luego del agregado de los reactivos Griess.
- Limitaciones: Los microorganismos que al reducir los nitratos liberan gas nitrógeno, producen un resultado falso negativo con la metodología detallada previamente. Ante un resultado negativo, agregar unas granallas de Zinc y observar el color desarrollado.
- Prueba Positiva: ausencia de color rosado rojo luego del agregado de Zinc.
  - Prueba Negativa: desarrollo de color rosado-rojo luego del agregado de Zinc.

CÓDIGO: B02-113-06. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.

## ❖ AGAR LISINA HIERRO (BRITANIA)

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona de gelatina	5,0	Suspender 35g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber unos 15 minutos. Calentar cuidadosamente, agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en pico de flauta dejando un fondo vertical apto para la punción. Color del medio preparado: Violeta.
Extracto de levadura	3,0	
Glucosa	1,0	
Lisina	10,0	
Citrato de hierro y amonio	0,5	
Tiosulfato de sodio	0,04	
Púrpura de bromocresol	0,02	
Agar	15,0	
pH final: 6,7 ± 0,2		



Siembra: A partir de un cultivo puro de 24-48 horas, sembrar con ansa recta en punta picando inicialmente el fondo y extendiendo luego sobre la superficie del medio. Incubar a 35-37°C durante 24 horas, en aerobiosis.

Resultados:

Decarboxilación de la lisina:

-Prueba Positiva: Pico violeta/fondo violeta.

-Prueba Negativa: Pico violeta/fondo amarillo.

Desaminación de la lisina:

Pico rojizo/fondo amarillo. Esto sucede con cepas del género *Proteus*, *Providencia* y alguna cepas de *Morganella* spp.

Producción de ácido sulfhídrico:

-Prueba positiva: Ennegrecimiento del medio (especialmente en el límite del pico y fondo)

CÓDIGO: B02-106-06. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.

#### ❖ AGAR TSI (BRITANIA)

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Extracto de carne	3,0	Suspender 62,5g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien, calentar agitando y hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de hemólisis. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo. Características del medio preparado: rojo
Pluripeptona	20,0	
Cloruro de sodio	5,0	
Lactosa	10,0	
Sacarosa	10,0	
Glucosa	1,0	
Sulfato de hierro y amonio	0,2	
Tiosulfato de sodio	0,2	
Rojo de fenol	0,02	
Agar	13,0	
pH final: 7,3 ± 0,2		

Siembra: A partir de un cultivo puro de 24-48 horas, sembrar con ansa recta en punta picando inicialmente el fondo y extendiendo luego sobre la superficie del medio. Incubar a 35-37°C durante 24 horas, en aerobiosis.

Resultados:

-Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.

-Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.

-Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.

-La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.

-El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

CÓDIGO: B02-134-06. PRESENTACIÓN: medio deshidratado por 500 gramos.



**❖ MEDIO BAM CON UREA (BRITANIA)**

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	20,0	Suspender 36g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar y calentar en ebullición durante 1 a 2 minutos hasta que se disuelva completamente. Distribuir 4 ml de medio en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos. Enfriar en posición vertical. Color del medio preparado: verde amarillento.
Lactosa	3,0	
Urea	10,0	
Fucsina ácida	0,037	
Azul de timol	0,048	
Agar	3,0	
pH final: 8,3 ± 0,2		

**Siembra:** A partir de un cultivo puro de 24-48 horas, sembrar con ansa recta en punta. Incubar a 35-37°C durante 24 horas, en aerobiosis. Luego, colocar una tira de papel de filtro estéril en el tubo ya sembrado, y otra tira embebida en una solución saturada de subacetato de plomo. Incubar 24-96 horas a 35-37°C, en aerobiosis. Observar diariamente los cambios de color. Se recomienda incubar un tubo con el medio sin inocular (color verde amarillento) para comparar los cambios de color.

**Resultados**
**Metabolismo de lactosa y actividad ureásica:**

- Fermentación de lactosa negativo, ureasa negativo: verde amarillento.
- Fermentación de lactosa positivo, ureasa negativo: amarillo, naranja, rosado, rojo.
- Fermentación de lactosa negativo, ureasa positivo: azul violáceo, azul verdoso.

**Prueba de Indol:** Agregar a la tira de papel de filtro una gota de reactivo de Indol y observar el color desarrollado.

-Positivo: rosa.

-Negativo: amarillo.

**Producción de ácido sulfhídrico:**

-Positivo: papel de filtro ennegrecido.

-Negativo: ausencia de ennegrecimiento en el papel de filtro.

**Observaciones:** la producción de ácido sulfhídrico por algunas de las cepas de *Proteus* spp. se detecta después de 72 horas de incubación.

**Movilidad:**

-Positiva: presencia de turbidez que se extiende más allá de la línea de siembra.

-Negativa: solo se observa turbidez en la línea de siembra.

**CÓDIGO:** B02-108-06. **PRESENTACIÓN:** medio deshidratado por 500 gramos.

**❖ MEDIO SIM (BRITANIA)**

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Tripteína	20,0	Suspender 30g del polvo/ litro de agua destilada. Mezclar hasta disolver, calentar agitando y hervir durante un minuto. Distribuir 4 ml en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Solidificar en posición vertical. Color del medio preparado: ámbar.
Peptona	6,1	
Sulfato de hierro y amonio	0,2	
Tiosulfato de sodio	0,2	
Agar	3,5	
pH final: 7,3 ± 0,2		





**Siembra:** A partir de un cultivo de 18-24 horas en medio sólido, sembrar por punción profunda con ansa recta en punta. Se debe inocular el centro del tubo, y la punción debe abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Es importante que la siembra se realice en línea recta. Incubar durante 24 horas, a 35-37°C, en aerobiosis. Revelar agregando de 3-5 gotas del reactivo de Indol (Código: B15-503-61).

**Resultados:**

- Cepas móviles: producen turbidez que se extiende más allá de la línea de siembra.
- Cepas inmóviles: el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.
- Cepas SH<sub>2</sub> positivas: ennegrecimiento en la línea de siembra o en todo el medio.
- Cepas SH<sub>2</sub> negativas: el medio permanece sin cambio de color.
- Cepas indol positivas: desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Indol.
- Cepas indol negativas: sin cambio de color.

**Limitaciones:** En las bacterias aerobias estrictas, que sólo crecen en superficie, la movilidad puede ser difícil de observar. Algunas bacterias productoras de melanina como *M. morgani*, pueden dar un color parduzco, que no debe confundirse con el color negro debido a la producción de ácido sulfhídrico.

**CÓDIGO:** B02-131-06. **PRESENTACIÓN:** medio deshidratado por 500 gramos.

---

#### ❖ OXIDASA (BRITANIA)

**Siembra:**

- En tubo: a partir de un cultivo puro, hacer una suspensión densa del inóculo en 0.2 ml de agua destilada estéril, y agregar un disco de oxidasa.
- En portaobjetos: humedecer el disco de oxidasa con una gota de agua y luego colocar sobre la colonia en estudio. Ésta metodología se realiza cuando se tiene escaso número disponible de colonias en estudio.

**Incubación:** Generalmente dentro del minuto, y a temperatura ambiente se detectan los resultados positivos. Una reacción lenta, pasado los 2 minutos, debe considerarse negativa.

**Resultados:**

**Positivo:** observación de color rojo-fucsia en el disco y/o la solución.

**Negativo:** el disco y/o la solución permanecen sin cambio de color.

**Limitaciones:** La prueba debe realizarse utilizando cultivos frescos (18-24 horas), y que no provengan de medios con azúcares con pH ácido. No usar ansas de nichrome por riesgos de obtener resultados falsos positivos provenientes del metal reducido. Se recomienda utilizar una varilla de vidrio, plástico o madera.

**CÓDIGO:** B12-403-24. **PRESENTACIÓN:** frasco x 25 discos.



## **ANEXO 5: COMPOSICIÓN DEL SUSTITUTO LÁCTEO PARA TERNEROS**

BOOSTER es un lactoreemplazante de leche de vaca apto para la crianza artificial de terneros, que provee todos los nutrientes necesarios para obtener un óptimo crecimiento de los terneros en su etapa de lactancia.

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL (base seca)	
Proteína bruta (mínimo)	21 %
Extracto etéreo (mínimo)	16 %
Lactosa (mínimo)	46 %
Cenizas (máximo)	9 %
Calcio	0,8 %
Fósforo	0,5%
Hierro	100 ppm
Zinc	40 ppm
Cobre	10 ppm
Vitamina A	24000 UI/Kg
Vitamina D	4800 UI/Kg
Vitamina E	45 UI/Kg

### **INGREDIENTES:**

Leche en polvo descremada, suero de queso en polvo, lactosa, suero reengrasado, harina de soja micronizada, núcleo vitamínico mineral terneros, fosfatos monodiválvicos, aromatizante, antioxidante.

### **MODO DE USO Y PREPARACIÓN:**

Booster lactoreemplazante terneros, se ofrece a los terneros desde el "calostrado" (primeros 2 a 5 días de vida), en adelante hasta completar la etapa de recría. Diluir de 80-130gr de producto por cada litro de agua potable según tabla de alimentación. Prácticamente, se utiliza 1Kg de Booster y completando con 9 litros de agua potable para obtener los 10 litros de sustituto de leche.

### **IMPORTANTE:**

Para una mejor dilución se recomienda calentar el 60% del agua a 50-55°C, agregarle el 100% del producto y completar con el total del agua. La temperatura ideal para ofrecer el sustituto a los terneros es 37-39°C. Respetar la temperatura y los horarios de entrega diariamente. Se recomienda alimentar a los terneros al menos 2 veces al día. Ante un cuadro de diarrea, consultar al profesional veterinario, reducir la dosis del sustituto a la mitad, asegurando la provisión de agua para el ternero. Proteger este producto de la humedad y de la luz solar directa. Almacenar en lugares higiénicos, con el envase cerrado. Evitar roturas de envases.

Temperatura de conservación: 0-25°C

Presentación del producto: Envases de 25 Kg.

**ANEXO 6: PLANILLA PARA EL SEGUIMIENTO DIARIO DE LOS TERNEROS**

Fecha:				
Ternero	1	2	3	4
Edad (días)				
Peso inicial (Kg)				
Ingesta agua (SI/NO)				
Ingesta leche (SI/NO)	Mañana: Tarde:	Mañana: Tarde:	Mañana: Tarde:	Mañana: Tarde:
Reflejo succión (SI/NO/POCO)				
Postura erguida (SI/NO)				
Pelo brillante (SI/NO)				
Consistencia materia fecal				
Color materia fecal				
Presencia sangre/fibrina/mucus				
Número deposiciones				
Duración diarrea (días)				
Ojos hundidos (SI/NO)				
Postración (SI/NO)				
Emaciación (SI/NO)				
Aspecto de las mucosas				
Cuerpo (FRÍO/CALIENTE)				
Miembros (FRÍO/CALIENTE)				
Grado deshidratación				
Prueba del pliegue cutáneo				
Tratamiento realizado	IgY especif encapsulada	IgY especif libre	IgY inespecif encapsulada	Sin IgY
Peso final (Kg)				
Ganancia/pérdida de peso				
Temperatura (°C)				
Observaciones:				

**Consistencia de la materia fecal**

- (0): Normal (firme y bien formada)  
 (1): Pastosa (anormal pero no diarrea)  
 (2): Semi-líquida (diarrea leve)  
 (3): Líquida (diarrea severa y acuosa)

**Grado de deshidratación**

- (0): Ninguno (ojos brillantes, piel flexible en la prueba del pliegue) (0-5%)  
 (1): Leve (ojos hundidos, mucosas secas, prueba del pliegue persiste 3-5 seg) (6-8%)  
 (2): Moderada (ojos hundidos, mucosas secas, prueba del pliegue persiste más de 10 seg, ausencia de succión, no presenta postura erguida) (8-10%)  
 (3): Severa o profunda (extremidades frías, pulso débil, animal deprimido, pliegue de la piel persistente) (mayor 10% peso corporal)

**ANEXO 7: PLANILLA PARA EL DÍA DE SACRIFICIO DE LOS TERNEROS**

Fecha:				
Ternero	1	2	3	4
Recuento de hematíes totales				
Recuento de leucocitos totales				
Fórmula leucocitaria	Neutrófilos: Linfocitos: Monocitos: Eosinófilos: Basófilos:	Neutrófilos: Linfocitos: Monocitos: Eosinófilos: Basófilos:	Neutrófilos: Linfocitos: Monocitos: Eosinófilos: Basófilos:	Neutrófilos: Linfocitos: Monocitos: Eosinófilos: Basófilos:
Observaciones de la Necropsia del animal (macroscópicamente)				
Observaciones de preparados histológicos (microscópicamente)				
Bacteriología de la materia fecal o del contenido intestinal	E. coli: Proteus: Otros:	E. coli: Proteus: Otros:	E. coli: Proteus: Otros:	E. coli: Proteus: Otros:
Factores de virulencia por PCR (F17, STa, K99 y F41)	F17: STa: K99: F41:	F17: STa: K99: F41:	F17: STa: K99: F41:	F17: STa: K99: F41:
Parasitología de la materia fecal o del contenido intestinal	Cripto: Eimeria: Giardia:	Cripto: Eimeria: Giardia:	Cripto: Eimeria: Giardia:	Cripto: Eimeria: Giardia:
Virología de la materia fecal o del contenido intestinal	Rotavirus:	Rotavirus:	Rotavirus:	Rotavirus:





U.N.R.C.  
Biblioteca Central

72656



72656