



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES IGY PRESENTES EN LA YEMA
DEL HUEVO PARA TRES BACTERIAS IDENTIFICADAS EN LECHE DE VACAS
POSITIVAS A MASTITIS SUBCLINICA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Profesor Guía

MVZ. David F. Andrade O. Mg.Sc.

Autor

Raúl Esteban Montenegro Almeida

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

David Francisco Andrade Ojeda
Médico Veterinario Zootecnista
Mg.Sc. En Tecnología de Alimentos
C.I. 1712693165

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Alexandra Angulo
Médico Veterinario Zootecnista
C.I. 1714976295

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Raúl Esteban Montenegro Almeida

C.I. 1723520001

AGRADECIMIENTOS

A la institución, al personal docente, que me acogió en mi formación profesional y personal. Un especial agradecimiento a mi tutor Mg.Sc David Andrade, quien desde un principio mostró interés y dedicación para sacar adelante en conjunto este trabajo investigativo, demás personas que contribuyeron a su realización y a los animales, quienes han sido la inspiración de mi profesión.

DEDICATORIA

A mi familia, quienes siempre han sido un soporte a lo largo de mi vida, a mi madre, Isabel, quien ha estado conmigo en todo momento de manera incondicional, a mis hermanas quienes me han motivado para ser mejor cada vez, a mi padre, a mi abuela, quien inculcó en mí el gusto por el trabajo con los animales y a todos quienes han formado parte de este trayecto de formación, mis amigos.

RESUMEN

Mastitis es una enfermedad de gran importancia en el ámbito pecuario, causada por una variedad de agentes etiológicos, tanto físicos, biológicos, mecánicos, infecciosos o de manejo. A un porcentaje elevado de estos casos se los atribuye a la presencia de organismos patógenos, los mismos que ingresan por el canal del pezón y colonizan la glándula mamaria, trayendo consigo efectos negativos que afectan a la salud del animal. El objetivo de este trabajo fue obtener anticuerpos policlonales IgY presentes en la yema de huevo de gallina, para tres bacterias identificadas en leche de vacas positivas a mastitis subclínica, vacas de dos predios lecheros ubicados en Nono y el Chaco. En el estudio se utilizaron 10 aves raza Lohman Brown de 14 semanas de edad, a las que se inoculó las tres bacterias identificadas en forma de antígenos (*S. aureus*, *S. intermedius* y *S. agalactiae*). Adicionalmente, se realizaron variaciones en la dieta, formado tres grupos experimentales, de la siguiente manera: alimento balanceado el primer grupo, un segundo grupo con balanceado y vitaminas y el tercer grupo balanceado con espirulina, a cada grupo se le administró un antígeno diferente. Para la evaluación se tomaron muestras de sangre y huevos durante seis semanas, realizando titulaciones de anticuerpos en suero y yema. El resultado obtenido fue que el grupo inoculado con el antígeno de *S. agalactiae* y mantenido con balanceado adicionado espirulina tuvo una respuesta inmunitaria más elevada a los 14 y 21 días; también la concentración de anticuerpos purificados (10.5 mg/mL) fue mayor al resto de grupos, seguido por el grupo que se alimentó con balanceado más vitaminas e inoculado con *S. aureus* (9.5 mg/mL) y finalmente el grupo que se alimentó de balanceado únicamente e inoculado con *S. intermedius* (7.2 mg/mL). Con esto se concluye que los agentes causales de mastitis subclínica bovina son capaces de generar la respuesta inmune en aves, por consiguiente las IgY son transmitidas a los huevos y pueden ser purificados a partir de sus yemas.

Palabras clave: mastitis, anticuerpos IgY, *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. agalactiae*.

ABSTRACT

Mastitis is a disease of great importance in the livestock area, caused by a variety of etiological agents, physical, biological, mechanical, infectious or due to management. A high percentage of these cases are attributed to the presence of pathogenic organisms, which enter through the nipple canal and colonize the mammary gland, bringing negative effects that affect the health of the animal. The objective of this study was to obtain polyclonal antibody IgY present in egg yolk on milk of three subclinical mastitis-positive cows. For this, samples from two dairy farms were obtained on dairy cows located in Nono and Chaco. In the studio were manipulated 10 birds of 14 weeks of age from Lohman Brown breed, and inoculated with three identified bacteria in antigen form (*S. aureus*, *S. intermedius* and *S. agalactiae*). Additionally, diet variations were held, forming three experimental groups as follows: the first group with concentrate, a second group with concentrate food and vitamins and the third group concentrate with Spirulina, each group was inoculated with a different antigen. For the assessment, blood samples and eggs were taken for six weeks, performing titration in serum and yolk. The results showed that the Group inoculated with the antigen of *S. agalactiae* and maintained with concentrate and Spirulina had a higher immune response at 14 and 21 days, also the concentration of purified antibodies (10.5 mg / mL) was higher compared to the rest of the groups, followed by the group that was fed with concentrate plus vitamins and inoculated with *S. aureus* (9.5 mg / mL); and finally the group that was fed with concentrate only and inoculated with *S. intermedius* (7.2 mg/mL). With this results, we can conclude that the causal agents of bovine subclinical mastitis, are capable to generate the immune response in birds, therefore, the IgY are transmitted.

Key words: mastitis, antibody, IgY, *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. agalactiae*.

INDICE

CAPITULO I: INTRODUCCION	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Objetivo General	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3. Problema	3
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes investigativos	4
2.2. Glándula mamaria.....	6
2.2.1. Estructura externa.....	6
2.2.1.1. Sistema de ligamentos suspensorios de la ubre.....	6
2.2.2. Estructura interna.....	7
2.2.3. Mamogénesis.....	9
2.2.4. Lactogénesis.....	10
2.2.5. Galactopoyesis	10
2.2.6. Secado.....	11
2.2.7. Alteraciones de la glándula mamaria	11
2.2.7.1. Malformaciones.....	11
2.2.8. Mastitis.....	12
2.2.8.1. Causas de la mastitis	13
2.2.8.2. Sintomatología de la enfermedad.	14
2.2.8.3. Pruebas diagnósticas para mastitis.....	14
2.2.8.4. Pruebas Químicas.....	15
2.2.8.5. Pruebas Biológicas	16
2.2.8.6. Pruebas bacteriológicas.....	17
2.2.8.7. Control y prevención de la enfermedad	17
2.3. Aislamiento y cultivo bacteriano de leche mastítica.....	21
2.3.1. Descripción de los agentes bacterianos.....	21
2.3.1.1. Staphylococcus aureus	22

2.3.1.2. Staphylococcus intermedius.....	26
2.3.1.3. Streptococcus agalactiae	29
2.4 Inmunoglobulinas IgY, formación, descripción, extracción, usos y ventajas.	32
2.4.1. Aparato reproductor de la gallina	32
2.4.1.1. Ovario	33
2.4.1.2. Oviducto.....	33
2.4.2. Formación del huevo.....	34
2.4.3. Inmunoglobulinas IgY.....	36
2.4.4. El sistema inmune en las aves.....	37
2.4.5. Estructura de las inmuglobulinas en las aves	38
2.4.6. Transferencia de inmunoglobulina IgY a la yema	39
2.4.7. Historia de la tecnología IgY.	40
2.4.8. Extracción y purificación de la IgY presente en yema de huevo	41
2.4.9. Aplicación de la tecnología IgY	42
2.4.10. Futuro de la tecnología IgY.	46
2.4.11. Ventajas del uso de inmunoglobulinas IgY en el tratamiento de especies domésticas.....	48
3.1. Diseño de la investigación.	50
3.1.1. Unidad de estudio de la investigación.....	51
3.1.1.1. Obtención de muestras de leche mastítica.	51
3.1.1.2. Obtención de anticuerpos IgY.....	51
3.1.2. Población y muestra.....	54
3.1.2.1. Población	54
3.1.2.2. Muestra	55
3.2. Toma de muestras de leche	55
3.2.1. Método de campo.	55
3.2.1.1. Protocolo para toma de muestras de leche.....	55
3.2.1.2. Método para la obtención de muestra de leche	56
3.3. Materiales.....	61
3.4. Hipótesis.....	62

3.5. Variables	63
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1. Resultados	64
4.2. Discusión.....	70
4.3. Limitaciones.....	73
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y	
RECOMENDACIONES.....	74
5.1. Conclusiones.....	74
5.2. Recomendaciones	74
REFERENCIAS	76
ANEXOS.....	87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de la ubicación geográfica del cantón El Chaco, provincia del Napo.....	53
Figura 2: Mapa de la ubicación geográfica de la parroquia de San Miguel de Nono, provincia de Pichincha.	54
Figura 3: Mapa de la ubicación geográfica de la parroquia de San Antonio de Pichincha.....	54
Figura 4: Metodología para cultivo y aislamiento de las muestras.	57
Figura 5: Diferencias de peso (kg)	67
Figura 6: Prueba de diferencia entre medias de titulaje en suero.	68
Figura 7: Titulaje en suero sanguíneo	69
Figura 8: Medias de concentración IgY purificado de yema.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura de los grupos de investigación.....	51
Tabla 2. Variables de Estudio	64
Tabla 3. Datos iniciales de la investigación	66
Tabla 4. Diferencias de Peso por grupos.....	66
Tabla 5. Promedio de titulajes en suero sanguíneo y yema de huevo.....	67
Tabla 6. Análisis de varianza de titulaje en suero por bacteria.	68
Tabla 7. Prueba de diferencia de medias (LSD) en suero sanguíneo.....	68
Tabla 8. <i>Promedio de concentración de IgY purificada.....</i>	<i>69</i>
Tabla 9. <i>Análisis de varianza de concentración de IgY purificada.</i>	<i>70</i>
Tabla 10. <i>Prueba de diferencia de medias (LSD) concentración de IgY en yema.</i>	<i>71</i>

CAPITULO I: INTRODUCCION

1.1. Antecedentes

Se conoce a la mastitis como una enfermedad de distribución mundial, muy común y costosa para el productor. Sin duda son muchos los estudios que se han realizado sobre la misma enfermedad, determinando que altera la composición del lácteo, eleva la carga bacteriana e incluso las cualidades organolépticas de la leche. Este problema se considera de difícil erradicación por su fácil diseminación, pero es posible evitarlo mediante acciones preventivas (Philpot y Nickerson, 2002).

Esta enfermedad es de naturaleza infecciosa, desencadenada en la mayoría de casos por una asepsia deficiente o nula antes del ordeño; una condición importante es la falta de sellado después del mismo. Las heridas abiertas o traumatismos sin duda son causas adicionales (Menzies y Ramanoon, 2001).

A nivel mundial los tratamientos de elección son los antibióticos, que representan un gasto económico bastante elevado, afectando a la economía de los grandes y pequeños productores.

Wellenberg et al. (2005), estiman que las pérdidas monetarias bordean los 35 billones de dólares americanos por año. Por estas razones, es de interés para el presente estudio el desarrollar, mediante tecnologías alternativas no antibióticas, un método preventivo para controlar la enfermedad.

La tecnología IgY es un tema antiguo pero recientemente retomado, ya que en 1893 Klemperer describe en archivos de patología y farmacología el primer ensayo sobre inmunización a partir de anticuerpos de yema de huevo; este científico inoculó a un grupo de gallinas una solución de caldo de cultivo que contenía bacterias de *Clostridium tetani*, posterior a esto recolectó los huevos y preparó una sustancia acuosa a partir de las yemas, para así inocular a tres grupos de ratones, que serían su unidad experimental. Inoculando 1ml, 0.50 ml y 0.25 ml respectivamente dejando un cuarto grupo como unidad de control.

Seguido a esto desafió a los cuatro grupos exponiéndoles a la enfermedad, resultando que los grupos inoculados con 1 y 0.50ml de antígeno sobrevivieron a la enfermedad, no siendo así el caso de los ratones que recibieron 0.25ml y por supuesto el grupo que no fue inoculado.

Con este experimento se conocieron las ventajas de la utilización de la yema de huevo como un método de protección específica. Este experimento inexplicablemente quedó en el olvido hasta que en el año de 1959, dos alemanes Russel y Burch describen este método en una publicación “Los principios de la técnica experimental humana” (Terzolo 2010). El objetivo principal del presente trabajo es obtener anticuerpos policlonales IgY presentes en la yema de huevo, para tres bacterias identificadas en leche de vacas positivas a mastitis subclínica, para esto se empleará el ya mencionado método con la finalidad de combatir inmunológicamente a los agentes causales de esta infección que merma la producción láctea.

Si bien es cierto se han realizado varios estudios sobre la tecnología IgY, en nuestra realidad productiva no se ha evaluado su aplicación sobre el control de mastitis, por ende el tema propuesto es novedoso por las particularidades de la investigación, constituyendo un aporte tanto para productores, empresas de acopio y para el sector académico que basándose en este estudio podrá desarrollar nuevas investigaciones con aplicación al campo preventivo. específicamente para esta patología tan común y tan necesitada de solución.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Obtener anticuerpos policlonales IgY presentes en la yema de huevo de gallina, para tres bacterias identificadas en leche de vacas positivas a mastitis subclínica.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar y aislar tres patógenos principales presentes en muestras de leche positivas a mastitis subclínica de dos predios lecheros.
- Evaluar el efecto de la dieta y suplementos sobre la cantidad de anticuerpos específicos presentes en suero y yema de huevo en diferentes periodos de tiempo, posterior a la inoculación del antígeno.
- Relacionar la cantidad de anticuerpos policlonales IgY purificados con el tipo de antígeno bacteriano inoculado en un tiempo determinado.

1.3. Problema

La mastitis es una enfermedad que trae consigo un alto índice de pérdidas de productividad, así también considerables pérdidas económicas en los predios que dedican su producción al negocio de la leche y por supuesto una baja calidad de vida para los animales.

Para el control y tratamiento de la enfermedad existen medidas de bioseguridad y otras ya curativas, principalmente tratamientos antibióticos, sin embargo ninguna medida preventiva, como por ejemplo una bacterina, que pueda proteger al animal de ciertos agentes patógenos oportunistas.

Consiente de esta realidad, en el presente estudio se propone obtener anticuerpos específicos para tres bacterias presentes en muestras de leche positiva a mastitis subclínica mediante el uso de la tecnología IgY.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

La mastitis bovina es una enfermedad de carácter crónico, dicha enfermedad es de distribución mundial, en la actualidad existen una variedad de medicamentos para combatirla y prevenirla, lastimosamente hasta el momento no se han conseguido resultados positivos para erradicarla de los hatos lecheros (Bray y Broaddus, 2006).

Esta enfermedad existe desde la domesticación de la vaca, con fines productivos (Philpot y Nickerson, 1993). A nivel mundial se cree que al menos un tercio de todas las vacas se ven afectadas por esta enfermedad, en cualquiera de sus dos presentaciones.

La mastitis es una enfermedad infecciosa donde interactúan entre 137 a 150 bacterias, entre todos ellos se debe mencionar que los agentes más representativos de esta enfermedad son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Esta enfermedad es el resultado de varios factores como por ejemplo el medio ambiente o habitat, microorganismos y el manejo, todos estos factores causales se asocian y desencadenan un cuadro mastítico infeccioso.

Esta enfermedad aparte de afectar a la salud del animal, tiene repercusión en la salud pública, es por esto que se considera con más razón un problema de distribución mundial, según se conoce la mastitis representa el 30 % de todas la enfermedades en el ganado lechero.

A nivel nacional se han hecho estudios en el sector de Mejía, Cayambe, Quito y Ruminahui, con la finalidad de conocer la prevalencia de mastitis en los principales sectores lecheros del país. En estos estudios se han aislado e identificado los agentes causales de esta enfermedad (Álvarez, 1965, p.7).

En el año de 1984 Torres realiza un estudio con la finalidad de conocer el número de animales afectados por mastitis subclínica, donde se muestra que de 1485 animales 1183 son positivos a mastitis subclínica y el 90% son afectados por bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus disgalactiae* y *Streptococcus*, el 10% sobrante corresponde distintas bacterias como por ejemplo *E. coli* (Espinoza y Mier, 2013).

Dada la problemática que esta enfermedad acarrea es necesario formular tratamientos no solo curativos, sino mejor aún, preventivos.

En el presente trabajo investigativo se plantea la utilización de la tecnología IgY. Esta alternativa terapéutica se apoya en la realización de anticuerpos partiendo de la inoculación de un antígeno en gallinas de postura, para posteriormente recolectar los huevos y extraer de la yema los anticuerpos específicos.

Esta metodología se la considera una alternativa muy efectiva para la obtención de anticuerpos específicos, la misma que se consigue a partir de la separación de los lípidos y agua presentes en la yema de huevo (Bilbao, 2007). Las aves tienen la capacidad de transportar los anticuerpos séricos a la yema del huevo, alojándolos ahí para que transmitir por inmunidad pasiva al pollo recién nacido (Bilbao, 2007).

Valiéndose de esta condición natural, se puede aprovechar dicha circunstancia fisiológica y emplearla en pro de la salud. Si bien es cierto se han realizado varios estudios sobre la tecnología IgY en el campo de la medicina humana y la medicina veterinaria, ninguno de ellos se ha enfocado en tratamientos para esta conocida enfermedad, nuestra realidad productiva necesita otro tipo de alternativas no antibióticas para el tratamiento de la mastitis.

Por esto el presente tema resulta novedoso dadas las particularidades de la investigación, constituyendo un aporte tanto para productores, empresas de

acopio y para el sector académico que basándose en este estudio podrá desarrollar nuevas investigaciones con aplicación al campo preventivo, específicamente para esta patología tan común y tan necesitada de apoyo a partir de la investigación.

2.2. Glándula mamaria

En el caso de la mayoría de los mamíferos cuadrúpedos, la ubicación de la glándula mamaria se inserta ventralmente, ofreciendo de esta manera un acceso fácil al neonato para que se pueda alimentar de la leche materna. En el caso de la vaca, se suspende por la parte externa del abdomen posterior y se considera una glándula cutánea exocrina que secreta leche. Esta estructura se constituye por cuatro glándulas, conocidas como “cuartos”, normalmente cada cuarto es una unidad funcional en sí misma, que puede operar independientemente y alberga la leche en las cisternas, para posteriormente drenarla por su propio canal (Ávila y Romero, 2015).

Generalmente los cuartos posteriores son algo más grandes y pueden producir un 60% de la leche total.

La ubre de la vaca comprende está formada por varias estructuras anatómicas, una estructura externa formada por el sistema de ligamentos suspensorios y una estructura interna que posee un estroma (Ávila y Romero, 2015).

2.2.1. Estructura externa.

2.2.1.1. Sistema de ligamentos suspensorios de la ubre.

Este aparato se constituye por 7 elementos (Ávila y Romero, 2015).

La piel: que colabora en la suspensión de la glándula, estabilidad y protección de la misma.

- Cordón areolar: este forma una banda de soporte entre la región dorsal y la parte abdominal.
- Tejido areolar: este se ubica subcutáneamente, sujetando a la piel y a los tejidos aledaños.
- Ligamento suspensorio lateral: formado en su mayoría por tejido elástico, tejido conjuntivo fibroso, este ligamento se origina en el tendón subpélvico extendiéndose hacia la parte delantera de la ubre y hacia la parte baja de la misma.
- En la porción media de la ubre, dos láminas elásticas que se originan en la túnica abdominal, formando el ligamento suspensorio medio. A este ligamento se le atribuye una gran capacidad de amortiguación, gracias a su capacidad de elongación.

2.2.2. Estructura interna.

A la ubre se la considera una glándula exocrina dado que la leche es una secreción sintetizada en células especializadas que se agrupan y ubican en los alveolos para posteriormente secretar este producto fuera del cuerpo a través de un sistema de conductos especializados.

Se considera al alveolo como la unidad de producción funcional, a esta estructura se la describe como una esfera hueca, conformada por una pared de células secretoras de leche. Los alveolos están rodeados por capilares sanguíneos y células mioepiteliales.

Estos alveolos se agrupan entre 150 a 230 de ellos, a manera de racimos sostenidos por un estroma, los mismos que están irrigados por arterias, venas y una lámina propia (Ávila y Romero, 2015). Los alveolos que conforman los lóbulos desembocan en pequeños ductos dentro del mismo, llamados lóbulos intralobulares.

En concreto las funciones del alveolo son:

- Precursores circulantes en la sangre.
- Transformar los precursores a nutrientes de la leche

— Descargar la leche dentro del lumen.

Estas estructuras alveolares se componen de capas de células epiteliales, desempeñando la función de retirar nutrientes de la sangre, transformarlos en leche y descargarla en el lumen de cada alveolo (Ávila y Romero, 2015). Alrededor de cada alveolo se encuentra una red de capilares los cuales brindan nutrientes y hormonas con la finalidad de sintetizar la leche a más de retirar productos de desecho de las células alveolares. Los alveolos también están provistos de células musculares especializadas, dichas células actúan frente a la presencia de la oxitocina haciendo que la leche ingrese a los conductos y a las cisternas de cada pezón para almacenarse hasta que en condiciones naturales la cría succione el pezón que vendría a ser una prolongación cónica por donde fluye la leche al exterior.

El proceso de secreción de leche es de manera constante y rápida, se habla que después del ordeño tarda entre 8 a 10 horas para llenarse las cisternas, hay que entender que, conforme la presión intramamaria aumenta la producción de leche va disminuyendo, con la finalidad de dar albergue a la cantidad soportable por las cisternas. Para que la producción de leche sea posible es necesario el paso de 400 a 500 kg de sangre por la ubre para que se genere apenas 1 kg de leche.

Una estructura muy importante que forma parte de la glándula es los pezones. El seno del pezón es una cavidad interna del mismo que se localiza exactamente abajo del seno lactífero papilar. El pezón se compone por una pared externa llamada epidermis, dermis, músculo, tejido conjuntivo y mucosa. En esta última porción se encuentran múltiples pliegues longitudinales y circulares, los mismos que forman tabicaciones dividiendo así al seno (Ávila y Romero, 2015).

El seno lactífero tiene conexión al exterior por un orificio muy angosto denominado el conducto estriado, ducto papilar o meato del pezón. Esta es la

estructura que se expande en presencia de la presión ejercida en condiciones naturales de la presión de la cría o en el ordeño (Ávila y Romero, 2015). Entre el canal estriado y el seno lactífero se encuentran una serie de pliegues entre cinco a siete, estos pliegues forman la conocida estructura llamada “Roseta de Füstenberg”, esta roseta se considera una barrera protectora ante la entrada y colonización de bacterias.

A parte de las estructuras ya mencionadas una parte muy importante es el sistema de circulación arterial.

La glándula se nutre por medio de la arteria pudenda externa en su mayoría y una pequeña parte de la arteria pudenda interna.

Arteria pudenda externa: Es voluminosa, su diámetro varía de acuerdo al tamaño de la glándula. Se acompaña cranealmente por la vena pudenda externa y también por los nódulos linfáticos mamarios y sus aferentes (Ávila y Romero, 2015).

Esta arteria a nivel de anillo inguinal superficial, presenta una flexura en forma de “S”, es de aquí de donde nacen dos gruesas ramas que son la arteria mamaria craneal y la arteria mamaria caudal.

El desarrollo de la glándula mamaria se realiza en distintas fases como son: mamogénesis, lactogénesis, galactopoyesis y secado de la glándula.

2.2.3. Mamogénesis

La glándula mamaria se desarrolla a nivel fetal en todas las especies mamíferas, en el bovino comienza desde el ectodermo, entre el día 30 al día 35 se visualizan las líneas mamarias. El resto de estructuras como los alvéolos, los canales mamarios y conductos excretorios se forman alrededor del tercer mes a tercer mes y medio.

- Mamogénesis prenatal: se da a nivel intrauterino, y comienza a los 35 días de formación embrionaria, aquí se forman los pezones y las cisternas glandulares, pero no se desarrollan los conductos principales.
- Posnatal o prepuberal: aquí se da el crecimiento y la maduración de los esfínteres y resto de fibras musculares.
- Puberal: en esta etapa la glándula crece con mayor rapidez que el resto de órganos. Los conductos se desarrollan con rapidez, desarrollo del epitelio y se vascularización.
- Gestacional: es en esta fase donde el desarrollo de la glándula alcanza su desarrollo al máximo, los lóbulos acaban su maduración. Hay desplazamiento de tejido adiposo, crecimiento total de conductos.

2.2.4. Lactogénesis

Llamado así al proceso por el cual las células de los alveolos mamarios adquieren la capacidad de secretar la leche, esta fase a su vez comprende dos etapas:

- Lactogénesis I: que comienza en el último tercio de gestación, aumentando la actividad enzimática, provocando la producción láctea.
- Lactogénesis II: existe secreción láctea abundante y comienza días antes del parto y continúa por varios días.

2.2.5. Galactopoyesis

Es la fase de mantenimiento de la producción láctea, donde intervienen hormonas como la GH, glucocorticoides, TSH, insulina.

2.2.6. Secado

Se conoce que las células alveolares que se van perdiendo a lo largo de la lactancia no se reemplazan, la cantidad de células alveolares influye de manera directa a la producción del lácteo. Es por esta razón que en temas de producción se permite a la glándula y sus tejidos recuperarse, dándole un descanso, a este periodo se la denomina “periodo de secado”, el mismo que puede ser natural y se lo llama destete, o artificial, que se lo realiza de manera gradual en el ordeño.

2.2.7. Alteraciones de la glándula mamaria

A lo largo de la vida del animal la glándula mamaria sufre de varios cambios morfológicos, funcionales, circulatorios, cambios iatrogénicos.

2.2.7.1. Malformaciones

Estas malformaciones pueden presentarse en los conductos galactóforos, pezón, esfínteres y demás estructuras que conforman la glándula.

Las malformaciones pueden ser adquiridas o de origen teratógeno, se pueden evidenciar en el momento del parto y en producción, al momento del ordeño.

Entre otras malformaciones se podría nombrar a:

- Hiperplasias.
- Quistes.
- Alteraciones circulatorias.
- Polimastía.
- Ginecomastia.

2.2.8. Mastitis

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria desencadenada por una infección de carácter patógeno. Tiene una tasa de afectación a nivel mundial muy elevada, basándose en investigaciones se conoce que la disminución en la producción de leche decrece en un 70% (Bray y Broaddus, 2006).

Esta condición tiene por consiguiente repercusión en una disminución del valor del lácteo, ya que dicha enfermedad afecta notablemente a la calidad (Bray y Broaddus, 2006).

Esta enfermedad se puede presentar de dos maneras:

- Mastitis Subclínica: es más común que la mastitis clínica, por su característica es difícil de detectarla ya que no presenta signos visibles ya que externamente la ubre luce con normalidad, por esta razón es necesario realizar pruebas confirmatorias, a la mastitis se la considera una infección de larga duración si no se la trata a tiempo (Radostits, 2002).
- Mastitis clínica: al contrario que la mastitis subclínica esta es de fácil determinación, a nivel de ubre se vuelve visible la inflamación, edematización, rigidez al momento de la palpación, al igual que en la leche, donde las características son notorias por la formación de cuábulos, secreciones anormales, hasta un tanto sanguinolientas (Radostits, 2002).
- Esta enfermedad de la glándula mamaria se desarrolla en tres etapas, la de invasión de patógenos, seguida la etapa de infección y por último la inflamación de la glándula (Radostits, 2002).
- La invasión: bacterias que habitan en el exterior de la ubre, encuentran la oportunidad de entrar a la glándula colonizándola.
- La Infección: las bacterias que invadieron la glándula se reproducen velozmente, originando una población representativa a nivel de los conductos glandulares y pezón.

- La inflamación: la ubre se presenta inflamada, presenta aumento de temperatura y en la leche ordeñada aumenta el número de leucocitos.

La mastitis es una enfermedad que se puede confirmar su presencia mediante la realización de varias pruebas. Existen test confirmatorios como el CMT, mismo que es usado con mayor frecuencia por la rapidez de entregar una respuesta, como también otros que consisten en pruebas químicas más complejas y se las debe realizar a nivel de laboratorio.

2.2.8.1. Causas de la mastitis

Varias pueden ser las causas que contribuyan a que el animal enferme de mastitis, principalmente se conoce que esta enfermedad es de carácter infeccioso y los agentes patógenos causales son más de 160, pero para que esto sea posible existen causas varias que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, entre ellas se podría tomar en cuenta a las siguientes:

- Estrés
- Factores ambientales
- Manejo
- Momento del ordeño
- Factores técnicos (Mazo, 2012).
-

Estas circunstancias vuelven propenso al animal para que su glándula pueda ser colonizada por estos agentes patógenos. Si no se llevan a cabo las labores de bioseguridad el animal puede fácilmente contraer la infección y así bajar el rendimiento de producción y peor aun disminuir su calidad de vida.

Estos agentes patógenos microscópicos penetran la ubre accediendo a ella por el canal del pezón, multiplicándose dentro de la glándula y ocasionando la infección. Se conoce que el 95% de los casos se responsabilizan a*

Staphylococcus aureus, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* (Pinzón, 1989).

*(Ver detalle en la página número 22).

2.2.8.2. Sintomatología de la enfermedad.

Al iniciar la infección no se presentan signos clínicos, no hay presencia de cuadros febriles, ni aumento de la temperatura en la región de la glándula, al igual que la leche no tiene cambios aparentes. Con el pasar de los días la infección se agudiza y por supuesto aparecen ya alteraciones notables dependiendo del grado de infección. La producción disminuye, la glándula se presenta edematizada y en ocasiones nódulos en los pezones. Si no se actúa de manera oportuna el tejido intersticial de la glándula se va endureciendo y aprisionando todo el tejido noble de su alrededor, en el caso de no actuar a tiempo la glándula se ve comprometida y toma una característica, rígida, hasta volverse una sola masa endurecida pudiendo perderse los cuartos afectados (Pinzón, 1989).

Para diagnosticar la infección mastítica se deberá realizar un examen físico de la ubre como tal, realizando una palpación, notar el cambio de textura, presencia de calor localizado, endurecimiento y al momento del ordeño fijarse en el aspecto de la leche. Acompañado al examen físico se deberá realizar pruebas de campo entre ellas la más popular es el CMT- California Mastitis Test (Pinzón, 1989).

2.2.8.3. Pruebas diagnósticas para mastitis

Entendido en que consiste la mastitis, la presentación y los agentes causales es necesario conocer las pruebas diagnosticas que existen para determinar la presencia de la enfermedad, entre ellas tenemos:

2.2.8.3.1. La observación y la palpación de la ubre

Se podría decir que es la manera más sencilla de evaluar la glándula mamaria, sin lugar a dudas, la base para realizar una segunda prueba confirmatoria. En animales positivos a la enfermedad la ubre exteriormente está sana, cumple sus funciones normales, pero internamente hay una infección alterando el tejido y por consiguiente razón, la leche (Pérez et al., 2005).

2.2.8.3.2. Prueba de la escudilla de ordeño

Esta prueba es realizada cuando existe la sospecha de que la infección mastítica está presente, para realizarla se deberá tomar una muestra de la leche sospechosa en un pocillo de fondo negro, donde visualmente se evidencia grumosidades ocasionadas por la infección mastitica (Pérez et al., 2005).

2.2.8.3.3. Prueba del paño negro

Esta evaluación se deberá realizar antes de cada ordeño, es considerado un examen de campo, básicamente cumple la misma función que el de escudilla, detecta grumosidades en la leche, las mismas que quedan sobre el paño de color oscuro, para efectuarla se deberá ocupar el tercer chorro y dejar pasar por un lienzo negro, donde si es positivo quedarán suspendidos grumos de leche (Pérez, 1986).

2.2.8.4. Pruebas Químicas

2.2.8.4.1. Conductividad eléctrica de la leche

Test de última generación, sin embargo no sería una prueba gold estándar. Consiste básicamente en determinar el incremento de conductividad eléctrica del lácteo respondiendo a un mayor contenido electrolítico como iones de sodio y cloro (Medina y Montaldo, 2003).

2.2.8.4.2. Papel indicador de mastitis

Consiste en tomar gotas directas del pezón e impregnarlas en la cinta de pH, se consideran vacas sospechosas aquellas que resultan con una coloración indicativa a pH igual o superior a 7. La confiabilidad de la prueba es de un 50% (Medina y Montaldo, 2003).

2.2.8.4.3. Prueba de Whiteside

Se mezcla la leche con NaOH al 4% lo que ocasiona una gelificación de la leche formando grumos visibles, estos grumos serán más grandes de acuerdo al número de células somáticas presentes en la muestra de leche (Ávila, 1984; Pérez, 1986).

2.2.8.5. Pruebas Biológicas

2.2.8.5.1. California Mastitis Test

La prueba california mastitis test o CMT ha sido utilizada durante años y se considera la primera opción al momento de realizar pruebas de campo, es una prueba sencilla pero a la vez subjetiva, nos permite evaluar animales enfermos con mastitis subclínica, determinando el número de células somáticas. (Morresey, 1999; Radostits, 2000; Medina y Montaldo, 2003; Erskine, 2001; Bedolla, 2004; Bedolla, 2004).

2.2.8.5.2. Prueba de Wisconsin para Mastitis

Está diseñada para emplearla a nivel de laboratorio, con esta se mide el número de células somáticas en la muestra de leche fresca, mezclada de varios proveedores o leche proveniente de depósitos de acopio. Reacciona con un reactivo similar al del CMT, la diferencia de esta prueba es que las mediciones son cuantitativas y depende de la viscosidad de la muestra (NMC, 1999; Bedolla, 2004).

2.2.8.5.3. Monitoreo del conteo de células somáticas

Hay que saber que las células somáticas son propias del organismo, estas células están presentes en la sangre y tejido glandular y obviamente pasaran a la leche. El número de células varía dependiendo del estado de salud del

animal y de la glándula mamaria en el periodo de lactancia, dado que tiene relación en la constitución de la leche, se considera como un parámetro de calidad representativo (Bedolla, 2004).

2.2.8.6. Pruebas bacteriológicas

Es necesario realizar cultivos bacteriológicos con la finalidad de conocer e identificar los organismos patógenos presentes en una infección mastítica, sea clínica o subclínica. Cabe recalcar que la toma de las muestras se deberán hacer con total cuidado de asepsia ya que de esto dependerá la veracidad de los resultados (Pérez et al., 2005).

2.2.8.7. Control y prevención de la enfermedad

Al momento del ordeño los pezones deben estar limpios, estimulados y secos, para esto se ocupará un trapo limpio o mejor aún papel desechable y agua fresca para realizar la limpieza de cada pezón. Lógicamente las manos del operario deberán estar limpias, ya que son una fuente importante de contaminación bacteriana (Andresen H, 2001).

2.2.8.7.1. Instalaciones y maquinaria de ordeño

El equipo de ordeño representa un factor importante que puede contribuir en gran medida con la incidencia de la mastitis. El equipo en si deberá estar bien calibrado y la fuerza de succión deberá ir de la mano con el número de animales y el tipo de máquina (Andresen H, 2001).

2.2.8.7.2. El personal

Los operarios al ser las personas que están en contacto directo con los animales, se consideran factores importantes en la presentación de la enfermedad. El manejo responsable de equipos, animales y asepsia ayudará a bajar el número de células somáticas. De no tener estos parámetros claros se pueden transformar en generadores de la enfermedad. Para esto se deberá

capacitar al personal de apoyo en varios puntos que a continuación se mencionarán (Andresen H, 2001).

- **Sellado de pezones después del ordeño**

Finalizado el ordeño el canal del pezón permanece abierto por un tiempo estimado de treinta minutos a dos horas, en este lapso de tiempo los microorganismos pueden fácilmente colonizar el canal y provocar nuevas infecciones. Es por este motivo la importancia del uso de productos antisépticos confiables, estos disminuyen la probabilidad de contraer infecciones intramamarias. El sellado del pezón es la medida más efectiva y barata en el plan de control para mastitis (Andresen H, 2001).

- **Eliminación de animales mastíticos crónicos**

Se considera a una vaca como crónica cuando presenta más de dos casos clínicos en una misma lactancia, y estos cuadros de enfermedad deberán presentarse con un máximo de quince días de diferencia. Estos pacientes por lo general después de ser tratados pasan de un cuadro clínico a un cuadro sub clínico, así después de un tiempo regresando al primer estado. Esto responde a que el tratamiento proporcionado obtiene únicamente la cura clínica y no la bacteriológica. Estos casos de mastitis crónica que no son aislados del rejo en producción son los que aportan con un elevado recuento de células somáticas a los tanques de acopio y diseminan la enfermedad a vacas sanas, por medio del equipo de ordeño principalmente (Andresen H, 2001).

- **Tiempo de secado**

En esta etapa se deberán tratar a todas las vacas que están pasando de la fase de producción a una época de descanso, aquí se deberá tratar a los cuatro cuartos de todas las vacas. Este tratamiento que por lo general suele ser antibiótico se llevará a cabo dos meses antes de la fecha probable del siguiente parto. La administración del antibiótico intramamario tiene por objetivo la prevención de la mastitis clínica a partir del tiempo de secado o como tratamiento curativo de algún episodio de mastitis subclínica en época de producción. En esta fase la

medicina de elección es el antibiótico secador de larga duración, ya que aumenta la posibilidad de curación (Andresen H, 2001)

- ***Planificación del ordeño***

Se recomienda ordeñar primero a los animales sanos y dejar para el final los animales enfermos en tratamiento, de esta manera se controla la diseminación de la enfermedad y agiliza la rutina de ordeño (Andresen H, 2001).

- ***Manejo de estrés en las vacas***

El mal trato de los operarios hacia los animales, el acarreo rápido, trabajos en la manga, intervención de otros animales como por ejemplo perros al momento del arreo del ganado, ha demostrado dichos factores adversos ayudan al incremento de células somáticas (Andresen H, 2001).

2.2.8.7.3. La Vaca

- ***Número de lactancias***

Las vacas normalmente tienen un recuento de células somáticas de 100.000 a 150.000 células sobre mililitro. Conforme crecen y a su vez aumentan el número de lactancias presentan un mayor número de células somáticas, sin embargo a la edad de la vaca este recuento no deberá sobrepasar las 200.000 cel/ml (Andresen H, 2001).

- ***Fase de lactancia***

El conteo de células somáticas elevado en fechas cercanas al parto se consideran normales, no necesariamente debe estar infectada la vaca para que este dato denote una infección. Conforme avanza la etapa de lactancia, entre unos 200 a 250 días, algunas vacas pueden presentar un incremento en los recuentos de células somáticas sin que posean la enfermedad. Como parte del manejo habrá que aportar con una mejor nutrición para el animal recién parido ya que estudios han demostrado una relación entre la cetosis y el desarrollo de mastitis en animales post parto (Andresen H, 2001).

2.2.8.7.4. Medio ambiente.

Actividades sencillas pueden reducir el riesgo de contagio. Por ejemplo sellar bien los pezones de cada vaca post ordeño contribuirá bastante, evitando la colonización de microorganismos patógenos. Otra medida importante es mantener el ambiente limpio y seco. Evitar que las vacas reposen o crucen sitios que presenten estancamientos de agua o acumulo de lodo, al menos las dos primeras horas post ordeño. Para evitar esta circunstancia se recomienda colocar comederos o saladeros a disposición del animal evitando así el contacto con un medio contaminado. “Ambiente limpio y seco es importante para mantener la salud de la ubre” (Andresen H, 2001).

2.2.8.7.5. Tratamiento

Durante varios años la mastitis se ha tratado con antimicrobianos, se estima que durante cincuenta años productores y veterinarios se han apoyado en las terapias antibióticas, a pesar de esto en la actualidad no se logra entrar en un acuerdo de un tratamiento efectivo y por supuesto económico (Pyorala, 2011). El metabolismo del antibiótico en el organismo del animal depende mucho de su vía de administración, la farmacocinética de ese medicamento, la cantidad de proteínas séricas y por supuesto el estado fisiológico de la ubre. Cuando se administra un fármaco por vía intramamaria un factor a tomar en cuenta es la naturaleza del adyuvante, ya que este permitirá la distribución del fármaco por la glándula mamaria, los adyuvantes de naturaleza orgánica son débiles y se acumulan en la leche. Se considera que las drogas antimastíticas en lo posible deberán tener una actividad bactericida más que fagocítica dado que la acción fagocítica es menor en la glándula mamaria (Pyorala, 2011).

- *Tratamiento intramamario*

Generalmente productores, técnicos y veterinarios ocupan esta vía de administración para tratamientos mastíticos, mediante la administración de esta vía se obtienen varias ventajas ya que permite el aporte de altas concentraciones de antibiótico en los compartimentos de la glándula donde se acopia la leche, otra ventaja es el pobre consumo del

antibiótico dado que está siendo colocado en el lugar preciso para que actúe eficazmente. Dentro de todo, la administración por esta vía tiene también sus puntos en contra dado que la distribución del antibiótico en ocasiones no será uniforme a través de la ubre, existe una alta probabilidad de contaminación de los cuartos al introducir el catéter intramamario por el conducto del pezón y existe la posibilidad de irritación del tejido mamario causado por la presencia del antibiótico. Aparte de esto se ha demostrado que al colocar antibióticos intramamarios se puede alterar la fagocitosis. Cuando se va a tratar una glándula infectada con antibióticos es vital saber que la leche no debe interferir con la actividad antimicrobiana de la droga. Si se va a emplear sulfas – trimetropin, tetraciclinas o macrólidos hay que conocer que estos medicamentos no actúan de la mejor manera por la presencia de leche, es aconsejable administrarlos por vía parenteral (Pyorala, 2011). Si bien es cierto el medicamento ingresa directamente a la glándula, pero una incertidumbre importante es si los antimicrobianos se acumulan en la leche o en el tejido de la ubre (Erskine 2003). La administración del antibiótico dependerá mucho de los resultados que se obtengan al momento de hacer un cultivo bacteriano y así determinar frente a que agente microbiano se está enfrentando. En el caso de los *Streptococcus* que son patógenos principales en las infecciones mastíticas, se conoce que estos se alojan en los compartimientos de la leche, mientras que el *S. aureus* penetra el tejido de la ubre ocasionando infecciones profundas.

2.3. Aislamiento y cultivo bacteriano de leche mastítica.

2.3.1. Descripción de los agentes bacterianos

La leche es considerada un excelente medio para la conservación y crecimiento de los diferentes patógenos que pueden colonizar la glándula. Para la multiplicación de estos microorganismos se debe tener condiciones óptimas como temperatura y concentración de microorganismos. La presencia de las bacterias en la leche representa un riesgo para la salud, siendo importante

conocer la carga normal de bacterias presente en la leche, se conoce que para inhibir la actividad microbiana es necesario mantener la leche cruda a una temperatura menor a 5°C, siendo ideal los 4°C. En el texto “Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia)”, realizan un muestreo de 11.416 cuartos en 2.854 vacas en plena producción, apoyándose en la prueba diagnóstica CMT, determinan que 7.485 cuartos se presentan libres de infección mastítica, y 3.931 cuartos resultan positivos a mastitis clínica y subclínica (Calderón y Rodríguez, 2008).

Se realizan aislamientos de las muestras de cuartos positivos al CMT y se obtiene 2.984 microorganismos que tienen responsabilidad en la patogénesis de la mastitis bovina. En el 46.4% de los cultivos se aisló a *S. aureus*, como agente principal, seguido por *S. agalactiae* y *C. bovis*, mientras que *S. uberis* y *S. dysgalactiae* representan el 8%. Siendo el 11.3% de los microorganismos patógenos oportunistas, el 1.2% son bacilos Gram negativos y el 1.2% restante representa a infecciones mixtas (Calderón y Rodríguez, 2008).

2.3.1.1. *Staphylococcus aureus*

También llamado *estafilococo dorado* o *áureo*, es una bacteria anaerobia gram positiva facultativa, inmóvil y carece de esporas, productora de coagulasa y catalasa, de distribución mundial. Se presenta en racimos irregulares parecidos a uvas, *Staphylococcus aureus* forma parte de la microflora de los animales a nivel de piel, aparato genitourinario e intestino, esta bacteria puede causar enfermedades mediante dos mecanismo. El primero se basa en la posibilidad de producir encimas y el segundo en toxinas de carácter extracelular. La facilidad de proliferarse es una característica muy importante de los microorganismos, cuando se multiplican en los tejidos pueden producir infecciones graves que pueden ir desde afecciones cutáneas, mucosas, causando foliculitis o conjuntivitis, esta bacteria puede patogenizarse causando enfermedades de riesgo vital (Antai SP, 1987).

Este microorganismo se lo describe por primera ocasión en 1880. El doctor Alexander Ogston lo describe después de haber drenado un absceso con pus, para 1884 Friederich Julius otorgó el nombre binomial de esta especie. En 1903 Loeb descubre la cuagulasa y en 1959 realiza un estudio con *S. pyogenes*, logrando grandes descubrimientos acerca de la especie que tuvieron mucha repercusión en la época. (Antai SP, 1987).

Durante estos años, las enfermedades causadas por este patógeno fueron tratadas con penicilina, en 1945 se reporta que las cepas de *S. aureus* resistían a los tratamientos con penicilina, destruyendo la β -lactamasa (LeChevallier , Seidler , 1980).

2.3.1.1.1. Transmisión y diseminación en el medio ambiente.

Esta bacteria es de distribución mundial. Forma parte de la flora bacteriana normal tanto de humanos como de otros animales, se aloja en mucosa y piel principalmente. A nivel de mucosas se localiza en el tracto de vías aéreas superiores, alrededor de la glándula y pezones. Por supuesto en productos de origen animal sin ser procesados como por ejemplo leche cruda, carne cruda o mal cocida, entre otros. La principal fuente de diseminación de esta bacteria es por contacto directo e indirecto con otros individuos enfermos.

En un hato lechero esta bacteria se la puede aislar de vacas infectadas, siendo estas las principales fuentes de infección para las demás vacas del hato. También se podrá encontrar a este género bacteriano en las escoriaciones presentes en tejido afectado por la infección, en las manos de los operarios que manipulan la ubre (Mellenberger y Kirk, 2001). La diseminación de esta bacteria en hatos lecheros es común basta que un animal este infectado por esta bacteria y un mal aseo del equipo de ordeño es suficiente para que animales sanos presente infecciones a causa de *S. aureus*, las vacas que han cursado un episodio anterior de infección ocasionado por esta bacteria tienen mayor probabilidad de contagio, al igual que otros factores como la edad y los días de lactancia (Mellenberger y Kirk, 2001).

2.3.1.1.2. Morfología y fisiología de la bacteria.

Son bacterias de forma esférica, móviles, son cocos de 0.8-1 mm de diámetro, forman colonias a manera de racimos, pero también se los puede encontrar en forma individual, en parejas o en cadenas cortas. Existen cepas que forman cápsulas, lo que ayuda a que aumente el factor de virulencia de dicha bacteria (Mellenberger y Kirk, 2001).

Estas bacterias poseen una capa de polisacáridos externos llamada capsula mucoide, esta característica le permite adosarse mejor y la vuelve irreconocible para los fagocitos. Hasta el momento se conocen alrededor de once serotipos de capsulas, siendo el serotipo uno y dos las capsulas más gruesas, tienen la capacidad de formar colonias mucoides, los serotipos cinco y siete se conoce como las cepas más poderosas y las responsables de causar varias enfermedades (Mellenberger y Kirk, 2001).

S. aureus es una bacteria gram positiva, conforme envejezca el cultivo puede teñirse como gram negativo, este microorganismo es anaerobio facultativo, la temperatura óptima para que se desarrolle es de 30 a 37 grados centígrados y un pH de 7 a 7.5 (Mellenberger y Kirk, 2001).

Este microorganismo se desarrolla bien en todos los medios de cultivo, sin embargo para poder aislarlo de manera más eficiente es aconsejable emplear agar sangre de carnero, aquí el crecimiento se manifiesta con colonias individuales, de 1-4 mm, lisas, brillantes y circulares. El color de las colonias generalmente es amarillo o dorado, distinguiéndolas del resto de bacterias que forman colonias de color blanco o naranjas (Mellenberger y Kirk, 2001).

2.3.1.1.3. Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana

Para confirmar la presencia de la bacteria se realiza una prueba de coagulasa, de ser positivo este microorganismo tiene la facilidad de provocar la coagulación de la sangre. Una manera distinta de confirmar la positividad de la bacteria es

identificarla mediante la producción de nucleosa, empleando bacteriófagos determinados, estos transportan fagocitos, los cuales son inmunes, cada cepa de *Staphylococcus* es sensible a un fagocito distinto, por este motivo se utiliza esta metodología para la identificación de las cepas de *S. aureus* (Mellenberger y Kirk, 2001).

Muy utilizada también la prueba de catalasa, donde se ocupa la enzima catalasa, con la finalidad de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno generando la presencia de burbujas. Otra prueba es la oxidasa, donde se determina la presencia de dicha enzima, la reacción que se genera responde a la presencia del citocromooxidasa, sistema que se activa cuando la oxidación del citocromo es reducida a causa del oxígeno molecular que produce peróxido de hidrógeno (Bedolla, 1999).

Otras pruebas bioquímicas utilizadas pero menos comunes son la prueba de resistencia a la bacitracina, resistencia a la furazolidona, prueba de la novobiocina, manitol, agar DNAsa, urea y Api Staph (Bedolla, 1999).

2.3.1.1.4. Resistencia del patógeno

Entre los cocos, se considera a los *Staphylococos* el tipo de bacteria más resistente, pueden soportar 60° centígrados por 30 minutos sin destruirse, algunas especies de estafilos pueden estar expuestos a 80° centígrados, a más de ser resistentes a altas temperaturas aguantan a desinfectantes como el formol, también a la desecación. Estos microbios presentan sensibilidad a la violeta de genciana en diluciones de 1/25, la penicilina, eritromicina, rifampicina, lincomicina, gentamicina y otros antibióticos más (Gubbay et al, 2003).

2.3.1.1.5. Diagnóstico

Para el diagnóstico de esta bacteria se puede realizar tres procedimientos: por cultivo bacteriano, pruebas microscópicas y pruebas bioquímicas.

Para realizar cualquiera de estas se deberá obtener una muestra, sea de secreción de heridas, abscesos, leche cruda infectada, un aspirado traqueal o sangre, todo depende del lugar donde se encuentre la afección. Ya obtenida la muestra se la tiñe con tinción gram, los estafilococos aparecerán como cocos gram positivos, a manera de racimos, si fueron aislados de medio agar, cuando se aíslan de muestras clínicas adoptan otras formas, apareciendo solos, en cadenas cortas o en pares, podrán presentar una morfología distinta al observarlos, lisados, si al paciente se lo ha administrado algún tratamiento antibiótico previo (Seija, 2008).

2.3.1.2. *Staphylococcus intermedius*

Este microorganismo de característica zoonótica, se lo puede aislar en caballos, perros, zorros, paloma doméstica, gatos, vacas, ovejas, entre otros (Pottumarthy et al. 2004;). A este *staphylococco* se lo consideraba un *staphylococcus aureus* hasta antes de los años ochenta, en el 2004 se le otorga otra identidad, como un microorganismo distinto y lo nombra como *S. intermedius* (Pottumarthy et al, 2004).

Este patógeno es comúnmente encontrado en la piel de los animales, fosas nasales, cavidad bucal y piel, en el humano se lo considera como un patógeno zoonótico, a este microorganismo se lo ha aislado en humanos la mayoría de ocasiones después de episodios con mordeduras de perros, en otras ocasiones por infecciones nosocomiales siendo igual de comunes que las presentadas por mordeduras de caninos (Pottumarthy et al, 2004).

2.3.1.2.1. Transmisión y diseminación en el medio ambiente

Esta bacteria es de distribución mundial. Normalmente se aloja en la piel, saliva, y mucosas de los animales. Se disemina por contacto directo, como por ejemplo mordidas, contacto directo de heridas, o en hospitales por contaminación nosocomial. En vacas se aloja en el exterior de la ubre, si este

órgano sufre de traumatismos o heridas expuestas es donde la bacteria aprovecha para colonizarla, causando fuertes infecciones (Mellenberger y Kirk, 2001).

En explotaciones de la industria lechera se ha aislado del equipo de ordeño, el mismo que representa el principal diseminador de la bacteria (Mellenberger y Kirk, 2001).

2.3.1.2.2. Morfología y fisiología de la bacteria

Son Gram positivos, catalasa positiva, se los observa bajo el microscopio como racimos de uvas en la mayoría de ocasiones, no poseen flagelos, carecen de esporas y en algunas de las ocasiones se ha observado la presencia de una cápsula (García et al., 2014).

Estos cocos presentan un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , son bacterias inmóviles, son anaerobias facultativas, el hecho de que sean catalasa positiva, es una característica clave para diferenciarlas de otros géneros de bacterias como los *streptococcus* o *enterococcus* (Mellenberger y Kirk, 2001).

Esta bacteria prolifera sin requerimientos nutricionales tan exigentes, crecen a temperaturas de entre 30 a 37 grados centígrados y en medios altamente salinos de entre 7.5 a 10% de cloruro de sodio (García et al., 2014).

Las bacterias gram positivas generalmente en su pared celular poseen ácidos teicoicos y peptidoglicanos. Estos peptidoglicanos brindan estabilidad y forma a la bacteria, también cumplen un papel importante en cuanto a factores de patogenicidad se refiere, por otro lado los ácidos teicoicos son los que permiten la unión de la bacteria con su órgano diana, en este caso la mucosa o piel del animal infectado (Pahissa, 2009).

2.3.1.2.3. Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana

Para la serología de los *staphylococcus* además de la característica de rápido crecimiento que tienen, se reconocen fácilmente, las colonias por lo general

son circulares, de superficie lisa, convexas, de color blanco, cremosas (Pahissa, 2009). Para la confirmación de la presencia de la bacteria en la muestra se realizan pruebas de confirmación, muy parecidas a las realizadas para *S. aureus*, se puede realizar la prueba de catalasa, diferenciándola de otras bacterias como los *streptococcus* que son catalasa negativo. La conocida prueba oxidasa, donde se busca la presencia de la enzima Citocromo C Oxidasa, ya que esta enzima oxida el citocromo C de la cadena transportadora de e⁻ negativos (Pahissa, 2009).

Otra muy ocupada es la coagulasa, esta tiene la capacidad de convertir el fibrinógeno en fibrina, esta característica es propia del *staphylococcus*, con esta prueba se busca el factor de aglutinación de los microorganismos en el momento que estos se mezclan con el plasma. Otras menos conocidas como la prueba MIO, por sus siglas en inglés, que significa Mollity idone ornitine que consiste en identificar la bacteria de acuerdo al movimiento que presenta a la reacción de Indol, otra más es la prueba TSI, esta se la hace en un medio nutritivo y diferenciador, esta prueba nos da la posibilidad de analizar la cantidad de ácido y gas que genera la bacteria a partir de glucosa y lactosa. La prueba LIA, diferencia los microorganismos productores de descarboxilación o generadores de desaminación de la lisina, es más utilizado al rato de confirmar la presencia de Salmonella (Pahissa, 2009).

2.3.1.2.4. Resistencia del patógeno

Los *staphylococcus* son bacterias muy resistentes a las adversidades climáticas, a temperatura ambiente es capaz de sobrevivir hasta cuatro meses, mueren exponiéndolas a temperaturas superiores a 60 grados por más de una hora (Seija, 2008).

En cuanto a las sustancias químicas que pueden matar estos microorganismos tenemos a desinfectantes como amonio cuaternario, cloro, clorhexidina, yodo, fenoles, por el lado de los antibióticos las penicilinas son los medicamentos de elección, la eritromicina, gentamicina entre otros más (Gubbay, et al, 2003).

2.3.1.2.5. Diagnóstico

Ya aislado el microorganismo ya sea de una herida, de una muestra de leche, de un raspado o incluso de alimentos, a nivel de laboratorio se lo debe colocar en agar sangre y agar chocolate que son los medios perfectos para el crecimiento de las supuestas colonias, este primer proceso deberá tardar 24 horas a una temperatura de 37 a 38 grados centígrados, ya transcurrido este lapso deberá haber presencia de colonias de tamaño medio de color blanco o crema (Silva, 2006). Ya obtenidas las colonias se deberá hacer una tinción Gram, donde se deberá observar grupos a manera de racimos y de forma esférica. Seguido a esto, para la confirmación, se debe realizar la prueba de catalasa positiva, donde habrá presencia de gas y como segunda prueba confirmativa la de coagulasa, estas dos nos ayudan a determinar que la bacteria es un *staphylococcus* (Silva, 2006).

2.3.1.3. *Streptococcus agalactiae*

Bacteria responsable de causar graves infecciones tanto en animales como en humanos. La clasificación de los *estreptococcus* depende de algunas características como por ejemplo la morfología de las colonias y el tipo de hemólisis que hacen, sabiendo esto tenemos a los β – hemolíticos, α hemolítico, hemolítica γ , causando la lisis completa de los glóbulos rojos, una lisis incompleta o conocida como hemólisis verde y sin hemólisis, respectivamente (Jevitz, 1996).

Los *streptococcus* son habitantes de la flora normal de humanos y animales, estos se patogenizan cuando hay un factor desencadenante, una enfermedad o una infección causada por otro agente, mala alimentación, algo que cause un descenso en el sistema inmune del paciente y puedan colonizar. Esta bacteria al igual que otras es más o menos peligrosa de acuerdo a los factores de virulencia que posee, específicamente en el caso de *streptococcus* están provistas de proteína M y ácido lipoteicoico, lo que permite la unión con el órgano diana, la presencia de ácido hialurónico, este ácido está encargado de

inhibir la fagocitosis, presencia de toxina pirogénica, esta causa el brote de escarlatina muy típico en niños de corta edad (Jevitz, 1996).

2.3.1.3.1. Transmisión y diseminación en el medio ambiente.

Esta bacteria se aloja normalmente en la piel de humanos y personas, los *streptococcus* del grupo β - hemolítico se diseminan mediante secreciones nasales o material orgánico contaminado, los del grupo α normalmente viven en el aparato genital tanto de machos como de hembras, en varias ocasiones pueden ser los causantes de infecciones neonatales. En el caso de las vacas específicamente, a este patógeno se lo responsabiliza directamente de las infecciones mastíticas, se considera que a nivel de hacienda se transmite de una vaca infectada al resto, por medio del equipo de ordeño, manos mal lavadas del personal operativo, trapos o toallas que se ocupan de una vaca infectada a una vaca sana (Ruegg, 2010).

Normalmente este agente patógeno no sobrevive durante mucho tiempo en el medio ambiente, pero cuando logra entrar a la glándula mamaria y colonizarla sin problema se disemina y puede ser parte de una infección mastítica (Ruegg, 2010).

2.3.1.3.2. Morfología y fisiología de la bacteria.

Es una bacteria gram positivo, poseen forma esférica de aproximadamente 2 micrones de diámetro, normalmente se agrupan en cadenas, de color comúnmente gris a blanco, son inmóviles, anaerobios facultativos, la temperatura óptima para vivir es 37 grados centígrados pero pueden vivir entre 10 a 45 grados centígrados (Jevitz, 1996).

. Es un coco, este patógeno forma cadenas, es oxidasa negativo, catalasa negativo y anaerobio facultativo, no poseen capsula con excepción de algunas especies que poseen capsula falsa de ácido hialurónico, este ácido se encarga de impedir la fagocitosis (Jevitz, 1996).

No generan esporas, ni tampoco producen pigmentos, crecen bien en medios de cultivo como el agar sangre y agar suero, son inmóviles, catalasa y oxidasa negativos (Jevitz, 1996).

2.3.1.3.3. Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana

Los *streptococcus* se clasifican serológicamente de acuerdo a la función de los antígenos de carbohidratos superficiales, para esto se los ha agrupado mediante un sistema llamado "Lancefield" (Amaro, 2012).

Los *streptococcus* beta hemolíticos de grupo A, B, C,F ,G se clasifican en un solo grupo, mediados por la presencia de polisacáridos en la pared celular, los del grupo D y algunas especies de enterococos se clasifican por la presencia de lipoteicoicos en la pared celular (Amaro, 2012).

2.3.1.3.4. Resistencia del patógeno

Streptococcus es una bacteria que sobrevive a temperaturas menores a 10 grados y mayores a 45 por 30 minutos, la temperatura óptima para su reproducción y el crecimiento se da mejor a 37° centígrados. Este microorganismo es sensible a los compuestos con cloro, amonio cuaternario, triclosan, formaldehído, yodo y resistente a la clorhexidina (Jevitz, 1996).

La respuesta que presenta este microbio a la acción de los antibióticos es negativa en el caso de la eritromicina (Jevitz, 1996).

En el Congreso Europeo de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas se recomienda el uso de penicilinas y sus derivados como medicamentos de elección para combatir infecciones causadas por este microorganismo, siendo la ampicilina el medicamento que mejor respuesta da para el control de una infección por *streptococcus* (Belmar et al.,2002).

2.3.1.3.5. Diagnostico

A nivel de laboratorio la identificación de *streptococcus agalactiae* se la realiza mediante la observación del crecimiento de las colonias, generalmente estas

colonias son de color blanco y de apariencia brillante, se las observa en parejas o en cadenas cortas, estas bacterias crecen bien en agar sangre. Otra manera de confirmar la positividad de la bacteria es realizando una tinción gram, *streptococcus* es gram positiva, también son causantes de hemólisis (Crespo, M., Velez, J. 1996).

Estas bacteria también son positivos al factor CAMP en agar sangre de cordero, y presentan resistencia a la bacitracina y a la sulfa – trimetropim. Son catalasa negativos al igual que a la prueba de bilis esculina (Brizuela, 2007).

2.4 Inmunoglobulinas IgY, formación, descripción, extracción, usos y ventajas.

2.4.1. Aparato reproductor de la gallina

En las aves al igual que en otras especies el aparato reproductor femenino está conformado por varias estructuras (FCA.UNCuyo, 2006).

En el caso de las gallinas se compone por dos segmentos primordiales, uno de ellos el ovario izquierdo y el oviducto izquierdo, ya que el ovario y oviducto derecho están atrofiados desde el desarrollo embrionario y no se consideran funcionales. Las gallinas desde el nacimiento tienen miles de folículos, los mismos que irán madurando conforme alcancen la madurez sexual, esto ocurre entre la semana 14 o 15, donde comienza la etapa de postura. Este proceso está mediado por las hormonas ováricas e hipofisarias. Al ovario izquierdo se lo ve tal como un racimo de uvas, esta característica es dada por la gran cantidad de folículos presentes en diferentes etapas de maduración. En el proceso de formación del huevo intervienen órganos, estructuras, hormonas que todas en conjunto hacen posible la ovoposición (FCA.UNCuyo, 2006).

2.4.1.1. Ovario

Es una estructura ubicada en la parte craneal del abdomen, debajo de la vena cava posterior y de la aorta, apoyado en el riñón, pulmón y por encima del saco aéreo izquierdo. Al ovario como ya se mencionó anteriormente el ovario posee una apariencia de racimo de uvas, de manera visible se observa la presencia de 6 a 10 folículos unos completamente maduros y otros en una etapa de desarrollo acelerado, entre estos folículos visibles también se observan otros que aún están empezando a madurar y otros de coloración blanca crema. Los folículos maduros son reclutados cuando alcanzan los 10mm de tamaño, el crecimiento de estos depende de la intervención de la hormona FSH y la LH, ya ocurrido el reclutamiento, los folículos maduros generan una cantidad menor de estrógenos y ahora tienen la capacidad de segregar progesterona (FCA.UNCuyo, 2006)

2.4.1.2. Oviducto

Es largo, de forma tubular, de color rosa, que se presenta desde la región del ovario y desemboca en la cloaca, en la gallina mide entre 70 a 75 cm aproximadamente, anatómicamente se ha dividido en 5 segmentos:

- Infundíbulo: adopta una forma de embudo, mide más o menos 8 centímetros de largo. Esta estructura presenta pliegues dobles en la mucosa interna. Este embudo se encarga de atrapar la yema madura, producto de la ovulación. En caso de haber la presencia de espermatozoides es aquí donde se da la fecundación. El tránsito de la yema por esta estructura dura alrededor de 15 minutos. Es aquí donde comienza la secreción de albumen (FCA.UNCuyo, 2006).
- Magno o magnum: se considera la parte más larga del aparato reproductor del ave, mide aproximadamente entre 30 a 33 centímetros, es muy elástico, posee grandes pliegues y una gran cantidad de glándulas secretoras. Es aquí donde se secreta la

albúmina densa o clara y se deposita alrededor de la yema, también aquí se forman las chalazas que son bandas gruesas de albúmina, encargadas de sostener la yema de huevo en una posición estable si cabe el término (FCA.UNCuyo, 2006).

- Istmo: mide alrededor de 8 a 10 cm de largo, de diámetro menor al magnum, pliegues menos acentuados, es en esta estructura donde se forman las partes internas y externas del huevo, conocidas también como membranas testáceas (FCA.UNCuyo, 2006).
- Útero: estructura que mide alrededor de 10 a 12 centímetros de largo, es de forma oval, como una bolsa con paredes musculares, aquí se forma la cascara del huevo, de este proceso se responsabiliza la glándula calcárea, también el huevo adquiere la pigmentación de la cascara (FCA.UNCuyo, 2006).
- Vagina: por último esta estructura anatómica de dimensiones estrechas y musculares, dan la posibilidad de rotación al huevo, en otras palabras permiten la ubicación del huevo antes de la oviposición, permitiendo salir por el polo agudo. La vagina se considera una estructura muy importante por una función específica que realiza, aquí se deposita una última membrana que envuelve enteramente a la cáscara, esta es una barrera que impide la penetración bacteriana (FCA.UNCuyo, 2006).

2.4.2. Formación del huevo

El huevo es el producto de un proceso natural de las aves, el mismo que se forma a partir del óvulo o yema, que al pasar por las diferentes estructuras que comprende el aparato reproductor de la gallina, este se va recubriendo de materiales altamente nutritivos y otros que le sirven de protección (Bardají J, 2011).

Aproximadamente una gallina promedio ovula cada 24 a 26 horas, dando a entender que produce un huevo diario, desde que alcanza la madurez sexual, es decir desde la semana 14 o 15 de edad (Bardají J, 2011).

Este proceso ocurre de forma normal en las gallinas, sin requerir la presencia de un gallo. El proceso de formación del huevo comprende desde la maduración del óvulo hasta el momento de la puesta. Antes de la gallina entre a la etapa de madurez sexual se la deberá proporcionar alimento, tanto en cantidad como calidad, este factor es de vital importancia para que la gallina ponga huevos de calidad (Bardají J, 2011).

Las gallinas empiezan la etapa de postura entre la semana 18 a la semana 20 de vida promedio, como anteriormente se mencionó el aparato reproductor de la gallina está conformado por ovario y oviducto izquierdo. El ovario de la gallina posee alrededor de 4000 óvulos más o menos, de este número una cierta cantidad alcanzará la maduración y dará lugar a un huevo. Un óvulo maduro da lugar a una yema, este óvulo se vasculariza y se nutre para llegar a la madurez, ya maduro este óvulo se desprende y si libera en el infundíbulo, tiene que haber una ruptura de la membrana folicular para que permita el paso del óvulo ubicado en el ovario hacia el infundíbulo (Bardají J, 2011).

A la yema le toma atravesar el infundíbulo alrededor de 15 a 30 minutos, en esta sección se forman dos mantos, los más externos de toda la membrana vitelina, representando dos tercios del total, también cumple la función de protección a la yema, impidiendo la entrada de agua hacia la yema. En el caso de haber la presencia de espermatozoides es en esta sección donde se da la fertilización del huevo. Ya superado el infundíbulo llega al magno, estructura que se considera la sección más extensa de todo el oviducto, aquí se sintetizan las proteínas que se depositaran en el huevo esto es posible dada la presencia de varios tipos de células especializadas, este proceso toma alrededor de 3 horas y media a 4, el magno y el útero son responsables de dar las propiedades a la clara y a la yema. Ya ocurrido este proceso pasa al istmo, el albumen es cubierto de membranas testáceas, una interna y una externa. Estas representan un 0.8% de peso total del huevo. La testácea externa se une mediante conexiones fibrosas a la membrana de la cáscara, por otro lado la

interna cubre al albumen. Este proceso demora alrededor de una hora (Bardají J, 2011).

Acabado el anterior proceso, en el útero se genera una rotación del huevo, este movimiento da lugar a la torsión de las fibras proteicas, es en este momento donde se forman las chalazas, estas son las encargadas desde este momento en sostener a la yema centrada. En el útero el huevo se aloja alrededor de 20 a 22 horas completándose la última etapa, la formación de la cascara, con esto se podría decir que el huevo está listo para salir por la cloaca, este último proceso es posible por las fibras de músculo liso que rodea la mucosa, dando el empuje necesario para que se produzca la ovoposición (Bardají J, 2011).

El proceso de la nueva ovoposición se puede dar 15 a 20 minutos después de la puesta, el estímulo doloroso de la expulsión del huevo ayuda a que el cerebro envíe la orden para la formación de otro nuevo huevo (Bardají J, 2011).

2.4.3. Inmunoglobulinas IgY

En el caso de las aves el sistema inmune es bastante similar al de los mamíferos, dado que poseen sistema inmune específico e inespecífico. Estos componentes inmunitarios tienen interacción y se complementan para tener una buena respuesta inmune. Las aves poseen al igual que los mamíferos células exponentes de antígenos y demás mecanismos funcionales que son regularizados por las interleuquinas. En el caso de las aves se presenta una notable diferencia en la manera de transmitir la inmunidad pasiva a la prole, nada similar en el caso de los mamíferos, donde se transmite en etapa placentaria y en el calostramiento, las aves transmiten mediante lo hacen a través de elementos fluidos del huevo (Kemplerer, 1893). Antes de la ovoposición la yema de huevo es nutrida por circulación sanguínea, la misma que lleva varios elementos como oxígeno, inmunoglobulinas las mismas que se transfieren a la yema alojándose ahí mediante receptores específicos. Durante la formación del huevo por el oviducto otras inmunoglobulinas como la IgM y la IgA se transfieren a la albúmina (Erhard & Schade, 2001).

Las inmunoglobulinas son las encargadas de codificar la inmunidad pasiva en las gallinas, estas inmunoglobulinas poseen dos partes, una parte liviana y una pesada, en las gallinas las inmunoglobulinas IgY son las que en mayor cantidad se encuentran en el suero sanguíneo, con un peso molecular de 190kDa, por lo que representan mayor facilidad de obtención al momento de querer obtenerlas (Erhard & Schade, 2001).

2.4.4. El sistema inmune en las aves

Los animales humanos y no humanos poseemos sistemas de defensa frente a agentes patógenos que pueden ocasionar un estado de enfermedad. Las aves no son la excepción y poseen una variedad de mecanismos encargados de acabar con las células infestadas por agentes patógenos o atacar y destruir patógenos ajenos al organismo (Schade y col. 2005; Rose y col.1974).

Este sistema de defensas se conforma por el sistema inmune innato y por el sistema inmune adquirido. En el caso de las aves en general, el sistema inmune se conforma por el Timo y la Bolsa de Fabricio, estos son los órganos principales y los secundarios son los nódulos linfoides, la médula ósea, tejido linfóide, el bazo y por último la glándula de Harder. La bolsa de Fabricio es el órgano donde se da el proceso de hematopoyesis, aquí se desarrollan los linfocitos B, esta estructura se ubica en la cloaca de las aves. La médula ósea es la encargada originar todas las células madre de la bolsa de Fabricio, y las del timo. Las células B se convierten en la bolsa de Fabricio y las T a nivel del Timo (Schade y col. 2005; Rose y col.1974).

Por otro lado las células plasmáticas y las células B de memoria se proliferan en el bazo. En las aves en términos generales se han identificado tres tipos de inmunoglobulinas, IgA, IgM, IgY, esta última es equivalente a las inmunoglobulinas G, ya que cumple básicamente la misma función, la IgY se transfiere por circulación sanguínea a la yema de huevo que es donde se aloja y en su momento dará defensas al embrión. Por otra parte el resto de

inmunoglobulinas como la A está presente en la clara de huevo, bilis y secreciones del intestino. En el caso de las inmunoglobulinas M se las puede encontrar también en la clara de huevo y en el suero sanguíneo (Schade y col. 2005; Rose y col. 1974).

2.4.5. Estructura de las inmunoglobulinas en las aves

En las aves las inmunoglobulinas se separan en dos tipos de cadenas polipeptídicas, la cadena polipeptídica pesada y la cadena polipeptídica liviana o ligera. Estas cadenas básicamente cumplen la función de emparejarse con un antígeno, estas establecen un sitio de combinación, por ejemplo en el caso de las inmunoglobulinas IgY, estas tienen dos lugares de combinación, estas inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas pesadas Gamma (Murcia H, 2009).

En cambio las cadenas ligeras o livianas se dividen en dos tipos las Kappa y las Lambda, estas se pueden asociar a las cadenas pesadas de todas las inmunoglobulinas (Murcia H, 2009).

Las aves producen anticuerpos frente a un estímulo antigénico al igual que cualquier otro mamífero o reptil. Los anticuerpos en las gallinas se transfieren a su descendencia a través de la yema de huevo, esto es posible por el paso de los anticuerpos al epitelio folicular ubicado en el ovario, dicho proceso ocurre durante la oogenesis (Rose et al, 1981). Normalmente existen cinco isotipos de anticuerpos, en las gallinas se conoce la existencia de tres grandes grupos, un grupo IgA se lo puede encontrar en vesícula biliar y oviducto, el grupo IgM, molécula de alto peso molecular y anticuerpos IgG dos subclases (7-8) representando la mayor cantidad de inmunoglobulinas a nivel plasmático. Las moléculas G7 de las aves, se denominan como inmunoglobulinas "Y" o IgY, estas moléculas tienen un peso molecular aproximado de 67KDa, mayor al peso de las inmunoglobulinas "G" con un peso de 50KDa o con las inmunoglobulinas IgA con un peso de 60KDa. Al no encontrar presencia de inmunoglobulinas IgM o IgA en la yema, se le otorga a las IgY el carácter de

inmunoglobulinas presentes en la yema en mayor proporción (Rose et al, 1981). Inmunoglobulinas “A” y “M” se encuentran en cantidades pequeñas en la clara del huevo (Murcia H, 2009).

2.4.6. Transferencia de inmunoglobulina IgY a la yema

Como se había enunciado anteriormente, la yema de huevo posee una alta cantidad de inmunoglobulinas IgY, estas inmunoglobulinas representan gran importancia en cuanto al factor inmune para los pollos recién nacidos, ya que estas inmunoglobulinas serán las que brinden defensas al ave recién nacida.

La transferencia de estos anticuerpos se da mediante inmunidad pasiva, el embrión en desarrollo se nutre de estas inmunoglobulinas en la semana 2 a la semana 3. El proceso de transferencia de inmunoglobulinas IgY a la yema de huevo, se da en dos pasos. Primeramente el suero transporta las IgY a la yema de huevo, siendo la equivalencia en mamíferos a través de la placenta. Este paso de inmunoglobulinas es de forma selectiva desde la circulación sanguínea de la gallina a la yema, la cantidad de inmunoglobulinas que se transfieran dependerá de la concentración que existe a nivel de suero sanguíneo. El segundo paso se considera la transmisión de IgY, desde el saco vitelínico al embrión en desarrollo. Este proceso está mediado por transporte activo (Chalghoumi et al., 2009).

Ya en el aparato reproductor las IgY, llegan a los receptores específicos para IgY en el ovocito, estas se unen y se distribuyen en la yema, esta fase de transporte se da a una velocidad muy reducida, dura alrededor de tres días, este proceso es mediado por los receptores Fc, desde el momento que se transporta las IgY desde el suero hasta la unión de las mismas a la membrana del saco vitelino, la unión a dicha membrana dependerá del pH que esta tenga (Chalghoumi et al., 2009).

2.4.7. Historia de la tecnología IgY.

El uso de huevos como fuente de obtención de anticuerpos fue descrito hace varios años. Klemperer, científico alemán en el año 1893 realizó un ensayo sobre protección pasiva partiendo de la yema de huevo de gallinas. Su trabajo básicamente consistió en inocular a un grupo de gallinas con cepas de *Clostridium tetani*, estas bacterias estaban diluidas en un caldo de cultivo. Posterior a la inoculación recolectó los huevos de las gallinas previamente inoculadas y alistó una solución de característica acuosa a partir de la yema, seguidamente organizó cuatro grupos de ratones, inoculó a tres grupos de ratones, a cada grupo inyectó 1ml, 0.50ml y 0.25ml y el cuarto grupo no recibió la inoculación, siendo el grupo testigo (Terzolo R, 2010). Con el objetivo de confirmar su teoría expuso a los ratones inoculados y no inoculados a una dosis de caldo con bacterias tetánicas y analizar la respuesta inmune que presentaban, encontrando que los ratones a los que se los inoculó 1ml y 0.50ml de solución acuosa de yema resistieron a la bacteria y su toxina, no siendo el caso de los ratones que recibieron una dosis de 0.25ml de solución acuosa de yema, peor aún los ratones del grupo control, todos estos murieron (Terzolo R, 2010).

Con estos resultados se confirmó la utilidad y eficacia de la utilización de la yema como fuente de anticuerpos. Esto fue el principio de la utilización de tecnología IgY, hay que recalcar que lastimosamente este experimento haya quedado olvidado por varios años, ya que recién en 1959 otros científicos alemanes hayas retomado este estudio y publiquen un texto denominado “Los principios de la técnica experimental humana”, aun así no tomo la suficiente importancia sino hasta después de 20 años donde otros científicos comienzan a aplicar la tecnología IgY (Terzolo R, 2010).

A comienzos de 1996 el uso de la tecnología IgY, se convirtió en una práctica aceptada a nivel mundial, inclusive el Centro Europeo encargado de la Validación de Métodos Alternativos, recomienda el uso de tecnología IgY como la alternativa óptima para obtener anticuerpos, dejando de lado a los

mamíferos, en el mismo año la Oficina Veterinaria del Gobierno de Suiza aprueba como un método alternativo que apoya al bienestar animal (Schade R, Hilnak A, 1996).

2.4.8. Extracción y purificación de la IgY presente en yema de huevo

Posterior a la inoculación que se haya realizado en las gallinas habrá que separar y purificar los anticuerpos alojados en la yema de huevo, sin embargo la yema está conformada por agua, lípidos y proteínas. Para una posterior inoculación en los animales a los que se piensa proteger mediante este método es recomendable purificar la proteína IgY (Gallusimmunotech, 2014).

Dentro de la yema la proteína existente se clasifica en cuatro tipos que son: apovitellenins que representa el 13.4% del total, la lipovitellins, estas poseen abundante fósforo, representando alrededor de 40% y por último tenemos la livetinas representando el 9.3% (Gallusimmunotech, 2014).

El proceso de separación y purificación deja una fracción hidrosoluble rica en IgY, esta solución se la puede utilizar en inmuno ensayos. Existen varios métodos para realizar la separación y purificación de los anticuerpos, a continuación se los menciona (Gallusimmunotech, 2014).

- Dextran Sulfato precipitación.
- Precipitación con polietilenglicol.
- Solubilización de lípidos con solventes orgánicos.
- Precipitación con goma xantana/ carragenina.
- Ultrafiltración.
- Precipitación con sulfato de sodio.
- Precipitación con sulfato de amonio.
- Electroforesis (Gallusimmunotech, 2014)

2.4.9. Aplicación de la tecnología IgY

La tecnología IgY se la puede aplicar tanto en el campo de la medicina animal como en campo de la medicina humana.

Hay varios artículos donde se enuncia el uso de las IgY en pro de la salud humana, por ejemplo se han realizado varios ensayos donde se ocupan inmunoglobulinas Y, para evaluar concentraciones de proteínas con la ayuda de ELISA u otras pruebas de diagnóstico (Chacana et al., 2004, Schade et al., 2000, 2005 y 2007).

Estas inmunoglobulinas también son ocupadas en la rama de la inmunoquímica, detectando antígenos bacterianos, virales o parásitos en animales domésticos y animales de producción como aves y cerdos. También se las ocupa para establecer niveles de contaminación en alimento tanto por toxinas, micotoxinas o bacterias (Pichler, 1999). Otros tipos de estudios que se han realizado es la evaluación entre IgG e IgY, observando las propiedades de cada una y evaluando la efectividad de protección que brindan en animales inmunizados con el mismo protocolo. Estos estudios revelan que la IgY tiene varias ventajas en cuanto a especificidad se refiere, al igual que reacciones cruzadas e incluso a la sensibilidad. Estos factores vienen dados por la diferencia filogenética entre especies, mamíferos versus aves.

En humanos se han realizado en ensayos profilácticos y terapéuticos a partir de IgY. Por ejemplo analizar cómo actúa el calostro bovino hiperinmunizado con antígenos de rotavirus causantes de diarrea, este antígeno fue preparado a partir de muestras de heces de niños que presentaban la enfermedad. Se administró vía oral y se obtuvo como resultados una buena respuesta por parte las IGY.

También se demostró que se puede prevenir el desarrollo de úlceras gástricas a causa de *Helicobacter pylori*, las IgY actúan removiendo frecuentemente a las

bacterias, así previniendo la colonización de esta bacteria a lo largo del epitelio gástrico (Chalghoumi et al., 2009).

Hatta en el año 2009, realiza un ensayo utilizando tecnología IgY, con la finalidad de disminuir los niveles de ureasa en humanos, antes de esto realizó una hiperinmunización en gallinas con esta enzima, ya obtenidos los anticuerpos anexó una mezcla de yogurt con los IgY y dio de tomar 450ml a un grupo de personas positivos a *Helicobacter pylori* por cuatro semanas, otro grupo de personas no ingirió el tratamiento. Pasado el tiempo post tratamiento se evaluó a los dos grupos, demostrando que los niveles de esta enzima descendieron de manera significativa, reduciendo a la par la actividad de *Helicobacter pylori*.

Ciertamente los tratamientos antibióticos son métodos curativos y sin duda muy eficientes, la tecnología IgY es una alternativa más económica y mejor aún profiláctica (Carlander, 2002)

Otro estudio realizado en el campo de la medicina humana fue la demostración del uso de IgY como método profiláctico para *Streptococcus mutans*, bacteria responsable de la formación de placa en las piezas dentales de humanos, a esta bacteria se la relaciona con las caries. El ensayo consistió en administrar el polvo de la yema con anticuerpos para esta bacteria a un grupo de ratones y a un grupo de pacientes voluntarios humanos, se evaluó la protección brindada por estos anticuerpos, este estudio dio resultados positivos muy significativos, ya que disminuyó la presencia de *S. mutans*. Algo positivo de los anticuerpos IgY es que no hace falta administrar continuamente dosis de IgY, ya que se estimula la memoria inmunitaria y esta segrega anticuerpos indefinidamente (Hatta, 2009).

En la misma línea científica se evaluó la adición de IgY en los enjuagues bucales anti *S. mutans* en pacientes humanos. Analizando los resultados se obtuvo que la IgY imposibilitó la adherencia de placa y la presencia de esta

bacteria en un 59%. Esto confirma la efectividad de estas inmunoglobulinas frente a agentes patógenos que pueden afectar el estado de salud en humanos como en animales (Carlander, 2002).

En el campo de la salud humana se evaluó la utilización de IgY como método preventivo de fibrosis cística, esta enfermedad es muy común en Europa y América del Norte, principalmente los estadounidenses. Su etiología es de carácter genético, produciendo cantidades excesivas de secreción mucosa en el tracto respiratorio, en esta enfermedad también hay presencia de varios tipos de bacterias como la *Pseudomonas aeruginosa*, esta es la principal responsable de dicha enfermedad. El ensayo consistió en dar un tratamiento oral, mediante enjuagues bucales a pacientes positivos a la enfermedad por las noches, esta solución contenía 0.7 mg de IgY por cada ml, el tratamiento era con una solución de 70 ml. Terminado el tratamiento se demostró que la presencia de anticuerpos IgY presentes en la saliva permanecía durante 8 horas en cantidades elevadas, disminuyendo su presencia de acuerdo al transcurso de tiempo que transcurría desde la utilización del enjuague, hasta desaparecer a la hora 16 post tratamiento. Mientras más tiempo duraba el enjuague en la boca había una presencia más duradera de los anticuerpos en la cavidad, por ejemplo las personas que mantenían el enjuague en sus bocas por 2 minutos obtenían la presencia de los anticuerpos por 9 horas y los que mantuvieron el enjuague por 1 minuto tenían la presencia de anticuerpos hasta las 7 horas post tratamiento. Este experimento resultó ser positivo para el tratamiento profiláctico de dicha enfermedad, ya que logró retrasar el apareamiento de las infecciones de fibrosis cística y por ende la reducción de tratamientos antibióticos.

Un ensayo de mucha importancia en la actualidad fue el producir anticuerpos específicos con tecnología IgY, para la enterotoxina B proveniente del *S. aureus*, esta enterotoxina es considerada como un arma biológica, por esta razón la importancia de obtener anticuerpos para tan peligrosa toxina. En este estudio se demostró que la utilización de anticuerpos IgY como método

profiláctico resulta efectivo, esta teoría se la probó con ratones SPF y monos, estos fueron expuestos al desafío letal, aplicando la toxina en aerosoles, post exposición los animales respondieron de manera positiva comprobando que están protegidos contra esta toxina (LeClaire et al. 2002).

En 1990, se demostró la capacidad de protección de las IgY, frente al veneno de la serpiente cascabel y algunas especies de escorpiones. Las diferentes pruebas han comprobado que el utilizar anticuerpos IgY es más seguro que otros tratamientos actuales, debido a que los efectos colaterales de las IgY son nulos por el hecho de la diferencia filogenética entre aves y mamíferos (Thalley, 1990).

En el campo veterinario también se han realizado varios estudios con fines terapéuticos y profilácticos. Principalmente los estudios realizados mayoritariamente en animales ha sido con cerdos y terneros, por ejemplo un estudio realizado para tratar problemas entéricos a causa de *E. coli*, rotavirus y coronavirus se ocupó tecnología IgY. En Japón se ha logrado conseguir inmunizar a los terneros del efecto del rotavirus, el mismo que causa diarreas en esta especie (Mine, 2002).

Así como este ensayo hay muchos más, realizados a partir de anticuerpos IgY extraídos de la yema de huevo. Existen otros cuantos estudios más, para obtener anticuerpos para rotavirus en cerdos, parvovirus en caninos y otros ensayos para parásitos entéricos en aves (Lillehog, Sasaki, 1994).

Sunwoo en el 2002 realizó un ensayo para comprobar que las IgY pueden inhibir el crecimiento in vitro sobre *E. coli*, la investigación mantenía que esta bacteria es la causante del conocido síndrome urémico-hemolítico, esta patología se adquiere por una alimentación basada principalmente en el consumo de carnes rojas y afecta generalmente a niños. En esta investigación se observó que las IgY se unieron al área bacteriana, impidiendo el aumento de las mismas, a raíz de cambios en la forma superficial de la *E. coli*. Las IgY también han intervenido en reducir la adherencia de dicho patógeno a la

mucosa gástrica, estas características vuelven a las IgY un método profiláctico de elección, ya que se minimiza la posibilidad de desarrollar resistencias como es el caso de los antibióticos, a más de eso se preserva la flora intestinal.

Si el tratamiento se lo brinda a los animales de abastecimiento previo faenamiento y aprovechamiento de las canales, se puede disminuir la incidencia de esta bacteria en los humanos (Sunwoo, 2002).

Otra aplicación en el campo de la medicina veterinaria y zootecnia ha sido el uso de las IgY en la acuicultura, principalmente en salmónidos, para tratar problemas bacterianos causados por *Edwardsiella tarda*, un tipo de bacteria que afecta al tracto digestivo de peces. El tratamiento consiste en administrar IgY en el agua de las pozas donde se los cría a los peces, se comprobó que el tratamiento era efectivo ya que brindó protección a los animales contra esta bacteria.

Otra manera de administrar las IgY es en el alimento peletizado, el mismo que puede contener anticuerpos para una bacteria específica (Lee et al. 2000).

2.4.10. Futuro de la tecnología IgY.

La tecnología IgY cada vez llama más la atención, de científicos a nivel mundial.

Este método ha tomado fuerza en los últimos años, dada la efectividad, bajo costo de producción y la facilidad de obtener los anticuerpos. Sin duda las múltiples investigaciones que se han llevado a cabo con esta tecnología, tanto en el campo de la medicina humana como animal han aportado al desarrollo e interés de los científicos (Terzolo R, 2010).

Una ventaja favorable de estos anticuerpos es la baja probabilidad de reacciones cruzadas entre los anticuerpos aviares y los receptores mamíferos, dada las diferencias filogenéticas que estos tienen.

En Europa específicamente los países pertenecientes a la Unión Europea han convocado a científicos que están involucrados con el tema, con la finalidad de crear un programa de investigación denominado “Acción – Costo”, este proyecto abarca varios micro- proyectos divididos en tres grupos, WG1 “Nuevo uso para productos y subproductos de huevo”, el WG2 “Uso de huevos no alimenticios” y por último el WG3 “Nuevas técnicas y tecnologías para el procesamiento de yema de huevo” (Terzolo R, 2010). Esta iniciativa busca aumentar los proyectos de investigación referentes a la tecnología IgY.

Lo que se espera en un futuro cercano es que mediante la ayuda de estas técnicas alternativas se reduzca el uso excesivo de tratamientos antibióticos, y cambiar el pensamiento de los profesionales de la salud, de la tradicional idea de ser profesionales que curan, por la idea de ser profesionales que previenen (Terzolo R, 2010).

Como es de conocimiento público los casos referentes a la resistencia de los antibióticos van cada vez en aumento, esta es una razón de peso para impulsar la utilización de este tipo de tratamientos, ya que en la yema de huevo se puede contener una amplia cantidad anticuerpos para parásitos intestinales principalmente o microorganismos patógenos.

Hoy en día en algunos países asiáticos, ya se comercializan productos de bebida como lácteos o yogurt anexados anticuerpos de *Helicobacter pilory*, para tratar problemas de gastritis a causa de dicha bacteria (Terzolo R, 2010). En América Latina, existe el mismo interés de anexar anticuerpos en productos lácteos para prevenir de las infecciones gastrointestinales en niños, principalmente en países de bajos recursos, ya que se ha comprobado que

están mayormente expuestos a problemas gástricos por su tipo de alimentación (Terzolo R, 2010).

2.4.11. Ventajas del uso de inmunoglobulinas IgY en el tratamiento de especies domésticas.

La administración de los anticuerpos IgY es una técnica llamativa y utilizada últimamente con mayor frecuencia, su eficacia para brindar inmunidad frente a agentes patógenos es muy considerable (Li, et al. 2016).

Entre las ventajas que aporta esta tecnología a los tratamientos en el campo veterinario tenemos:

- Tecnología muy apreciada por el hecho de reducir la resistencia a los antibióticos, ya que reduce el uso de los mismos (Chalghoumi et al., 2009).
- Se puede utilizar frente a organismos que no tienen sensibilidad a algún antibiótico (Chalghoumi et al., 2009).
- No es necesario desangrar al animal para obtener los anticuerpos como era el caso de los mamíferos (Chalghoumi et al., 2009).
- Método mínimamente invasivo (Chalghoumi et al., 2009).
- No existen reacciones cruzadas entre animales, la diferencia filogenética impide que esto ocurra entre mamíferos y aves (Chalghoumi et al., 2009).
- La facilidad de administración al paciente, podemos inocular vía IM, SC e inclusive de manera oral, esta última es la elección al momento de tratar problemas gástricos (Chalghoumi et al., 2009).
- El procedimiento para obtener los anticuerpos es amigable con el medio ambiente, no siendo de la misma manera con la industria farmacéutica (Li, et al. 2016).
- No quedan residuos tóxicos en el animal (Li, et al. 2016).
- El tratamiento puede ser ocupado para controlar varios tipos de agentes patógenos (Li, et al. 2016).

2.4.12. Efectos de la nutrición en la producción de anticuerpos.

La relación entre la malnutrición e infección es una de las razones principales de mortalidad en animales, la nutrición está en sinergismo con la inmunidad de los animales, si hay un desequilibrio puede afectar también a la productividad de una explotación.

La mala nutrición influye de manera directa en la inmunocompetencia de las aves u otros animales, de ahí proviene la resistencia a enfermedades, la respuesta inmune frente a un proceso infeccioso afecta al metabolismo, requerimientos nutricionales y de hecho al crecimiento del animal (Klasing, et al. 1995). La malnutrición animal implica un crecimiento de la estabilidad, incidencia y de la mortandad ligada a las enfermedades, ya que son responsables de producir inapetencia. Las deficiencias severas o crónicas de nutrientes reducen la respuesta inmune, esto va de la mano con la elevada velocidad de división de las células y el enorme número de enzimas necesarias para producir una respuesta inmune. En los últimos años las deficiencias de nutrientes son extrañas en las producciones animales, gracias a la formulación de balanceados, sin embargo algunos de los nutrientes pueden variar de sobremanera la respuesta inmunológica cuando la concentración en las dietas varían encontrándose en mayor o menor cantidad los requerimientos para cubrir las necesidades normales (Klasing, et al. 1995). La malnutrición y la respuesta inmune baja es el resultado de una interacción que tiene consecuencias serias sobre el huésped, las infecciones se hacen presentes y los patógenos oportunistas colonizan un organismo sano (FAO, 2016).

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño de la investigación.

Para la investigación se planteó formar cuatro grupos de aves, cada grupo conformado por tres aves, a tres de los grupos se les inoculó una especie bacteriana, al grupo 1 se le inoculó el antígeno de *S. intermedio*, al grupo 2 se lo inoculó el antígeno de *S. aureus*, al grupo 3 se inoculó *S. agalactiae* y por último el grupo control, sin inóculo (Tabla 1). Adicionalmente, el alimento fue evaluado dentro de cada grupo de aves de la siguiente manera: Al primer grupo se lo mantuvo con alimento balanceado comercial 120gr por ave, al segundo grupo con alimento balanceado comercial 120gr más espirulina 0.50gr por ave día, al grupo tres con alimento balanceado comercial 120gr más vitaminas 0.50gr en el alimento por ave al día y por último al grupo testigo únicamente alimento balanceado comercial 120gr por ave al día.

Tabla 1.
Estructura de los grupos de investigación.

Bacterias	Gallinas	# animales
<i>S. Intermedio</i>	A	1
Alimento	A	1
Balanceado	A	1
<i>S. Aureus</i>	B	1
Espirulina	B	1
	B	1
<i>S. Agalacteae</i>	C	1
Vitaminas	C	1
	C	1
Control	D	1
Alimento		
Balanceado		
comercial		
Total animales:		10

3.1.1. Unidad de estudio de la investigación

3.1.1.1. Obtención de muestras de leche mastítica.

Para la realización del presente estudio se tomaron muestras de dos haciendas lecheras, las mismas que presentaron problemas de mastitis subclínica. La primera ubicada en la localidad del Chaco, cantón ubicado en la provincia de Napo, con una superficie de 3.473 km². La “Hacienda Santa Rosa”, dedicada a la explotación lechera, presenta problemas de mastitis subclínica (Fig. 1).

La segunda fue la “Granja Experimental Nono UDLA”, ubicada a 20 minutos de Quito en la parroquia de Nono, esta zona dedicada principalmente a la agricultura y ganadería, cuenta con una temperatura de 12 a 22 grados centígrados y una humedad del 75% (Fig. 2).

3.1.1.2. Obtención de anticuerpos IgY.

El estudio como tal se lo realizó en la localidad de Rumicucho, poblado ubicado en la parte noroccidental de Quito, se construyó un pequeño galpón donde se alojó a 10 aves de postura raza Lohan Brown, las mismas que estaban separadas por grupos de tres aves cada uno, con un total de cuatro grupos, posteriormente estas aves fueron inoculadas con un antígeno específico.

- **Ubicación de la quinta.**

Rumicucho, ubicado en la parroquia de San Antonio de Pichincha, ubicada al noroccidente de Quito, con una población de 80.000 habitantes aproximadamente, una superficie de 116.26 km cuadrados. Pertenece al Distrito Metropolitano de Quito, a una altura de 2.400m sobre el mar. El clima del sector cuenta con una temperatura entre 16 a 28 grados, humedad de 88% y presencia de lluvias casi nula. (Fig. 3).

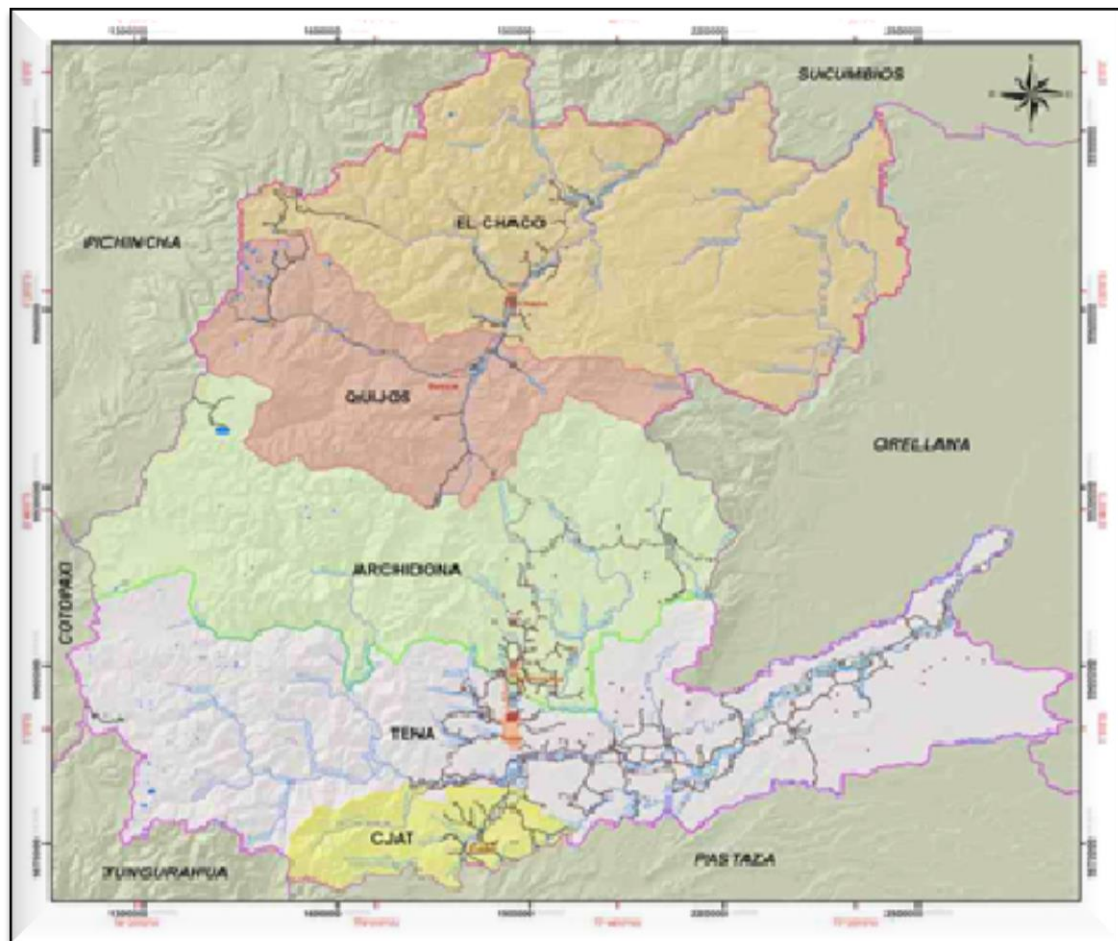


Figura 1. Mapa de la ubicación geográfica del cantón El Chaco, provincia del Napo. Tomado de, *Prefectura Napo (2016)*.

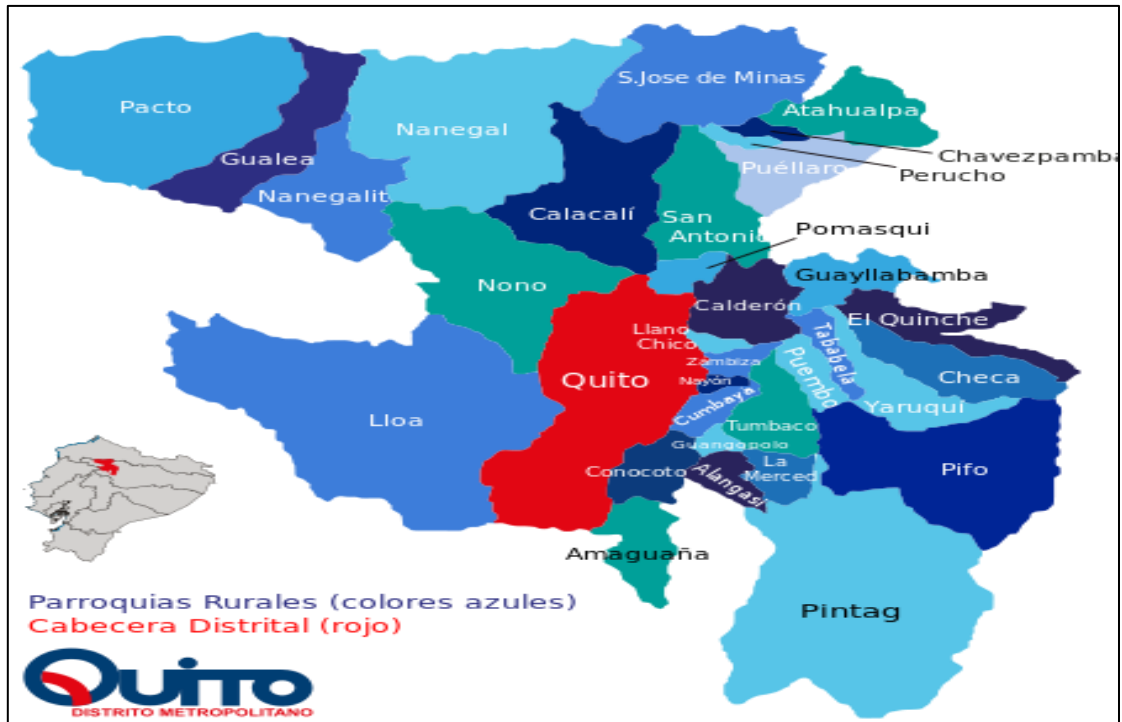


Figura 2. Mapa de la ubicación geográfica de la parroquia de San Miguel de Nono, provincia de Pichincha. Tomado de, Ecuador Noticias (2016).



Figura 3. Mapa de la ubicación geográfica de la parroquia de San Antonio de Pichincha. Tomado de, Google Maps, (2015).

3.1.2. Población y muestra.

3.1.2.1. Población

Las fincas de donde se obtuvieron las muestras tienen un total de 33 animales bovinos raza Holstein en su mayoría y el resto de razas como Brown Swiss, Jersey y Normando. En la finca número uno se contó con 12 ejemplares y en la finca número dos con 21 animales.

La selección se realizó bajo los siguientes criterios:

a) Criterios de inclusión.

- Vacas desde segundo parto.
- Vacas que estén en etapa de lactancia.
- Vacas recurrentes en presentar la enfermedad.
- Vacas que presenten mastitis subclínica grado III, al realizar el test de CMT.
- Vacas que no hayan recibido tratamiento para la enfermedad.

b) Criterios de exclusión.

- Vacas de primer parto.
- Vacas que estén en la fase previa a la próxima lactancia (secado).
- Vacas que no alcancen el grado de mastitis subclínica grado III al realizar el test de CMT.
- Vacas que hayan recibido tratamiento.
- Vacas con mastitis clínica, que presentan signos macroscópicos evidentes.

c) Obtención de anticuerpos.

Para la obtención de anticuerpos se planteó formar 4 grupos, de tres gallinas cada uno, aves de raza Lohmann Brown, con una edad de 14 semanas de edad en promedio, sometidas al mismo sistema de manejo y alimentación, exceptuando dos grupos (2 y 3), que fueron mantenidos con la adición de espirulina y vitaminas al alimento respectivamente, este estudio tuvo una

duración de un mes y medio donde se realizaron titulajes de anticuerpos en suero sanguíneo y yema de huevo.

3.1.2.2. Muestra

La muestra se estableció en un tiempo determinado, comenzando en el mes de abril, desde el 4 del mismo mes hasta el 11 de mayo, realizando mediciones en suero sanguíneo y en yema de huevo determinando la presencia de anticuerpos en la yema de huevo.

3.2. Toma de muestras de leche

Para realizar esta investigación, se requería realizar tomas de muestras de leche a hatos ganaderos sospechosos de poseer mastitis subclínica, resultando positivas las muestras se podía obtener las bacterias para la posterior inoculación en los animales de experimentación. Estas muestras se las tomaron *in situ*. Post toma, se envió al laboratorio para su cultivo y aislamiento de las bacterias de interés.

Las muestras fueron obtenidas en dos haciendas diferentes, localizadas en la provincia de Napo y la otra en Pichincha, de estas se realizó los respectivos cultivos bacterianos. Este procedimiento se realizó entre Octubre de 2015 a Diciembre 2015.

3.2.1. Método de campo.

3.2.1.1. Protocolo para toma de muestras de leche.

Para la obtención de la muestra de leche se procedió a sujetar al animal en el establo de ordeño; se limpió la ubre del animal retirando material orgánico de la misma, seguidamente, usando guantes se lavó con agua y jabón, frotando con una toalla desechable, se secó y por último se limpió con una cantidad de alcohol al 70% en toda la glándula, y con una gasa se aplicó la misma solución en la punta de cada pezón hasta que la gasa luzca limpia, sin residuos.

3.2.1.2. Método para la obtención de muestra de leche

Para recolectar la muestra se eliminó los tres primeros chorros, posteriormente se tomó la muestra desde los pezones más alejados hacia los más cercanos que habían sido ya identificados como positivos a mastitis subclínica. Se removió las tapas de los frascos estériles, con precisión de que la tapa no entre en contacto con superficies sucias, el frasco colector se lo inclinó en ángulo para evitar que restos de material orgánico caigan dentro, con una distancia prudente entre el pezón y el frasco se comenzó a ordeñar el cuarto hasta completar de 3 a 5ml de leche. Inmediatamente se colocó la tapa, se membretó y colocó en refrigeración a 4 grados centígrados hasta ser procesada después de 3 horas. Terminada la colecta se selló los pezones evitando la contaminación. Las muestras se las procesó en el laboratorio (Libexlab), ubicado en la ciudad de Quito, aquí se realizó el cultivo y aislamiento de las bacterias presentes en la muestra.

Este proceso se realizó en las dos haciendas ganaderas.

3.2.1.2.1. Método de laboratorio

El método para el cultivo y el aislamiento se presenta en la Figura 4, la misma que resume todo el procedimiento llevado a cabo.

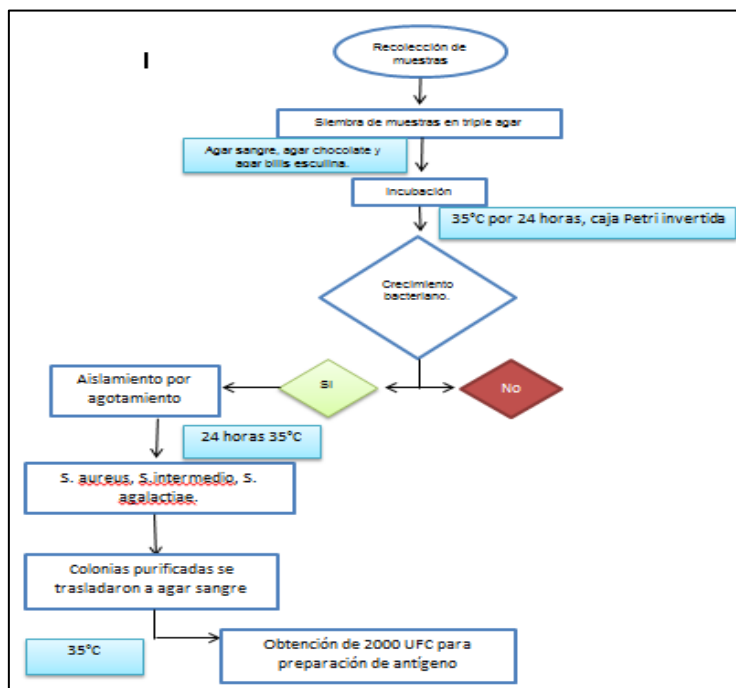


Figura 4. Metodología para cultivo y aislamiento de las muestras.

El cultivo bacteriano se realizó a partir de las muestras de leche mastítica provenientes de la Hacienda Santa Rosa y de la Granja Experimental UDLA. De las muestras obtenidas y enviadas al laboratorio se realizó un cultivo para posterior aislamiento de las colonias, se sembró en triple agar con un asa calibrada en estría cruzada. Se invirtió todas las cajas con la tapa hacia abajo para evitar la evaporación y se incubó a 35 °C por 24 horas.

3.2.1.2.2. Método de aislamiento bacteriano.

A las 24 horas post cultivo se obtuvieron varias colonias bacterianas, en este caso se aisló por agotamiento *S. aureus*, *S. agalactiae* y *S. intemedio*.

Se colocó en agar sangre y se lo mantuvo a 35° C.

3.2.1.2.3. Protocolo de preparación de antígeno.

- Se mantuvo en incubación a 35 °C hasta que las colonias sean representativas.
- Ya obteniendo colonias maduras se recolectó con un asa calibrada a 5x100UFC/ml.
- Se recolectaron colonias de *S. aureus*.
- Se recolectaron colonias de *S. intermedio*.
- Se recolectaron colonias de *S. agalactiae*.
- En un tubo de ensayo estéril se diluyeron las colonias y se las inactivaron con formaldehído al 1.7%.
- Se homogenizaron las muestras, se añadió solución PBS.
- Se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de inocular en las aves.

3.2.1.2.4. Protocolo de inoculación del antígeno en las aves.

- Se seleccionaron las aves a ser inoculadas y se las separaron en grupos.
- El antígeno se lo mantuvo a 4 °C en un cooler con gel refrigerante.
- Se colocaron a las aves en posición ventro dorsal y se dividió con una línea imaginaria la pechuga en cuatro cuadrantes.
- Se cargó en una jeringuilla de 3ml, 2ml de antígeno.
- Por último se inoculó vía IM 0.25 ml de antígeno en cada cuadrante de la pechuga.
- Este procedimiento se repitió con cada ave, a excepción del grupo testigo.

3.2.1.2.5. Protocolo de toma de muestras de sangre

Para la recolección de muestras sanguíneas y posterior titulaje, se recolectaron aproximadamente 3 a 5 ml de sangre por cada ave.

- Se colocó al ave en posición ventro dorsal y se ubicó la vena braquial.

- Alineando la aguja con la vena se la introdujo, la punta de la aguja apuntando hacia la punta del ala, con la finalidad de que la sangre se obtenga con mayor facilidad.
- Creando el vacío necesario se obtuvo entre 3 a 4 ml de sangre.
- Se colocaron las muestras en tubos colectores estériles, inclinando la jeringa sin aguja se depositó el contenido en el tubo.
- Se esperó hasta que se forme un coagulo y se separe el suero.
- Se conservaron a temperatura ambiente hasta llegar al laboratorio y ser procesada.

3.2.1.2.6. Protocolo de titulación de anticuerpos en suero sanguíneo.

La técnica ocupada para realizar la titulación de anticuerpos estuvo a cargo del Centro de Diagnóstico Clínico Veterinario Animalab. Aquí se empleó la técnica de turbidimetría automatizada.

Cuando la IgY está presente en la muestra que previamente ha sido precipitada y en presencia de anticuerpos anti IgY, la dispersión de luz que se genera por el complejo anticuerpo es correspondiente a la concentración de las inmunoglobulinas “Y”, gracias a este proceso se puede cuantificar los anticuerpos por medio de turbidimetría.

- Primero se precalentó el reactivo y el instrumental necesario a 37 °C.
- Con la ayuda de un pipeta graduada se pipeteó la cubeta y se recogió 1.5 ml de reactivo (A), y 10 µL de agua destilada.
- Seguido a esto se mezclaron los reactivos y se introdujo en la cubeta con la muestra de suero sanguíneo.
- Con la ayuda de un cronómetro se contabilizaron 5 minutos.
- Ya pasado este tiempo se leyó la absorbancia del reactivo (blanco), de los calibradores y de la muestra calibrada a 540nm.

3.2.1.2.7. Protocolo titulación de anticuerpos IgY en yema de huevo.

Se repitió el mismo protocolo para titulaje de anticuerpos en suero sanguíneo.

- Primero se precalentó el reactivo y el instrumental necesario a 37°C.
- Con la ayuda de un pipeta graduada se pipeteó la cubeta y se recogió 1.5 ml de reactivo (A), y 10 μ L de agua destilada.
- Seguido a esto se mezclaron los reactivos y se introdujo en la cubeta con la muestra de yema previamente separada.
- Con la ayuda de un cronómetro se contabilizaron 5 minutos.
- Ya pasado este tiempo se leyó la absorbancia del reactivo (blanco), de los calibradores y de la muestra calibrada a 540nm.

3.2.1.2.8. Protocolo de purificación y obtención de anticuerpos IgY en yema de huevo.

Para la obtención y separación de anticuerpos alojados en la yema de huevo se procesaron 10 huevos de gallina previamente inoculados con el antígeno deseado.

- Todos los procedimientos se realizaron con las medidas de bioseguridad necesarias.
- Se rompió la cascara de huevo y se separó cuidadosamente la yema de la clara.
- La yema se transfirió a un papel absorbente para eliminar los residuos de clara, dado que aquí existen otro tipo de inmunoglobulinas.
- Habiendo retirado los restos de clara, se rompió la membrana que recubre la yema y se la dejó caer en un tubo Falcon de 50ml.
- Posteriormente se mezcló el contenido de la yema con el doble de este volumen en solución PBS, más 3.5 gramos de polietilenglicol 6000, se agitó manualmente por 10 minutos para después centrifugar a 10000 rpm por 20 minutos.
- Terminada la centrifugación, se obtiene el sobrenadante y el precipitado, en la parte sólida existen mayormente grasas y en la solución acuosa están las proteínas IgY.

- Se desechó la parte sólida y la parte acuosa se recuperó en un segundo tubo.
- A esto se le añadió 8.5 gramos de polietilenglicol 6000.
- Se repitió el mismo procedimiento anteriormente enunciado y así se obtuvo un nuevo sobrenadante y un pellet.
- Se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet ya que aquí se encuentran los anticuerpos.
- El pellet residual se disolvió en 1ml de solución PBS con la ayuda de una varilla de vidrio, ya disuelto se añadió 9 ml más de PBS y se mezcló con polietilenglicol 6000 al 1.2 gramos.
- Esto se centrifugó nuevamente por 20 minutos.
- Ya retirado de la centrífuga con una pipeta automática se colocó en tubos Eppendorf y se almacenó a 4°C.

3.3. Materiales

Material de campo:

- Nariguera.
- Soga.
- Reactivo CMT
- Paleta para CMT.
- Guantes de inspección.
- Alcohol.
- Jabón.
- Tarros estériles para toma de muestras.
- Overol.
- Marcador.
- Esfero.
- Botas de caucho.
- Cooler.
- Gel refrigerante.
- Papel secante desechable.

- Jaulas de 50x 50 para cada unidad experimental.
- Galpón para las aves.
- Gasas
- Yodo
- Jeringuillas de 5ml
- Agujas hipodérmicas calibre #21
- Tubos estériles tapa roja.
- Gradilla.
- Cubeta de huevos.

Material de laboratorio:

- Caja Petri triple agar.
- Asa graduada.
- Solución PBS.
- Pipeta automática.
- Tubos Falcon.
- Tubos Eppendorf.
- Mechero.
- Tubos de ensayo estériles.
- Puntas para pipeta desechable.
- Reactivo Turbidimetría IgY.

3.4. Hipótesis

H0: La inoculación de antígenos específicos, obtenidos a partir de muestras de leche positiva a mastitis subclínica, a un grupo de gallinas vía intra - muscular, no son capaces de generar una respuesta inmune transmisible a la yema de huevo.

H1: La inoculación de antígenos específicos, obtenidos a partir de muestras de leche positiva a mastitis subclínica, a un grupo de gallinas vía intra - muscular, son capaces de generar una respuesta inmune transmisible a la yema de huevo.

3.5. Variables

En la siguiente Tabla 2, se presentan las diferentes variables que fueron analizadas en esta investigación.

Tabla 2.

Variables de Estudio.

Variables	Definición	Indicador	Unidad de medida
Peso	Ganancia de peso diario durante la experimentación	Peso inicial Peso final	Kg
Dieta	Tipo de alimento que se brindó a las aves durante la investigación	Alimento balanceado. Alimento balanceado con espirulina. Alimento balanceado con vitaminas.	gr.
Anticuerpos IgY	Anticuerpos específicos presentes en el organismo de cada ave sometida a un antígeno determinado	Suero sanguíneo de las gallinas. Yema de huevo.	μL/ml
Bacterias	Bacterias extraídas de muestras de leche pertenecientes a vacas positivas a mastitis subclínica, de las cuales se obtuvo antígenos para posterior inoculación	<i>Staphylococcus intermedio.</i> <i>Staphylococcus aureus.</i> <i>Streptococcus agalactiae.</i>	UFC.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Este capítulo da a conocer los datos obtenidos en el presente estudio, dando de esta manera respuesta a la hipótesis planteada. La inoculación de antígenos específicos obtenidos a partir de muestras de leche positiva a mastitis subclínica a un grupo de gallinas vía intra – muscular, son capaces de generar una respuesta inmune transmisible a la yema de huevo.

Dentro de las principales bacterias de las muestras de leche de vacas mastíticas tomadas de las dos fincas, se aislaron y purificaron 3 cepas bacterianas que son: *S. intermedio*, *S. aureus* y *S. agalactiae*.

Como análisis estadísticos se realizó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA); para analizar las medias se realizó la prueba de Diferencia Significativa de Medias (LSD), mediante los programas estadísticos Statgraphycs XV.II y SPSS Statistics 22. Estas pruebas se las realizó con un grado de confianza del 95% y posibilidad de error del 5%.

Durante el mes y medio de muestreo de suero sanguíneo y yema, se valoró la respuesta antigénica, teniendo como datos de inicio los que se expresan en la tabla 3.

Tabla 3.
Datos iniciales de la investigación.

Grupo	Peso inicial Aves (kg)	Titulaje suero pre-inóculo. $\mu\text{l/ml}$	Inoculación del antígeno.
<i>S. intermedio</i>	2.00	1.89	2000UFC
	1.80	2.00	2000UFC
	2.20	2.56	2000UFC
<i>S.aureus</i>	2.20	1.84	2000UFC
	2.50	1.43	2000UFC

	1.90	2.10	2000UFC
	2.20	2.45	2000UFC
<i>S.agalactiae</i>	1.90	2.30	2000UFC
	2.50	1.78	2000UFC
Testigo	1.90	1.90	2000UFC

Las aves utilizadas para el estudio presentaron un promedio de peso inicial de 1.98 Kg, y en los titulajes pre inóculo un promedio de 2.02 μ l/ml, permitiendo conocer los datos iniciales de las aves para el estudio.

Tabla 4.

Diferencias de Peso por grupos

Dieta	Peso inicial kg	Peso inicial promedio kg	Peso final kg	Peso final promedio kg	Ganancia de Peso Promedio kg
Grupo 1	2.00	2.00	2.50	2.57	0.57
	1.80		2.60		
	2.20		2.60		
Grupo 2	2.20	2.20	2.70	2.70	0.50
	2.50		2.90		
	1.90		2.50		
Grupo 3	2.20	1.87	2.70	2.77	0.90
	1.90		2.60		
	1.50		3.00		
Grupo 4	1.60	1.60	2.60	2.60	1.00

Nota: Grupo 1: alimento balanceado comercial. Grupo 2: alimento comercial más vitaminas. Grupo 3: alimento balanceado comercial más espirulina. Grupo 4: alimento balanceado.

Al utilizar el peso como un indicador para evaluar el estado de salud de las aves, se observó que en los grupos experimentales hay una ganancia mínima de 0.5 kg al final del estudio; debido al tipo de dieta que se brindó, resalta el grupo que recibió alimento balanceado con espirulina, el cual tuvo una ganancia mayor de los tratamientos evaluados. Estas variaciones se representan en la figura 5.

La tabla 5 presenta el promedio de los valores de las titulaciones realizadas en suero sanguíneo de las aves y yema de huevo en diferentes tiempos. Los valores de donde se obtuvieron estos promedios se expresan en el Anexo 24.

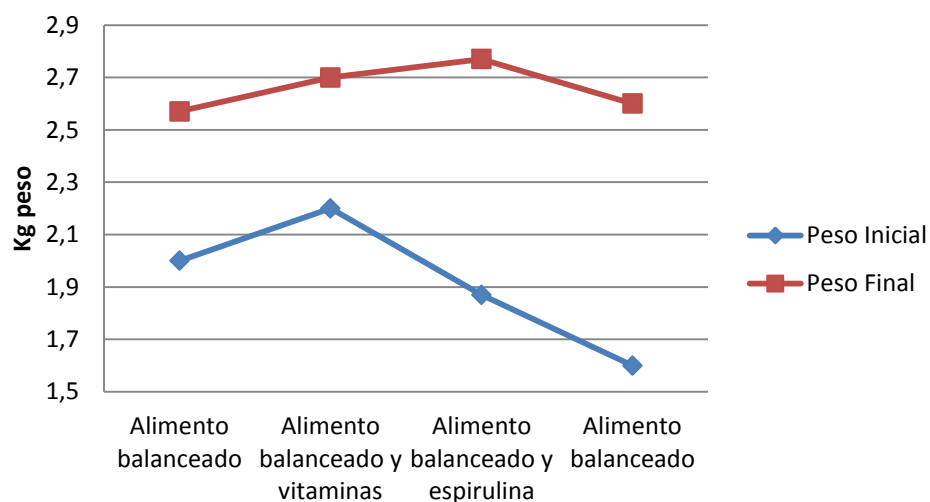


Figura 4. Diferencias de peso (kg)

Tabla 5.

Promedio de titulajes en suero sanguíneo y yema de huevo.

Tratamiento	Titulaje en suero sanguíneo ($\mu\text{l/L}$)				Titulaje en yema	
	Pre inóculo	7 días	14 días	21 días	28 días	44 días
Grupo 1	2.15	4.13	4.40	4.04	11.57	10.27
Grupo 2	1.79	4.88	4.51	4.33	12.01	11.48
Grupo 3	2.18	4.47	5.03	5.13	10.52	11.13
Grupo 4	1.90	2.90	2.90	2.90	6.80	6.80

Nota: Grupo 1: *S. intermedio*. grupo 2: *S.aureus*. grupo 3: *S.agalactiae*.

Mediante el ANOVA y LSD, se encontró una diferencia significativa ($p\text{-Valor} < 0.001$; <0.05), como se demuestra en la tabla 6. Adicionalmente se compararon las medias mediante la prueba de LSD, encontrando diferencias entre los titulajes: preinóculo, 7 y 14 días; pero sin diferencia entre los 14 y 21 días (ver tabla 7 y figura 6).

Tabla 6.
Análisis de varianza de titulaje en suero por bacteria.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	70.7801	3	23.5934	87.18	0.0000
Intra grupos	9.7431	36	0.270642		
Total (Corr.)	80.5232	39			

Tabla 7.
Prueba de diferencia de medias (LSD) en suero sanguíneo.

Contraste Titulajes	Sig.	Diferencia	+/- Límites
pre inoculo – 7 días	*	-0.512	0.471847
pre inoculo – 14 días	*	-2.823	0.471847
pre inoculo – 21 días	*	-2.957	0.471847
7 días – 14 días	*	-2.311	0.471847
7 días – 21 días	*	-2.445	0.471847
14 días – 28 días		-0.134	0.471847

* indica una diferencia significativa al 95% LSD.

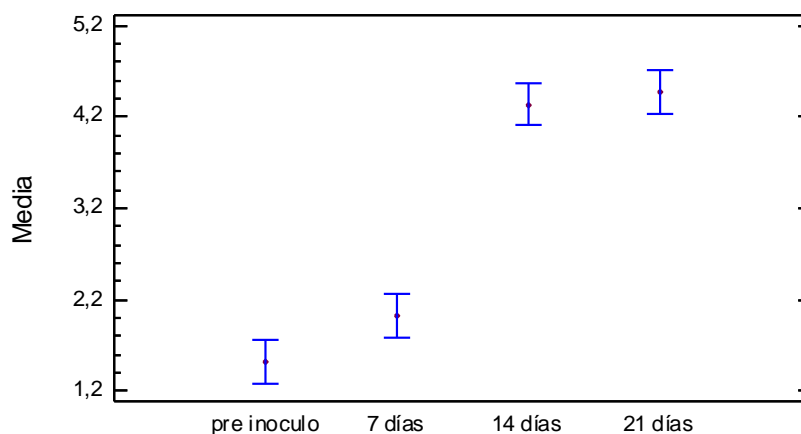


Figura 5. Prueba de diferencia entre medias de titulaje en suero.

La figura 7 muestra la variación de los valores promedios de titulajes de suero sanguíneo realizados en diferentes tiempos, los mismos indican la respuesta antigénica de las aves frente a la inoculación de un agente específico. Se evidencia que al día 7 se obtuvo un pico alto de respuesta frente al estímulo

antigénico en relación a la titulación pre inóculo, mientras que en las dos siguientes titulaciones no hay una diferencia significativa. Es importante resaltar el titulaje del tratamiento testigo en donde no se valoran cambios significativos, pero al ser comparado con los tratamientos experimentales, se evidencia la respuesta antigénica esperada.

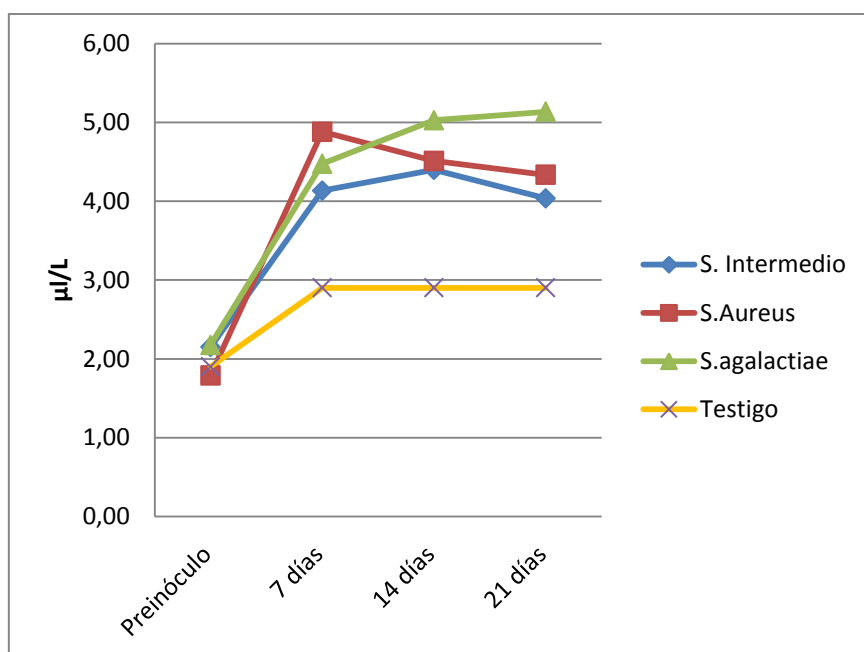


Figura 6. Titulaje en suero sanguíneo

La tabla 8 evidencia la concentración de anticuerpos IgY purificados, los tres grupos presentan un promedio de 9.12 mg/mL, siendo el grupo 3 (*S. agalactiae*) el que mayor concentración obtuvo con 10.53 mg/mL, este grupo fue mantenido con balanceado y espirulina. Estas concentraciones se obtuvieron de la purificación de las muestras de huevos a los 44 días.

Tabla 8.

Promedio de concentración de IgY purificada.

	Recuento	Promedio	Desviación n Estándar	Coficiente de Variación	Mín.	Máx.	Rango	Sesgo Estandari zado
G1	3	7,30	0,30	4,0%	7,00	7,59	0,59	-0,0359483
G2	3	9,50	0,20	2,12%	9,27	9,65	0,38	-1,06175
G3	3	10,58	0,77	7,29%	9,78	11,32	1,54	-0,21895
Total	9	9,12	1,51	16,54%	7,0	11,32	4,32	-0,272243

Nota: Grupo 1: *S. intermedio*. grupo 2: *S.aureus*. grupo 3: *S.agalactiae*.

Al realizar el ANOVA se encontró una diferencia significativa (p -Valor < 0.001 ; < 0.05), como se demuestra en la tabla 9.

Tabla 9.

Análisis de varianza de concentración de IgY purificada.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	16,7723	2	8,38614	34,80	0,0005
Intra grupos	1,44593	6	0,240989		
Total (Corr.)	18,2182	8			

También se obtuvieron las diferencias de medias con el análisis LSD, donde se evidencia un contraste notable entre los tres grupos, siendo la más marcada la del grupo 3 y en menos cantidad entre el grupo 2 y 1 (Ver figura 8).

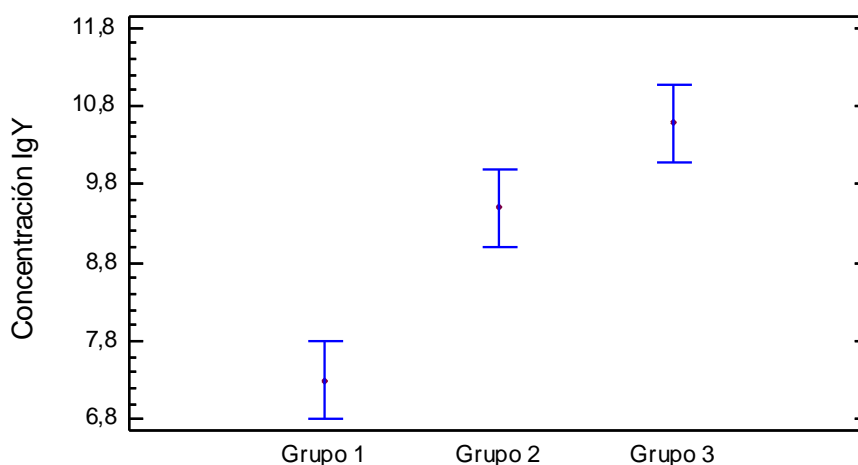


Figura 7. Medias de concentración IgY purificado de yema.

La tabla 10 expresa la diferencia entre los diferentes grupos, se realizó una comparación entre el grupo 1 con el grupo 2 y 3 y el grupo 2 con el grupo 3 evidenciando que existe una diferencia significativa entre ellos.

Tabla 10.

Prueba de diferencia de medias (LSD) concentración de IgY en yema.

Grupos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
G1	3	7.29667	X
G2	3	9.5	X
G3	3	10.5767	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G1 - G2	*	-2.20333	0.980782
G1 - G3	*	-3.28	0.980782
G2 - G3	*	-1.07667	0.980782

Nota: Grupo 1: *S. intermedio*. grupo 2: *S.aureus*. grupo 3: *S.agalactiae*.

4.2. Discusión

Si bien es cierto que no se ha reportado la inoculación y purificación de anticuerpos policlonales IgY para la mastitis bovina, la inoculación de un antígeno a gallinas de 14 semanas de edad puede ofrecer la obtención de un producto útil para la protección efectiva de dicha enfermedad en el ganado bovino o cualquier otra especie mamífera.

Como se evidencia en la tabla 3, a las aves se les realizó un titulado en suero sanguíneo para conocer su estado pre inóculo y se encontró que en el grupo 1 (*S. intermedio*) existen aves con una respuesta inmunogénica, dado que esta bacteria se encuentra comúnmente en la piel de animales sanos. En el grupo 2 también existió una respuesta inmunogénica ya que al igual que en el primer grupo, *S. aureus* es una bacteria que se alberga en tracto respiratorio y piel de las aves, tal como lo reporta García, et al. (2008) en su investigación.

El grupo tres de *S. agalactiae*, presentan una respuesta inmunológica mayor a los otros dos grupos experimentales; la literatura habla de que ésta bacteria es propia de los bovinos y es la causante de mastitis, pudiendo estar presente en varias especies animales como las aves, específicamente pollos, camélidos, anfibios, felinos, reptiles, peces y equinos (García, et al. 2008).

El peso fue una variable que se evaluó en las aves para poder realizar las inoculaciones. Al igual que los humanos los animales necesitan de la ingestión continua de alimentos, asegurando el funcionamiento de las actividades vitales. De esta manera se asegura la salud y productividad del animal, en este caso la postura de las aves. En el peso inicial se evidenció que las aves tenían un promedio de 1.91 kg, siendo este un peso apto para la inoculación de los antígenos, tal como lo reportan varios autores en sus investigaciones.

A cada grupo se lo alimento con una dieta distinta. Al primer grupo se lo puso a un régimen alimenticio de balanceado comercial, sin aditivos extras, grupo que obtuvo una ganancia de 0.57 kg de peso. Al grupo en el que se anexaron las vitaminas, obtuvieron una ganancia final de 0.50 kg en promedio. Esto da a notar que el alimento balanceado sin adiciones es suficiente para que las aves ganen peso y tengan una buena conversión alimenticia, obteniendo resultados similares a los presentados por Contreras et al. (2005).

Cabe recalcar que el grupo cuatro que fue el de control, obtuvo una mayor ganancia de peso frente a los demás grupos, esto se atribuye a que este grupo estuvo en condiciones distintas frente al resto de grupos de estudio, es decir, no fueron sometidos a condiciones de estrés como la manipulación e inoculación de antígenos, estas condiciones se sustentan en estudios realizados por el Instituto Americano de Estrés, dicho artículo menciona que condiciones de estrés generan pérdida de apetito total o parcial, susceptibilidad a enfermedades, letargia, problemas a nivel gastrointestinal (AIS, 2016). Pfizer, laboratorio fabricante de vacunas, advierte que post inoculación de un biológico sea virus vivo o atenuado pueda causar pérdida de apetito, repercutiendo en la ganancia de peso diario en el animal (Pfizer,2016). Klasing (1995) menciona que indistintamente de la naturaleza del inmunógeno, el estímulo del sistema inmune estimula un declive en el consumo, la ganancia de peso y la eficacia del uso del alimento. La disminución de la ingesta revela que el 70% del descenso de crecimiento del animal, mientras que el resto es debido a la pérdida de eficacia metabólica.

En cuanto al titulaje de anticuerpos, se observó que el grupo 2 que recibió aditamentos vitamínicos en el alimento obtuvo una mejor respuesta inmune con 4.88 μL , comparándolo con los resultados de los titulajes del grupo 1, con un promedio de 4.35 μL , corroborando que en animales la ausencia de vitaminas deprime la respuesta antigénica frente a inmunizaciones (Valverde, s.f).

Al tercer grupo que fue inoculado con *S. agalactiae* y se mantuvo con un régimen alimenticio de balanceado y espirulina, obteniendo una ganancia de peso de 0.90kg, siendo el grupo que más peso alcanzó en todo el estudio. Adicionalmente, este grupo fue alimentado con espirulina, alimento que estimula al sistema inmunitario dado su alto contenido en β - caroteno, que actúa en el fortalecimiento del sistema inmunitario de los individuos. Por sus propiedades antioxidantes, neutraliza los radicales libres que son los principales destructores de lípidos, alteran el material genético y pueden desencadenar enfermedades cancerígenas (Ciferri 1983). Dicho grupo demostró tener la respuesta inmunológica más prolongada, a los 7 días obtuvo un promedio 4.98 μL y una mayor concentración de anticuerpos IgY en yema purificada con un promedio de 10.57 mg/mL. La espirulina posee una sustancia en especial, el Phycocyanin que cumple la función de la eritropoyetina, regulando la producción de glóbulos blancos y el funcionamiento de las células de la médula espinal, estimulando el crecimiento del sistema inmunológico inmaduro o dañado, también mejora la actividad de las células T y la función glandular del Timo, incrementando los niveles de anticuerpos (Avian, 2008)

Independientemente del inmunógeno, la estimulación del sistema inmune provoca un descenso del consumo, de la ganancia de peso y de la eficacia de la utilización del alimento. La disminución de la ingestión explica alrededor del 70% del descenso del crecimiento, mientras que el resto es debido a la pérdida de eficacia metabólico.

Los picos más elevados en los titulajes de anticuerpos se presentan entre los días 7 y 14 post inoculación, coincidiendo en el estudio presentado por

Contreras et al. (2005). En la figura 7 se aprecia las concentraciones de anticuerpos en diferentes días, obteniendo una respuesta prolongada con el grupo tres; este resultado se relaciona con lo discutido previamente con respecto a la espirulina en el alimento, y la más baja correspondiendo al grupo uno, mismo que fue alimentado únicamente con balanceado comercial.

4.3. Limitaciones

El presente estudio presentó ciertas limitaciones al momento de desarrollar el ensayo, las mismas que se enlistan a continuación.

- Dificultad al adquirir aves de 14 semanas, dado que no es una edad comercial en el medio.
- Centros de diagnóstico especializados que brinden el servicio de titulación en yema de huevo.
- Costos elevados para el procesamiento de muestras.
- Tiempo reducido para poner a prueba el ensayo en animales diagnosticados con mastitis subclínica, causada por los agentes evaluados, para valorar su efectividad.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusiones

- Se identificó y aisló tres agentes causantes de mastitis subclínica, los cuales fueron inoculados exitosamente las aves.
- Se logró obtener anticuerpos IgY en yema de huevo de los tres agentes bacterianos.
- Se demostró que la respuesta inmune mejora con la presencia de aditivos alimenticios como las vitaminas y la espirulina.
- Se evidenció el paso de los anticuerpos IgY formados por el sistema inmune de las gallinas hacia el huevo, siendo esta en igual proporción a la respuesta inmune de los animales.
- Las aves del grupo 3 expuestas a *S. agalactiae*, presentaron una respuesta inmune mayor, ya que no es una bacteria propia de las aves, lo que generó una reacción más elevada, a esto se suma el efecto de la adhesión de espirulina, lo que mejoró la respuesta inmunológica.
- El presente estudio cumplió con las expectativas planteadas, alcanzó los objetivos generales y específicos, dando una pauta para otras investigaciones referentes al tema, buscando metas en pro del bienestar animal y la salud pública.

5.2. Recomendaciones

- Comprobar la efectividad de anticuerpos obtenidos en pacientes sanos susceptibles a mastitis subclínica originada por: *S. aureus*, *S. intermedio* y *S. agalactiae*; o en su defecto utilizar estos anticuerpos sobre animales enfermos para evaluar su respuesta a la mastitis.
- Adicionar al antígeno específico adyuvante de Freund y analizar la duración de respuesta antigénica con titulajes en suero.
- Evaluar la adición de vitaminas y espirulina en diferentes concentraciones.

- Analizar microbiológicamente muestras de animales que presenten mastitis clínica, con la finalidad de conocer los agentes causales, delimitando zonas específicas o animales persistentes a la enfermedad.
- Realizar ensayos con otras bacterias presentes en las muestras de leche proveniente de vacas positivas a mastitis subclínica.
- Estructurar grupos experimentales donde sean alimentados con diferentes regímenes alimenticios y sean inoculados un antígeno distinto, con la finalidad de evaluar la repercusión de los aditivos alimenticios frente a cada bacteria.
- Evaluar la concentración de IgY en yema mediante otras técnicas aplicables.
- Poner en uso esta técnica preventiva con otras enfermedades comunes en la casuística de nuestra región, no solo en especies mayores sino en animales de compañía.

REFERENCIAS

- Álvarez, R., Hernández, M., & Lucero, J. (1965). Aislamiento. Identificación y antibiograma de los gérmenes en la mastitis bovina. Quito. Ecuador. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador. pp 7.
- Amaro, J. (2012). Características generales del genero Streptococcus. Recuperado el 08 de marzo de 2016 de <http://academico.upv.cl/doctos/ENFE-6017/%7B103AD534-8A1F-456C-9BF8-99DD8BE54F05%7D/2012/S1/Streptococcus%202012.pdf>
- Amaro, J. (2012). Streptococcus. Recuperado el 24 de enero de 2016 de <http://academico.upv.cl/doctos/ENFE-6017/%7B103AD534-8A1F-456C-9BF8-99DD8BE54F05%7D/2012/S1/Streptococcus%202012.pdf>
- American Institute of Stress (2016). Recuperado el 04 de octubre de 2016 de <http://www.stress.org/pubsmultimedia/>
- Andresen, H. (2001). Mastitis prevención y control. Recuperado el 23 de enero de 2016 de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v12_n2/mastitis.htm
- Antai, SP. (1987). Incidence of Staphylococcus aureus. coliforms and antibiotic-resistant strains of Escherichia coli in rural water supplies in Port Harcourt. Journal of Applied Bacteriology. 62:371–375. Recuperado el 07 de marzo de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1987.tb04933.x/abstract>
- Ávila, S., & Romero, L. (2015). Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. UNAM. Recuperado el 08 de marzo de 2016 de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/110-anatomia.pdf
- Bardají, J. (2011). Anatomía y fisiología de las aves. Recuperado de 11 de abril de 2016 de <http://www.itgganadero.com/docs/itg/docs/2011/BAaves/ANATOMIAYFI SIOLOGIADELAS.pdf>

- Bedolla, C. (1999). Pruebas de laboratorio para la identificación de estafilococos. Recuperado el 10 de agosto de 2016 de <http://www.monografias.com/trabajos104/pruebas-laboratorio-identificacion-estafilococos/pruebas-laboratorio-identificacion-estafilococos.shtml#ixzz4GwZ2fbFo>
- Bedolla, CC. (2004). Métodos de detección de la mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Mimeo. Recuperado el 23 de abril de http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf
- Belmar, C., Abarzúa, F., Beker, J., Guzman, A., García, P., & Oyarzún, E. (2002). ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE 183 CEPAS DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE AISLADAS EN REGION VAGINO-PERINEAL DE EMBARAZADAS EN EL TERCER TRIMESTRE. Recuperado el 09 de marzo de 2016 de http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071775262002000200004&script=sci_arttext&tlng=pt
- Bilbao, G. (2007). Yemas de huevo que curan la diarrea. Recuperado el 18 de octubre de 2015 de <http://www.territorioidigital.com/Productivo/Productivo.asp?2007/09/29/Ganaderia>
- Bray, D. & Broaddus, B. (2006). How to Reduce Mastitis and Somatic Cell Counts in Your Dairy Herd. Proceedings 3rd Florida & Georgia Dairy Road Show. Recuperado el 17 de octubre de 2015 de <http://www.monografias.com/trabajos36/prevencion-mastitis/prevencion-mastitis.shtml>
- Bray, D. & Broaddus, B. (2006). How to Reduce Mastitis and Somatic Cell Counts in Your Dairy Herd. Proceedings 3rd Florida & Georgia Dairy Road Show. Referido de Prevención de la Mastitis Bovina: La desinfección de los pezones post-ordeño. Recueprado el 15 de abril de

- 2016 de <http://www.monografias.com/trabajos36/prevencion-mastitis/prevencion-mastitis2.shtml#ixzz4ITxBGn2B>
- Brizuela, M. (2007). Estreptococo Agalactiae Grupo B (EGB). Patógeno emergente de infección grave en neonatos y niños. Recuperado el 09 de marzo de 2016 de http://revistabioanalis.com/arxius/notas/Nota2_13.pdf
- Calderón, A., & Rodríguez, V. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). Recuperado el 22 de noviembre de 2015 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902008000400006
- Carlander, D. (2002). Avian IgY Antibody In vitro and in vivo. Recuperado el 06 de marzo de 2016 de <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:161296/FULLTEXT01.pdf>
- Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portelle, D., & Thewis, A. (2009). Anticuerpos de yema de huevo de gallina (IgY) la producción y el uso para la inmunización pasiva contra infecciones entéricas bacterianas en el pollo: una revisión. Recuperado el 24 de abril de 2016 de <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=4136>
- Ciferri, O. (1983) Spirulina. the edible microorganism. Recuperado el 12 de agosto de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC283708/>
- Conlago, L. (2013). Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de california mastitis test con identificación del agente etiológico. en la comunidad Paquiestancia. Cayambe – Ecuador. 2012. Recuperado el 18 de noviembre de 2015 de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6045>
- Contreras, V., De Lima, A., Navarro, M., Arteaga, R., Graterol, D., Cabello, L., & Farias, M.(2005). Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas con epimastigotas de

- Trypanosoma cruzi. Recuperado el 11 de agosto de 2016 de http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/igy_trypanosoma.pdf
- Crespo, M., & Vélez, J. (1996). Importancia clínica del Streptococcus agalactiae como causante de infección. Recuperado el 11 de abril de 2016 de <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/19/14>
- Ecuador Noticias (2016). Mapa Distrito Metropolitano. Recuperado el 04 de octubre de 2016 de <http://www.ecuadornoticias.com/search/label/MAPA%20ECUADOR>
- Erhard, M., Schade, R., Behn, I., Hlinak, A., & Staak, C. (2001). Chicken Egg Yolk Antibodies. Production and Application. IgY-Technology. (Ed) Springer. Lab Manuals. Berlin Heidelberg. New York pp. 255. Recuperado el 8 de mayo de 2016 de <http://www.springer.com/us/book/9783662044902>
- Erskine, R. (2001). Mastitis Control in Dairy Herds. In: Radostits OM, editor. Herd Health Food Animal Production Medicine. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. pp 397-433. Referido de Importancia del conteo de las células somáticas en la calidad de la leche bovina. Recuperado el 5 de junio de 2016 de <http://www.monografias.com/trabajos57/celulas-somaticas-bovina/celulas-somaticas-bovina2.shtml#ixzz4IU70UacQ>
- Espinoza, M., Mier, J. (2013). Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba california mastitis test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías lecheras del cantón el chaco. provincia del napo. Recuperado el 17 de octubre de 2015 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1281>
- FCA,. UNCuyo. (2006). Apuntes para asignatura Anatomía y Fisiología Animal De las carreras de Bromatología y Licenciatura en Bromatología. APARATO REPRODUCTOR DE AVES Y EL HUEVO. Recuperado el 11 de abril de 2016 de http://campus.fca.uncu.edu.ar/pluginfile.php/9600/mod_resource/content/0/Microsoft_Word_-_Repro_aves._huevo.pdf

- Ffizer (2016). Vacunas Felocell y Leukocell. Recuperado el 04 de octubre de 2016 de https://www.zoetisus.com/solutions/pages/frank/sp/documents/pfizer_fel_leu_sp_final.pdf
- Gallusimmunotech (2014). IgY purificación a partir de yemas de huevo de pollo. Recueperado el 10 de agosto de 2016 de <http://gallusimmunotech.com/experimental-protocols-using-igy/igy-purification-from-chicken-egg-yolks>
- García, J., Klesius, P., Evans, J., & Shoemaker, C. (2008). Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*. P. 151-154. Recuperado el 12 de agosto de 2016 de <http://naldc.nal.usda.gov/download/18514/PDF>
- Gobierno Autónomo Descentralizado De Napo (2016). Recuperado el 04 de octubre de 2016 de <http://www.napo.gob.ec/website/index.php/19-la-provincia>
- Google Maps (2016). Recuperado el 04 de octubre de 2016 de <https://www.google.com.ec/maps/place/San+Antonio/data=!4m2!3m1!1s0x8e2a77df59525453:0x19d6b7f1a8ee1670?sa=X&sqi=2&ved=0ahUKEwjwoZ2loMLPAhUC4SYKHRFMAHAQ8gEIGTAA>
- Gubbay, L., Galanternik, L., Galan, G., Cabrera, J., Galas, M., Degrossi., & Laboratorio Lamyc., A.N.L.I.S. (2003). *Staphylococcus aureus*: SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA Y DETECCIÓN DE ENTEROTOXINAS DE CEPAS AISLADAS DE ALIMENTOS Y MANOS DE MANIPULADORES. Recuperado el 5 de febrero de http://www.ub.edu.ar/revistas_digitales/Ciencias/Vol4Numero4/articulos.htm
- Hatta, H. (2009). Special yogurt fights stomach ulcer bug: study. Recuperado el 3 de abril de 2016 de <http://www.reuters.com/article/us-special-yogurt-idUSTRE52M5JA20090323>

- Jevitz, M. (1996) Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 13 Streptococcus. Recuperado el 08 de marzo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/>
- Klasing, K., Roura, E., & Korver, D. (1995). XI Curso de Especialización FEDNA, Barcelona. Department of Avian Science, Univ. of California. Davis. INTERACCIONES ENTRE NUTRICIÓN Y EL SISTEMA INMUNE. Recuperado el 04 de octubre de 2016 de www.produccion-animal.com.ar
- LeChevallier, MW & Seidler, RJ. (1980). Staphylococcus aureus in rural drinking-water. Applied and Environmental Microbiology. 39:739–742. Recuperado el 07 de marzo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC291412/>
- LeClaire, R., Hunt, R., Bavari, S. (2002) Protection against bacterial staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. Infect. Immun. 70: 2278-2281 Recuperado el 23 de abril de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127924/>
- Lee, SB., Mine, Y., Stevenson, MW. (2000) Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. J. Agric. Food Chem. Recuperado el 23 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637061>
- Li, X., Jing, K., Wang, X., Li, Y., Zhang, M., Li, Z., Xu, L., Wang, L., & Xu, Y. (2016). Protective effects of chicken egg yolk antibody (IgY) against experimental *Vibrio splendidus* infection in the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Recuperado el 6 de abril de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26592708>
- Lillehog, H., & Sasaki, K. (1994). Development and characterization of chicken-chicken B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies that detect sporozoite and merozoite of *Eimeria*. Poultry. Recuperado el 12 de abril de 2016 de <http://www.coccidia.icb.usp.br/icc9/proceedings/palestras/palestra07.html>

- Mazo, R. (2012). Mastitis bovina un problema en el campo. Recuperado el 26 de marzo de 2016 de <http://mazovelasquezenelcampo.blogspot.com/>
- Medina, C., & Montaldo, V. (2003). El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. IV Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Aguascalientes. México. pp. 21-23. Referido de Importancia del conteo de las células somáticas en la calidad de la leche bovina. Recuperado el 21 de abril de 2016 de <http://www.monografias.com/trabajos57/celulas-somaticas-bovina/celulas-somaticas-bovina2.shtml#ixzz4IU5T39jp>
- Mellenberger, R., & Kirk, J. (2001) Mastitis Control Program for Staph. aureus Infected Dairy Cows. Recuperado el 4 de febrero de http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/mastitis-control-program_staph.-aureaus.pdf.
- Mellenberger, R., & Kirk, J. (2001). Mastitis Control Program for Staph. aureus Infected Dairy Cows. Recuperado el 10 de agosto de 2016 de http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/mastitis-control-program_staph.-aureaus.pdf
- Menzies, P., & Ramanoon, SZ. (2001). Mastitis of sheep and goats. Recuperado el 07 de marzo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515405>
- Mine, Y., & Kovacs-Nolan, J. (2002). Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J. Med. Food* 5: 159-169. Recuperado el 08 de junio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495588>
- Morresey, P. (1999). Bovine Mastitis. In: Howard JL, Smith RA, editor. *Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice*. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. pp. 563-568. Referido de Importancia del conteo de las células somáticas en la calidad de la leche bovina. Recuperado el 23 de abril de <http://www.monografias.com/trabajos57/celulas-somaticas-bovina/celulas-somaticas-bovina2.shtml#ixzz4IU5oHUXg>

- Murcia, H. (2009). Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en inmunoensayos. Recuperado el 28 de abril de 2016 de [file:///C:/Users/esteban/Downloads/Dialnet-ImportanciaDeLasInmunoglobulinasAviaresYSusAplicac-3726659%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/esteban/Downloads/Dialnet-ImportanciaDeLasInmunoglobulinasAviaresYSusAplicac-3726659%20(1).pdf)
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M., (2013). Microbiología médica. Pag 22. 23. Recuperado el 11 de abril de 2016 de [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=dDgcBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=\(Murray.+PR..+Rosenthal.+KS..+Pfaller.+M..+2013\).+Pag+22.+23.+Microbiolog%C3%ADa+m%C3%A9dica.&ots=6ybB0J1YUs&sig=td-a4CB6XW3SL6MxRowLT_qg2jQ#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=dDgcBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=(Murray.+PR..+Rosenthal.+KS..+Pfaller.+M..+2013).+Pag+22.+23.+Microbiolog%C3%ADa+m%C3%A9dica.&ots=6ybB0J1YUs&sig=td-a4CB6XW3SL6MxRowLT_qg2jQ#v=onepage&q&f=false)
- NMC. (2010). Técnica de recolección de muestra de leche. Global Organization for Mastitis Control and Milk Quality. Recuperado el 11 de abril de 2016 de <http://www.nmconline.org/transl/elLecheroSampling.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2016). Nutrición e infección, salud y enfermedad. Capítulo 3. Recuperado el 04 de octubre de 2016 de <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s07.htm>
- Pahissa, A. (2009). Infecciones producidas por Staphylococcus aureus. Recuperado el 10 de agosto de 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=qFRukXHQX6QC&redir_esc=y
- Pérez, CG., Bedolla, CC., & Castañeda, VH. (2005). Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. Sustentabilidad. Vol III, No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. pp. 86-94. Referido por Métodos de detección de la mastitis bovina. Recuperado el 27 de abril de 2016 de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Perez, DM. (1986). Manual sobre ganado productor de leche. Edit. Villicaña S.A., México. pp 710-744. Referido por Métodos de detección de la mastitis bovina. Recuperado el 27 de abril de 2016 de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>

- Philpot, W., & Nickerson, S. (2002). Vencendo a Luta Contra a Mastite. Publicado por Westfalia Surge Inc. e Westfalia Landtechnik do Brasil Ltda. Brasil. Milkbizz. Edição Brasileira. pp 6-9. 15-17. 22-27. 38-43.
- Pichler, H. (1999). Development of an enzyme-immunoassay for the determination of the mycotoxin zearalenone based on egg-yolk antibodies from immunized chicken. Referido de Aplicaciones de tecnología de las inmunoglobulinas de yema de huevo (IgY) de gallina. Recuperado el 16 de junio de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/280984316_Aplicaciones_de_tecnologia_de_las_inmunoglobulinas_de_yema_de_huevo_IgY_de_gallina
- Pinzón, J. (1989). Mastitis Bovina Tipos, Agentes causales y Diagnósticos. Recuperado el 26 de marzo de 2016 de http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd31/texto/mastitis.htm
- Pottumarthy, S., Schapiro, J., Prentice, J., Houze, Y., Swanzy, S., & Brad T. (2004). Clinical Isolates of Staphylococcus intermedius Masquerading as Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Recuperado el 29 de junio de <http://jcm.asm.org/content/42/12/5881.full>
- Producción de anticuerpos policlonales Inmunización experimental de ratones (2010). Recuperado el 12 de agosto de 2016 de http://www.ciens.ula.ve/biologia/if_practica_1_produccion_ac_raton_b2010.pdf
- Pyorala, S. (2011). EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS DURANTE LA LACTANCIA. Recuperado el 7 de abril de 2016 de http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/59-Mastitis_lactancia.pdf
- Radostits, O., Gay-Clive, C., Blood, D., & Hinchliff, K. (2002). Medicina Veterinaria; tratado de las enfermedades del ganado bovino. ovino. porcino. caprino y equino. (90 ed.) (vol. 1). Ed. McGraw–

Hill Interamericana. Madrid. España. pp 738-752.

- Rose, M., & Orlans, E. (1981). Immunoglobulins in the egg. embryo and young chick. *Developmental and Comp. Immunology* 5. 15-20. Recuperado el 25 de abril de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7009243>
- Ruegg. P. (2005). Milk Quality Factsheet *Streptococcus agalactiae*. Recuperado el 08 de marzo de 2016 de http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/streptococcus-agalactiae_spanish.pdf
- Ruegg. P. (2010). Tratamiento de las Mastitis Clínica: Factores que Influyen en la enfermedad. Recuperado el 10 de agosto de 2016 de <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/El-tratamiento-de-las-Mastitis-Cl%C3%ADnicas-ANEMBE-2011.pdf>
- Schade, R., Gutierrez, C., Rodolfo, S., Chacana, P., Porankiewicz, J., & Terzolo H.R. (2006). Chicken egg yolk antibodies (IgY- tecnología): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim*. Recuperado el 24 de abril de 2016 de <http://www.cabi.org/Uploads/animal-science/worlds-poultry-science-association/WPSA-italy-2006/10080.pdf>
- Schade, R., Gutierrez., Calzado, E., Sarmiento, R., Chacana, P., Porankiewicz-Asplund, J., & Terzolo. H. R. (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 (2): 129-154. Recuperado el 9 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16180988>
- Schade, R., Zhang, X., & Terzolo, HR. (2007). Use of IgY Antibodies in Human and Veterinary Medicine. In: *Bioactive Egg Compounds*. R. Huopalahti. R. Lopez-Fandiño. M. Anton & R. Schade (Eds.). Springer. Germany. ISBN 978-3-540-37883. Chapter 23. pp. 213-222. Recuperado el 8 de mayo de 2016 de http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-540-37885-3_25
- Seija, V. (2008). Etiopatogenia microbiológica recuperado el 07 de marzo de 2016 de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>

- Silva, M. (2006) Curso Agentes Vivos de Enfermedades más Prevalentes en Chile. Recuperado el 08 de marzo de 2016 de <http://staphylococcus-aureus.blogspot.com/2006/11/diagstico-de-laboratorio.html>
- Sunwoo, H., Wang, W., Sima, J (2002). Detection of Escherichia coli, using chicken inmunoglobulin Y. Recueprado el 23 de mayo de 2016 de <http://europepmc.org/abstract/med/16781781>
- Terzolo, R. (2010). Aplicaciones de tecnología de las inmunoglobulinas de yema de huevo (IgY) de gallina. Recuperado el 4 de mayo de 2016 de [file:///C:/Users/esteban/Desktop/Anteproyecto/Aplicaciones%20de%20tecnología%20de%20las%20inmunoglobulinas%20de%20yema%20de%20huevo%20\(IgY\)%20de%20gallina.pdf](file:///C:/Users/esteban/Desktop/Anteproyecto/Aplicaciones%20de%20tecnología%20de%20las%20inmunoglobulinas%20de%20yema%20de%20huevo%20(IgY)%20de%20gallina.pdf)
- Thalley, BS & Carroll SB. (1990). Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. Recuperado el 11 de abril de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1366776>
- Valverde, R. (S.F.) Las vitaminas y el sistema inmune. Recuperado el 12 de agosto de 2016 de <http://www.feednet.ucr.ac.cr/bromatologia/LAS%20VITAMINAS%20Y%20EL%20SISTEMA%20INMUNE.pdf>
- Wellenberg, G., Poel, V., & Oirschot, V. (2005). Viral infections and bovine mastitis: A review. Veterinary Microbiology, Article 2361, Pp. 2-21. Recuperado el 04 de octubre 2016 de <http://www.veterinaria.org/revistas/prueba-articulo4458.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Construcción del galpón.



Anexo 2. Avance en la construcción del galpón.



Anexo 3. Galpón finalizado, listo para recibir a las aves.



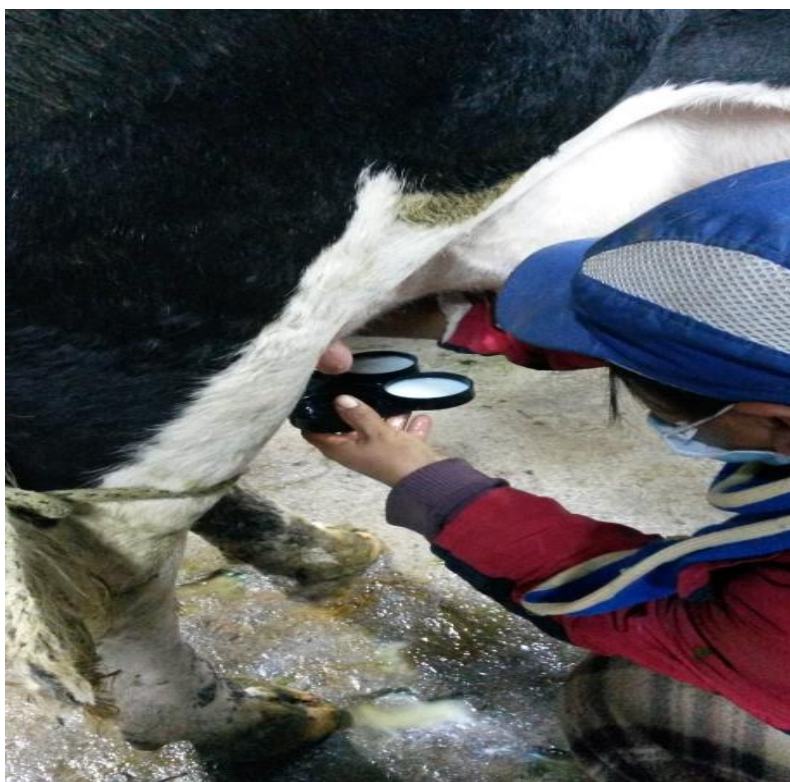
Anexo 4. Jaulas listas para albergar a las aves.



Anexo 5. Granja Experimental UDLA-Nono.



Anexo 6. Muestra de leche en posillos para test de CMT.



Anexo 7. Muestra de leche con reactivo CMT.



Anexo 8. Finca Santa Rosa – El Chaco, limpieza de la glándula para recolección de muestras.



Anexo 9. Secado de glándula mamaria, previo test de CMT.



Anexo 10. Muestra de leche para realizar test de CMT.



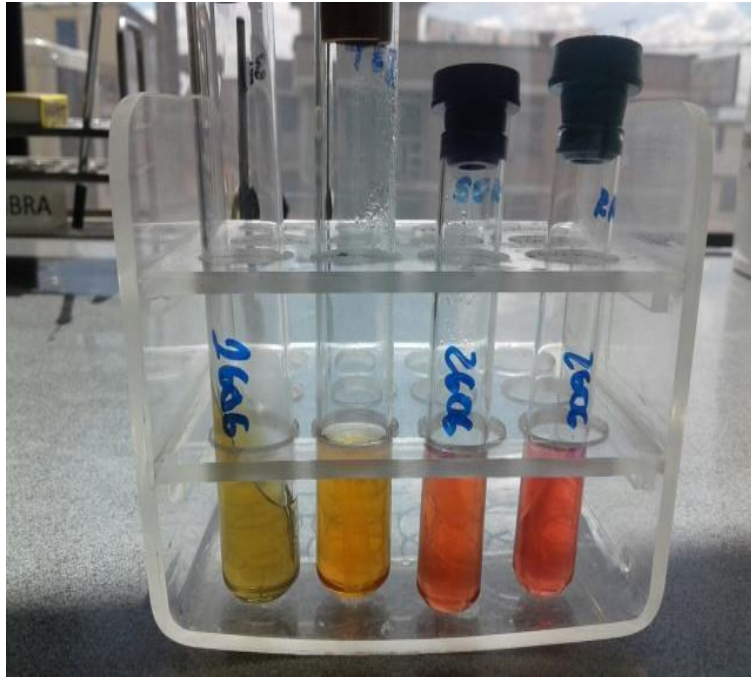
Anexo 11. Recolección de muestra de leche positiva a mastitis sub clínica grado III.



Anexo 12. Cultivo y aislamiento de muestras en el laboratorio. Muestra sembrada en triple agar 24 horas de cultivo.



Anexo 13. Cultivo sometido a prueba de oxidasa y catalasa.



Anexo 14 Cultivo de *S. aureus* en agar sangre, purificado.



Anexo 15. Cultivo de *S. intermedio* en agar sangre, purificado.



Anexo 16. Cultivo de *S. agalactiae* en agar sangre, purificado.



Anexo 17. Preparación de inóculo.



Anexo 18. Inactivación de bacterias con formaldehído al 1.7%.



Anexo 18. Solución estéril.



Anexo 19. Antígeno listo para ser inoculado.



Anexo 20. Inoculación de antígeno vía IM en aves de 14 semanas.



Anexo 21. Muestra de sangre para titulación en suero.



Anexo 22. Muestras de huevos para titulación en yema de huevo.



Anexo 23. Titulaje de anticuerpos en yema de huevo.



Anexo 24. Tabla de titulajes de anticuerpos en suero sanguíneo y yema de huevo.

Tratamiento	Preinóculo	TITULACIONES				
		7 días	14 días	21 días	28 días	44 días
Grupo 1	1.89	2.9	2.9	2.9	6.18	6.8
	2	3.8	5.1	5.3	10.22	11.08
	2.56	4	4.4	3.9	11.21	10.2
Grupo 2	1.84	4.1	4.31	4	12.26	10.2
	1.43	4.3	4.48	4.21	11.24	10.4
	2.1	4.64	4.98	5	10.1	10.9
Grupo 3	2.45	4.79	4.77	4	13.22	11.21
	2.3	4.9	3.8	4.2	10.81	11.22
	1.78	4.95	4.96	4.8	12.01	12.02
Grupo 4	1.9	4.98	5	5.1	11.24	12.22