

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

SISTEMA DE POSGRADO FACULTAD TÉCNICA PARA EL
DESARROLLO

Trabajo de Titulación

Previa a la obtención del grado de

MAGISTER EN SISTEMAS SOSTENIBLES DE PRODUCCIÓN ANIMAL

“LAS INMUNOGLOBULINAS Y, COMO UNA ALTERNATIVA A LA
ANTIBIOTERAPIA CONTRA *Escherichia coli* EN SISTEMAS DE
PRODUCCIÓN DE POLLOS BROILERS”

Tutor:

Dr. William López Vásquez

Elaborado por:

Pedro Pablo Cedeño Reyes

Guayaquil 23 Abril del 2015



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

SISTEMA DE POSGRADO

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Magister Pedro Pablo Cedeño Reyes como requerimiento parcial para la obtención del Grado Académico de Magíster en Sistemas Sostenibles de Producción Animal.

Guayaquil, Abril del 2015

DIRECTOR DE TESIS

Dr. William López Vásquez.

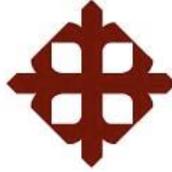
REVISORES:

Ing. Noelia Caicedo Coello.

Dr. José Álvarez Alvarado

DIRECTOR DEL PROGRAMA

Ing. John E. Franco Rodríguez.



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Pedro Pablo Cedeño Reyes

DECLARO QUE:

El proyecto de grado denominado “LAS INMUNOGLOBULINAS Y, COMO UNA ALTERNATIVA A LA ANTIOTERAPIA CONTRA *Escherichia coli* EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE POLLOS BROILERS” ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en cada página correspondiente, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

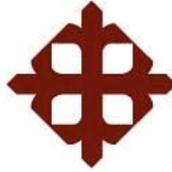
En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Guayaquil, Abril del 2015

EL AUTOR

Pedro Pablo Cedeño Reyes

C.I. 1308992104



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

SISTEMA DE POSTGRADO

AUTORIZACIÓN

Yo, Pedro Pablo Cedeño Reyes autorizo a la Universidad Católica Santiago de Guayaquil, la publicación, en la biblioteca de la Institución del proyecto titulado: “Las Inmunoglobulinas Y, como una alternativa a la antibioterapia contra *Escherichia coli* en Sistemas de Producción de pollos broilers”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Guayaquil, Abril del 2015

EL AUTOR

Pedro Pablo Cedeño Reyes
C.I. 1308992104

AGRADECIMIENTO

A la universidad Católica Santiago de Guayaquil.

A la Empresa Llaguno Cía. Ltda., por permitirme realizar el presente trabajo de investigación, en el área de bioterio y en los predios su propiedad.

Al Dr. Gonzalo Llaguno Figueroa, quien me apoyó en todo momento durante el transcurso de esta investigación.

A la Q.F. Soraya Tapia Bastidas, Jefa de Producción de Laboratorios Llaguno.

Al Dr. Pedro Sacoto. Gerente de producción de Laboratorios Llaguno.

Al Ing. Marcos Holguín Burgos. Jefe del departamento de mantenimiento técnico.

Al Dr. Aníbal Robalino Robayo. Maestro y amigo.

Al Dr. Mauro Llor Macías. Maestro y amigo.

A nuestros catedráticos con afecto, respeto y admiración.

ÍNDICE

CAPÍTULO	CONTENIDO	PÁG.
1.	PLANTEAMIENTO	1
1.1.	ANTECEDENTES	1
1.2.	Descripción del objeto de la investigación.....	3
1.3.	Justificación.....	4
1.4.	Preguntas de investigación.....	6
1.5.	Objetivos.....	7
	1.5.1. General.....	7
	1.5.2. Específicos.....	7
2.	MARCO TEÓRICO	8
2.1.	Colibacilosis.....	8
	2.1.1. Incidencia y distribución.....	9
	2.1.2. Etiología y patogénesis.....	10
	2.1.3. Hallazgos clínicos y lesiones.....	14
	2.1.4. Diagnóstico.....	15
	2.1.5. Zoonosis.....	17
	2.1.6. Tratamiento.....	20
	2.1.7. Prevención.....	21
2.2.	Resistencia de las bacterias a los antimicrobianos.....	22
2.3.	Tratamientos alternativos a problemas infecciosos entéricos.....	25
	2.3.1. Aceite Esencial de la planta de Orégano.....	25
	2.3.2. Utilización de Inmunomoduladores.....	26
	2.3.3. Prebióticos y Probióticos.....	27
	2.3.4. Aditivos fitogénicos para alimentos (PFA).....	28
	2.3.5. Ácidos Orgánicos.....	28
	2.3.6. Uso de Inmunoglobulinas Y.....	29
2.4.	Inmunoglobulina Y, de yema de huevo.....	30

2.4.1. Especificidad de la IgY.....	33
2.4.2. Transferencia de la IgY al huevo.....	34
2.4.3. Extracción y aislamiento de la IgY de la yema de huevo.....	35
2.4.4. Uso y ventajas de la IgY.....	36
2.4.5. Uso de Inmunoglobulinas Y, en pruebas inmuno serológicas de diagnóstico.....	38
2.5. Titulación de Virus o Bacterias.....	39
2.5.1. Titulaciones.....	39
2.5.2. Tipos de Titulación.....	40
2.6. Aplicación de Vacunas.....	43
2.7. Medios de Cultivo.....	43
2.7.1. Clasificación de medios de Cultivo.....	44
2.7.1.1. Medios de cultivo de acuerdo a su consistencia...	44
2.7.1.2. Medios de cultivo de acuerdo a su finalidad.....	45
2.7.2. Medios de cultivo comerciales.....	46
2.7.2.1. Medio de cultivo L.B. (Luria Bertani) o Agar Miller.....	46
2.7.2.2. Medio de cultivo Caldo Tryptic Soy Broth (TSB).	47
2.7.2.3. Medio Agar MacConkey.....	48
2.7.3. Preparación de Medios de Cultivo.....	49
2.7.3.1. Preparación de la solución.....	49
2.7.3.2. Esterilización.....	50
2.7.3.3. Vertido en Placa.....	50
3. METODOLOGÍA.....	51
3.1. Enfoque.....	51
3.2. El Universo.....	52
3.3. Lugar de la investigación.....	53
3.4. Equipos y Materiales.....	54
3.4.1. Materiales de Laboratorio.....	54
3.4.2. Materiales de Campo.....	55
3.5. Variables En Estudio.....	56

3.5.1. Variables o categorías de investigación.....	56
3.5.2. Medición de variables.....	56
3.5.2.1. Morbilidad.....	56
3.5.2.2. Mortalidad.....	57
3.5.2.3. Costo de tratamientos.....	57
3.6. Métodos.....	57
Descripción Del Trabajo.....	57
3.6.1. Aislamiento y secuenciación de <i>E. coli</i>	58
3.6.2. Titulación de la bacteria <i>E. coli</i>	58
3.6.2.1. Preparación de medios de cultivo.....	58
3.6.2.2. Siembra de <i>E. coli</i> e incubación por 18 horas.....	60
3.6.2.3. Primera dilución de <i>E. coli</i> (dilución 1 en 10) e incubación por 18 horas.....	60
3.6.2.4. Segunda dilución de <i>E. coli</i> (dilución 1 en 100) e incubación por 4 horas.....	61
3.6.2.5. Inoculación de <i>E. coli</i> en medio Solido y en pollitas de 1 día de edad.....	61
3.6.2.6. Periodo de observación.....	61
3.6.2.7. Confrontación de las Inmunoglobulinas con bacterias ya tituladas.....	62
3.6.2.8. Procedimientos de recolección de datos.....	63
3.6.3. Estudios Estadísticos.....	65
3.6.4. Plan de trabajo.....	66
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
5. CONCLUSIONES.....	76
6. RECOMENDACIONES.....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	78
ANEXOS.....	89

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁG.
Cuadro 1 Eficiencia de la inmunoglobulina Y frente al desafío con 1 DL 50% de <i>E. coli</i> y comparación del factor de conversión alimenticia (F.C) al día 7 post-inoculación. 35 días de edad.....	68
Cuadro 2 Comparación del factor de conversión alimenticia (F.C) al día 13 post-inoculación. 41 días.....	70
Cuadro 3 Inocuidad de las inmunoglobulinas aplicadas a pollos Ross 308.....	72
Cuadro 4 Comparación de costos de tratamientos.....	73

ÍNDICE DE GRÁFICOS

CONTENIDO	PÁG.
Gráfico 1 Eficiencia de los tratamientos en relación al FC	
Acumulado.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ubicación del Cantón Lomas de Sargentillo, Provincia del Guayas.....	89
Figura 2	Siembra de <i>E coli</i> en Medio Líquido (TSB)	89
Figura 3	Realización de diluciones de la <i>E Coli</i> para la Obtención de la DL50.....	90
Figura 4	Colonias de <i>E coli</i> en Agar MacConkey.....	90
Figura 5	Inoculación de <i>E. Coli</i> en pollitos de 1 día de edad, para la obtención de DL 50.....	91
Figura 6	Grupo de pollitos inoculados con <i>E coli</i> en la dilución 10^{-10}	91
Figura 7	Toma de datos para determinar letalidad de <i>E Coli</i> en pollitos de 1 día de edad.....	92
Figura 8	Aplicación de IgY directamente al bebedero.....	92
Figura 9	Aplicación de <i>E Coli</i>	93
Figura 10	Jeringa especial utilizada para la inoculación del <i>E coli</i>	93



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

RESUMEN

En el cantón Lomas de Sargentillo provincia del Guayas, se realizó la presente investigación. Los objetivos fueron los siguientes: determinar la eficacia de las inmunoglobulinas Y, ante retos de *E. coli* en pollos broilers, analizar la inocuidad del uso de inmunoglobulinas en pollos broilers, realizar un análisis de costos de tratamientos con IgY vs Enrofloxacina. Se utilizó pollos broilers de 28 días, distribuidos en 5 grupos de 50 pollos. Se inoculó 1 dosis letal 50 % de *E. coli* O111: H, a todos los grupos y 48 horas post inoculación, se aplicó las IgY, al grupo 1 a las 48 horas, grupo 2 a las 48 y 72 horas, grupo 3 a las 48, 72 y 96 horas, al grupo 4 se aplicó enrofloxacina y el grupo 5 fue control. A través de la conversión alimenticia se evidencia que la eficacia de la IgY es nula de acuerdo a la ANOVA y a la correlación de Fisher, no hubo diferencia significativa entre los grupos que recibieron IgY y los que no recibieron, no se observó mortalidad y la morbilidad fue del 20 % durante los 13 días de estudio, el tratamiento con mayor cantidad de IgY, tuvo un costo de USD \$ 6.00, comparado con la enrofloxacina USD \$ 31,54. Se concluye que las IgY no son eficaces contra *E. coli* inoculado vía S.C., son inocuas y los tratamientos empleándolas son más económicos que la administración de Enrofloxacina.

Palabras Claves: Inmunoglobulinas Y, *Escherichia coli*, conversión alimenticia.



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

ABSTRACT

This research was conducted in the city of Lomas de Sargentillo who belongs to Guayas province. The objectives were: determining the effectiveness of immunoglobulins and to residues of *E. coli* in broilers, testing the safety of the use of immunoglobulins in broilers, an analysis of costs of treatments with IgY vs. Enrofloxacin. Broilers of 28 days was used, divided into 5 groups of 50 chicks. 1 lethal 50 dose of *E. coli* O111:H was inoculated to all groups and 48 hours post inoculation of *E. coli*, the IgY was applied, the group 1 to 48 hours, Group 2 at 48 and 72 hours group 3 to 48, 72 and 96 hours, to group 4 was applied enrofloxacin and group 5 was control. Through the feed conversion is evident that the efficacy of the IgY is zero according to the ANOVA and Fisher Correlation, there is no significant difference between the groups that received IgY and those did not receive, observed no mortality and morbidity was 20% during the 13 days of the study, treatment with IgY costs as much USD \$ 6 compared with enrofloxacin that costs USD \$ 31.54. The conclusion is the IgY are not effective against *E. coli* inoculated via SC, they are safe and treatments using them are cheaper than using enrofloxacin.

Keywords: Immunoglobulin Y, Escherichia coli, feed conversion.

1. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

1.1. Antecedentes

La colibacilosis es una de las principales enfermedades de la avicultura industrial moderna, está distribuida en aves de todas las edades y en los diferentes tipos de sistemas de producción. Causa grandes perjuicios económicos en el mundo entero por cuadros patológicos., tales como: colisepticemia, ooforitis, peritonitis, neumonía, pleuroneumonía, aerosaculitis, enterocolitis, pericarditis, celulitis, coligranuloma, enfermedad respiratoria crónica complicada (DRCC), onfalitis, salpingitis, cloacitis, panoftalmitis, osteomielitis, artritis, sinovitis(Dinev, 2007).

Los cuadros patológicos son causados por ciertos microorganismos específicos, denominados bacterias patógenas, por su capacidad de producir una enfermedad. Este tipo de microorganismo se lo puede combatir con antimicrobianos, que son sustancias que impiden el desarrollo y la actividad de las bacterias (NHI, 2014).

Es muy conocido que los antibióticos han mejorado substancialmente la respuesta médica a las patologías causadas por bacterias, e hicieron menos complicado el tratamiento de muchas enfermedades que antes eran fatales, el uso incorrecto, la utilización de sub-dosis y la falta de verificación respecto al agente causal de algunas enfermedades han causado, la aplicación inadecuada de estas moléculas lo cual ha provocado transformaciones de tipo genotípicas en las poblaciones de bacterias que antes eran susceptibles, y en la actualidad ya no lo son a determinados fármacos. Esta situación es muy preocupante, ya que basados en estudios minuciosos algunos científicos consideran que la efectividad de algunas terapias utilizando antibióticos no serán del todo eficaces en el próximo centenar de años (Rosenblatt Farrell, 2009).

Durante los últimos años, los antibióticos han sido utilizados en la industria animal para promover el crecimiento (en dosis sub-terapéuticas), para la prevención de enfermedades (en dosis profilácticas) y para tratar medicamente las infecciones. El uso inadecuado o excesivo de ellos ha contribuido a la generación de las superbacterias, que son resistentes a los antibióticos (Yegani y Korver, 2009).

Lamentablemente, en países de menor desarrollo como el nuestro, aun se sigue utilizando antibióticos de forma sub-terapéutica o en sobre dosis, y en muchos casos quienes prescriben estos medicamentos no son profesionales, siendo propensos a cometer muchos errores en cuanto a dosificación y manejo de medicamentos. Esto es muy preocupante por ello se hace necesario realizar estudios en las poblaciones humanas sobre la posible ingesta de alimentos con residuos de antibióticos que potencialmente inducirán resistencia en las bacterias y harán inútiles futuros tratamientos con antibióticos (Martínez et al, 2014).

Frente a esta problemática se han desarrollado alternativas tecnológicas que cubren diferentes aspectos entre los que se encuentran las normas de bioseguridad y manejo, vacunación, selección genética, exclusión competitiva, y el desarrollo de productos multifuncionales como prebióticos, probióticos, oligosacáridos (mananoligosacaridos y fructooligosacáridos), ácidos orgánicos (fumárico, propiónicoentre otros) extractos vegetales (aceites esenciales de orégano). López et al (2009). Citado por Medina et al (2014).

La aplicación de la IgY ha creado un aumento en el interés de los científicos que promueven el desarrollo de nuevas alternativas para controlar problemas bacterianos. Además de su uso en medicina humana en inmunodiagnóstico, odontología, medicina forense, investigaciones biomédicas en general, también es utilizada en medicina veterinaria en producción animal (Terzolo, 2009).

La IgY predomina en la yema de los huevos de gallina, en muchos estudios, se ha demostrado que la IgY de yema de huevo presenta afinidad y sensibilidad similares a las de la IgG mamífera. La IgY de huevo es particularmente útil como Inmunoprolifáctico o Inmunoterapéutico. Algunas de estas aplicaciones son la prevención y tratamiento de diarreas humanas y animales, caries, xenotransplantes, síndrome urémico hemolítico, fibrosis cística, elaboración de antitoxinas antivenenos, (Chacana y Terzolo, 2003).

1.2. Descripción del Objeto de la Investigación

Las pérdidas económicas asociadas a la infección causada por *Escherichia coli*, son muy elevadas y afectan a la industria avícola a nivel global. Este microorganismo es parte de la flora microbiana normal presente en los intestinos de mamíferos, como de las aves comerciales, además dentro de este género de bacterias se encuentran cepas toxígenas las cuales causan problemas tanto a nivel local como sistémico. En la industria avícola los antibióticos siempre han sido una de las opciones más efectivas para controlar problemas asociados a *E.coli*. Sin embargo, actualmente se ha aislado en las granjas avícolas cepas de *E.coli* que frecuentemente son resistentes a uno o más antibióticos (Yegani y Korver, 2009).

Por lo anterior, se evaluó la habilidad de los anticuerpos de yema inducidos tras la hiperinmunización de gallinas con antígenos selectos de *E.coli*, para proteger a los pollos de engorde contra la infección del tracto respiratorio y otras afecciones asociadas a septicemia que sea causada por *E.coli*.

Estudios en vivo han demostrado que los anticuerpos de yema tienen efectos inhibidores sobre el crecimiento del *E.coli* K99 en lechones. El efecto protector de anticuerpos de yema de huevo contra la infección por *E. coli* K99 en lechones recién nacidos indica que los animales tratados con

IgY a partir de las gallinas inmunizadas contra *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) fueron protegidos contra los efectos nocivos de esta bacteria (Liou et al, 2011).

La investigación se llevó a cabo en el cantón Lomas de Sargentillo de la provincia del Guayas. El sitio donde se desarrolló el trabajo está aislado e influenciado por poblaciones microbiológicas pertenecientes a la actividad avícola, debido a que en el sitio escogido, hasta hace pocos meses se encontraba en funcionamiento un centro de producción avícola.

1.3. Justificación

El aumento desmesurado de la población mundial y la necesidad de proteína de alta calidad, crean un ambiente de presión en la industria avícola ya que se debe maximizar los recursos para alcanzar altos niveles de producción con bajos costos de inversión. En la actualidad, la actividad avícola es la principal fuente de proteína animal de alto valor biológico, ya que a través de ella se genera productos como carnes blancas, huevos, entre otros.

La preocupación por la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos va en aumento y es a nivel mundial, se ha reportado que los antibióticos, que hace algunas décadas controlaban y aniquilaban las bacterias en la actualidad ya no funcionan y lo más preocupante es que, el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos está estancado, de manera que el tema de la fármaco resistencia es cada vez más importante y está siendo tratado por las autoridades de muchos países, ya que se ha convertido en problema de salud pública.

La necesidad de la población mundial de alimentos limpios que no contengan trazas de antibióticos y la tendencia del consumidor actual de adquirir productos tipo orgánicos impulsa a la industria avícola a buscar

producir disminuyendo al máximo la cantidad de químicos de todo tipo, utilizados en la actividad avícola.

La disminución de costos de producción en la industria avícola será mayor si se baja el consumo de antibióticos, ya que se disminuiría las grandes importaciones de este insumo, generando un aumento en las ganancias, incrementando la actividad avícola y a la vez mejorando la infraestructura avícola ecuatoriana.

1.4. Preguntas de Investigación

¿Las IgY pueden ser útiles para controlar los efectos del *E.coli* en la industria avícola?

¿El uso de IgY será inocuo en los sistemas de producción intensivos de pollos broilers?

¿La IgY puede constituirse en una alternativa para la inmunoterapia de las aves?

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. General

Evaluar el uso de Inmunoglobulinas en el control de *E. coli* agente que afecta a los sistemas de producción de pollos broilers.

1.5.2. Específicos

1. Determinar la eficacia de las inmunoglobulinas ante retos de *E. coli* en pollos broilers.
2. Analizar la Inocuidad del uso de Inmunoglobulinas en los sistemas de producción intensivos de pollos broilers.
3. Realizar un análisis de los costos de tratamientos con inmunoglobulinas vs tratamiento con antibiótico.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Colibacilosis

Colibacilosis es el termino comúnmente empleado para designar las infecciones causadas por *Escherichia coli* en los animales. Identificada como parte de la microbiota entérica en la mayoría de los animales, fue considerada durante mucho tiempo como un microorganismo no patogénico. Sin embargo, algunos sero grupos de *E. coli* comenzaron a ser asociados a diversas patologías del hombre y en los animales domésticos. *E.coli* O157:H7 es considerado actualmente uno de los principales agentes de toxico infecciones alimentarias relacionadas al consumo de productos de origen animal, principalmente en países desarrollados como Estados Unidos y Japón. En los países en desarrollo, el cuadro clínico más frecuente es la gastroenteritis en niños recién nacidos, responsable anualmente por millones de muertes (Berchieriet al, 2009).

De acuerdo a Barrientos (2011),el hallazgo clínico más frecuentes de la colibacilosis en aves domésticas es la colisepticemia de origen respiratorio, que es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria avícola.

En las aves, la infección por *E. coli* es considerada secundaria a otros agentes y la manifestación de la enfermedad es extra-intestinal. La colibacilosis es una de las principales enfermedades de la avicultura industrial moderna, debido a los grandes perjuicios económicos causados en el mundo entero por cuadros como: Colisepticemia, peritonitis, neumonía, pleuroneumonía, aerosaculitis, pericarditis, celulitis, coligranuloma, Enfermedad respiratoria crónica complicada (DRCC), onfalitis, salpingitis, síndrome de cabeza hinchada (SCI), panoftalmia, osteomielitis, sinovitis (Berchieri et al,2009).

2.1.1. Incidencia y Distribución

La *Escherichia coli* puede estar presente en todo el globo terráqueo, aun en la Antártida. La situación geográfica, temperatura, y humedad ambiental son factores que determinan su incidencia. La prevalencia es mayor en zonas húmedas y cálidas, condiciones que prolongan la supervivencia de este microorganismo (Stanchi, 2007).

De acuerdo a Berchieri et al, (2009), la *E. coli* hace parte de la microbiota entérica de los mamíferos y aves. La colonización del intestino ocurre luego del nacimiento, y aunque el papel de la microbiota entérica aún no ha sido completamente dilucidado, existen evidencias de la participación de estos microorganismos en la nutrición, sirviendo como fuentes de vitaminas, ocupación de los sitios de la mucosa intestinal, impidiendo la colonización del epitelio por microorganismos patogénicos. La *E.coli* también puede ser fácilmente aislada de la región de la faringe y el tracto respiratorio superior de las aves.

En el tracto digestivo de las aves, la *E. coli* puede ser encontrada en concentraciones por encima de 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de heces, siendo del 10 al 20% de estas muestras potencialmente patogénicas para los animales. Hay una excreción continua de *E. coli* portadora de factores de virulencia a través de las heces, hecho que torna a su distribución cosmopolita. La bacteria puede permanecer en las instalaciones por largos periodos, contaminando el alimento y el agua, que servirán como vía de diseminación de la bacteria. La contaminación fecal de la cascara de huevo es una de las principales vías de transmisión para los pollitos, resultando en alta mortalidad embrionaria. Roedores y aves silvestres también pueden funcionar como reservorios de la enfermedad (Berchieriet al, 2009).

En nuestro país aún no se ha notificado trabajo alguno desarrollado para determinar la presencia de cepas de *E. coli* patógenas, pero es muy común entre los técnicos clínicos realizar hallazgos clínicos y confirmar a través de análisis laboratoriales, la presencia de este patógeno muy nocivo para las aves.

En el vecino país Perú un grupo de científicos desarrollaron una investigación para determinar la presencia de cepas patogénicas de *E. coli* (EPEC), en este trabajo la edad de las aves muestreadas oscilaba entre 14 y 31 días, del total de muestras 41 resultaron positivas a *E. coli*, de estas el 65 por ciento expresó uno o más genes de virulencia, gracias a esta situación se las denominó potencialmente patógenas, mientras que aquellas que expresaron 5 genes de virulencia se las denominó patógenas (Carranza, 2012).

2.1.2. Etiología y Patogénesis

La *Escherichia coli* es un microorganismo que coloniza normalmente el intestino sano. Sin embargo, existen serotipos que son capaces de provocar diarreas en animales recién nacidos, adultos y en los hombres. Para entender mejor la actividad lesiva de las *E. coli* en los hospederos, las cepas de estas bacterias se clasifican en patotipos como: enteropatogénicas (EPEC), enteroinvasivas (EIEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroagregativas (EAEC) y verotoxigénicas (VTEC), dependiendo de los factores de virulencia que poseen (Stanchi, 2007).

Además de los patotipos antes mencionados existe la *E. coli* productora de toxina Shiga (Vero) (STEC/VTEC). Capaz de provocar graves problemas de salud en el hombre, transmitiéndose desde los reservorios animales a través de la cadena alimentaria (Wasteson, 2001).

Como lo indica Kahn (2007), el *E. coli* es una bacteria Gram negativa en forma de bacilo, que se encuentra normalmente en los intestinos de las aves de granja y el resto de animales; aunque la mayoría no son patógenas, un número limitado de cepas produce infecciones extra intestinales. Las cepas patogénicas son frecuentemente los serotipos O1, O2, O78, pero se han descrito serotipos O11, O15, O18, O51, O115, O132 en aislados de *E.coli* asociados con celulitis y colibacilosis. Existe una considerable diversidad de sero grupos entre los aislados clínicos, y sólo un pequeño porcentaje de estos aislados pertenecen a los serotipos O1, O2, u O78. De hecho, entre el 18-29% de *E.coli* los aislados de erisipelas aviares no pueden ser tipificados.

En el ambiente de los criaderos de aves de granja existe una cantidad elevada de *E. coli* debido a la contaminación fecal. Puede producirse una exposición inicial a cepas patógenas de *E. coli* en zonas de incubación, a partir de huevos infectados o contaminados, pero la infección generalizada normalmente precisa de factores ambientales o causas infecciosas predisponentes (Kahn, 2007).

Las *E. coli* de los serogrupos O78, O88, O20, O2 se caracterizan por poseer factores de virulencia del patotipos 1 (Perelló, 2010).

La infección en aves por *E. coli* son de dos tipos, local y sistémico, el *E. coli* puede presentarse como agente primario o secundario (Dinev, 2007).

Las condiciones ambientales y de manejo contribuyen mucho a la ocurrencia de la enfermedad, pues la bacteria es considerada como oportunista. Altas concentraciones de amonio en el galpón, deficiencia en la ventilación de ambientes avícolas, temperaturas extremas, humedad de la cama, el manejo con alta densidad y la deficiente desinfección son

consideradas los principales factores ambientales predisponentes (Berchieriet al, 2009).

La micoplasmosis, la bronquitis infecciosa, Newcastle, la enteritis hemorrágica y la bordetelosis del pavo preceden a la colibacilosis. La infección generalizada aparece cuando entra en la circulación, a partir de las vías respiratorias o del intestino, un número elevado de cepas patógenas de *E. coli* (Kahn, 2007).

De modo general cualquier factor ambiental nutricional o infeccioso que pueda lesionar el epitelio respiratorio, así como aquellos que interfieran con el sistema inmunológico pueden tornar al ave susceptible a la infección por *E. coli* patogénicas (Berchieriet al, 2009).

Según Morales et al, (2005), la contaminación de la cascara del huevo es una de las grandes fuentes de Infección, de manera que muchos embriones mueren al final de la incubación o una hora después del nacimiento, presentando onfalitis.

De acuerdo a Robalino (2000), en avestruces la colibacilosis se presenta como infección primaria en polluelos a nivel del saco vitelino, y en reproductoras en el oviducto; en infecciones secundarias posterior a fuertes presiones de estrés, como concomitante o como secuelas de enfermedades víricas como el Newcastle.

Butcher y Rodríguez (2007), indica que algunas compañías se han quejado, en muchos casos, de reacciones secundarias excesivas después de vacunar para Newcastle y Bronquitis Infecciosa. Los pollos son vacunados de acuerdo al programa de la integración y luego necesitan ser tratados con antibióticos para aplacar la reacción secundaria de colibacilosis septicémica y saculitis aérea. Muchos de estos lotes van a

tener pesos bajos, pobre uniformidad y conversión y un aumento en la mortalidad debido a las reacciones severas o prolongadas.

La *E. coli* puede asociarse a otras bacterias como la *Klebsiella pneumoniae* y la *Pseudomona aeruginosa* ocasionando síndromes intestinales y respiratorios (Robalino, 2000).

El sistema de la mucosa intestinal juega un rol central en la exclusión y eliminación de antígenos dietéticos perjudiciales, así como de patógenos entéricos. La nutrición, la microflora normal, los patógenos y otros factores afectan el mantenimiento del tracto digestivo y su sistema inmune asociado (Hyun, 2007).

Entre los factores de virulencia de la *Escherichia coli*, están los accesorios de adhesión a la mucosa y una serie de toxinas que van destruyendo las capas más superficiales o más profundas del tejido y pueden llegar provocar septicemia. La adherencia es la primera propiedad patógena que tiene este microorganismo. La capacidad de adherirse a los gangliósidos receptores de las micro vellosidades del epitelio intestinal está vinculada a su propiedad de expresar estructuras de adhesión (adhesinas), aquellas bacterias que no tengan esta capacidad no podrán mantenerse en el epitelio urinario, respiratorio o intestinal y serán arrastradas por el flujo de líquido (Stanchi, 2007).

Perelló (2010), expresa en su trabajo en gallinas ponedoras que entre los factores de virulencia de la *E. coli*, el *cvi*, se encontró con mayor frecuencia en las cepas aisladas de material fecal en comparación con cepas que se aislaron en casos clínicos, además indica que debido a la competencia y necesidad de sobrevivir que existe entre las diferentes cepas de *E. coli*, la producción de colicina a nivel intestinal sería mayor que a nivel sistémico.

De acuerdo a Stanchi (2007), otro factor de virulencia es la producción de enterotoxinas, entre ellas la enterotoxina LT, que necesita de sus subunidades A y B. Las subunidades B se unen al gangliósidos receptor de la mucosa del intestino delgado posibilitando la internalización de la subunidad A. Esta incita la activación de la adenilatociclasa, con lo cual se elevan los niveles citoplasmáticos de AMP cíclico, esto da como resultado en la pérdida de iones Na⁺, Cl y agua.

La colibacilosis aviar con mucha frecuencia es provocada por más de una cepa. Esta conclusión tiene su explicación en los resultados de una investigación en la cual aproximadamente el 45 % de los problemas clínicos estaban generados por una cepa que representaba la mayor cantidad de bacterias aisladas (Perelló, 2010).

2.1.3. Hallazgos Clínicos y Lesiones

Kahn (2007), manifestó que los síntomas son inespecíficos y varían de acuerdo con la edad, los órganos afectados y la enfermedad simultánea, las aves jóvenes que mueren de septicemia aguda presentan pocas lesiones, excepto el hígado y el bazo agrandado e hiperémicos, con un aumento del líquido en las cavidades corporales. Las aves que sobreviven a la septicemia desarrollan inflamaciones fibrinopurulentas sub-agudas del saco aéreo, pericarditis, perihepatitis, y reducción linfocitaria de la bolsa y el timo. Aunque la inflamación del saco aéreo es una lesión clásica de la colibacilosis, no se sabe con exactitud si proviene de una exposición respiratoria primaria o de la extensión de la serositis.

A esto se suma lo que indica Delmar (2014), la colibacilosis es una enfermedad que afecta a todas las edades en las aves, se presenta en individuos que recién nacieron hasta aves que están en el fin de su ciclo productivo, un ejemplo de esto es que en pollitos es muy común encontrar onfalitis acompañada de infección del saco vitelino, este estado de

enfermedad algunos técnicos lo denominan enfermedad del pollito blando, debido a que generalmente se presenta una tasa alta de mortalidad, mientras que aquellos individuos que lograron sobrevivir no llegan a obtener buenos resultados zootécnicos. En el caso de pollos broilers se presentan pericarditis, sinovitis en la cual se observa inflamación de los tendones y articulaciones lo que causa cojera y disminución en la ganancia de peso.

De acuerdo a Deeming, (2001), en avestruces se presentan casos de septicemias por *E. coli*, a veces se presentan lesiones similares a las observadas en las aves de corral, por ejemplo pericarditis fibrinosa y perihepatitis.

Stanchi (2007), indica que en las aves la *E. coli* puede afectar penetrando en las vías respiratorias o complicando problemas respiratorios causados por agentes virales, provocando o agudizando infecciones generalizadas, septicemia y muerte. Además se pueden apreciar cuadros con lesiones intestinales granulomatosas (coligranuloma), en el hígado y el pulmón. En determinadas ocasiones la *E. coli* se introduce en el huevo durante su paso por el oviducto o al salir de la cloaca.

2.1.4. Diagnóstico

Cuando un técnico con experiencia diagnóstica una patología de cualquier índole esta labor se completa con la planeación e implementación de una estrategia de control, la cual arrojará mejores resultados si la investigación es muy detallada y minuciosa, como lo indica Ross (2009).

De acuerdo con Berchieriet al,(2009), el diagnóstico de la colibacilosis se divide en:

1. Diagnóstico Necroscópico

La colibacilosis interfiere en todas las etapas de producción de aves comerciales, contribuyendo a la disminución de la calidad de las aves. Las aves afectadas desarrollan lesiones en diferentes órganos, como hígado, corazón, oviducto, folículos ováricos, membranas de los sacos aéreos, senos nasales, sacos de yemas, sistema nervioso central y tejidos adyacentes, articulaciones y tejidos subcutáneos. De esa forma, las alteraciones anatomopatológicas más frecuentes son perihepatitis, pericarditis, aerosaculitis, onfalitis, neumonía fibrinosa, onfalitis, salpingitis, meningoencefalitis, sinusitis y artritis caseosa.

Recientemente se asoció la infección por *E.coli* a celulitis en pollos de engorde. El diagnóstico diferencial debe ser realizado, ya que otras bacterias pueden causar lesiones semejantes, como *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Pasteurella* y *Salmonella* e infecciones por *Ornithobacterium rhinotracheale*.

2. Diagnostico Bacteriológico.

Fragmentos de los órganos afectados deben ser cultivados en caldos de nutrientes (caldo BHI o nutriente) e incubados a 37° C por 24 horas. Los medios selectivos más indicados para el aislamiento de *E.coli* son agar MacConkey, agar Eosina Azul de Metileno (EMB), agar Hoekten, agar Verde Brillante. La *E.coli* presenta colonias rosadas o anaranjadas en agar MacConkey, colonias verdeadas con aspecto metálico en medio EMB, colonias amarillosas en medio AVB y Hoekten.

En su investigación Perelló (2010), indica que no existe diferencia en el crecimiento de colonias bacterianas puras, cuando

se aíslala *E. coli* a partir de muestras de órganos o tejidos como pericardio, hígado, ovario, peritoneo, entre otros. En esta investigación se obtuvo el 72,7 % de cultivos puros en los órganos y tejidos antes citados.

2.1.5. Zoonosis

Las cepas de *E. coli* que causan problemas diarreicos se clasifican en grupos de patogenicidad basados en las propiedades de virulencia, los mecanismos de patogenicidad, los síntomas clínicos y la serología. Las cinco categorías principales incluyen enterotoxígenos *E. coli* (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), enteroagregativa *E. coli* (EAggEC), enteroinvasiva *E. coli* (EIEC) y Shiga (Vero) productora de la toxina de *E. coli* (STEC / VTEC), Wasteson (2001). Desde un punto de vista zoonótica, STEC es el único grupo de *E. coli* con patogenicidad de gran interés, pues estas son cepas productoras de la toxina shiga y son capaces de causar enfermedad grave en el hombre, que se transmiten a través de la cadena alimentaria, desde sus reservorios animales (Stanchi, 2007).

Casi todos los serotipos de *E. coli* aislados de aves son solo patógenos para aves, sin embargo las aves son susceptibles a la colonización de *E. coli* O157:H7 causante de enteritis hemorrágica en humanos. Y aunque la presencia de *E. coli* en canales de pollo es considerada normal, esta no deben ser mayor a 1000 UFC/g, En conjunto las lesiones por *E. coli* son causa importante de decomisos en el rastro (Barrientos, 2011).

El papel de los pollos de engorde en la transmisión de la *E. coli* patógena (O157), hacia las personas no está aún claro debido a que faltan

evidencias concretas de la semejanza genética entre las bacterias que afectan a las personas y las que lo hacen en los pollos broilers.

En su trabajo Receptet al, (2012), analizaron la presencia *E. coli* y su expresión de genes de virulencia en pollos broilers y personas. Las muestras de pollos se tomaron de hígado, ciegos y canal, mientras que en las personas se extrajeron de heces. La similitud genética entre las cepas de pollos broilers y cepas que afectan a humanos fueron analizadas a través electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), Reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de separación inmunogenética (IMS). Los resultados obtenidos mostraron que el 12 % de la población de aves fue positivo para *E. coli* (O157) y las muestras de heces humanas también presentaron positividad a *E. coli* (O157), sin embargo ningunas de las cepas encontradas en ambos grupos de muestras expresó genes de H7, toxina shiga 1-2, o enterohemolisina. Además se determinó que no hubo relaciones genéticas entre las cepas aisladas de pollos de engorde y humanos.

De acuerdo a Gaskin *et al* (2001), existen un gran número de estirpes, además de muchas especies específicas para algunas especies de animales. Los humanos con colibacilosis usualmente manifiestan diarrea que puede complicarse con otros síndromes dependiendo del serotipo de *E. coli*. Estas complicaciones pueden incluir fiebre, disentería, shock, y pápulas (pequeñas hemorragias múltiples en la piel y en las membranas de las mucosas).

El periodo de incubación es de 12 horas a 5 días, aunque lo más común es de 12-72 horas. La transmisión de esta enfermedad se efectúa por vía fecal-oral, a causa de ingestión de agua o alimentos contaminados o de cama sucia, esta situación se genera normalmente en aviarios con pocas normas de limpieza (Hernández, 2010).

De acuerdo a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA (2014), la *Escherichia coli* es un microorganismo que está presente en los intestinos de personas y animales sanos, además forma parte de la flora microbiana normal existente. Sin embargo existen cepas capaces de provocar deterioro de la salud y llegar a causar una infección complicada. Las VTEC (*E. coli* productora de Verotoxina) es un grupo de bacterias que pueden causar síndrome urémico hemolítico y diarrea sanguinolenta en humanos, que puede generar una insuficiencia renal y muerte.

Las personas se pueden infectar con las VTEC (*E. coli* productora de Verotoxina) a través del contacto directo con animales que padecen la infección, por el consumo o manipulación de agua o alimentos contaminados. Estas bacterias se han encontrado en leche sin pasteurizar, quesos, lechugas, espinacas, coles, entre otros. El inadecuado procesamiento de la carne desde la matanza hasta su maduración, puede ser la causa principal de la contaminación de esta fuente de proteína, a esto se adiciona el hecho de que las heces de animales que presenten esta patología pueden contaminar otros alimentos y el agua (EFSA, 2014).

Raji et al, (2006), indican que el pollo de parrilla puede considerarse como un portador de VTEC (*E. coli* productora de Verocitotoxina) y causar grandes pérdidas por efectos de mortalidad y baja conversión alimenticia en Tanzania, pero esto no significa que esta bacteria exprese patogenicidad y cause enfermedad en las personas, tomando como elementos de juicio para esta afirmación el hecho de que las cepas de VTEC, estudiadas a partir de muestras de contenidos intestinales de pollos, que se comercializaban en restaurants, presentaron factores de virulencia baja para los humanos.

Una situación muy preocupante se vivió en el año 2011 cuando apareció un brote en Alemania y Francia de VTEC, O104:H4 una rara cepa

virulenta que causó efectos importantes en la salud de habitantes de estas naciones (EFSA, 2014).

2.1.6. Tratamiento

De acuerdo a Stanchi (2007), el manejo y las condiciones ambientales al que se exponen animales afectados, los convierte en individuos más susceptibles a la *E. coli*, el indiscriminado uso de los fármacos ha provocado el desarrollo de resistencia. Entre los antimicrobianos que muestran actividad contra estos microorganismos figuran la combinación de Sulfametoxazol + trimetropin, Gentamicina y el Cloranfenicol.

Páez y Ocampo (2005), indican que el tratamiento para *E.coli* es:

a. Tratamientos en el Alimento

- Furazolidona 400 ppm durante 5 días como medida curativa.
- AcidoOxolínico a 150 ppm durante 5 a 7 días.
- Clortetraciclina 400 ppm durante 5 a 7 días como medida curativa.
- Oxitetraciclina 400 ppm durante 5 a 7 días como medida curativa.
- Amoxicilina 192 ppm durante 5 días como medida curativa.
- Sulfadimetoxina 120ppm + Trimetoprin 30 ppm durante 5 a 7 días como medida curativa.
- Sulfaclopiridazina 150 a 300 ppm + Trimetoprin 30 a 60 ppm durante 7 días como medida curativa.
- Fosfomicina a dosis de 10 a 40 mg/kg.
- Eritromicina 200 ppm + Colistina 20 ppm durante 5 a 8 días como medida curativa.

b. Tratamientos en el agua de bebida.

- Enrofloxacin a razón de 10 mg/kg de p.v. en el agua de bebida durante 3 a 5 días como medida curativa.
- Danofloxacin a razón de 5 mg/kg de p.v. en el agua de bebida durante 3 días como medida curativa.
- Flumequina razón de 9 mg/kg de p.v. en el agua de bebida durante 3 a 5 días como medida curativa.
- Ácido nalidixídico al 12% a razón de 1 -2 c/c/litro de agua de bebida durante 5 días como medida curativa.
- Neomicina 75 ppm durante 5 días como medida curativa.
- Fosfomicina a dosis de 10 a 40 mg/kg.

Estos tratamiento son solo unos cuantos del total registrados en la Obra Terapéutica Avícola. Los tratamientos con antibióticos proporcionados en el agua de bebida, generalmente constituyen la primera medida terapéutica para combatir el brote infeccioso, de ser necesario, y como última medida se sugiere la aplicación de dicho fármaco vía intramuscular, además de prolongar el tratamiento.

Perelló (2010), indica que la colistina es un antibiótico que se debe utilizar al momento de instaurar un tratamiento contra la *E. coli*, dado que esta bacteria presentó sensibilidad a la acción de este medicamento.

2.1.7. Prevención

En las medidas de prevención se utilizan vacunas emulsionadas las cuales contiene cultivos puros de diferentes serotipos de *E. coli*, suspendidos en emulsión.

Entre las vacunas que se encuentran en el mercado está una que contiene cultivos puros de *E. coli* serotipos O1, O2 Y O78, los cuales fueron

inactivados de manera química y emulsionados en aceite mineral, conteniendo adyuvantes que tienen la capacidad de conferir inmunidad elevada, de prolongada duración (Avimex, 2015).

Este tipo de vacuna es utilizada para la prevención y control de colibacilosis de las aves, teniendo en cuenta la ubicación geográfica de la granja, el grado de patogenicidad de la cepa de campo que está afectando la población aviar, la edad y estado inmune de las aves, entre otros.

2.2. Resistencia de las bacterias a los antimicrobianos.

La OMS (2013), puntualiza que la resistencia a los antibióticos es la capacidad que posee un microorganismo de resistir y evitar su potencial muerte al estar en contacto con un fármaco antimicrobiano al que antes era sensible. La resistencia de estos organismos es causada por la evolución que tienen algunas cepas, la cual resulta de la selección genética dada por la exposición de los microorganismos a algunos fármacos antimicrobianos. En este contexto siempre está la posibilidad de transmisión de características genotípicas y fenotípicas que proveen resistencia a bacterias de diferentes géneros.

Stanchi (2007), declara que la resistencia que presentan los microorganismos a un determinado antibiótico puede ser expresada en forma natural o intrínseca, mutacional o adquirida.

Resistencia Natural: Se entiende por resistencia natural al hecho de que ciertas cepas de microorganismos presentan en su constitución un conjunto de mecanismos permanentes, los cuales son determinados genéticamente, que no están relacionado con la exposición o aumento de dosis de un determinado antimicrobiano. El efecto que ejercen las bencilpenicilinas sobre las poblaciones de bacterias como las *Pseudomana*

aeruginosa es un ejemplo típico de este tipo de resistencia, (Sussmann, et al, s.f.).

Resistencia Mutacional: Está generada por una o varias alteraciones en la secuencia del genoma bacteriano, este tipo puede afectar a genes preexistentes entre los cuales se enfoca de la misma manera en genes estructurales como en regulatorios, mientras que cuando afecta a genes adquiridos se pueden producir cambios mínimos en la estructura del genoma que se traducen en grandes cambios en la función de las diferentes enzimas un ejemplo de esto es las diferencias producidas en la β -lactamasa.(Stanchi, 2007).

Resistencia Adquirida: Este tipo de fenómeno se produce por cambios puntuales en el genoma bacteriano (mutación) o por la adquisición de éste (plásmidos, trasposones, integrones) (Sussmann, et al s.f.).

La utilización inadecuada e innecesaria de antibióticos es otro factor que contribuye a la acumulación de resistencia. Dosis sub-terapéuticas y los tratamiento antimicrobianos inconclusos son conocidos procesos que llevan a la proliferación de cepas resistentes. Sin embargo el problema más grande (por su magnitud) es la utilización innecesaria de antibióticos en enfermedades virales tales como infecciones respiratorias altas, o auto limitadas como las diarreas según Trueba (2008).

De acuerdo a Castaño *et al*, (2007), el principal obstáculo para el funcionamiento eficaz de los tratamientos utilizando antibióticos es la capacidad que tienen algunas bacterias para resistir el embate de estas moléculas. Lo preocupante de esta situación está, en que no solo bloquea la actividad del fármaco, provocando que continúe el desmedro de la salud del individuo, sino que además causa la desaparición de las cepas

susceptibles y fomenta la diseminación de microorganismos que presentan resistencia.

Como indica Serrano (2011), una herramienta de mucho valor utilizada en medicina clínica, que permite aprovechar la eficacia de los antibacterianos a la hora de aplicar un determinado tratamiento, es el antibiograma, este instrumento contribuye a disminuir los gastos en el proceso productivo, ocasionados por la compra de medicamentos.

En un estudio de Castaño *et al*, (2007), se demostró que algunas de las cepas de *E. coli* son resistentes a todos antibióticos usados en esa prueba, por lo tanto, el tratamiento con antibiótico podría ser efectivo en la eliminación de otras bacterias asociadas con el proceso respiratorio tales como *Bordetella* y *Salmonella*. Y que entre los antibióticos utilizados, los que presentan un mejor comportamiento son los pertenecientes a la familia de las Quinolonas, ya que sus tres derivados (*Ciprofloxacina*, *Norfloxacina* y *Enrofloxacina*) los que obtuvieron un menor porcentaje de resistencia con respecto a los demás antibióticos.

En su trabajo de investigación Martínez y Cortes (2012), encontraron que las cepas de *E. coli* provenientes de aves de traspatio fueron resistentes a algunos antimicrobianos, mientras que las de mayor resistencia fueron las de pollo de engorda comercial, en este trabajo también se observó que la resistencia de estas cepas contra sulfacloropiridacina/trimetoprim fue del 100% mientras que para tilosina el porcentaje fue menor.

En otro trabajo Kagambèga *et al* (2013), reporta la resistencia antimicrobiana de *S. typhimurium* aislada de aves de corral y humanos, las cuales fueron multirresistentes a los antimicrobianos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas y trimetoprim).

La presión impuesta a la industria avícola por parte de muchos organismos internacionales, sobre todo en la Unión Europea, para prohibir el uso de dosis sub-terapéuticas de los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, así como la imposición para la eliminación de los procesos de producción de carne, huevos, leche y otros alimentos, de estos compuestos, ha creado una situación que promueve la búsqueda de otras alternativas más viables.

Muchos estudios avalan la utilización de anticuerpos específicos de yema de huevo (IgY), los cuales han sido probados positivamente, tanto para prevenir como para controlar patologías causadas por agentes virales o bacterianos, dichos trabajos de investigación se han llevado a cabo en diferentes especies de animales incluido los seres humanos (Yegani y Korver, 2009).

Finalmente, la Medicina Veterinaria está obligada a preservar la utilidad de los antibióticos que se usan en medicina humana, razón por la cual se han constituido varias organizaciones entre las que destaca FARAD (Food Animal Avoidance Database). Según esta organización los siguientes antimicrobianos deben ser evitados a toda costa en animales de abasto Cloranfenicol, Nitroimidazoles (incluye dimetridazole, metronidazole y ipronidazole), Sulfonamidas en vacas lecheras, fluoroquinolonas (ciprofloxacino enrofloxacino, danofloxacino), Glucopeptidos (vancomicina y avorparcina), Nitrofuranos (includingnitrofurazona, furazolidona) y cualquier droga antiviral, como lo indica Trueba (2008).

2.3. Tratamientos Alternativos a Problemas Infecciosos Entéricos

2.3.1. Aceite Esencial De La Planta De Orégano

Según Cabrera (2007), el aceite esencial de la planta de orégano, debido a su alto contenido de fenoles, tiene un modo mecánico único de actuar contra las bacterias sin permitir que las mismas desarrollen cualquier tipo de resistencia. Incrementa la permeabilidad de la membrana celular de la bacteria permitiendo el paso de iones y cationes (K^+ , Na^+) con el resultado final ahogando o deshidratando las células de la bacteria y eventualmente muriendo. Cuando el aceite no hace contacto con la célula de la bacteria, cepilla y elimina las células epiteliales del intestino. Este proceso permite la generación de nuevas capas de células epiteliales con mayor capacidad de absorción que las viejas capas celulares que han sido reemplazadas.

2.3.2. Utilización de Inmunomoduladores

El término inmunomodulación se usa generalmente para describir la manipulación farmacológica del sistema inmune. Esto puede implicar un aumento de la magnitud de la respuesta inmune (inmunoestimulación) o una reducción de su magnitud (inmunosupresión). La inmunomodulación específica implica una alteración en la respuesta del sistema inmune a un estímulo antigénico específico, como la obtenida en la vacunación, mientras que la inmunomodulación inespecífica implica una alteración más general, en que el estado de alerta del sistema inmune responde a una amplia gama de estímulos antigénicos. Los principales componentes del sistema inmune que son blancos de la inmunomodulación incluyen los linfocitos B y T, monocitos y macrófagos, granulocitos y células NK. Las citocinas y otras secreciones antimicrobianas también pueden ser objeto de estrategias de inmunomodulación, según Hyun (2007).

De acuerdo a Rutz (2010), los Mananooligosacáridos (MOS) extraídos de la pared de la levadura, pueden ayudar en este sentido. El (MOS) Presenta 3 mecanismos de acción distintos sobre la inmunología. En primer lugar se ha observado que el MOS altera la proporción y la función de los leucocitos aislados en la sangre periférica, así como en el tracto gastrointestinal. En segundo lugar, el MOS altera la población bacteriana dentro del tracto gastrointestinal. En tercer lugar parte de los efectos del MOS pueden resultar de la supresión de la respuesta inmunológica pro-inflamatoria.

2.3.3. Prebióticos y Probióticos.

Como lo indica Mascarell y Peris (2010), dentro del grupo de los prebióticos, en el mercado encontramos paredes celulares, tanto de bacterias como de levaduras, ricas en galactomananos, polímeros naturales procedentes de gomas vegetales, como la de garrofín y compuestos procedentes del procesado o fraccionado de materias primas, como los fructooligosacáridos y manano-oligosacáridos —FOS, MOS—. Todas ellas presentan en común el hecho de estar constituidas en base a manosa, monosacárido de amplia distribución tanto en el mundo animal como vegetal, y que según su porcentaje en la composición del producto marcará su mayor o menor eficacia. El mecanismo de acción de la manosa consiste en bloquear las fimbrias tipo I, utilizadas por los microorganismos patógenos de interés —salmonella— para adherirse al epitelio y colonizar el aparato intestinal, lo que fuerza la eliminación de la bacteria vía heces, aunque permanece viva durante todo el proceso.

Sansalone (2008), indica que los probióticos son cultivos definidos de microorganismos vivos (uno o varios géneros) que aplicados al animal, afectan beneficiosamente al huésped, mejorando las propiedades de la microflora intestinal. Pues deben poseer capacidades tecnológicas que le

permitan ser producidos a gran escala y refrigerados por periodos de tiempo considerable.

2.3.4. Aditivos Fitogénicos para Alimentos (PFA)

Schieder (2014), expone que por mucho tiempo se han aplicado aditivos fotogénicos en el alimento para mejorar la eficiencia de la alimentación, tales como hierbas, especias, aceites esenciales y otros extractos de plantas. Estos PFA han demostrado influir en menor o mayor medida en la calidad de la carne y las características de las carcasas. El modo de acción de los metabolitos secundarios de las PFA, especialmente los compuestos fenólicos se describe teniendo en cuenta el beneficio que tienen estos con la hidrofobicidad de las células bacterianas, un ejemplo de esto es la acumulación de compuestos fenólicos en la bicapa lipídica o de la interacción con proteínas de membrana.

En un trabajo de investigación llevado a cabo en el Oeste de Bengala en la India se comparó el uso de PFA en el alimento versus la adición de un antibiótico promotor de crecimiento (Metileno disilicilato de Bacitracina) también en el alimento, los resultados de esta investigación revelaron que el alimento que contenía PFA tuvieron mayores tasas de crecimiento, alcanzando mayor peso a la canal, además hubo mayor rendimiento de pechuga y muslo por kilogramo de peso vivo de acuerdo a Schieder (2014).

2.3.5. Ácidos Orgánicos

El uso de acidificantes en el pienso es una práctica habitual. La experiencia demuestra que los ácidos orgánicos de cadena corta (Fórmico, Acético, Propiónico), utilizados en raciones para monogástricos dan mejores resultados que los ácidos orgánicos constituidos por cadenas largas, además tienen mucha más actividad contra los microorganismos.

De acuerdo a Pérez (2009), la acción biosida o biostática de los ácidos orgánicos se produce de dos formas diferentes:

- Intervienen en la metabolización de los hidratos de carbono de la pared celular de los microorganismos, donde diversas enzimas quedan bloqueadas de manera que están células mueren.
- Los microorganismos se reproducen mejor en un pH cercano a la neutralidad, por lo que al acidificar el alimento a través de la adición de ácidos orgánicos se consigue limitar el crecimiento bacteriano.

2.3.6. Uso de Inmunoglobulinas Y

En varias localidades de nuestro planeta se han llevado a cabo numerosos trabajos de investigación para confirmar los beneficios de las inmunoglobulinas en la salud de los animales domésticos, dichos trabajos fueron realizados de manera experimental en laboratorios y en condiciones normales de manejo en establos de producción láctea.

En un trabajo realizado en un establo se administró la IgY de dos formas:

- a) Sustituto lácteo, al cual se le añadió una porción de yema de huevo en polvo, mismos que provenían de gallinas hiperinmunizadas.
- b) Administración directa de un huevo entero, la fuente no especifica si este fue cosido o crudo.

Batistino y colaboradores (2008), observaron en terneros recién nacidos menor incidencia de diarrea durante los meses de verano, terneros a los cuales se les administró junto con la ración diaria de leche un huevo de gallina, Las gallinas fueron vacunadas vía subcutánea 14 días antes, utilizando antígeno contra *Rotavirus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Corona virus*.

Moreira et al (2003), indicaron que el comportamiento terapéutico de anticuerpos de yema de huevo en enfermedades con agentes etiológicos como *Rotavirus*, *E. coli*, *Coronavirus* y *Salmonella*, ofreció buenos resultados sobre todo cuando se experimentó con bovinos jóvenes.

Se han realizado algunos estudios clínicos que demuestran que la administración de IgY a pacientes humanos que padecen distintas infecciones bacterianas, puede reducir el grado de la enfermedad. Por ejemplo, la administración oral de IgY específica anti *Pseudomona aeruginosa* aumenta el tiempo que necesita la bacteria para colonizar el tracto intestinal y por lo tanto permite la disminución de la infección. De esta manera, el tratamiento con IgY específica se presenta como una alternativa ó complemento al uso de antibióticos, reduciendo la aparición de cepas resistentes (Chacana y Terzolo, 2003).

2.4. Inmunoglobulina Y, de Yema de Huevo.

Como indica en su trabajo Gutiérrez et al (2009), existen algunas ventajas muy importantes en la producción de Inmunoglobulinas Y (IgY), a partir de yemas de huevos obtenidos de gallinas ponedoras, entre las cuales se destacan, mejores respuestas a ciertas glicoproteínas de membrana celular, que se encuentran en antígenos de mamíferos muy

conservados filogénicamente, esto ha despertado un gran interés en los últimos años en algunos estudiosos.

Los pollos son eficaces productores de anticuerpos (IgY) contra las proteínas de mamíferos, capaces de producir grandes cantidades de anticuerpos, que se pueden recuperar por extracción simple no intrusiva de yema de huevo (Rajic et al, 2009).

En las aves, el funcionamiento del sistema inmune es similar al de otras especies de vertebrados, su función es el mantenimiento de la integridad y estabilidad genética de las especies en un estado estable, puede reconocer sustancias específicas como propias y tiene la capacidad de diferenciarlas de otras que las considera extrañas. Los órganos linfoides primarios son los lugares donde se forman las células linfoides, mientras que los órganos linfoides secundarios son aquellos donde se lleva a cabo la maduración o almacenamiento de las células linfoides para su posterior utilización en una posible acción inmunitaria. (Montaño, 2005).

Tizard (2009), expone que la inmunoglobulina que está en mayor proporción y desempeña el papel principal en el suero de los pollos se denomina IgY, es muy parecida a la IgG de los mamíferos, excepto por que presenta diferencias a nivel molecular, esta es la causa que le permite tomar otro nombre. Algunos investigadores han llegado a proponer que existen tres subclases de esta inmunoglobulina, las cuales ha llegado a denominarlas IgY1, IgY2, IgY3, aunque estas proposiciones no están confirmadas en estudios serios.

Las Inmunoglobulinas son glucoproteínas que se adhieren específicamente, tanto dentro del animal vivo (in vivo) como en diferentes materiales de laboratorio (in vitro), a determinados epítopes presentes en los inmunógenos que les dieron origen. La reacción entre el anticuerpo y el

antígeno es de naturaleza química y física. Esta unión es específica, e involucra a moléculas enteras sin disgregación, aun después de haberse combinado. Esta unión Ag-Ac es firme pero con características de reversibilidad, es decir, el complejo puede disgregarse y sus elementos pueden retornar a su estado previo (Stanchi, 2007).

El termino inmunoglobulina se utiliza para describir todos los receptores de antígenos de linfocitos B (BRC) solubles. En mamíferos existen cinco clases (isotípos) diferentes de inmunoglobulinas, de acuerdo a Tizard (2009).

De acuerdo a Gómez et al (2007), en las aves, las IgG presentan homología de entre 30 – 35 % con las IgG de los mamíferos y son las principales responsables de una respuesta inmune secundaria. Las IgG o IgY aviares constan de cuatro dominios constantes en sus cadenas pesadas, en vez de los tres típicos de los mamíferos. En cuanto a su peso molecular es de 175 kDa.

Yegani y Korver (2008), indican que, se ha demostrado la existencia de tres clases de Inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgY) en pollos. La IgG de las aves se la denomina IgY debido a que proviene de la yema de huevo y en muchos aspectos estructurales difieren con las IgG, que poseen los mamíferos. La IgY es la inmunoglobulina del suero de los pollos. Se transporta de la gallina al embrión a través de la yema de huevo, por lo que la yema contiene altas concentraciones de IgY.

Las inmunoglobulinas de las aves, al igual que las de los mamíferos, presentan una cadena liviana (L) y una cadena pesada (H), que se encuentran unidas mediante puentes disulfuro. La molécula se compone de una región constante y otra variable que le confiere especificidad en la unión con diferentes antígenos, Chacana y Terzolo (2003), citado por (Montaño, 2005).

En las aves de corral, la IgY es la Inmunoglobulina que mayormente se encuentra en el suero sanguíneo, pues esta es análoga a la IgG que se encuentre en los mamíferos vertebrados, y está implicada en la respuesta inmune secundaria (Tizard, 2009).

Sin embargo, gracias a estudios genéticos recientes, se determinó que la IgY es filogenéticamente antecesora de la IgG y de la IgE de los mamíferos. Existen diferencias en la estructura de la IgY cuando se compara con la IgG. La IgY presenta un dominio constante adicional con respecto a la IgG, de acuerdo a Chacana y Terzolo (2003).

2.4.1. Especificidad de la IgY

En general, se aceptan tres mecanismos básicos vinculados con la diversidad de las inmunoglobulinas: El re-acomodamiento genético, la conversión genética y la mutación somática. A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, en los cuales la hipermutación somática es el mecanismo más importante para generar diversas inmunoglobulinas, la gran diversidad de las IgY está principalmente basada en la conversión genética. En este caso ocurre una recombinación no recíproca entre genes homólogos, donde una porción de la información es transferida desde una secuencia donadora a otra aceptor a homóloga. De esta manera, en los loci donde se encuentran los genes responsables de la codificación de las cadenas L y H de las inmunoglobulinas (elementos VL y VH), aparece un gran número de pseudogenes V, que son responsables de la diversidad de las moléculas de anticuerpos según, los autores Chacana y Terzolo (2003).

2.4.2. Transferencia de la IgY al huevo

En las aves la carga de anticuerpos maternos se transmiten desde la reproductora hiperinmunizada o que sufrió una infección natural, al nuevo individuo a través del saco vitelino que se encuentra en el huevo. Estos anticuerpos maternos tienen relativamente una corta vida, generalmente una o dos semanas, en algunos casos se ha observado hasta 4 semanas. El único objetivo de estas proteínas que dan origen a la inmunidad pasiva es de proteger a las aves jóvenes durante sus primeras semanas de vida, esto le permite defenderse de problemas causados por exposición temprana a un microorganismo, durante el proceso de desarrollo y maduración del sistema inmune (Balaguer, 2008).

La transferencia de la IgY al huevo ocurre en los folículos ováricos. En las membranas de los ovocitos de las gallinas existen receptores específicos que captan activamente las IgY presentes en el suero. Esto permite que en la yema del huevo, la concentración de IgY alcance niveles similares a los del suero (6 a 13 mg/ml). No ocurre lo mismo con la IgM e IgA, de las que sólo se encuentran trazas en la yema. De esta manera, el contenido de inmunoglobulinas en la yema de huevo corresponde casi exclusivamente a IgY (Chacana y Terzolo, 2003).

La inmunoglobulina Y es el isotipo predominante en la yema. El epitelio folicular es el encargado de regular la transferencia de IgY, pues este sufre algunos cambios morfológicos durante el desarrollo del huevo. El epitelio folicular se aplana y adelgaza para permitir el paso de una alta cantidad de inmunoglobulinas. El traslado de anticuerpos a través del epitelio folicular del ovario obtiene su máximo nivel 3 o 4 días previo a la ovulación y empieza a declinar debido a la presencia y desarrollo de la membrana vitelina que se encuentra entre el huevo y el epitelio folicular del ovario (Balaguer, 2008).

En el huevo de la gallina la albúmina representa el 58% del peso total, la yema el 31% y la cascara el 10,5 %. Al separar cada una de estas partes, se producen pérdidas que se aproximan al 0,3% (Boerlegui, 2008).

2.4.3. Extracción Y Aislamiento de la IgY de la yema de Huevo

En la actualidad se han desarrollado un sinnúmero de procedimientos para aislar y purificar la IgY presente en la yema de huevo, uno de los más utilizados es el que emplea ácido caprílico (octanoico), que tiene la capacidad de precipitar proteínas que no son inmunoglobulinas, permitiendo que las IgY se encuentren solas en el sobrenadante (Chávez, 2009).

Las proteínas presentes en la yema de huevo pueden dividirse en cuatro fracciones. Fracción vitelínica ó lipovitelínica (47,5%) formada principalmente por fosfo-núcleo-albúmina (400 kDa); Fracción vitelelínica (38,6%); fracción fosfovítínica (4,3%), compuesta por una proteína con alto contenido de fósforo (36 kDa); y una fracción livetínica (9,6%) donde se encuentran las proteínas solubles. Esta última fracción es muy heterogénea, conteniendo alrededor de diez tipos de proteínas diferentes (Chacana y Terzolo, 2003). El mejor método de deslipidación y extracción de IgY requiere dilución con agua, acidificación del extracto y precipitación con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 60%, recuperándose 43,35 mg de proteína yema (Barroso et al, 2005).

Chaves (2009), sustenta que dependiendo del tipo de ensayo en que se vayan a emplear las Inmunoglobulinas se elegirá el método de extracción, pues las proteínas (IgY) obtenidas a partir del uso de cloroformo como solvente, no se pueden usar en inmunoterapias orales ni aplicar durante ensayos in vivo. Esto permite aseverar que cuando en el método de extracción está presente este ácido orgánico las IgY obtenidas no se

deben utilizar como ingrediente activo en ningún alimento, ya que está comprobado que el cloroformo se utiliza en este método en cantidades altas.

De acuerdo a Bustos *et al* (2009), el mayor inconveniente al trabajar las yemas de huevo, es la necesidad de homogenizar éstas con el fin de evitar las variaciones en los títulos.

Chenyao (2015), indica que entre las dificultades que se presentan para la obtención de IgY de yema de huevo está el espacio de tiempo el cual es bastante considerable en todas las técnicas de extracción, sin embargo se realizó un trabajo probando diluciones en diferentes concentraciones y en diferentes polisacáridos tales como: Pectina, carragenina, carboximetilcelulosa, metilcelulosa y sulfato de dextrano en dosis de 0:01, 0:05, 0.1, 0.15 y 2 % respectivamente. En este trabajo se pudo constatar que el polisacárido que mejores resultados obtuvo fue la pectina al 0.1 %, en esta concentración la cantidad de inmunoglobulina que se obtuvo fue 8:36 mg/mL de yema de huevo, en una concentración de 83,3 % además se minimiza el efecto negativo de la IgY en la inmunoreactividad.

2.4.4. Uso y ventajas de la IgY.

Chacana y Terzolo (2003), sostienen que en la actualidad se han desarrollado diversos reactivos de diagnóstico para ser utilizados en trabajos de investigación en Biomedicina. Las Inmunoglobulinas de yema de huevo aparecen como elementos importantes en la constitución de dichas herramientas. Las IgY han ganado popularidad y mayor uso entre los científicos debido a que para su obtención solo se necesita yemas de huevo y no se necesita sangrar al ave donador, como es el caso cuando se utilizan mamíferos para la obtención de IgG, a esto se suma la preocupación por el bienestar animal.

Además el volumen de inmunoglobulinas que se obtienen de una gallina de postura durante su vida es mucho más alto que la cantidad de IgY que produce un conejo al momento de la cosecha.

Está demostrado que gracias a la separación filogénica que existe entre mamíferos y aves, no hay posibilidad de reacciones cruzadas entre IgY de las aves con la IgG de los mamíferos. Este detalle es muy importante en la industria productora de inmunoreactivos, tomando en cuenta que las inmunoglobulinas generadas por un ave pueden estar dirigidas hacia antígenos de mamíferos altamente conservados (Chacana y Terzolo, 2003).

Las Inmunoglobulinas Y, son elementos nobles las cuales permiten su uso con fines terapéuticos y profilácticos gracias a que los costos de producción son más bajos y se pueden extraer en grandes volúmenes a diferencia del caso de IgG de mamíferos (Terzolo, 2009).

La producción de inmunoglobulina Y de yema de huevo puede ser considerada como una buena alternativa para el desarrollo de métodos a utilizar en inmunodiagnóstico de enfermedades clínicas en caninos, debido a su producción constante y en grandes cantidades como lo indica Nunes, *et al* (2014).

Hyline (2005), indica que una gallina puede en 80 semanas producir 362 huevos con un peso promedio de 64 g.

Boerlegui (2008), indica que por mucho tiempo el huevo de gallina viene siendo parte fundamental en la alimentación del ser humano, por ello sus bondades nutricionales son muy conocidas y el resultado de esta familiarización permite argumentar que las inmunoglobulinas pueden tener

una buena aceptación, al momento de desarrollar productos nuevos, generados a partir de tecnología de IgY.

No obstante, deberá determinarse si las formulaciones terapéuticas o profilácticas de IgY (huevo en polvo, soluciones de yema, entre otros) son en realidad consideradas medicamentos, sobre los cuales se reglamentarán las correspondientes regulaciones, o bien si son considerados alimentos funcionales o aditivos alimenticios, los cuales pueden ser usados sin ninguna restricción, siendo así mucho más económicos que los medicamentos (Terzolo, 2009).

2.4.5. Uso de inmunoglobulinas y, en pruebas inmoserológicas de Diagnóstico

Debido a la especificidad de la reacción Ag-Ac, esta ha sido utilizada para la identificación de microorganismos (virus, bacterias, parásitos, hongos, entre otros) o sus productos (endo y exotoxinas bacterianas, enzimas, entre otros), y para la identificación y cuantificación de anticuerpos séricos con fines diagnósticos. Las pruebas serológicas han sido y siguen siendo de mucha utilidad en la investigación básica y aplicada de los fenómenos patogénicos de los microorganismos (Stanchi, 2007).

En el campo de las pruebas inmunoserológicas nos encontramos con pruebas primarias y secundarias.

Pruebas Primarias

- Técnicas de inmunohistoquímica.
- Inmunofluorescencia.
- Técnica de inmunoperoxidasa.
- Enzimoimmunoensayos.
- Prueba de ELISA ensayo de inmunoabsorción con ligadura de enzima.

- Inmunotransferencia.

Pruebas Secundarias.

- Precipitación.
- Aglutinación.
- Fijación de complemento.

Pruebas Terciarias.

- Reacción de neutralización.
- Protección.

2.5. Titulación de virus o bacterias

La titulación de virus y bacterias y el método de Reed y Muench, citado por López (2010).

La titulación viral se emplea para conocer la cantidad de virus que hay en una suspensión.

Para titular un virus se realizan diluciones del mismo, para de esta manera determinar la mayor dilución que produzca el efecto deseado, ejemplo: quiero conocer hasta que dilución el virus mata, paraliza, produce un efecto citopático, entre otros

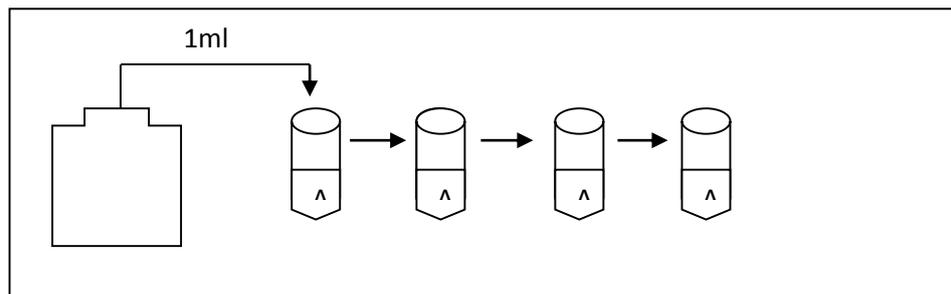
2.5.1. Titulaciones

Pasos para realizar las titulaciones:

Realizar Diluciones: las más usadas son:

- Dilución en base 2. En varios tubos de ensayo (deben estar numerados) se colocará 1 ml del diluyente (solución salina). Posteriormente se toma

1 ml del virus de alguna muestra madre y se lo agrega al tubo de ensayo numero 1 (dilución 1:2). Luego se toma 1 ml del primer tubo y se lo agregará al segundo tubo de ensayo (dilución 1:4), y así sucesivamente se realizan las diluciones. Por lo tanto al final siempre tendremos 1 ml, de volumen en cada tubo, lo que variará será la dilución.



- Dilución en Base 10. En varios tubos de ensayos (numerados) se coloca 9 ml de diluyente (solución salina), posteriormente se toma 1 ml del virus de alguna muestra madre y se lo coloca al tubo de ensayo número 1 (dilución 1:10). Luego se toma 1 ml del primer tubo y se lo agregará al segundo tubo de ensayo (dilución 1:100), y así sucesivamente se realizan las diluciones. ($1/10 = 10^{-1}$; $1/100 = 10^{-2}$; $1/1000 = 10^{-3}$; $1/10000 = 10^{-4}$).

2.5.2. Tipos de titulación

La titulación viral se emplea para conocer la cantidad de virus que hay en una suspensión.

Titulo Infeccioso 100%.

En esta cuantificación biológica, el punto final es usualmente considerado como la dilución máxima que produce ese efecto. Puede estimarse un punto final 100% a la máxima dilución que produce el efecto esperado en el 100% de los inoculados, no es muy precisa y se la usa poco.

Titulo Infeccioso 50%.

La mayoría de los laboratorios utilizan un punto final 50% que sería la máxima dilución que afecta a por lo menos el 50% de los inoculados. Se expresa también como dosis letal 50% (DL50), o dosis infecciosa 50% (DI50). La mejor forma de determinar este punto final es usar un gran número de animales y diluciones cercanas.

Se hacen una serie de diluciones del microorganismo (o suero si se quiere titular suero para conocer el nivel de anticuerpos) y cada dilución es inoculada en un pequeño grupo del sustrato biológico a emplearse (células cultivadas en tubos, microplacas, huevos embrionados, ratones, entre otros) generalmente de 6 a 8 unidades por dilución.

Reed y Muench en 1938 citado por López (2005) diseñaron un método para estimar el punto final 50% de dosis infecciosa que se usan en todos los laboratorios.

A manera de ejemplo se plantea el siguiente ejercicio: Se hacen diluciones base 10, generalmente de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , entre otros.

Se escogen cuatro o cinco diluciones para inocular, usando por ejemplo 6 ratones por dilución. Suponiendo que los ratones mueren así:

10^{-3}	6 inoculados y 6 muertos
10^{-4}	6 inoculados y 6 muertos
10^{-5}	6 inoculados y 4 muertos
10^{-6}	6 inoculados y 1 muertos
10^{-7}	6 inoculados y 0 muertos

Ordenamiento de los Datos

Dilución	Mortalidad	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Proporción	%
10 ⁻³	6/6	6	0	17	0	17/17	100
10 ⁻⁴	6/6	6	0	11	0	11/11	100
10 ⁻⁵	4/6	4	2	5	2	5/7	71
10 ⁻⁶	1/6	1	5	1	7	1/8	13
10 ⁻⁷	0/6	0	6	0	13	0/13	0

La columna de sumatoria de muertos se forma sumando de abajo hacia arriba ya que a menores diluciones habrá mayor mortalidad y la columna de sumatoria de vivos se hará sumando de arriba hacia abajo ya que a mayor dilución habrá mayor número de vivos.

Para determinar el título se toma como base la dilución que muestre el porcentaje de mortalidad inmediatamente superior al 50%, en este ejemplo será 10⁻⁵. El 50% estará entre esta dilución y la siguiente y la proporcional para llegar al 50% se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\% \text{ de mortalidad inmediato } > \text{ al } 50 \%) - (50)}{(\% \text{ de mortalidad inmediato } > \text{ al } 50 \%) - (\% \text{ mortalidad inmediato } < \text{ al } 50 \%)}$$

Reemplazando:

$$\frac{71-50}{71-13} = \frac{21}{58} = 0,36 \times \log \text{ del factor de dilución } (\log \text{ de } 10 = 1) = 0,3620$$

Este valor se agrega a la base y el título infeccioso 50% (TI 50%) en este ejemplo será 5,36.

2.6. Aplicación de Vacunas

La revisión de literatura respecto a la aplicación de vacunas en este trabajo es de mucha importancia, ya que para la obtención de la Dosis Letal 50 se realizó inoculación del *E. coli* en pollitas de un día de edad utilizando la vía S.C., además para la inoculación al momento de confrontar el *E. coli* con las inmunoglobulinas Y también se utilizó esta vía.

Como lo indica Cobb (2013), para la aplicación de vacunas en el cuello, la piel de la nuca del ave debe ser levantada creando un bolsillo entre la piel y los músculos del cuello. Inserte la aguja a través de este bolsillo, con la aguja dirigida en forma paralela al cuello del ave. El sitio de la inyección debe ser entre la mitad y la parte baja del cuello, sobre la línea dorsal media. Habrá una resistencia mientras la aguja pasa a través de la piel seguida de un movimiento libre en el espacio subcutáneo. Si esta diferencia no se nota o es seguida por una resistencia nuevamente, la aguja puede estar en la piel, en el músculo del cuello o en la espina dorsal. Evite inyectar dentro de los músculos del cuello, intradérmicamente o muy cerca de la cabeza. Una vez la aguja está en el espacio subcutáneo, se aplica la dosis completa de la vacuna antes de la sustracción de la aguja. Una temprana sustracción de la aguja resultará en aves recibiendo una dosis parcial de vacuna.

2.7. Medios de Cultivo

Stanchi (2007), indica que cuando propagamos microorganismos proporcionándoles las condiciones ambientales adecuadas estamos realizando un cultivo.

La gran población de bacterias que afectan a los animales en general tiene la capacidad de crecer en medios que poseen las condiciones nutritivas adecuadas fuera del hospedador, este tipo de crecimiento se conoce como (in vitro), las bacterias en proceso de desarrollo y reproducción necesitan crear réplicas de propias, para ello están obligadas a depender del aporte de sustancias vitales para recrear su composición química y realizar su metabolismo (Stanchi, 2007).

Entre los medios de cultivo que existen en el mercado, encontramos muchas marcas y con los nutrientes necesarios para los diferentes microorganismos deseados de replicar.

2.7.1. Clasificación de Medios de Cultivo

Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo a su consistencia y a su finalidad, además es importante tener claro que dentro de cada una de estas clasificaciones se existen categorías que van de acuerdo a la selectividad (impide el crecimiento de bacterias Gram positivas) y a la capacidad diferencial (permite diferenciar la actividad sobre la lactosa) (Stanchi, 2007).

2.7.1.1. Medios de Cultivo de Acuerdo a su Consistencia

Como lo indican López y Torres (2006), dentro de esta clasificación se ubican los medios de cultivo:

Líquido.- En este medio los elementos nutritivos esenciales se encuentran disueltos en una solución acuosa.

Semisólidos.- Los elementos nutritivos esenciales se encuentran suspendidos en un medio cuya consistencia es gelatinosa, se utilizan para comprobar la motilidad de un determinado microorganismo.

Sólidos.- Los nutrientes esenciales están en un medio conocido como agar duro o estría, para su utilización se lo divide en cajas Petri antes de solidificarse para luego poder realizar las lecturas, este tipo de medio permite aislar y diferenciar bacterias.

2.7.1.2. Medios de cultivo de acuerdo a su finalidad

Medio de Transporte.- Es un medio que no posee nutrientes, a más de agua, sales y un amortiguador de pH. Puede ser líquido o semisólido, como su nombre lo indica permite transportar al laboratorio muestras tomadas en el campo, sin que estas sufran cambios (Casado et al 2012).

Medio de Enriquecimiento.- Sirve para permitir el crecimiento de una determinada bacteria patógena la cual se encuentra en una muestra que posee otras bacterias. Un ejemplo de este es el caldo selenito para materia fecal, que se usa en el aislamiento de *Salmonellas*, las bacterias que tienen mayor capacidad de adaptación son aquellas que sobreviven de acuerdo a Stanchi (2007).

Medio Mínimo. Este medio posee la mínima cantidad de nutrientes que permiten el desarrollo de una bacteria (López y Torres, 2006).

Medio Simple o General. Posee los nutrientes en mínimas proporciones y permite el crecimiento de la mayoría de bacterias no exigentes (Domenech et al, 2009).

Medio Enriquecido.- Es un medio simple al cual se le agregan elementos que aumentan su valor nutritivo, se utiliza para cultivar microorganismos exigentes como *estreptococos* o *micoplasmas*. Un ejemplo de este tipo de medios son: agar sangre, suero de chocolate en caldo o agar entre otros (Sanabria y Acevedo 2001).

Medio Selectivo. Posee elementos inhibidores (antibióticos) que facilitan el crecimiento de una población específica de bacterias patógenas y frenan el desarrollo de otras (Casado et al 2012).

Medio Diferencial. Contiene un sustrato sobre el cual la bacteria puede actuar o no, permitiendo diferenciar bioquímicamente a una determinada bacteria gracias a su actividad metabólica, ejemplo de esto son, la observación de hemólisis, coloración de las colonias y otras reacciones indicadoras como lo expresa Rojas (2011).

Medio especial. Gracias a los elementos nutricionales específicos permiten el crecimiento de bacteria que solo en este tipo de medio pueden crecer.(Sanabria y Acevedo 2001).

2.7.2. Medios de Cultivo Comerciales

En el mercado existen medios de cultivo de todo tipo y de muchas marcas, sin embargo los utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

2.7.2.1. Medio de Cultivo L.B. (Luria Bertani). o Agar Miller

Formula de lujo (g/L)

Triptona.....	10,0
Extracto de Levadura	5,0
Cloruro de sodio	5.0
pH final	7.0 +- 0,2.

Instrucciones.

Suspender 20,0 g de polvo en 1 litro de agua destilada o desionizada, mezclar hasta que este componente se disuelva. Distribuir en recipientes finales, para luego esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Este es un medio que se utiliza para cultivar enterobacterias, también es utilizado en trabajos de biología molecular, generalmente a este medio se añade un antibiótico para seleccionar bacterias que tienen un elemento genético específico. Además se lo aplica en trabajos para crecimiento de microorganismos facultativos. Para el análisis de la morfología de colonias de *E. coli*, es utilizado como superficie de crecimiento con mucha frecuencia en los laboratorios de universidades (Macwilliams y Min-ken, 2006).

2.7.2.2. Medio de Cultivo Caldo Tryptic Soy Broth (TSB).

Fórmula/Litro

Digerido enzimático de caseína	17,0 g
Digerido enzimático de harina de soya.....	.3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato dipotásico.....	2,5 g
Dextrosa.....	2,5 g
pH final 7.0 +- 0,2 a 25 °C	

Preparación

Disolver 30 g del medio en 1 litro de agua destilada o desionizada, mezclar hasta que este componente se disuelva. Distribuir en recipientes finales, para luego esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

El caldo de T.S.B. dentro de sus componentes se encuentra la caseína y la harina de soya que son buenas fuentes de nitrógeno, además contiene dextrosa la cual está conformada de carbono que es una excelente fuente de energía lo que facilita el crecimiento de los microorganismos, mientras que el cloruro de sodio se encarga de mantener el equilibrio de la presión osmótica en la solución.

El medio de cultivo líquido (T.S.B.) es un medio que se desarrolló para determinar la efectividad de las sulfonamidas contra neumococos, clostridios y otros microorganismos no esporulantes sin la necesidad de usar sangre. Los organismos anaerobios tienen una excelente tasa de crecimiento en este medio, además se utiliza con mucha frecuencia en la preparación del inóculo en las pruebas de sensibilidad de difusión en disco (Acumedía, 2010).

2.7.2.3. Medio Agar MacConkey

Formula/Litro

Peptona.....	17,0 g
Pluripeptona.....	3,0 g
Lactosa.....	10,0 g
Mezcla de sales biliares.....	1,5 g
Cloruro de sodio.....	5,0 g

Agar.....	13,5 g
RojoNeutro.....	0,03 g
Cristal de violeta.....	0,001g
pH final 7.0 +- 0,1 a 0,2	

Preparación

Disolver 50,0 g del medio en 1 litro de agua destilada o desionizada. Reposar 5 minutos, mezclar hasta que este componente se disuelva. Distribuir en recipientes finales, para luego esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Allen, 2005).

2.7.3. Preparación de Medios de Cultivo

La preparación de los medios de cultivo es un proceso muy importante en investigación microbiológica, pues para obtener excelentes resultados es necesario que el operador o técnico posea además de habilidad y destreza, conocimientos básicos en fisicoquímica y microbiología según Rojas (2011).

2.7.3.1. Preparación de la Solución

Al preparar los medios de cultivo deben ser mezclados o hidratados en recipientes limpios, libres de detergente, utilizando para la reconstitución agua destilada o desmineralizada. El primer paso es el pesaje del medio de cultivo, luego se mezcla con el 90 % de la cantidad de agua destilada requerida y se agita de manera vigorosa hasta obtener una dilución homogénea, luego se agrega el 10% de agua para enjuagar de las paredes del recipiente el medio de cultivo adherido (Sanabria y Acevedo 2001).

2.7.3.2. Esterilización

Una vez repartido el medio en los recipientes definitivos o en aquellos que se desarrolle el trabajo de investigación, excepto cajas Petri se ingresa al autoclave. El proceso de esterilización viene indicado en la etiqueta de los medios de cultivos comerciales, se lo realiza en la autoclave a 121 ° C y a 15 libras de presión por un lapso de tiempo de 15 minutos. Después de que este proceso haya completado, se debe verificar que la válvula del autoclave se encuentre abierta y por consiguiente halla equilibrio de presiones, en este momento se debe de sacar el medio de la autoclave para evitar sobre carga térmica, se debe enfriar rápidamente a temperatura de vertido 45 a 50 °C (Rojas, 2011).

2.7.3.3. Vertido en Placa.

El vertido del medio de cultivo fundido y estéril se debe de realizar distribuyendo este en las placas de Petri en un ambiente aséptico con una proximidad de 10 cm, a la llama del mechero de Bunsen. Si fuera necesario se puede conservar el medio preparado en tubos o botellas esterilizadas previamente, para cuando sea necesario utilizarlos se fundirán en baño maría (Domenech et al, 2009).

3. METODOLOGÍA.

3.1. Enfoque.

La utilización de inmunoglobulina Y, se la viene realizando desde varias década atrás, estos anticuerpos han demostrado su eficacia en diferentes trabajos de investigación, existiendo reportes en diferentes campos. Su uso ha tenido excelentes resultados en ciencias como la inmunoquímica en la cual es de mucha importancia al momento de demostrar antígenos bacterianos o virales en animales, obteniendo buenos resultados también en plantas. En los últimos años, se observa un aumento en la aplicación de la IgY para hacer frente a enfermedades a través de terapias o profilaxis, es por ello que esta tecnología se perfila como una excelente alternativa para controlar ciertas enfermedades de tipo infeccioso. Gracias a las propiedades inocuas que tiene el huevo, los productos derivados de este, tienen muy bajas posibilidades de producir reacciones alérgicas, a esto se suma otra ventaja, el bajo costo de un tratamiento aplicando Inmunoglobulinas, sobre todo terapias dirigidas a problemas intestinales.

Se han realizado una gran cantidad de pruebas las cuales han obtenidos resultados muy satisfactorios tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. En medicina humana se realizaron un sinnúmero de experimentos. Se investigó la protección terapéutica aportada por la IgY anti-*Helicobacter pylori*, demostrándose que la IgY específica anti-*H. pylori* es efectiva en el tratamiento de las infecciones causadas por este agente infeccioso. Luego de comprobar que la IgY específica inhibía el crecimiento in vitro de *H. pylori*, se realizaron ensayos in vivo, utilizando jerbos como modelo experimental. La IgY logró reducir la adherencia de la bacteria al epitelio gástrico, disminuyendo también las lesiones en la mucosa. Debido a estos exitosos resultados, se realizaron pruebas en 63 pacientes humanos, comparando el tratamiento con IgY (94% de curación) y con

antibióticos (88% de curación). El tratamiento con IgY logró reducir la densidad de *H. pylori* y la inflamación aguda.

3.2. El Universo

La infección por *Escherichia coli* es responsable por pérdidas significativas en la producción avícola a nivel global. Esta bacteria es un integrante normal de la flora microbiana existente en los intestinos de las aves de corral, pero puede resultar patógeno después de que se presenten factores que provocan estrés en las aves, como es el caso de problemas nutricionales, ambientales y de manejo, además esta bacteria es considerada como agente secundario a problemas respiratorios desencadenados por reacciones post-vacúnales exacerbadas de virus vacúnales como Newcastle y Bronquitis Infecciosa, produciendo un complejo que causa infección localizada o septicémica.

En la industria avícola, los antibióticos siempre han sido una de las opciones más efectivas para controlar problemas asociados a *E.coli*. Sin embargo, se ha demostrado que las cepas de *E.coli* aisladas en granjas avícolas son resistentes a uno o más antibióticos, esto se debe a los cambios genéticos en los microorganismos que pudieron volverlos más virulentos o patógenos, de manera similar los cambios genéticos en las aves podrían haber alterado su susceptibilidad y resistencia a las enfermedades.

Existe gran preocupación que la resistencia a los antibióticos adquirida por las bacterias pueda hacer que los fármacos usados más comúnmente sean menos efectivos. Durante las dos últimas décadas, la aplicación de inmunoglobulinas específicas para ciertos microorganismos ha sido una estrategia muy utilizada, la cual se la ha llevado a cabo en el laboratorio y en estudios clínicos.

3.3. Lugar de la Investigación

La investigación se efectuó en los terrenos de la empresa Llaguno Cía. Ltda., la cual construyó un galpón técnicamente diseñado para realizar la presente investigación. El sitio está ubicado en la zona de Escoberia, cantón Lomas de Sargentillo. Las características de ubicación son:

Cantón: Lomas de Sargentillo.
Provincia: Guayas.
Latitud sur: 1° 52' 48''
Longitud oeste: 80° 05' 13.3''
Altitud: 30m.s.n.m
Temperatura media anual: 26 °C
Precipitación media anual: 500 mm.
Luminosidad: 1600 horas anuales.
Altitud: máxima 20 msnm.
Superficie: 58,6 Km².



Fig. 1 Ubicación del cantón Lomas de Sargentillo en la provincia de Guayas.

3.4. Equipos y Materiales

3.4.1. Materiales de Laboratorio

- Tubos de ensayo.
- Cajas Petri.
- Pipetas.
- Guantes
- Mascarilla
- Mandil
- Pipetero de 10ml y 25 ml.
- Probetas.
- Medio de cultivo liquido (TSB)
- Medio de cultivo solido (Agar MacConkey y Miller)
- Cepas de *E.coli* tituladas.
- Inmunoglobulinas Y, facilitadas por la empresa LLAGUNO Cia Ltda.
- Espátula de Digralsky
- Equipos de baño de María
- Termómetro
- Jarra de laboratorio utilizada en autoclave.
- Haza de platino
- Cepillos de lavar equipos de vidrio
- Gradillas porta tubos
- Papel aluminio
- Algodón
- Gasa
- Bolsas para pesar medios de cultivos
- Balanza electrónica para pesar medios de cultivo.
- Parafilm
- Detergente
- Desinfectante

- Piola de algodón
- Papel de empaque
- Agua desionizada o destilada
- Micropipetas marca Boeco.
- Puntas de micropipetas.
- Ropa y zapatones.
- Lente para contaje de colonias.
- Cámara Bioseguridad.
- Cámara incubadora.
- Autoclave.

3.4.2. Materiales de Campo

- Cajas plásticas para proceso de titulación en campo.
- 250 pollos Broilers Línea Ross 308.
- Galpón de 10m de largo x 6m de ancho.
- Comederos de 7 kg (20)
- Bebederos automáticos (5)
- Bebederos manuales de 2 litros (10)
- Campana de calor 500 pollitos (1)
- Baldes de plástico de 5 litros (5)
- Jarras plásticas de 1 litro (5)
- Mesa plástica para poner insumos al momento de inocular
- Balanza para pesar alimento (1)
- Balanza para pesar aves (1)
- Jarra graduada para medir volúmenes (1)
- Mandiles
- Guantes
- Termómetro
- Mecheros de vidrio
- Equipo de necropsia.

- Equipo para Plaqueo (Cajas Petri y medios de cultivos)
- Insumos. (Alimentos, Vitaminas, Vacunas, Entre otros)
- Materiales para toma de muestras (jeringas de 1, 3, 5, y 10 ml.)
- Caja térmica para transportar muestras al laboratorio.
- Bolsas de hielo (hielo mágico) para transporte de muestras.
- Crematorio.
- Jeringa graduada a 0,01 ml.
- Tamo para utilizar como cama para las aves.
- Papel periódico.
- Alcohol 1 litro.

3.5. Variables en Estudio

3.5.1. Variables o Categorías de Investigación

En este trabajo se utilizaron variables de dos tipos, las cuales se describen a continuación:

- Morbilidad.
- Mortalidad.
- Costos de tratamientos.

3.5.2. Medición de Variables

3.5.2.1. Morbilidad

Esta es una variable cualitativa, la cual se cuantificó gracias a las observaciones realizadas a diario en horarios de 07h00 - 13h00 - 18h00 durante los días de post inoculación de *E. coli*. Ininterrumpidamente, dichas observaciones fueron la base para determinar el deterioro de la salud de

las aves, traducido en decaimiento, falta de apetito, apatismo. La medición de esta variable se llevó a cabo durante 30 minutos para cada observación. La escala de medición de dicha variable fue de uno a cinco puntos, donde uno indica decaimiento en mínima expresión y cinco, decaimiento en la más alta expresión.

3.5.2.2. Mortalidad

Variable cuantitativa que expresó el porcentaje de animales que murieron durante el experimento, para medir esta variable, se verificó el número total de muertos en la última observación del día, esto fue a las 18h00 de cada día, ingresando el dato en la hoja de registro diario de mortalidad.

3.5.2.3. Costo de Tratamientos

Variable cuantitativa que estableció los valores finales para cada tratamiento, tanto de las repeticiones con inmunoglobulinas como la aplicación de enrofloxacin.

3.6. Métodos

Descripción del Trabajo

Este trabajo constó de dos fases:

- a) Titulación de la bacteria *E. coli* (en laboratorio).
- b) Confrontación de las inmunoglobulinas con bacteria ya titulada.(Campo).

3.6.1. Aislamiento y Secuenciación de *E. coli*.

- Se tomó muestras de pollos broilers de 34 días, que presentaron problemas respiratorios, al realizarles la necropsia se encontraron lesiones de aerosaculitis tipo 2, se tomó muestras de saco aéreo e hígado y se envió al laboratorio para aislar la bacteria.
- Una vez aislada la bacteria se envió a secuenciar genéticamente en un laboratorio certificado.

3.6.2. Titulación de la Bacteria *E. coli*

La titulación de bacteria *E. coli* se realizó en de la siguiente manera:

3.6.2.1. Preparación de Medios de Cultivo.

Para la siembra del *E. coli*, se utilizó 1 medio de cultivo líquido (Tryptic Soy Brot) y dos medios de cultivo sólidos (Agar Miller y MacConkey).

La preparación del caldo se realizó como se describe a continuación:

1- Pesado del medio (TSB).

En una balanza electrónica se pesó el medio de cultivo cuya dosis de dilución es de 30 g / litro de agua destilada, la cantidad de medio a preparar fue de 105 ml, para cada ensayo.

2- Disolución de medio (TSB)

Para disolver el medio de cultivo ya pesado se mezcló con agua destilada o desionizada en un matraz de 500 ml y se procedió a agitar hasta que estuvo totalmente disuelto.

3- Preparación de tapones de tubos de ensayo

Para tapones de tubo de ensayo se utilizó torundas de algodón en el interior de pequeños paños de gasa.

4- Dosificación del medio disuelto (TSB)

Utilizando una pipeta de 10 ml y un pipetero de la misma capacidad se procedió a dosificar el medio en los tubos de ensayo a razón de 4,5 ml por cada tubo. Como este trabajo necesita diluir en dos ocasiones, los tubos con 4,5 ml de cultivo fueron 22

5- Empacado de tubos de ensayo para ingresar al autoclave

Para la esterilización de los tubos con medio de cultivo, se utilizó una jarra para esterilizar en autoclave, los tubos de introdujeron en el interior de la jarra y luego esta se tapó con papel aluminio y papel de empaque sujetos con una piola de algodón.

6- Preparación de autoclave

Para que este equipo estuviese listo para ser utilizado, fue necesario aplicar 1,5 litros de agua destilada en el interior y ajustar válvulas de gas.

7- Introducción de materiales ala autoclave

Las jarras con tubos que contenían medio de cultivo, fueron introducidas en una canastilla que se encuentra en el interior dela autoclave, luego se procedió a cerrar la autoclave, utilizando una llave de tuercas número 9, empezando a ajustar las tuercas que se

encuentran en posición frente a frente en cruz, continuando hasta que se completen todas las tuercas.

8- Proceso de esterilización

Una vez cerrado la autoclave se encendió y se dejó esterilizar los medios a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos, luego se extrajo y se dejó enfriar para ser utilizado.

3.6.2.2. Siembra de *E. coli*. e Incubación por 18 Horas

La siembra del *E. coli* se la llevo a cabo de la siguiente manera:

Utilizando un haza de platino se hizo un barrido en la superficie del medio de cultivo solido (Agar Miller) donde creció el *E. coli*, se obtuvo una cantidad de colonias considerable, para luego proceder a sembrar en el medio de cultivo líquido.

El *E. coli* sembrado en el medio líquido se puso en la estufa a 37°C y se dejó incubar por 18 horas.

3.6.2.3. Primera Dilución de *E. coli* (dilución 1 en 10) e incubación por 18 horas.

Utilizando una micropipeta de 500 unidades lambdas, con puntas para la misma capacidad se procedió a tomar 500 unidades lambdas del tubo # 0, que contenía bacteria madre y se inoculo el tubo # 1, para luego agitar de manera generosa hasta que se forme un pequeño remolino en el interior del medio de cultivo. Este procedimiento se realizó en el interior de la cámara de flujo laminar, tomando las debidas precauciones y aplicando las medidas de bioseguridad que se llevan en el laboratorio. Este procedimiento se llevó a cabo en todas las diluciones desde el tubo # 1

hasta el # 10. Siembra de *E. coli* en medio líquido y se dejó incubar por 18 horas.

3.6.2.4. Segunda Dilución de *E. Coli* (dilución 1 en 100) e Incubación por 4 horas

Pasado el tiempo previsto de incubación, se extrajo los tubos de ensayo para proceder a realizar otra vez diluciones, esta vez fue 1 en 100, para ello se utilizó una micropipeta de 50 unidades lambdas con sus respectivas puntas, se realizó el trabajo de dilución del mismo modo que se describió antes, con la única diferencia de volumen al realizar las diluciones. Luego de realizar las diluciones se dejó incubar por 4 horas.

3.6.2.5. Inoculación de *E. coli* en Medio solido y en pollitas de 1 día de edad.

Una vez pasado el tiempo de incubación (4 horas) se procedió a inocular 100 unidades lambdas en medio de cultivo sólido contenido en cajas de Petri numeradas de la siguiente manera , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y se dejó incubar por 18 horas. Paralelo a este proceso se inoculo con 100 unidades lambdas a pollitas de 1 día de edad, separadas en 10 grupos de 7 aves cada uno y numeradas de la siguiente manera, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}

3.6.2.6. Periodo de Observación.

Una vez inoculadas las pollitas de 1 día de edad, se procedió a observar por un periodo de 7 días, para determinar la mortalidad de cada grupo y así poder calcular la Dosis Letal 50 por el método de Reed y Muench.

Todo este proceso para ser más entendible se lo describe a continuación en una forma resumida:

1. Siembra de *E. coli* en medio líquido y se dejó incubar por 18 horas.
2. Realización de diluciones en medio líquido 1 en 10, y luego se dejó incubar por 18 horas.
3. Realización de diluciones en medio líquido 1 en 100, y luego se dejó incubar por 4 horas.
4. Siembra en cultivo sólido de 100 µl y aplicación de la misma cantidad de inóculo a cada pollita de 1 día de edad.
5. Las pollitas inoculadas se separaron en 10 grupos de 7 aves, los cuales se denominaron 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} .
6. El periodo de observación de mortalidad fue de 7 días.

La Dosis Letal 50 fue 10^{-5} ⁴⁶.

3.6.2.7. Confrontación de las inmunoglobulinas con Bacterias ya tituladas

Se utilizaron 5 grupos de 50 pollos, que estuvieron en las mismas condiciones de manejo, con el mismo alimento, en el mismo galpón.

Ellos se identificaron como grupos: T₁, T₂, T₃, T₄, T₅.

Proceso.

Todos los tratamientos recibieron una dosis letal 50 de *E. coli* vía S.C.

Todos los grupos recibieron en el agua de bebida 100 dosis terapéuticas de IgY, siendo la diferencia entre los tratamientos, el número de aplicaciones de IgY (dosis terapéuticas) que se aplicó a los T₁, T₂, T₃,

mientras que al T₄, se aplicó en rofloxacina 10 mg /Kg PV, y al T₅ se tomó como grupo control lo cual se explica a continuación:

- **T₁:** Se aplicó 2 dosis terapéuticas de IgY por ave, a las 48 horas post-inoculación de *E. coli*. (2 dosis por ave).
- **T₂:** Se aplicó 2 dosis terapéuticas de IgY por ave, a las 48 y 72 horas post-inoculación de *E. coli*. (4 dosis por ave).
- **T₃:** Se aplicó 2 dosis terapéuticas de IgY por ave, a las 48, 72 y 96 horas post-inoculación de *E. coli*. (6 dosis por ave).
- **T₄:** Este grupo a las 48 horas recibió un tratamiento convencional de antibiótico (Enrofloxacina) en dosis de 10 mg/kg peso vivo, durante cinco días.
- **T₅:** Grupo Control al que no se aplicó IgY ni antibiótico.

Las aves se observaron por un periodo total de 13 días post-inoculación de *E. coli* y los resultados se registraron por el porcentaje de morbilidad, mortalidad, costo de tratamiento.

3.6.2.8. Procedimientos de Recolección de Datos

- La morbilidad se registró a diario, por la mañana de 7h00 a 7h30, al medio día de 13h00 a 13h30 y en la tarde de 18h00 a 18h30, se observó por 30 minutos el comportamiento y actitud de las aves.
- La mortalidad se registró diariamente.
- Se registró el costo del tratamiento con inmunoglobulinas y del tratamiento con antibiótico, para luego realizar la respectiva comparación.
- La medición de la morbilidad y la mortalidad se realizó conforme al siguiente gráfico:

Inicio de la Terapia

Aplicación

DL50

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

T1



T2



T3



T4



T5



0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Mediciones de Morbilidad y Mortalidad

3.6.3. Estudios Estadísticos

Se empleó test de ANOVA para la comparación de mediciones de peso y la ganancia de peso entre los grupos a los 7 y los 13 días del estudio. Se corroboraron los supuestos de normalidad (Test de Shapiro-Wilk) y de Homogeneidad (Test de Barlett). Se empleó Test de correlación de Fisher entre las variables en estudio. Se comparó los resultados de cada grupo en estudio con los valores de la tabla publicada por (Ross, 2012), a través del Test t de Student.

3.6.4. Plan de Trabajo

Actividades	Mes	1				2				3				4				5				6			
	Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Construcción de Galpón		■	■	■																					
Compra de pollitos BB Para Titulación			■																						
Titulación de <i>E. coli</i> en pollitos			■	■	■	■																			
Compra de pollitos para prueba de campo							■																		
Crianza de Pollitos para prueba de campo								■	■	■	■														
Pesajes semanales y Observación diaria									■	■	■	■													
Inoculación de <i>E. coli</i> en pollos de 21 días												■													
Observación y diagnóstico de Enfermedad												■	■												
Toma de datos mortalidad, morbilidad (etc)												■	■												
Revisión de Información Adicional														■	■										
Análisis de Resultados															■	■	■								
Escritura del borrador																■	■								
Revisión del documento																	■								
Escritura del documento final																				■	■				
Presentación a la UCSG																							■		

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se utilizó pollos de 28 días de edad, dicho estudio se realizó en la zona de Escoberia del cantón Lomas de Sargentillo de la provincia del Guayas.

Del total de 250 pollos broilers divididos en 5 grupos con una cantidad de 50 pollos para cada grupo. Cada grupo fue inoculado con la bacteria *E. coli*, cepa *O111:H*, al grupo 1, 2, y 3 se le aplicó directamente al bebedero Inmunoglobulinas Y, el Grupo 4 se le aplicó enrofloxacina y en el Grupo 5 agua pura.

En los respectivos experimentos se determinó lo siguiente:

Evaluar el uso de Inmunoglobulinas y, en el Control de *E. coli* agente que afecta a los Sistemas de Producción de pollos broilers

Los Grupos 1, 2 y 3, con un total de 150 pollos, previamente fueron inoculados con 1 dosis letal 50 % de la cepa *O111:H* de *E. coli* y después de 48 horas se empleó Inmunoglobulinas Y, en diferentes aplicaciones: al Grupo 1 se aplicó a las 48 horas post inoculación de *E.coli*, al grupo 2 se aplicó a las 48 y 72 horas post inoculación y para el grupo 3 se administró a las 48, 72 y 96 horas post inoculación. En cuanto al tiempo de observación fue de 13 días.

Determinar la eficacia de las inmunoglobulinas ante retos de *E.coli* en pollos broilers.

Se determinó una eficacia parcial de las inmunoglobulinas ante retos de *E.coli* en pollos broilers de 28 días.

La comparación de los datos de peso corporal y de consumo de alimento de cada grupo con el valor de tabla empleando el tets ***t de Student*** fue significativo (p: 0,000). El peso corporal real fue inferior al de tablas, mientras

que el consumo de alimento en gramos fue superior al estándar en cada grupo, esto dio como resultado una mayor conversión alimenticia en los grupos en estudio con respecto a la tabla estándar publicada por Ross (2012), esto contrasta con los resultados presentados por Gutiérrez et al (2013), quienes en su trabajo de investigación evaluaron la capacidad de protección y el comportamiento de los parámetros zootécnicos en pollos cebados que recibieron en la alimentación IgY en diversos programas, confrontados con un programa en el que se utilizó coccidiostatos y otro que utilizó una vacuna comercial, frente a desafíos con *Eimeriaacervulina*. En dicho trabajo se concluyó que los tratamientos que contenían IgY más salinomicina e IgY mas betaína obtuvieron los más altos pesos corporales además de las mayores ganancias de peso, esto se tradujo en las conversiones de alimento más bajas con respecto al resto de grupos en estudio.

Cuadro 1. Eficiencia de la Inmunoglobulina Y, frente al desafío con 1 DL 50 % de *E. coli* y comparación del factor de conversión alimenticia (F. C.) al día 7 post-inoculación. 35 días de edad.

Factor de Conversion Alimenticia. 7 días Post inoculación							
Grupos	aves	Peso Corporal		Consumo alimento (g)		Factor de Conversión	
		Real	Tabla	Real	Tabla	Real	Tabla
1	50	1.708	1.977	3.261	3.135	1,91	1,59
2	50	1.795	1.977	3.303	3.135	1,84	1,59
3	50	1.860	1.977	3.348	3.135	1,80	1,59
4 (a)	50	1.895	1.977	3.288	3.135	1,74	1,59
5	50	1.658	1.977	3.291	3.135	1,98	1,59

Grupo 4(a) Grupo con antibiótico; Grupo 5 Grupo control.

En este trabajo la eficacia de las Inmunoglobulinas, se la determinó a través de la conversión alimenticia, de la morbilidad y mortalidad las cuales se describen a continuación:

A través de la conversión alimenticia se puede indicar que la eficacia es nula, ya que la comparación de los resultados de pesos y ganancia de pesos de los grupos en estudio a través de técnicas estadísticas ANOVA indicó que no hay diferencia significativa entre los grupos en estudio ni al día 7 ni al día 13,(p: 0,06). La correlación de Fisher no demostró diferencia significativa entre los grupos (r: 0,2 p: 0,10). Dichos eventos difieren con los resultados obtenidos por Hermans et al. (2014), quien examinó el uso potencial de la inmunización pasiva para reducir la colonización de *Campylobacter jejuni* en pollos de engorda, en este trabajo se hiperinmunizó gallinas con un lisado de células enteras de *C jejuni*, resultando en una reducción de los recuentos en animales sembrados tres días después de la inoculación, en relación con el grupo control.

Además también difiere con los resultados obtenidos por Lee et al (2009), quien demostró que la inducción de la inmunidad pasiva para controlar coccidiosis causadas por *Eimeria tenella* y *máxima* en pollos broilers de 1 semana de edad a través de IgY de yema de huevos, preparadas a partir de gallinas hiperinmunizadas y administradas vía oral mejoró la ganancia de peso significativamente en los pollos que recibieron IgY, en comparación con el grupo control.

La razón por la cual difiere esta investigación con los trabajos de los autores antes citados es probablemente porque las 2 investigaciones citadas se realizaron inoculando el agente patógeno por vía oral, mientras que en el presente trabajo la inoculación de la *E. coli* se realizó por vía parenteral (S.C.). Sin embargo cuando se comparó estadísticamente los grupos en estudio con la tabla estándar indicada por Ross, (2012), se pudo apreciar que existe diferencia estadística significativa.

En cuanto a la morbilidad y mortalidad se observó que la morbilidad en el grupo 5, tubo 2 puntos en una escala de 1 a 5 en los primeros días post

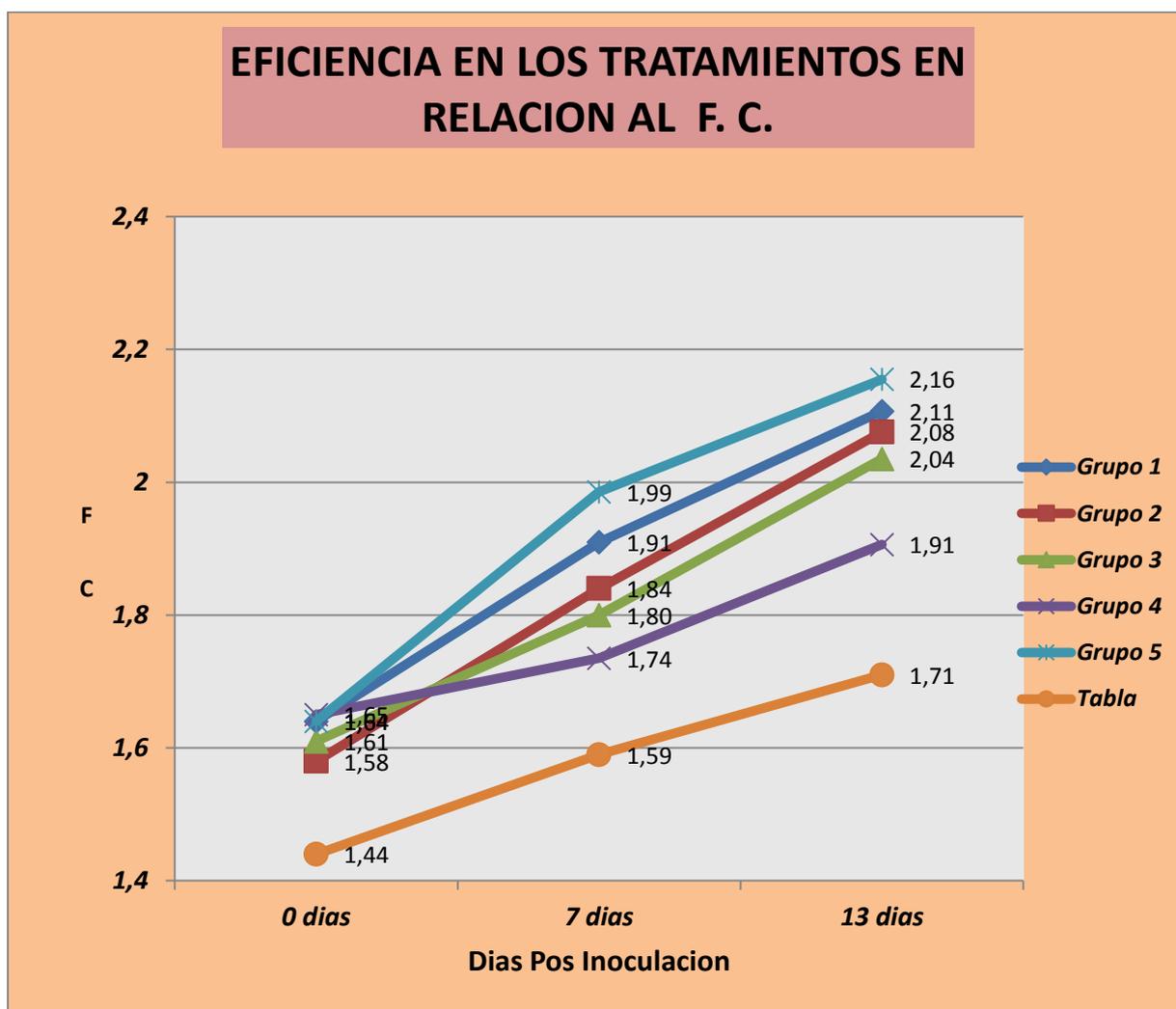
inoculación de *E. coli*. Sin embargo este evento no se presentó en los otros grupos, además no se observó mortalidad en ningún grupo, probablemente debido a que la DL 50 del *E. coli* que se obtuvo siguiendo el método experimental que menciona Reis, (1996) en el cual se utiliza pollitos del mismo sexo y de 1 día de edad, afecta a pollitos de 1 día de edad, pero no causa los mismos signos clínicos y mortalidad en pollos de 28 días de edad, como los empleados en la confrontación de las IgY con 1 dosis letal 50 de *E coli* que se realizó en esta investigación.

Cuadro 2. Comparación del factor de conversión alimenticia (F. C.) al día 13 post-inoculación. 41 días de edad.

Factor de Conversión Alimenticia. 13 días Post inoculación							
Grupos	aves	Peso Corporal		Consumo alimento (g)		F C	
		Real	Tabla	Real	Tabla	Real	Tabla
1	50	2.165	2.475	4.562	4.238	2,11	1,71
2	50	2.215	2.475	4.598	4.238	2,08	1,71
3	50	2.275	2.475	4.630	4.238	2,04	1,71
4 (a)	50	2.390	2.475	4.556	4.238	1,91	1,71
5	50	2.120	2.475	4.569	4.238	2,16	1,71

G4(a) Grupo con antibiótico; G5 Grupo control.

Gráfico 1. Eficiencia de los tratamientos en relación al FC acumulado



En esta figura se aprecia el Factor de Conversión acumulado a los días 7 (35 días de edad) y 13 (41 días de edad) post inoculación.

Analizar la inocuidad del uso de inmunoglobulinas y, en los sistemas de producción intensivos de pollos broilers.

Las inmunoglobulinas aplicadas en este estudio fueron inocuas para el tratamiento contra *E. coli* en los Grupos 1, 2 y 3.

Cuadro 3: Inocuidad de las inmunoglobulinas aplicadas a pollos Ross 308.

Inocuidad. 13 días Post inoculación						
	Aves	Dosis / ave	Mortalidad	Morbilidad	Alza térmica	Consumo de alimento
G1	50	2	0	0	0	Normal
G2	50	4	0	0	0	Normal
G3	50	6	0	0	0	Normal
G4	50	0	0	0	0	Normal
G5	50	0	0	3	2	Disminuido

En trabajos de diferentes autores se demuestra la inocuidad de las inmunoglobulinas Y. En un estudio de Zhonghua et al, (2004), demostró que la inmunoglobulina Y, es un agente seguro y eficaz en el tratamiento de la faringitis aguda y crónica, especialmente para la faringitis aguda en humanos.

En este trabajo se logró determinar que las inmunoglobulinas (IgY) administradas a pollos de 28 días de edad fue inocuo. De los cinco grupos en estudio, a los grupos 1, 2 y 3, se aplicó inmunoglobulinas (IgY) al grupo 4 se aplicó antibiótico y al 5 se suministró agua pura, En todos los grupos se observó la mortalidad y morbilidad durante 13 días, en este periodo de tiempo no se pudo

observar signos de deterioro en la salud de las aves en los grupos 1,2 y 3, además se pudo apreciar que aun en el tratamiento con mayor cantidad de IgY grupo 3,(300 dosis) no presentó diferencia en el estado de salud. Sin embargo podemos apreciar que el único grupo que presentó morbilidad en grado 2 de acuerdo a la escala de medición es el grupo 5, el cual sirvió como grupo control.

Con esto se puede concluir que las inmunoglobulinas presentaron inocuidad para la salud de las aves, siendo las inmunoglobulinas un material biológico que potencialmente puede producir alguna reacción adversa. No se observó ninguna reacción secundaria mediata ni inmediata en los grupos que recibieron las diferentes dosis de Ig Y.

Realizar Un Análisis de los costos de Tratamientos con Inmunoglobulinas Y vs Tratamiento con Antibiótico

En este estudio se determinó que cada uno de los tratamientos en la que se emplea IgY, resulta más barato respecto al tratamiento con enrofloxacin.

Cuadro 4. Comparación de costos de tratamiento.

Costo de Tratamientos						
	Días Tratamiento	# de aves	dosis/ ave/día	Dosis tratamiento total	Costo dosis	Costo Tratamiento USD\$
Tratamiento 1	1	50	2	100	0.02	2
Tratamiento 2	2	50	2	200	0.02	4
Tratamiento 3	3	50	2	300	0.02	6
Tratamiento Enrofloxacin	5	50	10 mg /kg	4150 mg	0.0076	31.54

En este cuadro se describe la diferencia en el costo de los tratamientos con Ig Y, y enrofloxacin. El tratamiento 1 presentó un costo de USD \$ 2, el tratamiento 2 costó USD \$ 4, el tratamiento 3 tuvo un valor de USD \$6; y respecto al tratamiento con enrofloxacin tuvo un precio de USD \$ 31,54.

Por lo tanto los tratamientos con IgY fueron de bajo costo con relación al tratamiento con enrofloxacin. Esta diferencia es muy importante de considerar, porque el uso de un tratamiento biológico como es el que emplea Inmunoglobulinas, nos permite analizar la disminución del uso antibióticos, ya que su uso indiscriminado y sin criterio técnico han provocado el desarrollo de resistencia a un sinnúmero de antimicrobianos; también es de conocimiento técnico que el uso de dichos fármacos crea presión selectiva para bacterias resistentes. La variación en el costo de los tratamientos obedece a tres factores los cuales son:

Costo de Dosis.

El costo por dosis de la inmunoglobulina es de 0,02 centavos de dólar. Mientras que en el caso de la enrofloxacin es de 0 ,0076 centavos de dólar por dosis.

Duración del Tratamiento.

La duración del tratamiento es otro factor que aumenta el costo, si consideramos que los tratamientos duraron 1(G1); 2(G2); 3(G3); y 5(G5) días respectivamente, podemos ver que las inmunoglobulinas se aplicaron 3 días, mientras que la enrofloxacin se aplicó 5 días.

Cantidad de Dosis por Tratamiento.

La cantidad de dosis es de mucha importancia para cada tratamiento. En el caso de la enrofloxacin la dosis se expresa como la cantidad de mg de droga activa por kg de PV, esto significa 10 mg/kg PV, las aves que se trataron con este antibiótico presentaron durante los 5 días de tratamiento 415 kg de peso vivo (PV) acumulado, a los cuales aplicamos 4150 mg de enrofloxacin cuyo costo es de 31,54 dólares americanos. En el caso de las inmunoglobulinas se aplicaron 300 dosis al tratamiento 3.

Morbilidad y mortalidad encontrada:

Del total de 250 pollos agrupados en 5 grupos, 50 presentaron disminución del consumo de alimento acentuada el grupo 5, resultante al 20% de morbilidad. En ninguno de los 5 grupos presentaron casos de mortalidad (0%).

5 CONCLUSIONES.

En el presente estudio se concluye que no se observó diferencia significativa en el peso corporal y la ganancia de peso obtenida, entre los grupos a los que se les administró inmunoglobulinas y los que no la recibieron.

- Se determinó que debido a la utilización de la vía parenteral para efectuar inoculación del patógeno, no se puede confirmar la eficacia de la IgY a través de la conversión alimenticia, dado que en los trabajos que preceden esta investigación se utilizó la vía oral para inocular el patógeno utilizado para confrontar con las IgY.
- Se observó completa inocuidad en el uso de las inmunoglobulinas Y.
- Los tratamientos con IgY son considerablemente más económicos que el uso de antibióticos, además permite una producción más ecológica y sustentable.

6. RECOMENDACIONES.

- Realizar estudios más amplios sobre el uso de las IgY aplicadas vía oral para tratar infecciones bacterianas septicémicas.
- Efectuar investigaciones de inmunoglobulinas Y en cerdos y bovinos.
- Promover el uso de las inmunoglobulinas Y con el propósito de proteger a los animales de infecciones causadas por bacterias entéricas patógenas nivel del tracto digestivo.
- Difundir los resultados obtenidos a la comunidad avícola, científica y la sociedad en general.

BIBLIOGRAFÍA.

- ACUMEDIA. 2010. TRYPTIC SOY BROTH (7164). Bajado el 19 febrero 2015. http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/prodInfo/7164_PI.pdf
- ALLEN, M. 2005. MacConkey Agar Plates Protocols. Bajado 19 febrero 2015. www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2855macconkey-agar-plates-protocols
- AVIMEX 2015. *E. coli* bacterina emulsionada. Bajado 22- marzo 2015. http://www.engormix.com/laboratorio-avimex-mexico/coli-vacuna-prevencion-colibacilosis-aviar-sh557_pr286.htm
- BALAGUER, J. 2008. Inmunidad Pasiva (I) Selecciones Avícolas. Agosto 2008. Pág. 41 – 43. Bajado el 12 de mayo del 2011 <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/bacteriologia-complejo-respiratorio-aves-t3355/165-p0.htm>.
- BARRIENTOS, B. 2011. Bacteriología en el complejo respiratorio de las aves. Bajado el 12 de Mayo del 2011. <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/bacteriologia-complejo-respiratorio-aves-t3355/165-p0.htm>. Bajado el 12 de Mayo del 2011
- BARROSO P., MURCIA, H., VEGA, N y PÉRES G. 2005. Obtención y Purificación de IgY dirigidas contra la lectina de *Salvia bogotensis* Bajado 12 Mayo 2011. <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1376>
- BATISTINO E., GHIZZONI F y SALVUSKY, N. 2008. Utilización de huevos de gallinas con incorporación de Inmunoglobulina Y para atenuar la incidencia de diarrea en terneros. Bajado 12 enero 2015. www.produccion-animal.com.ar.

- BERCHIERI., *et al.* 2009. DOENCAS DAS AVES. 2ed. Fundacao APINCO de Ciencia e tecnologia Avícolas. Av., Andrade Neves, 2.501 – 13070 – 001. Campinas, SP, Brasil.
- BILBAO G., CHACANA, P., PARREÑO, V., TERZOLO, H. 2007. Diarrea de los terneros: una solución proporcionada por la gallina. Bajado 12 de abril del 2011. http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_dig/diarrea.htm.
- BOERLEGUI, J, comp. 2008. El libro del huevo. Quito, TECNOSUMI. p17.
- BUSTOS, F. *et al.* 2009. Utilización de un inmunomodulador para mejorar la inmunidad materna en aves reproductoras pesadas. Bajado el 12 de Abril del 2011. <http://www.cuencarural.com/granja/avicultura/62483-utilizacion-de-un-inmunomodulador-para-mejorar-la-inmunidad-materna-en-aves-reproductoras-pesadas/>.
- BUTCHER, P y RODRIGUEZ, J. 2007. Enfermedades Respiratorias y Complicaciones en Pollos. Avicultura Profesional. Santiago de Chile. Vol. 25(5): 18-20
- CABRERA, R. 2007. Los productos naturales y su papel en la Industria de la Producción Animal ¿Podemos confiar en ellos?. Avicultura Ecuatoriana.(Quito, Ecuador) (116): 40-42
- CARRANZA, C., LEÓN., FALCÓN, N., NEUMANN, A y KROMM, C. 2012. Caracterización y distribución de cepas de *Escherichia coli* potencialmente patógenas aisladas de pollos broiler de explotaciones avícolas en Perú. Bajado el 16 Febrero del 2015. www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172012000200011&script=sci_arttext

- CASADO, C., TORRICO, G y MEDINA, M. 2012. Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología. Bajado 21 marzo 2015. <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- CASTAÑO, J., BOTERO, A., BETANCUR, O Y ARICAPA H.2007. Comportamiento de los principales antibióticos usados en avicultura frente a cepas respiratorias de *E.coli* en pollos de engorde del Municipio de Floridablanca (Santander – Colombia). Bajado el 12 de Mayo del 2011. http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista7_1.pdf.
- CHACANA, P y TERZOLO, H. 2003. Una introducción a la tecnología IgY, anticuerpos de yema de huevo. Bajado 12 Abril del 2011. <http://engormix.com/ma-avicultura/sanidad/articulos/una-introduccion-tecnologia-igy-t4555/165-p0.htm>
- CHACANA. P., TERZOLO. H., GUTIÉRREZ CALZADO. E y SCHADE. 2004. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina: biología, propiedades y su aplicación en medicina humana y veterinaria. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 85 (5)
- CHAVES, E. 2009. Adherencia del *Streptococcus mutans* después del uso de la IgY extraído de la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas.(Tesis de tercer nivel) Bajado 15 de Enero del 2015. <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/EDITHROSARIOCHAVEZALVARADO.pdf>
- CHENYAO, T. FANG, G., ZHENJIAO, H., ZHAOXIA, C¹ AND MEIHU, M.¹. 2015.Un método simple para aislar inmunoglobulina de yema de huevo de gallina usando una solución eficaz de deslipidación y sulfato de amonio. Bajado 28 febrero 2015. <http://www.vetefarm.com/nota.asp?not=2460&sec=16>

- COBB. 2013. Guía de Procedimientos para Vacunación. Bajado 27 marzo 2014. <http://www.cobb-vantress.com/languages/spanish/products/guide-library>
- DEEMING, D. 2001. El avestruz. Biología, producción y sanidad. Zaragoza, ACRIBIA, S.A. p
- DELMAR, D. 2014. Colibacilosis: estrategia para un mejor control. Industria Avícola.Vol.61, número 4 abril 2014- Bajado el 16 de Enero 2015. <http://www.industriaavicola-digital.com/201404/default/5/0#&pageSet=1>
- DINEV, I. 2007. Diseases of Poultry. A Colour Atlas. First Edition. Ceva sante animal. 2m printhouseLtd.
- DOMENECH, A., LÓPEZ, A., OLIVER, A y RAMIREZ, A. et al 2009. Prácticas de Microbiología. 2009 – 2010. Bajado 22 marzo 2015. <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>
- EFSA. 2014. EFSA. Explains zoonotic diseases ¿What is Zoonotic *E. coli*? Bajado el 7 de marzo 2015. <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/factsheetecoli.pdf>
- GASKIN, J., WILSON, H., MATHER, P., JACOB, J and GARCIA, L. 2001. Enfermedades de las Aves Transmisibles a los Humanos. Publicación de la Universidad de Florida. p2. Bajado el 13 de Abril del 2011. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AN/AN09900.pdf>.
- GOMEZ, E., BLANCO, M. y DOMENECH, A. 2007. Manual de Inmunología Veterinaria. PEARSON Prentice Hall. P.152.
- GUTIERREZ, E., ESTEBAN, J., HEREDIA, T., BAUMLER, H y SCHADE, R. 2009. Producción de un anticuerpo IgY específico contra el antígeno CD41 humano. Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Calle 23

y Carretera del Caney, Apartado Postal 4032, Código Postal 90400, Santiago de Cuba. Bajado 30 enero 2015. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181221662004.pdf>

- GUTIERREZ, P. et al. 2013. Comportamiento productivo de pollos de engorda tratados con inmunoglobulinas para la prevención de la coccidiosis ante un desafío controlado con *Eimeria acervulina*. Engormix. Bajado el 1 Abril del 2015. <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/comportamiento-productivo-pollos-engorda-t5275/165-p0.htm>
- HERMANS, D. 2014. Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. Bajado 30 Enero 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589217>
- HERNADEZ, G. 2010. Enfermedad aviar. Colibacilosis Aviar. Bajado el 21 Marzo 2015. <http://gumer19.blogspot.com/2010/06/colibacilosis-aviar.html>
- Hy-line. 2005. Guía de manejo Comercial 2005-2007. p3
- HYUN, S. 2007. Mejorando a Inmunidad Innata de Aves a través de Nuevas Estrategias Inmunológicas y Genómicas. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura. Porto Alegre - Brasil 2007.
- KAHN, C., ed. 2007. Manual de Merck de Veterinaria. 6ed. Barcelona, Océano. p 2189.
- KAGAMBÉGA, A. et al. 2013. Prevalence and characterization of *Salmonella entérica* from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human *Salmonella* isolates. Bajado 25 Enero 2015. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24215206.

- LEE, S. et al. 2009. Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. Bajado 10 enero 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19450929>.
www.researchgate.net/...IgY.../00b49515aeb09ac18...
- LIOU, J., SHIAU, J., TAI, CH and CHEN, L. 2011. Production of Egg Yolk Immunoglobulin Against *Escherichia coli* From White Leghorn and Lohmann Chickens. Bajado 22 marzo 2015. <http://www.medwelljournals.com/fulltext/?doi=javaa.2011.2349.2356>
- LÓPEZ, W. 2010. Virología Veterinaria, editorial de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UTM, Machala. pp. 132 -136.
- LOPEZ, N. AFANDOR, G y ARIZA, C. 2009. Evaluación de tres levaduras provenientes de ecosistemas colombianos en la alimentación de pollos de engorde. Revista corpoica- Ciencia Tecnología Agropecuaria 10 (1), 102-114. Bogotá.
- LOPEZ, L y TORRES, C. 2006. Medios de Cultivo. Trabajo Practico N° 4. Bajado 16 febrero 2015. <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>
- MACWILLIAMS, M. y MIN-KEN, L. 2006. Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol. Bajado 19 febrero 2015. www.microbelibrary.org/component/laboratory-test/3031-luria-broth-lb-and-luria-agar-la-media-and-their-uses-protocol
- MARTINEZ, ACI. y CORTES, C. 2012. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* aisladas de aves de Importación, traspatio y comerciales. Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, FMVZ, UNAM. México. Bajado el 27 de Mayo 2013. <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/resistencia-antimicrobiana-cepas-escherichia-t4397/165-p0.htm>

- MARTINEZ, M., MELO, C., CÓRDOBA, M y PORTILLA, J. 2014. Diagnóstico de los principales antibióticos recomendados para pollo de engorde (broiler) por los centros agropecuarios del municipio de Pasto, Nariño, Colombia. Bajado 22 Marzo 2015. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122_93542014000100009
- MASCARELL, J. y PERIS, S. 2010. El uso de Antimicrobianos en Avicultura: Conceptos, Eficacia y Situación legal. Selecciones Avícolas. Agosto 2010. pp. 13 - 21.
- MEDINA, N. GONZALES, C. DAZA, S. RESTREPO, O y BARAHONA, R. 2014. Desempeño Productivo de Pollos de engorde suplementados con biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* derivada de la fermentación de residuos de banano. RevFacmedVetZoot. 61(3) Medellin. Colombia.
- MENDOZA, J. et al. 2012. Eficacia experimental de anticuerpos IgY producidos en huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. Bajado 10 Enero 2015. <http://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/v29n1/a10v29n1>
- MONTAÑO, A. 2005. Temas selectos de inmunología veterinaria. Editorial El Manual Moderno. P92 - 102.
- MORALES, H et al. 2004 Bioseguridad en la Industria avícola. s.e. p42.
- MOREIRA, A. BILBAO, G y TERZOLO, H. (2003) Prevención de la diarrea neonatal de los terneros mediante la administración de huevos de gallinas vacunadas. Bajado el 12 de Abril del 2011. http://www.inta.gov.ar/balcarce/noticias/expo_ganadera/articulos/moreira.htm.
- NHI, 2014. Infecciones Bacterianas. Bajado el 22 de Marzo del 2015. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/bacterialinfections.html>

- NUNES, F et al. 2014. Production and Characterization of IgY against Canine IgG: Prospect of a New Tool for the Immunodiagnostic of Canine Diseases. Brazilian Archives of Biology and Technology. Bajado 20 Enero 2015. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-132014000400523
- M S. 2013. Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N°194. Bajado 27 de Diciembre 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- PAEZ, D. y OCAMPOS, L. 2005. Terapéutica Avícola. México, Arbel impresores S.A. pp. 219-221.
- PERELLÓ, M. 2010. Detección y Caracterización de Aislados de *Escherichiacoli* de origen Clínico y Fecal en gallinas ponedoras. Tesis Doctoral. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Medicina Veterinaria Departamento de Sanidad Animal. Pp 141 -149. Bajado el 9 de Marzo 2015. <http://www.visavet.es/data/tesis/dteccion-y-caracterizacion-de-aislados-de%20Escherichia-coli-de-origen-clinico-y-fecal-en>
- PEREZ, E. 2009. Ácidos Orgánicos en Alimentación Animal. Avitec. (Quito, Ecuador) (01): 8-9.
- RAJIC, A. et al. 2009. Protein depletion using IgY from chickens immunised with human protein cocktails. Bajado 30 enero 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=uses+igY+of+yolk+in+poultry>
- RAJIC, A., MINGA, M y MACHANG'U 2006. Prevalence and Characterization of *Vero toxigenic Escherichia coli* O157 Isolated from Local Chicken in Morogoro, Tanzania. Bajado el 16 de febrero del 2015. <http://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2006.952.958>

- RECEP, K. HASAN, O y BURHAN,C. 2012. Isolation and Molecular Characterization of *Escherichia coli* O157 from Broiler and Human Samples. Bajado el 8 marzo 2015.<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2011.0991>
- REIS, E. 1996. Estudo da patogenezidade em uma amostra de *Escherichia coli* septicemica para aves. Bajado 12 abril 2011. <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000108065&fd=y>
- ROBALINO, A., 2000. Manual del Avestruz. Quito, SUR Editores. p 76.
- ROJAS, A. 2011. Conceptos y Práctica de Microbiología General. Bajado 22 Marzo 2015.
- ROSS, 2009. Manual de manejo del pollo de engorde Ross. Bajado 27 Marzo 2014. http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/RossManualManejoPolloEngordeRoss-2009.pdf
- ROSS, 2012. Ross 308, Broiler Objetivos de Rendimiento. Bajado 27 Marzo 2014. http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross-308-Broiler-Objetivos-de-Rendimiento-SP.pdf
- ROSENBLATT-FARRELL, N. 2009. El paisaje de la resistencia a los antibióticos. Bajado 10 marzo 2011. <http://www.scielo.org/pdf/spm/v51n5/11.pdf>
- RUTZ, F. 2010. Soluciones naturales: una alternativa para mejorar la respuesta inmunológica en aves. Avicultura Ecuatoriana.(Quito, Ecuador) (150): 31-33.

- SANSALONE, P. 2008. Conceptos sobre Alternativas no Antibióticas en Aves de Consumo. Simposio llevado a cabo en el XII Seminario Internacional de Avicultura. “Sector Avícola: Retos, Riesgos y Desafíos”. Guayaquil – Ecuador.
- SCHIEDER, C. 2014. Phytogetic and their impact on meat quality. ALL ABOUT FEED. Volumen 22, No. 6 – 7.
- SERRANO, L. 2011. Por qué fallan los antibióticos? Engormix. Bajado 10 Octubre 2012.
<http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/resistencia-a-antibioticos-en-animales-t3260/165-p0.htm>
- STANCHI, N. 2007. Microbiología Veterinaria. Edit. INTERAMERICANA. Pp. 88-91.
- SUSSMANN P., MATTOS L Y RESTREPO A. ?. Resistencia bacteriana. Bajado 22-marzo 2015.
<http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
- TERZOLO, H. 2009. Tecnología de las Inmunoglobulinas de la yema de huevo. Bajado 15 abril 2013.
<http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/27649/08-tecnolog%25EDa+de+las+inmunoglobulinas+de+yema+de+huevo+.pdf>.
- TIZARD, I. 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8ed. Barcelona, Elsevier. Pp.170-173.
- TRUEBA, G. 2008. Uso Racional de Antibióticos en Medicina Veterinaria. Simposio llevado a cabo en el XII Seminario Internacional de Avicultura. “Sector Avícola: Retos, Riesgos y Desafíos”. Guayaquil – Ecuador.

- YEGANY, M. y KORVER, D. 2009. Application of egg yolk antibodies as replacement for antibiotics in poultry. Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2P5, Canada. Bajado 30 Enero 2015. <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=7311256&fileId=S0043933910000048>
- WASTESON, Y. 2001. Zoonotic *Escherichia coli*. Bajado 25 Enero 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11995395>
- ZHONGHUA ER BI YAN HOU KE ZA ZHI. 2004. Effect of specific immunoglobulin Y in the treatment of acute and chronic pharyngitis. Bajado 25 Enero 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195596>

ANEXOS

Figura 1. Área de Inoculación donde se realizó las diluciones para la obtención de la DL 50 de la *E. coli*.



Figura 2. Siembra de *E. coli* en Medio Liquido (TSB)



Figura 3. Realización de diluciones de la *E. coli*, para la Obtención de la DL50.



Figura 4. Colonias de *E. coli* en Agar MacConkey.



Figura 5. Inoculación de *E. coli* en pollitos de 1 día de edad, para la obtención de DL 50



Figura 6. Grupo de pollitos inoculados con *E. coli* en la dilución 10^{-10}



Figura 7. Toma de datos para determinar letalidad de *E. coli* en pollitos de 1 día de edad.



Imagen 8. Aplicación de IgY directamente al bebedero.



Figura 9. Aplicación de *E. coli*.



Figura 10. Jeringa especial utilizada para la inoculación del *E. coli*.



Grupo :	3	# Pollos :	10
Ingreso aves :		Edad pollos :	1 día
Semilla :	E. coli	Origen :	
Fecha Inoc :		Hora Inoc :	13h00
Dosis Inoc :	0,1 ml	Vía Inoc :	Sub Cutanea
Dilucion :	10 -3	Grupo :	3
Responsable	Pedro Cedeño Reyes M		

Simbolos :
BE Buen Estado
E1 Enfermo leve
E2 Enfermo Terminal
M Muerto

		D i a s d e O b s e r v a c i o n											
		13-jul-11	14-jul-11	15-jul-11	16-jul-11	17-jul-11	18-jul-11	19-jul-11	20-jul-11	21-jul-11			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
		07h00	12h00	18h00	07h00	12h00	18h00	07h00	12h00	18h00	07h00	12h00	18h00
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													

Observaciones :



Guayaquil, 15 de Enero del 2013

Pedro Cedeño
Llaguno Cia. Ltda.
Cdla. Canales del Peñón
DURAN

Objeto: Estudio de viabilidad y pureza de 8 cepas, Taxonomía Molecular y Criopreservación.

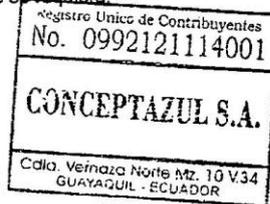
- 1- Repique de la cepa en medio sólido o caldo.
- 2- Extracción del ADN cromosómico.
- 3- Amplificación mediante PCR del gen 16S rRNA en bacterias.
- 4- Purificación de los amplicones
- 5- Secuenciación
- 6- Análisis de las secuencias en bancos de datos (GenBank, EMBL etc...), mediante alineamiento de homología usando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), alineamiento y árbol filogenético mediante el programa MEGA4 y CLUSTALW.
- 7- Entrega del informe.

Por medio de la presente, le hago entrega del informe correspondiente al análisis molecular para la identificación de las cepas de bacterias y hongos entregadas.

Agradeciendo por su interés en nuestros servicios, quedo de Ud., para cualquier información adicional que se requiera.

Atentamente,


Emmerik Motte, Ph.D.
Director de Investigación
Conceptazul S.A.



Identificación molecular de cepas de Bacterias

Objetivo.

Identificación molecular de cepas de 8 bacterias.

Metodología.

Cepas.

Fueron entregadas por el Sr. Pedro Cedeño 8 cepas bacterianas

Las cepas fueron resembradas en medios de cultivos con el fin de confirmar la viabilidad y pureza y obtener muestras frescas para el proceso de extracción. Las cepas de bacterias fueron sembradas en medio TSA e incubadas a 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo necesario de cultivo de cada grupo (bacteria) se procedió a tomar las respectivas muestras para la extracción de su material genético (ADN genómico).

Extracción de ADN.

Para las cepas bacterianas obtenidas se procedió a extraer su ADN genómico mediante el protocolo para bacterias "TENS" permitiendo así la extracción del ADN correspondiente.

Amplificación por PCR.

El trabajo de amplificación por PCR fue primeramente realizado sobre el gen 16S rRNA.

Secuenciación y análisis de secuencias.

Las secuencias fueron purificadas mediante el Wizard PCR Clean Up System de Promega y enviadas a secuenciar. El alineamiento de las secuencias se realizó empleando el software online Blast (Basic Local Alignment Search Tool), se determinó la homología mediante comparación de las secuencias en el GenBank, y se desarrolló la construcción de árboles filogenéticos de acuerdo a la homología mediante el programa Mega 4 y CLUSTALW.

Resultados.

Las secuencias amplificadas de cada cepa presentaron fragmentos con su respectivo en tamaño.

Secuenciación.

Los productos de las regiones 16SrDNA amplificados para cada cepa fueron secuenciados y analizados en los bancos de datos, obteniéndose los siguientes resultados:

Cepa CED1 (*Escherichia coli* / *Shigella flexneri*)

La cepa no pudo ser recultivada. Sin embargo se realizó la identificación molecular a partir del ADN extraído de la cepa original entregada.

La calidad de la secuencia obtenida no fue buena, probablemente debido a un ADN degradado por falta de viabilidad de la cepa. Los fragmentos secuenciados dieron un 99% de similitud con Cepas de *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*.



Cepa CED2 (*Enterobacteriaceae*)

La cepa fue identificada con solo un 98% de similitud, ubicándola dentro del grupo de *Enterobacteriaceae*, con homologías tanto con cepas de tipo *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae*.

Cepa CED3 (*Escherichia coli*)

La cepa fue identificada con un 99% con cepas de *Escherichia coli* y unos aislados de Bacterias marinas no identificadas asociadas al bacterioplankton.

Cepa CED4 (*Escherichia coli*)

La cepa fue identificada como *Escherichia coli* con un 99% de homología.

Cepa CED5 (*Escherichia coli*)

Esta cepa fue identificada como *Escherichia coli* en un 98% y asociada con las *enterobacteriaceae*.

Cepa CED6 (*Escherichia coli* tipo O55:H7 y O157:H7)

Esta cepa fue identificada al 99% como *Escherichia coli* y muy similar a cepas patógenas de los serotipos O55:H7 y O157:H7.

Cepa CED7 y CED 8 (*Escherichia coli* tipo O111:H y O103:H2)

Las Cepas CED7 y CED8 parecen ser las mismas cepas. Fueron identificadas al 99% como *Escherichia coli* y muy similar a cepas patógenas de los serotipos O111:H y O103:H2.

Conclusión

De las 8 cepas entregadas, solo 7 cepas guardaron viabilidad y fueron criopreservadas. En las identificaciones moleculares, se confirmó la pertenencia a *Enterobacterias*, con una homología del 99% con cepas de *Escherichia coli*, CED3, CED4, CED5, CED6, CED7 y CED8. Las tres últimas tienen un relación de homología con cepas de *E. coli* patógenas, pertenecientes a los serotipos O55:H7, O157:H7, O111:H y O103:H2.

Las cepas CED1 y CED2 tienen una homología compartida entre cepas de *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* o *S. dysenteriae*, repectivamente.





AVÍCOLA SAN ISIDRO S. A. AVISID

INFORME DE ENSAYOS

FECHA DE INFORME:	13 de octubre de 2014	No. De Registro :	2014-50918
DATOS DEL CLIENTE			
CLIENTE:	PEDRO CEDEÑO	CONTACTO:	DR. CEDENO
EMPRESA:	PEDRO CEDEÑO	EMAIL:	pedro.c@hotmail.es
DIRECCION:	Porton de Beata Bloque 15 Villa 11		
TELEFONO:	,0993827323		

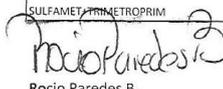
DATOS DE LA MUESTRA	
TIPO DE MUESTRA:	1 POLLITO DE 7 DIAS
GRANJA:	DE
LOTE:	DE
EDAD:	7 dias
DESCRIPCIÓN:	Pollito

RESULTADOS

MUESTRA	MICROORGANISMO	RESULTADOS	
		NUMERO DE AVES ANALIZADAS	NUMERO DE AVES POSITIVAS
1 POLLITO DE 7 DIAS	Escherichia coli	1	1

ANTIBIOGRAMAS

ANTIBIOTICO	Escherichia coli
AMPICILINA	RESISTENTE
AMOXICILINA	RESISTENTE
CIPROFLOXACINA	RESISTENTE
COLISTINA	SENSIBLE
CEFALOSPORINA 3 GENERACION	RESISTENTE
DOXICICLINA	RESISTENTE
ENROFLOXACINA	RESISTENTE
FOSFOMICINA-200	RESISTENTE
GENTAMICINA	RESISTENTE
NDRFLOXACINA	RESISTENTE
OXITETRACICLINA	RESISTENTE
SULFAMETAZOL + TRIMETOPRIM	RESISTENTE


Rocio Paredes B.
Bacteriologa y Laboratorista Clinico

Quito: Vía Conocoto - Amaguaña Km. 9 s/n
Guayaquil: Vía Nobol - Jipijapa a 1000 Mts. Vía Las Mercedes

* Telfs.: 02 2878-108 / 02 2878-111
* Telfs.: 04 2706-080 / 04 2706-042