

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINA Y CONTRA *Toxoplasma gondii*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ENRIQUE ADRIÁN HERRERA AGUIRRE

ASESORES:

MVZ, EPA, MC SOCORRO MAGDALENA ESCORCIA MARTÍNEZ
IB, MC, DR FERNANDO GÓMEZ-CHÁVEZ

CDMX, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi madre, por apoyarme durante toda la vida, por formarme como parte de lo que soy hasta ahora y, a pesar de todas las circunstancias, nunca abandonarme. Ella ha sido mi soporte cuando la tormenta se avecina, podría escribir una tesis completa hablando del agradecimiento que le tengo, siendo este trabajo el reflejo de su gran amor, sabiduría y confianza hacia mí y hacia mi hermano.

A mi abuelita Estelita, que se encuentra en las estrellas, y formó parte de mi educación y de mi formación personal.

A mi pareja, quien ha confiado en mí, me ha acompañado y conmigo ha estado, tanto en los buenos momentos, como en aquellos que no lo son tanto. Hay infinidad de frases y palabras con las que puedo describir su amor, compañía, tolerancia y apoyo hacia mi persona, así que este trabajo es resultado de todas aquellas acciones bondadosas que siempre me ha brindado. Ella me motivó a estudiar esta carrera y, hoy en día, amo lo que hago.

A los integrantes de mi familia que se han preocupado por mi bienestar y que su apoyo ha perseverado a lo largo de los años; en especial a mi hermano Miguel, y a mi padre Enrique, porque, aunque no pude crecer a su lado, siempre me dio herramientas para salir adelante.

A Dios, por darme la vida y obsequiarme día con día la dicha de estar vivo y en compañía de mis seres queridos.

A mis dos asesores, la Dra. Escorcía y el Dr. Fernando, quienes confiaron en mí para poder llevar a cabo este proyecto y que, sin su ayuda, este trabajo no sería tan de buena calidad.

A todos los animales que se vieron involucrados en este proyecto y a aquellos que estuvieron durante mis prácticas profesionales de la licenciatura.

A mis gatos, compañeros tan inocentes, pero que forman parte de mi familia y de mi día a día.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos más cercanos, ya que en estos tiempos de pandemia por COVID-19, puedes darte cuenta de quién realmente está ahí para darte una mano.

A mis asesores, por tenerme paciencia, guiarme de una manera excepcional y darme la oportunidad de trabajar a su lado, aprendiendo de su vasta sabiduría y experiencia en el ámbito profesional y personal.

A todos los profesores que formaron parte de mi educación profesional a lo largo de la licenciatura y a los profesores del departamento de Medicina y Zootecnia Avícola, quienes se esfuerzan diariamente para formar a los mejores médicos veterinarios zootecnistas del país, especialmente a aquellos que me dieron su mano para aprender juntos de su amplia experiencia.

Al Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría y al personal que forma parte de él, por abrirme sus puertas y echar mano de este proyecto.

A los integrantes del hospital donde laboro, quienes me motivaron también para concluir este proyecto. Porque ellos han confiado en mis capacidades y mis deseos de concluir esta etapa.

A la UNAM, la casa de estudios donde me formé desde que ingresé a la preparatoria y que me ha ofrecido todas las herramientas para superarme cada día.

Este trabajo no alcanza la perfección, porque esa sólo Dios la tiene; sin embargo, con este escrito tratamos de llegar a la excelencia.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Tecnología IgY	2
<i>1.1.1 Generalidades</i>	2
<i>1.1.2 Historia</i>	2
<i>1.1.3 Ventajas del uso de IgY</i>	3
<i>1.1.4 Sistema inmune, estructura de la IgY y propiedades</i>	6
<i>1.1.5 Modo de acción de la IgY</i>	9
<i>1.1.5.1 Aglutinación</i>	9
<i>1.1.5.2 Bloqueo de adherencia</i>	10
<i>1.1.5.3 Opcionización</i>	10
<i>1.1.5.4 Neutralización de toxinas</i>	11
1.2 Toxoplasmosis	13
<i>1.2.1 Aspectos epidemiológicos de importancia humana y veterinaria</i>	14
<i>1.2.2 Biología del parásito</i>	17
<i>1.2.2.1 Clasificación taxonómica</i>	17
<i>1.2.2.2 Morfología</i>	18
<i>1.2.2.2.1 Ooquistes y esporozoito</i>	19
<i>1.2.2.2.2 Taquizoito</i>	20
<i>1.2.2.2.3 Bradizoito</i>	22
<i>1.2.3 Ciclo biológico</i>	27

1.2.4	<i>Transmisión</i>	30
1.2.5	<i>Respuesta inmune inducida por Toxoplasma gondii</i>	33
1.2.6	<i>Antígenos de Toxoplasma gondii</i>	35
1.2.6.1	<i>Antígenos de superficie (SAG)</i>	36
1.2.7	<i>Métodos diagnósticos en México y su relevancia clínica</i>	37
1.2.7.1	<i>Prueba de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA, - Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay)</i>	40
1.3	Planteamiento del problema	45
1.4	Justificación	47
1.5	Objetivos	48
1.5.1	<i>General</i>	48
1.5.2	<i>Particulares</i>	48
2.	MATERIAL Y MÉTODOS	48
2.1	Producción de IgYs	48
2.2	Purificación de IgY de yemas de huevos utilizando polietilén glicol (PEG) 6000 de acuerdo con Amro y cols. (2017)	50
2.3	Precipitación con Sulfato de Amonio (NH₄)₂SO₄ de acuerdo con Wingfield (2016)	52
2.4	Obtención de la concentración de IgY en mg/mL mediante espectrofotometría con NanoDrop™	53
2.5	ELISA indirecta para la determinación del título de anticuerpos IgY contra <i>Toxoplasma gondii</i>, con base en lo descrito por Correa y cols. (2000)	54

3. RESULTADOS	57
4. DISCUSIÓN	70
5. CONCLUSIONES	72
6. BIBLIOGRAFÍA	73

Lista de Figuras

Figura 1. Comparación entre la estructura de la IgE, IgY e IgG

Figura 2. Modo de acción de la IgY

Figura 3. Mapa del estatus global de seroprevalencia de *Toxoplasma gondii*

Figura 4. Formas de *Toxoplasma gondii*

Figura 5. Esquema de un ooquiste de *Toxoplasma gondii*

Figura 6. Los tres estadios infectivos de *Toxoplasma gondii*

Figura 7. Corte transversal de un taquizoito de *Toxoplasma gondii* observado con microscopía electrónica

Figura 8. Esquema de un quiste tisular de *Toxoplasma gondii*

Figura 9. Esquema de un acercamiento de la estructura quística de *Toxoplasma gondii*

Figura 10. Fotografía tomada mediante microscopía electrónica de una sección transversal de un quiste tisular de *Toxoplasma gondii*

Figura 11. Corte histológico de una sección de tejido cerebral necrótico

Figura 12. Corte histológico de un quiste tisular en músculo cardíaco

Figura 13. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* en el hospedero definitivo

Figura 14. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* en el hospedero definitivo y en los intermediarios.

Figura 15. Tipos de ELISA

Figura 16. Descripción esquemática del modelo de la placa de ELISA para la titulación del anticuerpo secundario.

Figura 17. Descripción esquemática del modelo de la placa de ELISA para la titulación del anticuerpo primario y del antígeno

Lista de gráficas

Gráfica 1. Representación gráfica de los resultados de la absorbancia (densidad óptica) obtenida a partir de la titulación del anticuerpo secundario

Gráfica 2. Representación gráfica de los valores de absorbancia de la prueba de ELISA para evidenciar la presencia de la IgY anti *Toxoplasma gondii*, utilizando como antígeno al ECTg

Gráfica 3. Representación gráfica de los valores de absorbancia de la prueba de ELISA para evidenciar la presencia de la IgY anti *Toxoplasma gondii*, utilizando como antígeno al rSAG1

Lista de cuadros

Cuadro 1. Conteo total de piezas de huevo con base en el tiempo de inmunización de las aves

Cuadro 2. Valores de la absorbancia (densidad óptica) de la prueba de ELISA para la titulación del anticuerpo secundario

Cuadro 3. Valores de la absorbancia (densidad óptica) de la prueba de ELISA para evidenciar la presencia de IgY anti *Toxoplasma gondii* utilizando como antígenos al ECTg

Cuadro 4. Valores de la absorbancia (densidad óptica) de la prueba de ELISA para evidenciar la presencia de IgY anti *Toxoplasma gondii* utilizando como antígenos al rSAG1

RESUMEN

HERRERA AGUIRRE ENRIQUE ADRIÁN. Producción de Inmunoglobulina Y contra *Toxoplasma gondii* (bajo la supervisión de la M en C Socorro Magdalena Escorcía Martínez y el Dr. Fernando Gómez-Chávez).

La toxoplasmosis es una enfermedad generada por el protozooario intracelular *Toxoplasma gondii*, posee una distribución mundial y es capaz de infectar casi cualquier tipo de célula; con una gran variedad de hospederos intermediarios y un solo hospedero definitivo-el gato-, es considerado como uno de los parásitos con mayor “éxito” a nivel mundial. Fue descubierto hace más de 100 años en un roedor de tamaño pequeño –*Ctenodactylus gundi*- y a partir de ahí se han originado una inmensidad de artículos y libros que investigan y exponen lo relacionado con este parásito.

Por otra parte, desde hace más de 120 años los investigadores descubrieron una proteína proveniente de la yema de huevo de gallina: la inmunoglobulina Y, levantando gran interés en la investigación y usos de este anticuerpo; así como sus múltiples beneficios en la salud. Fue a partir del año 1996 que el término tecnología IgY fue aceptada y del año 2000 en adelante han surgido diversas patentes y se han propuesto usos para este tipo de tecnología.

En el presente trabajo se produjo IgY contra una proteína recombinante de superficie de *Toxoplasma gondii* sintetizada por el Instituto Nacional de Pediatría: el antígeno de superficie 1 recombinante (rSAG1), mediante la inoculación de la misma en gallinas tipo ALPES, mediante la obtención de las piezas de huevo y la purificación de la IgY. Finalmente demostramos la presencia de IgY específica contra este antígeno mediante la técnica de

ELISA. Abriendo el panorama para mejorar el diagnóstico de la enfermedad tanto en animales como en humanos utilizando la tecnología IgY.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tecnología IgY

1.1.1 Generalidades

Se le denomina tecnología IgY al proceso de producción, extracción y al uso de anticuerpos específicos procedentes de la yema de huevo de aves (IgY), cuyo objetivo se basa en la inmunoterapia pasiva y profilaxis, reportando su uso y aplicaciones en el área veterinaria, inmuno-diagnóstico y en la investigación (Schade, 2005; Thu, 2017; Leónidas C, 2020; Tipantiza; 2021).

1.1.2 Historia

El médico internista Felix Klemperer, en 1893, descubrió que las yemas de huevos colectadas, después de la inmunización de gallinas con la toxina tetánica, podían proteger a ratones (mediante inmunidad pasiva) cuando estos fueron inoculados con dosis letales de esa toxina, las llamó “proteínas neutralizantes”. Más tarde, en 1959, Russell y Burch crearon la comunidad científica que se encargaba de temas de bienestar animal y del concepto de las 3R, momento en el cual los aportes de Klemperer fueron retomados; es así como en 1969, Leslie y Clem, acuñaron el concepto IgY para referirse a los anticuerpos de las aves, al evidenciar diferencias significativas con las IgG de los mamíferos. A partir de la década de los 80’s se empezó a desarrollar una amplia variedad de aplicaciones para la IgY, principalmente en labores de investigación, diagnóstico y en la inmunoterapia en medicina

veterinaria (Klemperer, 1893; Leslie, 1969; Chacana, 2004; Schade, 2005 y 2006; Balls, 2010; Leiva, 2020; Leónidas, 2020).

Fue en 1995, cuando el doctor Claus Staak, inventó el nombre de tecnología IgY, relacionado a la producción y aplicación de los anticuerpos provenientes de la yema de huevo. Al siguiente año, el término fue aceptado internacionalmente y, de forma paralela, el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA) recomendó el uso de la tecnología IgY como alternativa al uso de la IgG, fundamentalmente porque se redujo el estrés al no tener la necesidad de obtener muestras de sangre de animales, y lograr conseguir anticuerpos mediante un método no invasivo: coleccionar huevos de gallinas que contengan IgY (Schade, 1996 y 2005; Gruber, 2004; Leónidas, 2020; Tipantiza, 2021). En 1999, la Oficina Veterinaria del Gobierno Suizo (Office Vétérinaire Fédéral) aprobó el uso de la tecnología IgY como alternativa para salvaguardar el bienestar animal (Anon, 1999; Schade, 2005).

1.1.3 Ventajas del uso de IgY

Entre las más destacadas se encuentra que 1) la IgY se obtiene mediante la recolección directa del huevo y no mediante la obtención de muestras sanguíneas, reemplazando el sangrado de los animales, influyendo directamente en la reducción del estrés y de prácticas que pueden llegar a ser dolorosas para los animales que forman parte de los procesos de investigación, docencia, etc. (Gruber, 2004; Leónidas, 2020). 2) Económicamente hablando, esta tecnología posee inmensas ventajas debido a que el gasto que se hace al criar un conejo es similar al de criar una gallina, pero un ave puede producir de 50-100 mg de IgY por huevo, considerando que las actuales líneas genéticas pueden llegar a poner más de 300 piezas de huevos al año, la cantidad de IgY que una gallina de estas puede producir es de 15,000 a

30,000 mg o más por año y así producir grandes cantidades de anticuerpos y, con esto, facilitar la inmunoterapia en medicina humana y veterinaria; mientras que un conejo sólo produce alrededor de 200 mg de IgG y este debe de ser sacrificado al momento de la toma de muestra; esto se traduce en que, para sintetizar una cantidad similar de inmunoglobulinas, se necesitaría de la producción de 4.3 conejos por año y tan solo de una gallina en ese mismo periodo de tiempo (**Schade 2000, 2005 y 2007; Chacana, 2004; Terzolo, 2010; Li, 2015**).

Otra ventaja importante sobre el uso de esta tecnología es que 3) se puede producir IgY contra proteínas altamente conservadas de mamíferos, es decir, las aves pueden producir más eficazmente anticuerpos contra proteínas humanas debido a la distancia filogenética y la diferencia que existe entre las secuencias de proteínas de mamíferos y de las aves. Entre mamíferos, las secuencias de los aminoácidos de hormonas y otras proteínas son muy similares; por ejemplo, la diferencia entra la insulina humana y la porcina es de únicamente un aminoácido, mientras que esta misma hormona difiere en siete aminoácidos cuando se compara con la de las aves. Otro ejemplo lo tenemos al inmunizar a un conejo con una proteína de un mamífero (humano), el sistema inmune de este animal no es capaz de reconocer a dicho antígeno como extraño; en cambio, al inmunizar a un ave, la probabilidad de que genere una respuesta inmune más efectiva es mayor (**Larsson 1993; Terzolo, 2010**).

4) Relacionado con el mismo concepto, se requiere una menor cantidad de antígeno para lograr inducir una respuesta inmune más efectiva en el ave, comparado con los mamíferos (**Larsson, 1998; Li, 2015**).

5) Los anticuerpos de las aves no activan el sistema del complemento, así lo demostró Käpyaho en 1989 en su ensayo inmunométrico cuando sus resultados fueron inefectivos en un 40% debido a que el complemento evitaba la unión del antígeno (hormona estimulante de

la tiroides (TSH, thyroid-stimulating hormone) con los anticuerpos; demostrando más adelante que los anticuerpos IgY evitaban esa interferencia (**Larsson, 1992**). Los receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las IgG proveen de un puente entre la respuesta inmune humoral y la celular (fagocitosis, endocitosis, citotoxicidad y mediadores inflamatorios), por este hecho, cuando se genera la unión entre el anticuerpo y el antígeno, resulta en la formación de un complejo inmune, que interactúa con los receptores de la Fc y del complemento sobre la célula, lo cual puede ser causa de cambios en la expresión de proteínas de superficie y de errores cuando se mide la activación plaquetaria. 6) Con el uso de la tecnología IgY, este evento de inflamación inespecífica no se presenta, siendo la IgY la elección para pruebas de ELISA y evitar falsos positivos (**Lindahl, 1992; Van de Winkel, 1993; Larsson, 1993**). 7) La IgY no se une a la proteína A (por ejemplo, de *Staphylococcus aureus*) ni a la proteína G (de esteptococos), evitando que, si estas bacterias se encuentran suspendidas en la muestra, no se generen reacciones falsas positivas; así como tampoco se unen al factor reumatoide (autoanticuerpo del tipo IgM producido contra la porción Fc de la inmunoglobulina G) (**Katz, 1985; Kastern, 1990; Engström, 1993; Larsson, 1993; Carlander, 2000**).

8) No se generan efectos secundarios adversos cuando los pacientes tratados son alérgicos al huevo o a la albúmina, ya que, durante el proceso de purificación, estas proteínas se eliminan (**Abbas, 2018**). Comparado con la vacunación, 9) la inmunoterapia pasiva con IgY posee una rápida respuesta de acción local, una gran actividad específica y, como resultado, puede ser aplicable en pacientes con un amplio rango de edad: incluyendo a recién nacidos, a individuos inmunocomprometidos y a embarazadas (**Rahman, 2013; Constantin, 2020**). 10) Es un anticuerpo altamente versátil, es decir, permite su uso como anticuerpos monoclonales

(anticuerpos sintetizados por una sola célula madre B y reconocen un mismo epítipo), policlonales (anticuerpos sintetizados por diferentes clones de células B y tienen la capacidad de reconocer diferentes epítipes de un solo antígeno), fragmentados o quiméricos (**Harley, 2016; Tipantiza, 2021**). 11) Estos anticuerpos IgY presentan la ventaja de ejercer un efecto antimicrobiano, e inmunoestimulante debido a la presencia de algunas proteínas, como la fosfoproteína fosvitina y derivados del ácido siálico (poseen propiedades antivirales). Estas proteínas se pueden hallar en las preparaciones de IgY comerciales en forma de huevo, polvo o yema en polvo (**Brady 2002; Zhang, 2019; Tipantiza, 2021**).

1.1.4 Sistema inmune, estructura de la IgY y propiedades

En el reino animal, existen diferentes mecanismos de protección contra microorganismos invasores, sustancias desconocidas y contra células malignas o tumorales. Como defensa, el sistema inmunológico en vertebrados se puede clasificar como innato y adquirido. Este último se divide en la rama celular (linfocitos T y B) y en la rama humoral (producción de anticuerpos). Los órganos que forman parte del sistema inmune de las aves se dividen en primarios (bolsa de Fabricio y timo) y en secundarios (bazo, glándula de Harder, nódulos linfáticos, médula ósea y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, mucosa-associated lymphoid tissue)). La médula ósea es la fuente de células madre que migran al timo y a la bolsa de Fabricio, es en esos dos órganos donde esas células se diferencian en células T y B, respectivamente. Mientras que el bazo es el encargado de albergar y donde proliferan las células plasmáticas; así mismo, las células B de memoria se pueden localizar en este mismo órgano secundario (**Erhard, 2000; Carlender, 2002; Janeway, 2002**).

La estructura general de la molécula de la IgY (**Figura 1**), isotipo de inmunoglobulina secretada por aves, anfibios, reptiles y peces pulmonados, consiste en dos cadenas pesadas y

en dos cadenas ligeras. El peso molecular fue obtenido mediante espectrofotometría de masas, pesando aproximadamente 167,250 Da. La cadena pesada (con un peso molecular de 65,105 Da) se indica con la letra griega “ ν ”, y posee un dominio variable y cuatro dominios constantes (CH1-CH4). Por otro lado, la cadena ligera (con un peso molecular de 18,660 Da) está compuesta por un dominio variable y uno constante. El fragmento Fab pesa 45,359 Da. La región de bisagra, comparada con la de la IgG de los mamíferos, no está presente, por lo tanto, la IgY pierde cierta flexibilidad, razón por la cual su capacidad para precipitar antígenos es reducida; no obstante, esa característica le confiere un mejor reconocimiento de los antígenos, es decir, tiene una mayor especificidad; además le otorga una mayor resistencia a la degradación y fragmentación proteolítica. La Fc corresponde al sitio de mayor interacción biológica y funciones efectoras, posee dos cadenas de carbonos hidratadas (la IgG mamífera tiene sólo una) (Faith, 1973; Cser, 1982; Noll, 1982; Shimizu, 1992; Sun, 2001; Schade, 2005; Spillner, 2012).

La inmunoglobulina Y es estable a temperaturas de entre 30°C a 70 °C; sin embargo, cuando se mantiene a más de 70°C durante 15 minutos, su capacidad de unión a los antígenos disminuye y, cuando la temperatura aumenta a 75°C o más, se desnaturaliza. Soporta una presión de 4,000 kg por cm². A pesar de ello, cuando se le adicionan altos niveles de sacarosa, maltosa, glicerol, o glicina, se le confiere protección adicional para evitar cambios debido a la desnaturalización. Además de lo anterior, se ha demostrado que el pH en el que la IgY puede ejercer bien sus funciones va desde 3.5 a 11. No obstante, cuando esta inmunoglobulina se encuentra en presencia de sorbitol, conserva cierta estabilidad (Lee, 2002; Rahman, 2013).

Este isotipo de anticuerpo es resistente a la inactivación por tripsina y por quimotripsina, pero es vulnerable a la acción de la pepsina (aunque con pH mayores a 5, puede conservar su actividad aglutinante y permanecer unida al antígeno, perdiendo dichas capacidades a pH de 4.5 o menor en presencia de esta última enzima) (Hatta, 1993; Rahman, 2013).

Existen diferentes técnicas para preservar la actividad de la IgY ante microambientes que, normalmente, dañan su función, por ejemplo, la disolución de amortiguador de carbonato de sodio, encapsular en liposomas, liposomas con lecitina o colesterol de huevo y polisacáridos como el alginato-quitosano, que forman películas con buena barrera al oxígeno (Rahman, 2013; Del Ángel, 2019). Se ha demostrado que al administrar IgY encapsulada, los cerdos que se encuentran bajo un cuadro de colibacilosis entérica se recuperan más rápido (Li, 2009); además la goma arábiga en combinación con la congelación y el secado preservan la actividad de IgY, protegiéndola de la hidrólisis enzimática de la pepsina, la tripsina y de la quimotripsina (Chang, 1999).

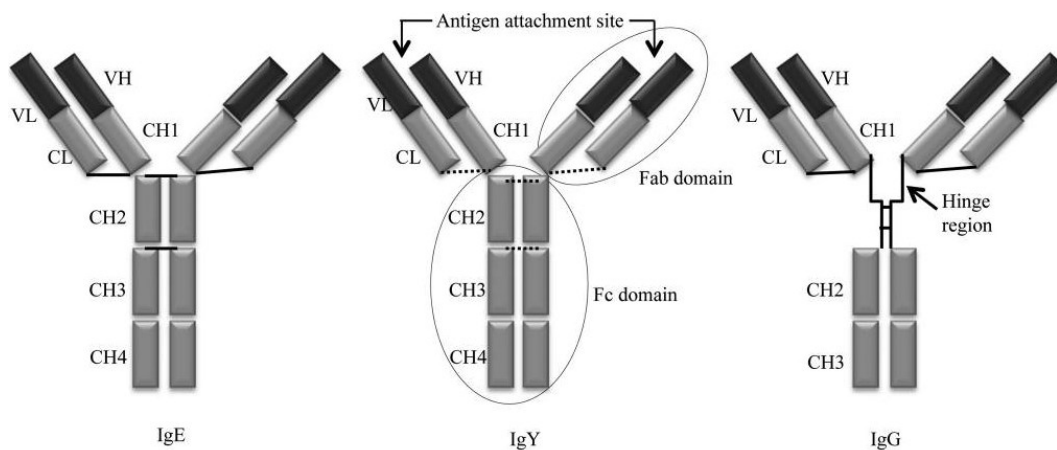


Figura 1. Comparación entre la estructura de la IgE, la IgY y la IgG. La IgY posee dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las primeras, consisten en un dominio variable (VH) y cuatro dominios constantes (CH1-CH4). Las dos cadenas pesadas están unidas

mediante puentes disulfuro. La cadena ligera cuenta únicamente con un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La región Fab (fragment antibody o fracción de anticuerpo) corresponde a aquella que se une a los epítopes de los antígenos; mientras que la región Fc (fragment crystallizable o fracción cristalizabile) tiene funciones efectoras biológicas. Nótese que los dominios constantes CH1 y CH2 de la IgG están unidos mediante una región de bisagra (hinge region), mientras que la IgY carece de esta unión.

Tomado de Rahman. (2013).

1.1.5 Modo de acción de la IgY

Actualmente se conocen los mecanismos de acción (**Figura 2**) de estos anticuerpos para ejercer sus funciones. Se sabe que combinan funciones de la IgG (fijar antígenos y opsonizar) y de la IgE (mediador de reacciones anafilácticas o de hipersensibilidad tipo 1) (**Lundqvist, 2006; Thirumalai D, 2019; Tipantiza, 2021**).

1.1.5.1 Aglutinación

La IgY tiene la capacidad de aglutinar antígenos (hongos, virus, bacterias), es decir, los inmoviliza y pueden ser eliminados más fácilmente. En otras palabras, funcionan como un “adhesivo biológico” para evitar la propagación de los microorganismos, limitar su movimiento y poder eliminarlos por medio del intestino (**Thu, 2017; Tipantiza, 2021**).

Tsubokura y cols., mediante su trabajo comprobaron lo anterior: inmunizaron a gallinas intramuscularmente con diferentes cepas de *C. jejuni*, recolectaron las piezas de huevos para extraer los anticuerpos, administraron vía oral a distintas cepas de la misma bacteria y

simultáneamente les administraron preparaciones con inmunoglobulinas a pollos de 22 días de edad, logrando una reducción del 99% de las bacterias contenidas en el intestino y un aumento del 80-95% del conteo total de bacterias en las heces (Tsubokura, 1997).

1.1.5.2 Bloqueo de adherencia

Este mecanismo es el principal modo de acción de la IgY: inhibe la adhesión de los antígenos a la superficie celular y con esto evita la propagación entre las células (mecanismo utilizado comúnmente por los virus). Lo mencionado anteriormente se debe a la gran especificidad de los anticuerpos IgY porque estos se unen a los epítopes específicos de cada antígeno (Abbas, 2018). Dicha característica se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* contra ciertos patógenos. Por ejemplo, Jin y cols., comprobaron que la presencia de la IgY evitaba la adherencia (en un 84.6 - 97.0%) de la bacteria *Escherichia coli* K88 enterotoxigénica a la mucosa intestinal de lechones de alrededor de 14 días de edad (Jin, 1998; Lee, 2002; Abbas, 2019).

La IgY posee la capacidad para unirse a distintos componentes de la superficie de bacterias gram-negativas, por ejemplo a las fimbrias o pili, a los flagelos, al lipopolisacárido (LPS) entre otras proteínas de membrana (Xu, 2011; Abbas, 2019). Gracias a este fenómeno, las funciones normales de la bacteria (como el crecimiento, producción y liberación de toxinas) se limitan y disminuyen significativamente (Xu, 2011).

1.1.5.3 Opsonización

Diversos estudios proponen que cuando la IgY se une a un patógeno, este último sufre alteraciones estructurales en su superficie, volviéndolo susceptible a la fagocitosis; similar a lo que Lee y cols. señalan en su experimento, en el que descubrió que la unión de IgY anti *Salmonella typhimurium* a la superficie de esa bacteria, generaba cambios conformacionales.

En otro estudio *in vitro* se demostró que bacterias viables del género *P. aeruginosa* podían ser reducidas en un 87% cuando se utilizaba IgY anti-*P. aeruginosa*, esto como consecuencia de la aglutinación, inmovilización, opsonización y posterior fagocitosis, demostrado mediante inmunofluorescencia indirecta (Lee, 2002; Nie, 2004; Thomsen, 2015; Abbas, 2019).

Así como también lo demostraron Zhen y cols., cuando inmunizaron a gallinas de 120 días de edad con *E. coli* O111, colectaron las piezas de huevos, aislaron y purificaron la IgY (86% de pureza) (con ELISA detectó la especificidad de las IgY contra esa cepa de *E. coli*). Obtuvieron células polimorfonucleares (PMN) y macrófagos (MΦ) de la leche de vacas Holstein sanas, las resuspendieron en PBS y agregaron IgY específica contra *E. coli* y no específica a leche de vacas con mastitis (de las cuales se aisló la cepa bacteriana), evidenciando que la actividad fagocítica de los PMN y de los MΦ incrementó en 59.95-86.45% y 57.81-84.17%, respectivamente, cuando estuvo presente la IgY específica (Zhen, 2008).

1.1.5.4 Neutralización de toxinas

La inmunoglobulina Y posee la capacidad de inhibir indirectamente la actividad de los microorganismos, es decir, puede actuar sin tener contacto con el patógeno gracias a su capacidad para neutralizar a las toxinas que son secretadas por diferentes bacterias (Abbas, 2019; Tipantiza, 2021). Por ejemplo, Arimitsu y cols. evaluaron la actividad de la toxina Shiga 2e (Stx2e, enzima producida por *E. coli*, capaz de producir la enfermedad del edema en lechones de 1 a 2 semanas de edad, provocando signos neurológicos; así como también es

la causante del síndrome urémico hemolítico en humanos): produjeron IgY anti-toxina Shiga 2e inoculando a gallinas de 5 meses de edad con 200 µg de la toxina atenuada, colectando las piezas de huevo y purificando la IgY anti-toxina Shiga 2e, obteniendo los títulos de IgY mediante ELISA y cerciorándose de las especificidad de la misma mediante western blot. Posteriormente, realizaron ensayos *in vitro* con células Vero (linaje celular derivado del riñón del mono verde africano), cuyo objetivo fue evaluar la neutralización de dichas toxinas cuando a estas células se les desafió con dosis letales de esa proteína, sobreviviendo aproximadamente el 20% del total de las células. Por otra parte, tenemos al ensayo *in vivo*, en el que se inoculó una solución con PBS, IgY anti-Stx2 y la toxina Stx2e a diferentes concentraciones, vía intraperitoneal a ratones, sobreviviendo alrededor del 40% de los ratones a los que se les administró la dosis más alta, el 100% de los animales inoculados con concentraciones más bajas lograron sobrevivir. Concluyendo que las IgY específicas contra la toxina, tuvieron la capacidad de neutralización de toxinas (Arimitsu, 2014).

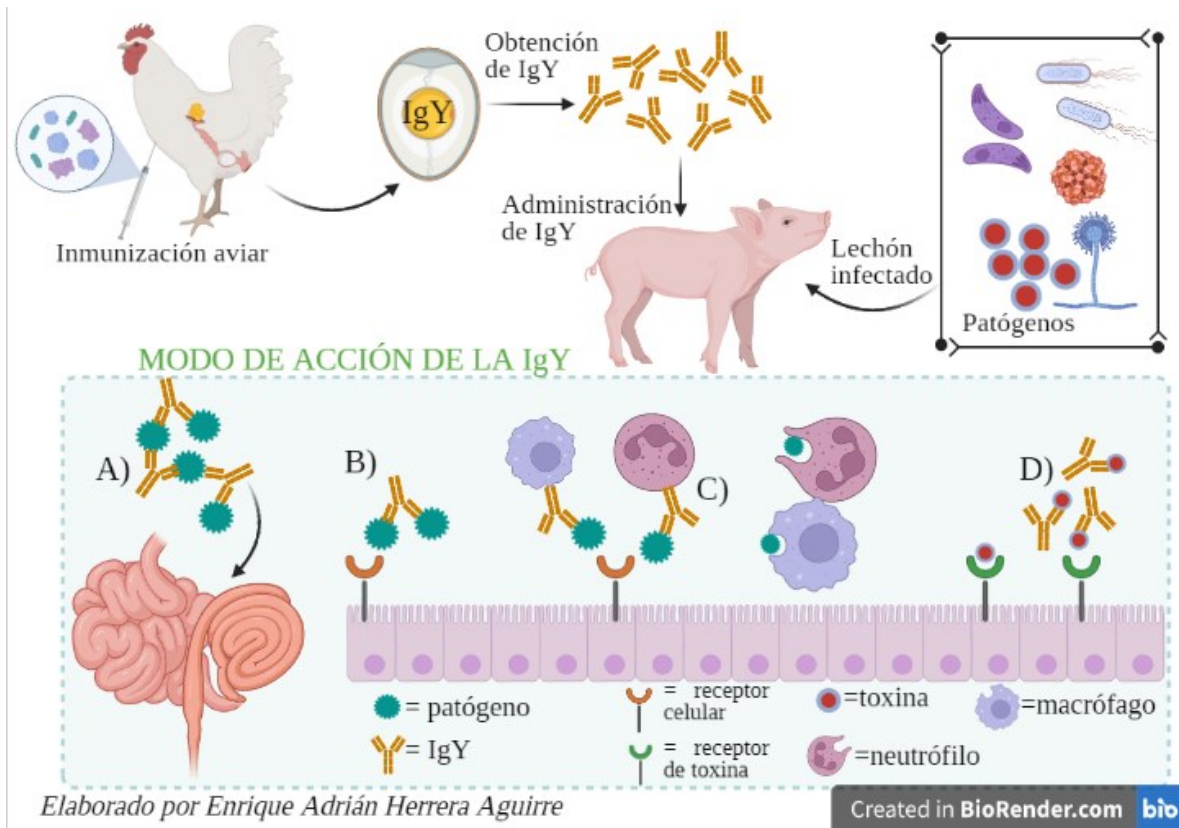


Figura 2. Modo de acción de la IgY. A) Aglutinación y posterior eliminación intestinal. B) Bloqueo de adherencia. C) Oponización y posterior fagocitosis. D) Neutralización de toxinas. Elaborado por Herrera, 2022. Basado en: Xu, 2011; Abbas, 2019; Tipantiza, 2021.

1.2 Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una enfermedad ubicua causada por el protozoo *Toxoplasma gondii*, la seropositividad se puede hallar hasta en un tercio de la población mundial; afecta a animales de sangre caliente (homeotermos) terrestres y acuáticos, todos estos funcionando como hospederos intermediarios. Los gatos y otros felinos silvestres actúan como hospederos definitivos, en los que el parásito puede ser eliminado por las heces en forma de ooquistes, la fase infectante de *Toxoplasma gondii* (Quiroz, 1988; Correa, 2017).

La importancia que ha adquirido este parásito intracelular obligado se debe a que posee un impacto socioeconómico y de salud pública, específicamente en niños que hayan adquirido una infección de tipo congénita pudiendo ser la causa de abortos, muerte neonatal, hidrocefalia, macrocefalia, retraso mental y ceguera (**Quiroz, 1988; Dubey, 2002**).

Sin embargo, también puede generar complicaciones clínicas en pacientes que cursan con eventos de inmunosupresión secundaria a enfermedades como el VIH, o en aquellos pacientes con enfermedad oncológica y que reciban tratamiento con quimioterapéuticos; así como individuos que hayan recibido un trasplante de órganos o cursen con enfermedades linfoproliferativas. Estas afecciones podrían generar que una infección que permanecía latente se reactive y cause enfermedad clínica (**Jones, 2003**).

Por las características descritas, es considerada una zoonosis; además, el tejido que llega a estar en contacto con el parásito llega a sufrir daño por una destrucción inducida por el mismo protozooario y depende íntimamente de la virulencia que posea la cepa que esté involucrada. Así la virulencia es categorizada como tipo I, tipo II y tipo III, en la que la primera es la más virulenta, la segunda es mucho más común y menos patogénica y la última no es común y puede variar fenotípicamente. De igual forma, existen cepas recombinantes y atípicas (**Correa, 2007**).

1.2.1 Aspectos epidemiológicos de importancia humana y veterinaria

La toxoplasmosis posee una mortalidad y morbilidad aparentemente bajas, pero representa un problema serio cuando se involucra con grupos de individuos que presentan factores de riesgo como mujeres embarazadas o inmunosuprimidos; así como también la incidencia

puede variar debido a aspectos geográficos, socioeconómicos y el estilo de vida de las poblaciones de estudio (**Pereira, 2002**).

En recién nacidos, la seroprevalencia de anticuerpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii* es de entre 0.06% hasta 93% y puede ir ligado con muertes fetales y hepatomegalia neonatal. La prevalencia de la toxoplasmosis congénita depende de la zona geográfica, por ejemplo: en Colombia la relación establecida es de 2 a 10 casos por cada 1000 nacidos vivos; mientras que en Suecia la relación reportada es de 1 por cada 10,000 nacidos vivos (**Rojas, 2021**).

Por otra parte, en mujeres de edad fértil la prevalencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* es de entre 18% y 88.7%, indicando probablemente que los individuos dentro de este grupo estén infectados de manera crónica. Mientras que para los anticuerpos IgM este porcentaje va de 1.34% a 30.9%, sugiriendo que esos individuos puedan estar cursando por una infección de tipo aguda (**Alba, 2011; Aykar, 2011; Wam, 2016; Rojas, 2021**).

La presencia de inmunoglobulinas G (IgG) anti-*Toxoplasma gondii* en individuos con inmunosupresión (100% pacientes con VIH/SIDA) tiene un porcentaje que varía de entre 8.8% y 94.3%. De aquí proviene la importancia de llevar a cabo un diagnóstico precoz de la enfermedad para así poder evitar complicaciones médicas (**San Miguel, 2010; Niguieli-Cawich, 2017; Dávila, 2020; Rojas, 2021**).

En otro estudio, se estimó que la seropositividad en adultos mayores de 45 años que viven en Brasil es de 80%, poniendo de manifiesto el continuo riesgo de contraer la infección a lo largo de la vida (**Pereira, 2002**).

La encuesta Nacional Seroepidemiológica, que se llevó a cabo en México en el año de 1992, arrojó una prevalencia promedio del 32%, teniendo variaciones que se hallan de entre 13% y

64% en zonas del norte del país y en zonas costeras, respectivamente (**Galván-Ramírez, 2012; Alvarado-Esquivel, 2010 y 2013; Jazmín, 2015**).

Los cuadros clínicos asociados a la toxoplasmosis congénita en animales se centran fundamentalmente en pequeños rumiantes, así como las implicaciones económicas que genera la enfermedad en estas especies, esencialmente en animales gestantes que adquieren una primoinfección. La mayoría de estos reportes provienen de países como Australia, Nueva Zelanda, Inglaterra e Irlanda (**Gorman, 1993**).

Cuando un pequeño rumiante (oveja o cabra) no gestante se infecta por alguna de las vías de transmisión, la infección por la que cursa el animal es transitoria y de pocas consecuencias clínicas y/o económicas. Sin embargo, cuando se infecta un hospedero que se encuentra en periodo de gestación, el parásito tiende a generar lesiones graves en el feto y en la placenta, provocando así abortos y muerte perinatal (**Gorman, 1993; Esnal, 2020**).

En un trabajo realizado por la empresa Ovino TG en España en el 2019, cuyo conteo total de animales fue de 2000 ovejas, se reportó un brote de toxoplasmosis; las pérdidas económicas de diferentes áreas de la producción sumaron alrededor de 7338 euros que no ingresaron a la empresa, agregando el costo de alimentación por día de las ovejas que no entraron en ordeño (1269 euros) da un total de 8607 euros de pérdidas económicas. La tasa de abortos antes del brote era de 0.5%, ascendiendo al 12.5% cuando se presentó la enfermedad (**Tejerina, 2019**).

En la **Figura 3** se muestra la seroprevalencia del parásito en el mundo, abarcando lugares como China, que posee menos del 10% de positividad a la presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*, hasta países como Brazil en el que la presencia de anticuerpos puede llegar hasta el 60% (**Pappas, 2009**).

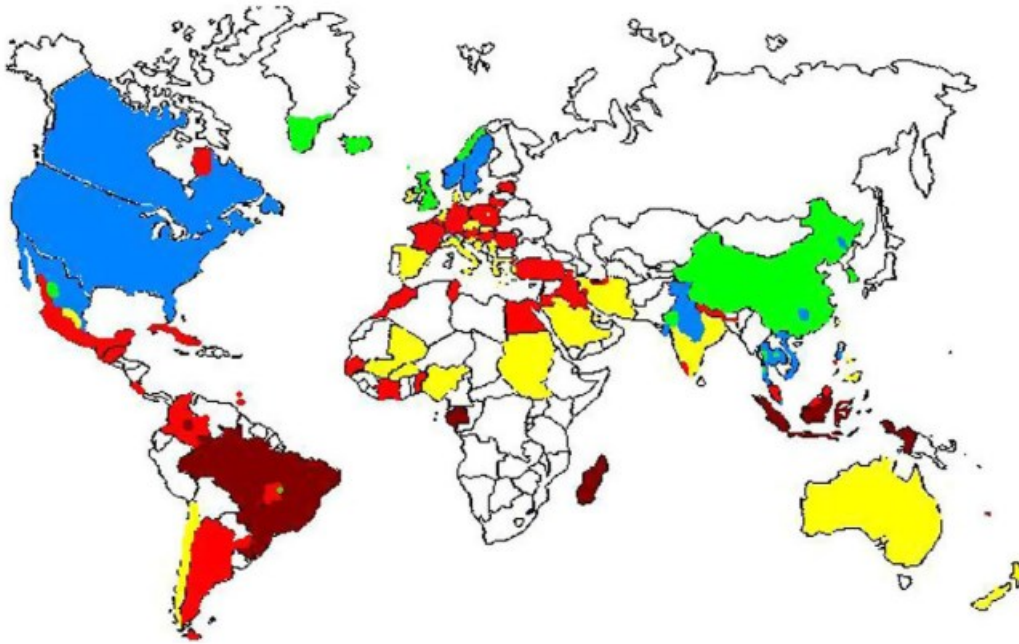


Figura 3. Mapa del estatus global de seroprevalencia de *Toxoplasma gondii*. Rojo oscuro: 60%, rojo claro: 40-60%, amarillo: 20-40%, azul: 10-20%, verde: <10% y blanco representa a las zonas donde no se cuenta con datos estadísticos. Tomado de Pappas. (2009).

1.2.2 Biología del parásito

1.2.2.1 Clasificación taxonómica

Toxoplasma gondii proviene de la raíz griega *toxon*, que significa arco, y de *gondi*, roedor pequeño proveniente de África, del que fue aislado a partir de células mononucleares del bazo y el hígado al parásito (Grandía, 2013; Correa, 2017).

Fue clasificado inicialmente con base en el tipo de hospedero, teniendo nueve especies. Más tarde, mediante investigaciones acerca del ciclo biológico y sus características

inmunológicas, se llegó a la conclusión de que todas eran idénticas, por lo tanto, se les agrupó bajo una misma especie: *T. gondii* (Gómez, 2004).

El parásito se clasifica de la siguiente forma:

Dominio: Eukariota

Reino: Protista

Phylum: Protozoa

Subphylum: Apicomplexa

Orden: Eucoccidiorida

Suborden: Eimeriina

Familia: Sarcocystidae

Subfamilia: Toxoplasmatinae

Género: *Toxoplasma*

Especie: *Toxoplasma gondii* (Petersen y Dubey, 2001; CABI, 2021).

1.2.2.2 Morfología

Para todos los hospederos existen tres estadios infecciosos: esporozoitos, son la forma resistente al medio ambiente, se hallan en los ooquistes esporulados, los taquizoitos y los bradizoitos (Jones y Dubey, 2010; Grandía R, 2013).

1.2.2.2.1 *Ooquistes y esporozoito*

Los ooquistes, que se encuentran en las heces del gato, pueden presentarse sin esporular (**Figura 4**), su forma es subesférica a esférica y miden de 10 a 12 μm de diámetro, en su interior posee un esporonte, y, con condiciones ambientales ideales de humedad y temperatura, estos maduran a ooquistes esporulados (**Figura 4**), miden de 11 a 13 μm y tienen forma subesférica a elipsoidal. El esporonte madura y se divide en dos esporoblastos y estos a su vez dan origen a dos esporoquistes (**Figuras 4 y 5**), cada uno mide de 6-8 μm y contienen cuatro esporozoitos (**Figura 4, 5 y 6**), es decir, 8 esporozoitos por cada ooquiste (**Quiroz, 1988; Dubey, 2010; Grandía, 2013**).

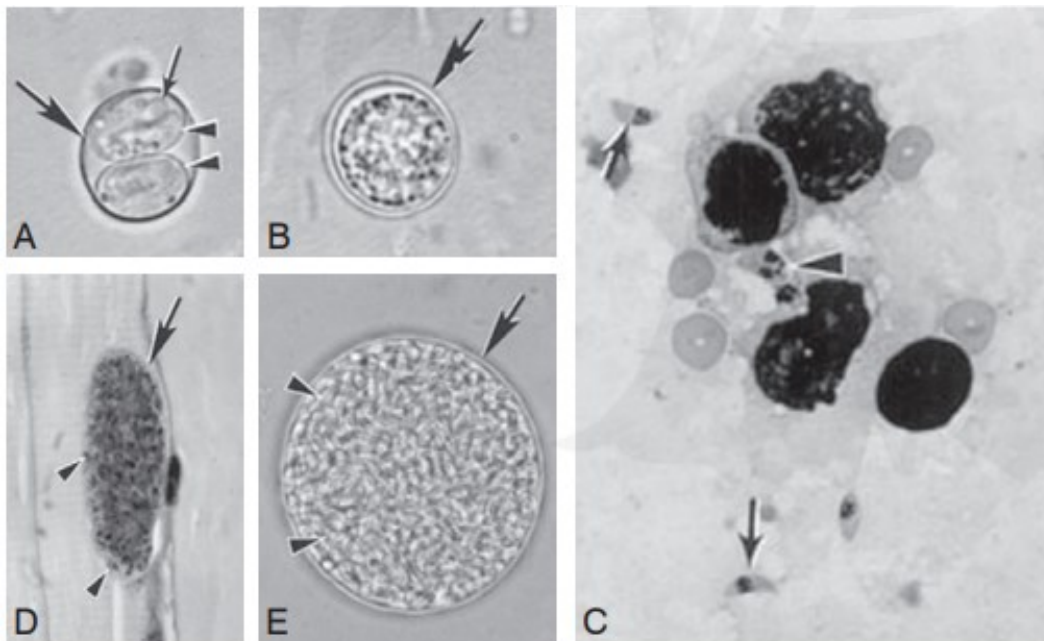


Figura 4. Formas de *Toxoplasma gondii*. A: ooquiste esporulado (maduro); B: ooquiste sin esporular; C: taquizoitos en tejido pulmonar; D: quiste tisular en un corte de músculo; E: quiste tisular en un corte de cerebro. Tomada de: Giraldo M. (2008).

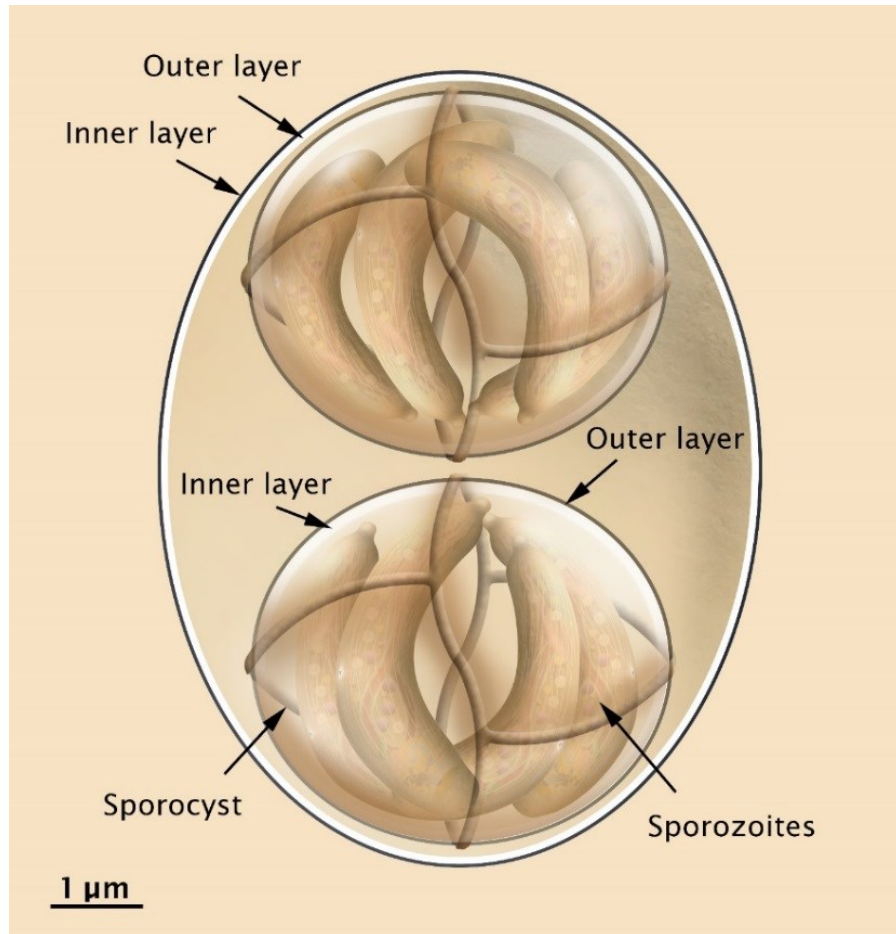


Figura 5. Esquema de un ooquiste de Toxoplasma gondii. Contiene dos esporocistes y estos a su vez contienen a cuatro esporozoitos. Inner layer: capa interna del ooquiste y del esporociste, respectivamente; outer layer: capa externa del ooquiste y del esporociste, respectivamente, sporocyst: esporociste y sporozoites: esporozoitos. Tomada de: Attias

M, Teixeira D y De Souza W. (2020).

1.2.2.2 Taquizoito

Poseen forma de medialuna, de coma o de punta de flecha curvada; miden 2 x 6 µm y poseen un núcleo que se puede encontrar casi en el centro de la célula (**Dubey, 2010**). Es un estadio asexual de rápida división y a la célula hospedera en cuyo interior se encuentran numerosos taquizoitos se le llama pseudoquiste (**Figuras 4, 6 y 7**) (**Quiroz, 1988**).

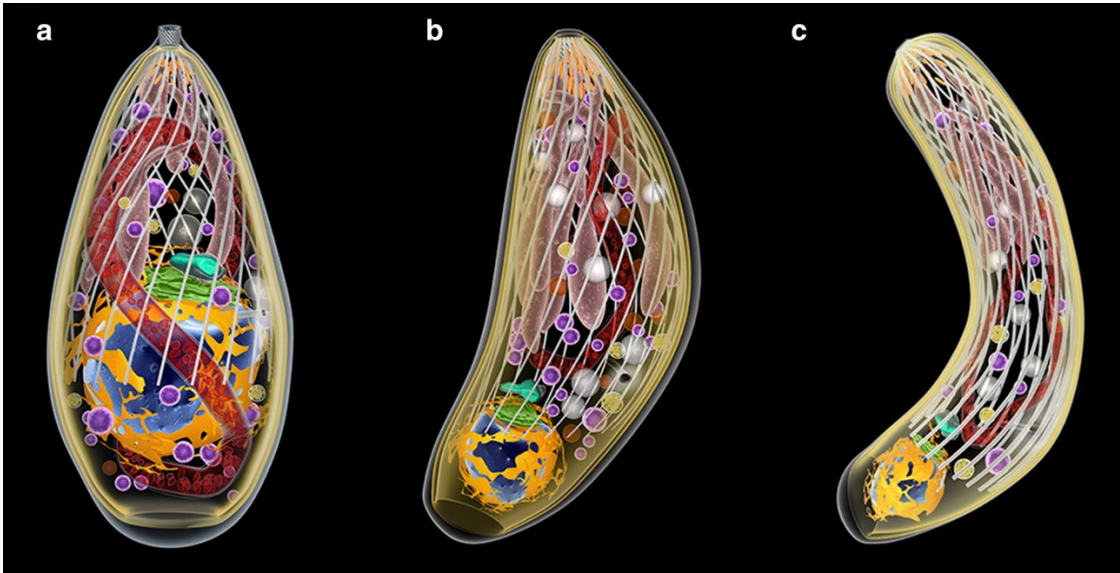


Figura 6. Los tres estadios infectivos de *Toxoplasma gondii*. a) taquizoito, b) bradizoito y c) esporozoito. En esta imagen se pueden observar los diferentes orgánulos que conforman a la célula. El núcleo (azul) está rodeado por el retículo endoplásmico rugoso (amarillo). Encima se encuentra el aparato de Golgi (verde) y el apicoplasto (azul-verdoso). La única mitocondria dispersa en el citoplasma (rojo). Gránulos densos (magenta, son orgánulos secretores) y los de amilopectina (blancos) distribuidos en el citoplasma. En el polo apical se encuentra el conoide cilíndrico y por debajo están los otros dos orgánulos secretores: micronemas (anaranjado) y roptrias (rosa). El cuerpo celular está rodeado por tres unidades de membrana celular y a lo largo de la célula están los microtúbulos. Tomada de: Attias M, Teixeira D y De Souza W. (2020).

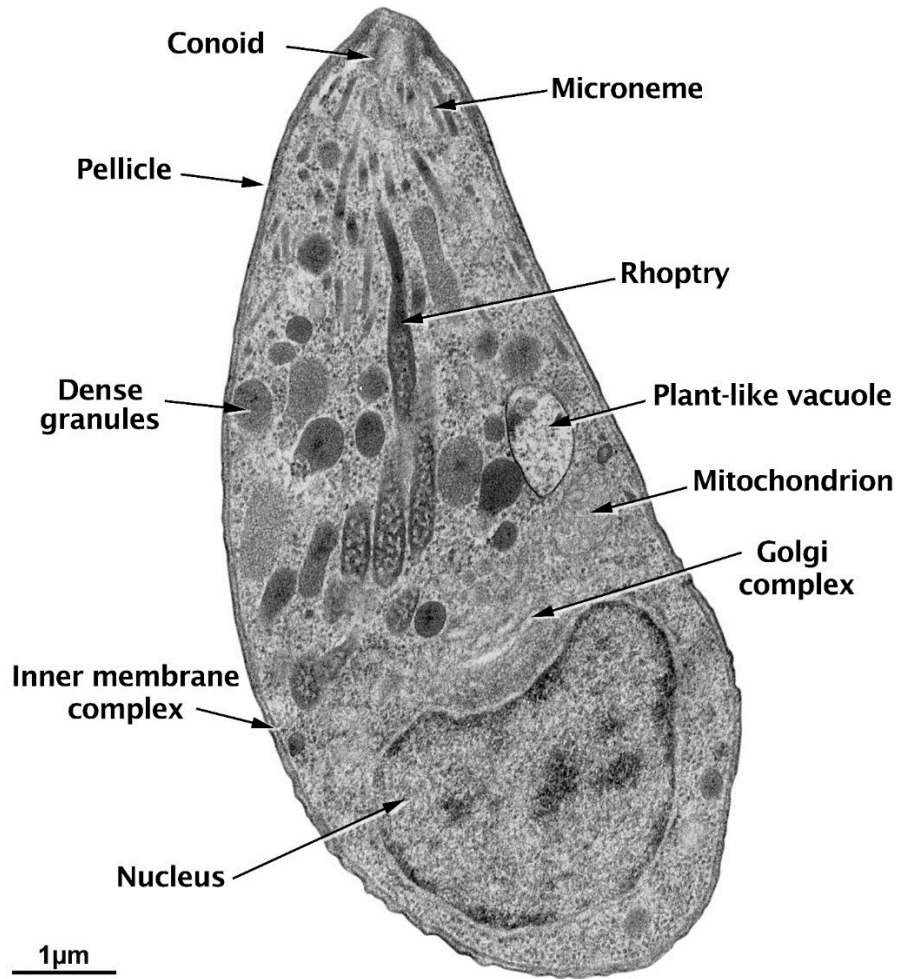


Figura 7. Corte transversal de un taquizoito de *Toxoplasma gondii* observado con microscopía electrónica. Conoid: conoide, microneme: micronema, rhoptry: roptria, plant-like vacuole: vacuolas lipídicas, mitochondrion: mitochondria, golgi complex: aparato de Golgi, nucleus: núcleo, inne membrane complex: porción interna del complejo de membrana, dense granules: gránulos densos, pellicle: membrana. Tomada de: Attias M, Teixeira D y De Souza W. (2020).

1.2.2.2.3 Bradizoito

Se hallan dentro de los quistes tisulares (**Figuras 4, 8, 9 y 10**). Los quistes pueden poseer diversidad de tamaños; los más jóvenes llegan a medir 5 µm de diámetro y contienen

únicamente a dos bradizoitos, mientras que los más viejos pueden contener a cientos de estos microorganismos y llegar a medir hasta 70 μm a 100 μm , dependiendo si se encuentran en cerebro (**Figura 11**) o en músculo (**Figura 12**), respectivamente. Cada bradizoito mide 7 x 1.5 μm . Comparados con los taquizoitos, los bradizoitos son más delgados, con un núcleo posterior y son más resistentes a la acción de enzimas proteolíticas (**Grandía, 2013**).

Los bradizoitos (**Figuras 4, 6, 8, 9 y 10**) son otra fase asexual, pero de lenta división celular (**Quiroz, 1988**).

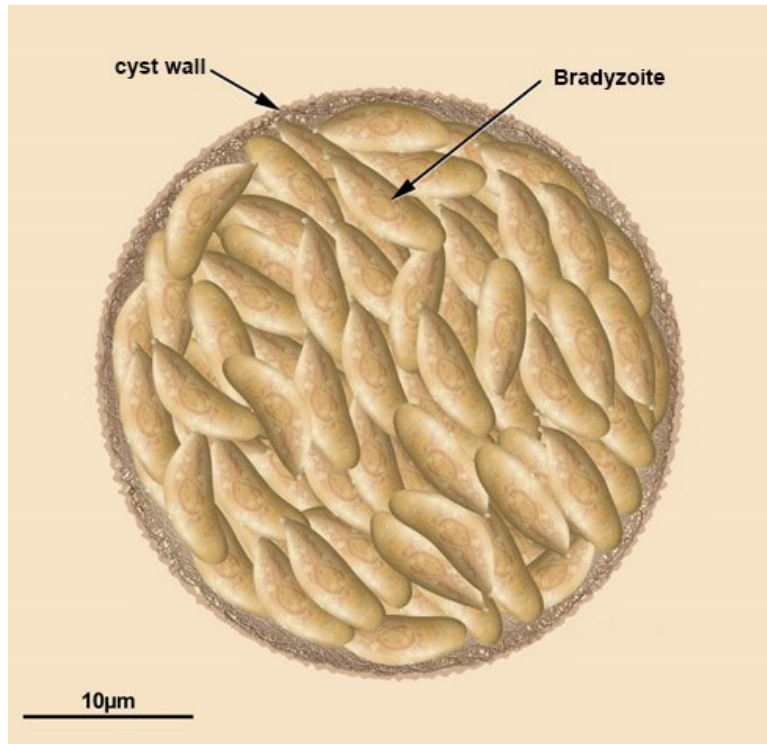


Figura 8. Esquema de un quiste tisular de Toxoplasma gondii. La pared quística es delgada y filamentosa, además de que en su interior pueden encontrarse cientos de bradizoitos. Tomada de: Attias M, Teixeira D y De Souza W. (2020).

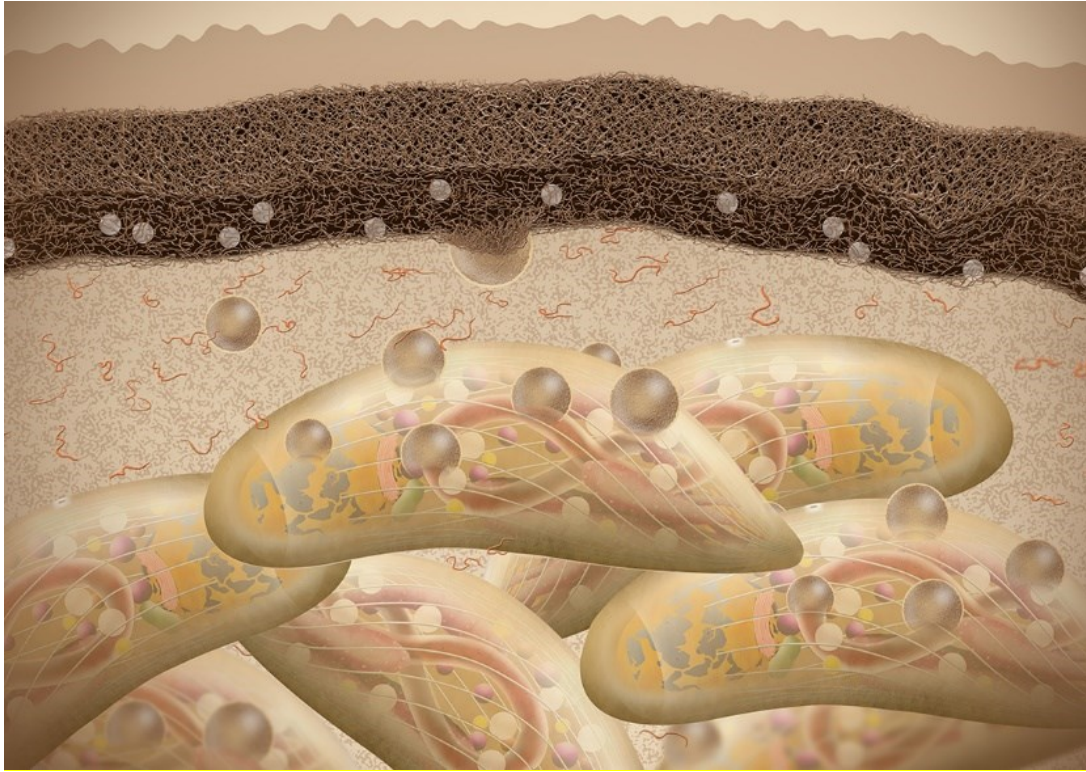


Figura 9. Esquema de un acercamiento de la estructura quística de *Toxoplasma gondii*. El quiste es rodeado por una membrana y debajo de ella se encuentra una delgada pared. Todos los componentes del quiste, desde la matriz hasta la membrana son sintetizados por los bradizoitos. Tomada de: Attias M, Teixeira D y De Souza W. (2020).

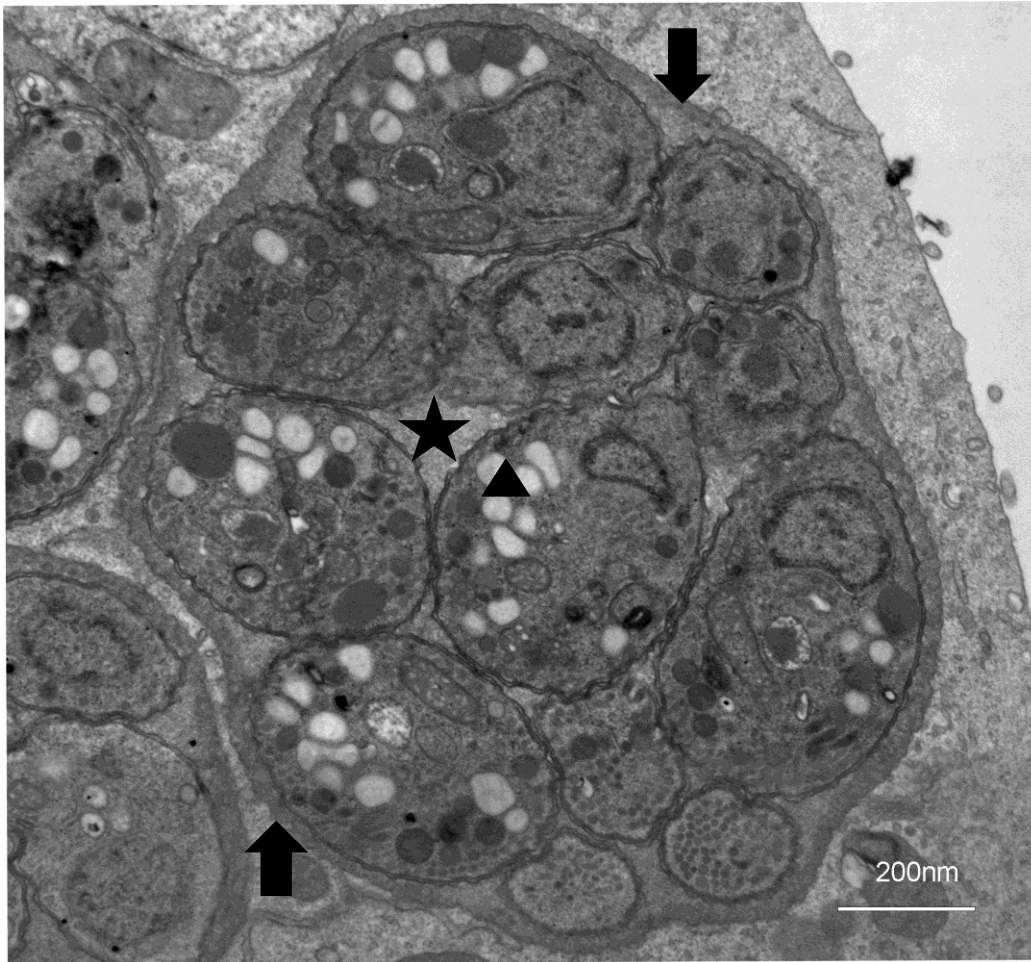


Figura 10. Fotografía tomada mediante microscopía electrónica de una sección transversal de un quiste tisular de Toxoplasma gondii en el que pueden contarse a 12 bradizoitos. Con flechas se señala a la pared quística, con una estrella se representa a la matriz granular y con un triángulo se observan los gránulos de amilopectina. Tomada de:

Attias M, Teixeira D y De Souza W. (2020).

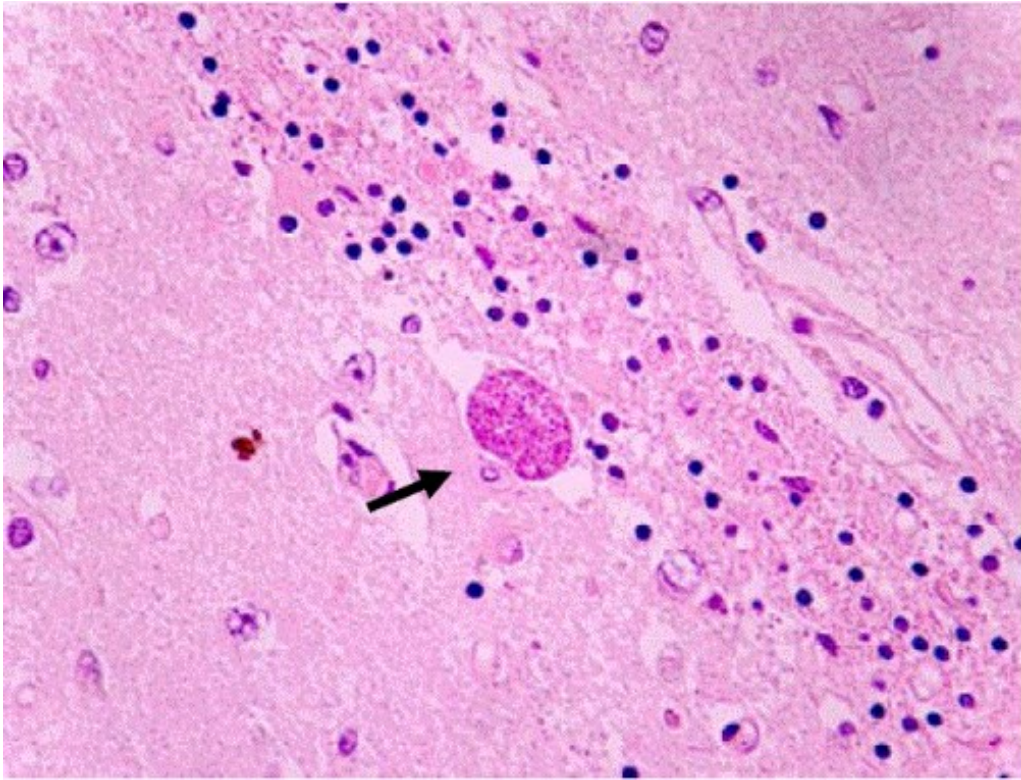


Figura 11. Corte histológico de una sección de tejido cerebral necrótico. Se puede observar un quiste y estructuras compatibles con bradizoitos. H & E, 40x. Tomada de: Cortés D, Aguirre N. (2018).

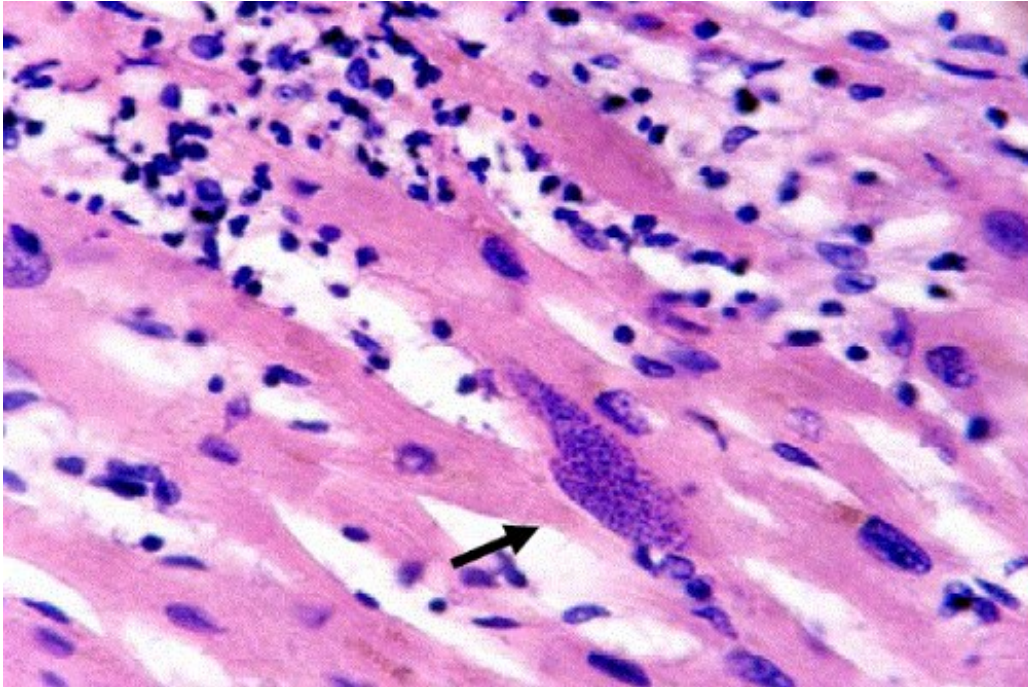


Figura 12. Corte histológico de un quiste tisular en músculo cardiaco. H & E, 10x.

Tomada de: Cortés D, Aguirre N. (2018).

1.2.3 Ciclo biológico

Se divide en tres fases: la enteroepitelial (se lleva a cabo en los hospederos definitivos), la extraintestinal (pudiéndose presentar tanto en los hospederos definitivos como en los intermediarios) y la fase esporogónica (se desarrolla en el medio ambiente) (**Dubey, 2010**).

El ciclo (**Figura 13**) inicia cuando un felino ingiere ooquistes (dispersos en el ambiente, en alimentos o agua contaminada con heces de gatos), quistes tisulares (en tejidos de hospederos intermediarios como roedores, aves, perros, cerdos, ovinos, bovinos, etc.) o pseudoquistes (en células de hospederos que contengan taquizoitos), sin embargo, esta última es menos común porque estos son lábiles (**Quiroz, 1988; Ameghino, 1991; Grandía, 2013**).

Después de la ingestión de los quistes u ooquistes, la acción de las enzimas proteolíticas del intestino y del estómago digieren su pared, momento en el cual se liberan los bradizoitos y

los esporozoitos, respectivamente. Estas dos células son capaces de llegar al epitelio intestinal, donde podrán desarrollar numerosas generaciones en los cinco tipos o estadios asexuales de la fase enteroepitelial (A, endodiogenia; B, endodiogenia y endopoliogenia; C, esquizogonia; D esquizogonia y endodopoliogenia; E, esquizogonia) (Quiroz, 1988; Grandía 2013). El término endodiogenia se refiere al alojamiento y reproducción intracelular de los taquizoitos, principalmente por un fenómeno llamado bipartición (Correa, 2017).

Lo anterior se refiere a la reproducción asexual de *Toxoplasma gondii*, posteriormente, la fase sexual, o gametogonia, la cual se da únicamente en los felinos, se inicia cuando a partir del tipo E o D se desarrollan los merozoítos, después el esquizonte (conjunto de merozoítos) y hasta los macrogametos (células femeninas) y los microgametos (células masculinas). El microgameto posee un doble flagelo que le posibilita desplazarse a lo largo de los enterocitos y fecundar al macrogameto, dando origen al cigoto (Rivera, 2017). Este proceso se da generalmente en las células del epitelio del íleon y en un lapso que va desde 5 hasta 15 días después de la infección (Quiroz, 1988). Después de este periodo de tiempo, los cigotos se diferencian en ooquistes no esporulados, salen al lumen intestinal y al ambiente con las heces del felino, pudiendo eliminar desde unos miles hasta millones de ooquistes en un periodo de 3 a 18 días post- infección contaminando así el suelo, hortalizas, y fuentes de agua (Muñiz, 2009; Tenter, 2009; Grandía, 2013).

Simultáneamente con el desarrollo de la fase enteroepitelial, la fase extraintestinal, que se lleva a cabo en los hospederos definitivos e intermediarios (Figura 14), se origina a partir de que los bradizoitos y los esporozoitos llegan a la lámina propia del intestino, multiplicándose y diferenciándose como taquizoitos en los distintos tejidos: endotelio vascular, fibroblastos, células mononucleares y leucocitos segmentados; además poseen la

capacidad de viajar a través del torrente sanguíneo y de la vía linfática hasta llegar a corazón, cerebro, pulmones, músculo, ojos y son capaces de atravesar la barrera placentaria (**Dubey, 2006; Moreno, 2013**).

Los taquizoitos son la forma móvil y altamente dinámica del parásito, estas características le confieren la capacidad de diseminarse rápidamente a través de los tejidos (**Muñiz, 2009**).

Estando dentro de las células hospederas, los taquizoitos se dividen y proliferan dentro de una vacuola parasitófora y cuando saturan el espacio intravacuolar de las células en las que se encuentran, los taquizoitos salen debido a una ruptura o lisis celular, invadiendo otras células adyacentes (**Rivera, 2017**), fenómeno conocido como fase aguda (**Correa, 2017**).

Los taquizoitos pueden encontrarse extracelularmente en cavidades corporales, líquido cerebroespinal y en la sangre (**Atías, 1994**).

Al tener contacto con el sistema inmune de individuos sanos, los taquizoitos son eliminados, sin embargo, algunos de estos se transforman en bradizoitos, momento en el cual empiezan a sintetizar una pared que los envuelve y protege del ataque inmunitario. Esta pared empieza a crecer y forma al quiste tisular, pudiendo sobrevivir durante toda la vida del hospedero y generar la fase crónica de la enfermedad (**Correa, 2017**).

En el gato, el periodo prepatente (periodo de tiempo que va desde que ocurre la ingestión de las diferentes fases del parásito, hasta que se eliminan los ooquistes en las heces) puede variar desde 3 a 10 días si lo que se ingirió fueron quistes tisulares o hasta 20 a 24 días con la ingesta de ooquistes (**Blood, 1986**).

Los ooquistes inmaduros pueden esporular en 2 a 3 días bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas (11-25 °C), así como pueden perder su capacidad para esporular a

temperaturas de -21°C durante 1 día, a -6°C durante 7 días o 50°C por 10 minutos. En contraste, los ooquistes esporulados resisten temperaturas más extremas durante más tiempo, llegan a permanecer viables por más de 54 meses a 4°C; además, mantienen sus características infectivas durante por lo menos 24 meses en agua salada y años en agua dulce (Dumétre, 2003; Dabritz, 2007; Galván, 2017).

1.2.4 Transmisión

La toxoplasmosis posee una transmisión de tipo horizontal y vertical. En cuanto a la primera, las formas más comunes son el consumo de ooquistes que son eliminados con las heces de, principalmente, el gato, pero también pueden eliminarlos linceos, pumas, ocelotes, jaguares, etc., esta forma del parásito se encuentra diseminada en el medio ambiente y algunos animales toman el papel de vectores mecánicos, por ejemplo: artrópodos, aves y pequeños mamíferos. La ingesta de los ooquistes se presenta cuando un individuo tiene contacto con tierra, verduras, frutas o agua contaminada, y no se lava ni se desinfecta las manos correctamente; además, el consumo de carne cruda o mal cocida; así como también los animales carnívoros al depredar una presa infectada con el parásito, son formas de transmisión de este tipo. Las transfusiones sanguíneas y los trasplantes de órganos, tanto en animales como en humanos, son elementos mediante los cuales se da la transmisión del parásito (Quiroz, 1988; Dubey, 2002; Mittal, 2014).

En la transmisión vertical, cuyo papel en el gato no es tan común (Venturini, 1995), pueden presentarse crías que se infecten y excreten ooquistes (Dubey, 1994). En contraste, en la especie humana, cuando la madre se infecta antes de la fecundación y es inmunocompetente, la probabilidad de transmisión al feto es menor, pero cuando se infectan estando embarazadas o se reactiva la enfermedad por alguna causa, el riesgo de transmisión transplacentaria es

alto. El riesgo de enfermedad congénita es menor (10-25%) cuando la infección se presenta en el primer tercio de gestación y es un 60-90% más alto en el tercer semestre. No obstante, si se llega a presentar la enfermedad, esta es más severa en el primer y segundo tercio de gestación, causando muerte fetal y aborto espontáneo (Dubey, 2002; Jones, 2003; Grandía 2013; Mittal, 2014; Rivera, 2017).

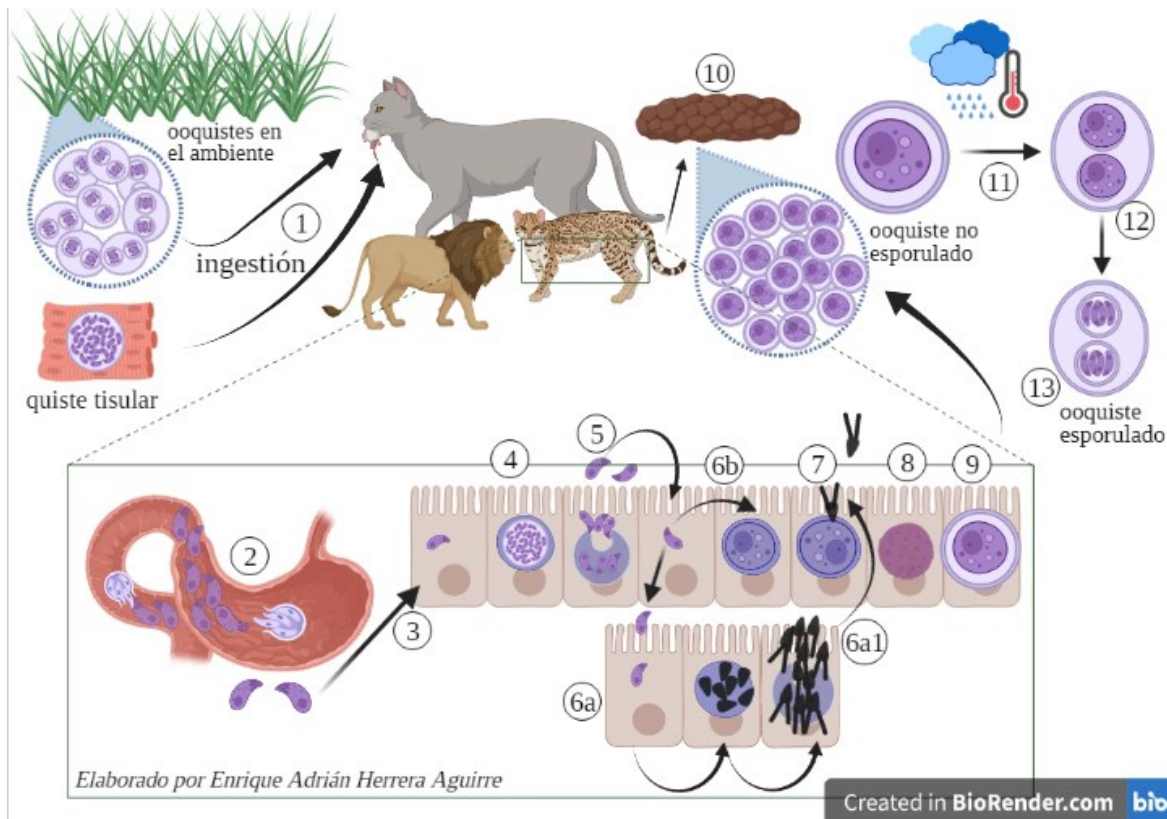


Figura 13. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* en el hospedero definitivo. 1) Ingestión de ooquistes esporulados o de quistes tisulares. 2) Liberación de esporozoitos en el estómago y duodeno. 3) Esporozoito inicia esquizogonia. 4) Formación del esquizonte. 5) Liberación de merozoitos. 6a) Esporozoitos inician microgametogonia. 6a1) Liberación de merozoitos. 6b) Esporozoitos inician la macrogametogonia y formación del macrogameto. 7) Fecundación. 8) Formación del cigoto. 9) Formación de ooquiste no

esporulado. 10) Liberación de los ooquistes con las heces. 11) Temperatura y humedad óptima. 12) Formación de esporoblastos 13) Formación del ooquiste esporulado.

Elaborado por Herrera, 2022. Basado en Quiroz, 1988; Bésne, 2010; CDC, 2020; Attias, 2020.

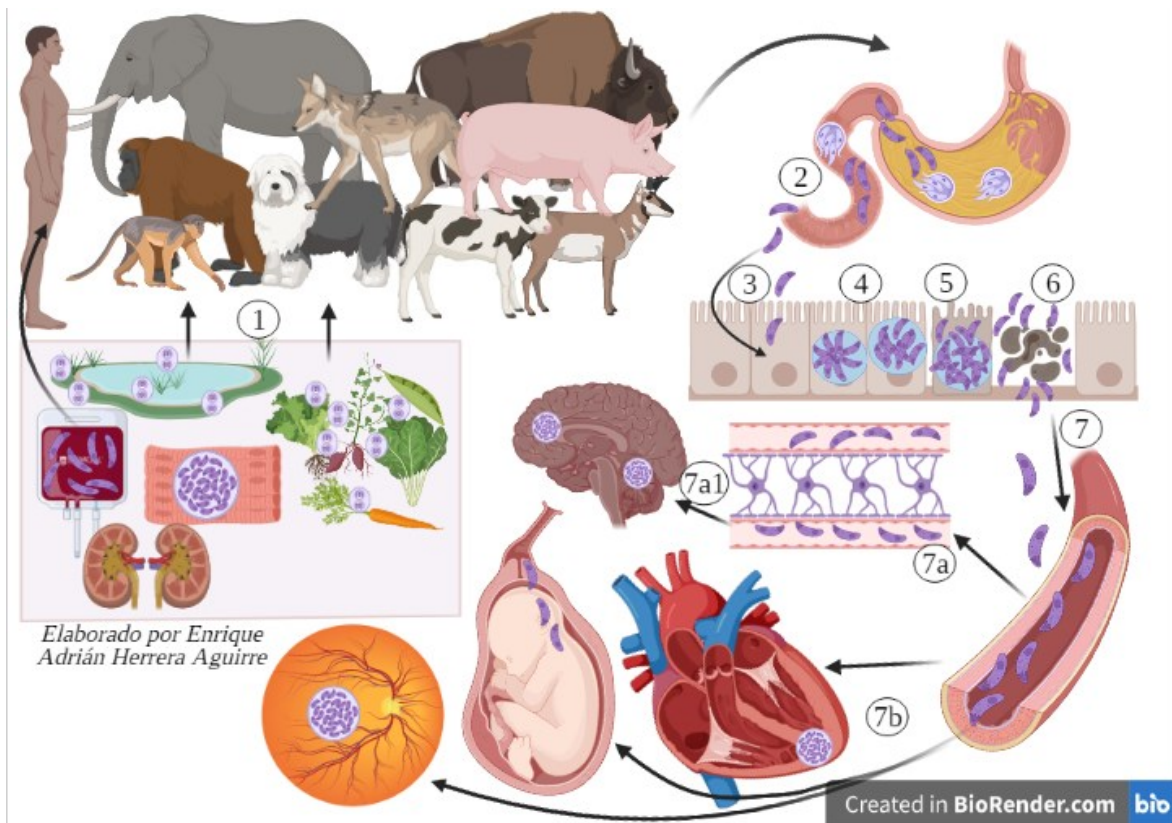


Figura 14. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* en el hospedero definitivo y en los intermediarios. 1) Ingestión de ooquistes esporulados del medio ambiente o de quistes tisulares. 2) Liberación de esporozoitos y bradizoitos en el estómago y duodeno. 3) Cambio de esporozoito a taquizoito y llegada al epitelio intestinal. 4) División de taquizoitos por endodiogamia y formación de la vacuola parasitófora. 5) Formación del pseudoquistes. 6)

Liberación de taquizoitos secundario a lisis celular. 7) Transporte al torrente sanguíneo.

7a) Taquizoitos diseminándose y atravesando barreras biológicas. 7a1) Formación de quiste tisular. 7b) Diseminación de taquizoitos a todo el organismo y formación de quistes tisulares en diferentes órganos. Elaborado por Herrera, 2022. Basado en Quiroz, 1988;

Bésne, 2010; CDC, 2020; Attias, 2020.

1.2.5 Respuesta inmune inducida por *Toxoplasma gondii*

Cuando son ingeridas las fases del parásito, estas deben de atravesar barreras que forman parte de la inmunidad innata, como el ácido clorhídrico del estómago, la secreción de moco y los péptidos antimicrobiales, los más importantes son las defensinas y catelicidinas. De igual manera, se encuentra la inmunoglobulina A que es secretada constantemente hacia el lumen intestinal, favoreciendo la opsonofagocitosis del parásito. Aquellas estructuras parasitarias que logran evadir esta parte de la inmunidad y logran invadir a los enterocitos, generan una cascada de acontecimientos, en los que incluye el arribo parasitario a nódulos linfáticos mesentéricos y la invasión a células nucleadas (**Abbas, 2014; Flores, 2015; Sánchez, 2016; Quevedo, 2020**).

Durante la fase aguda de la infección, los participantes en la respuesta inmune son primeramente las células del epitelio intestinal y el mismo parásito. Los enterocitos empiezan sintetizando quimiocinas (proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2)) que conducen a la atracción de neutrófilos, macrófagos, células NK y células dendríticas (CD). Los neutrófilos fagocitan a parásitos libres, es así como ayudan a la reducción de la carga parasitaria (**Takahashi, 2000; Yamazaki, 2002; Corthay, 2009; Schmidr, 2012; Jazmín, 2015**).

Macrófagos, CD4 y neutrófilos comienzan a segregar una citocina importante para el combate contra el parásito, no únicamente contra *Toxoplasma gondii*, sino también frente a otros patógenos intracelulares: la interleucina 12 (IL-12). Se ha demostrado *in vitro* que estas células producen IL-12 después de la exposición con taquizoitos o, en su defecto, con lisados del parásito (Gazzinelli, 1994; Sousa R, 1997; Bliss, 2000).

Al producirse grandes cantidades de IL-12, empieza la síntesis de IFN- γ , citocina cuya función primordial radica en que inicia la activación de macrófagos de forma masiva, fagocitosis y la destrucción del parásito; así mismo, estimula a las células NK y CD8⁺ para generar efectos citotóxicos. En sincronía, se sintetizan altas cantidades de TNF- α por parte de los macrófagos, el cual funciona como cofactor ayudando a que estas células lleven a cabo sus funciones efectoras: inhibición de la replicación y posterior eliminación del parásito. Los macrófagos y las células dendríticas presentan a los antígenos a los timocitos CD4⁺ y CD8⁺ y con ayuda de la IL-12 se induce la secreción del fenotipo Th1 (Suzuki, 1988; Correa, 2007).

Los macrófagos activados por la IL-12, producen, además de TNF- α , óxido nítrico (ON) y con esto se aumenta la destrucción del parásito (Correa, 2007).

En resumen, las citocinas clave para el control del parásito son: IL-12, IFN- γ y TNF- α . Cuando la infección ha sido controlada, inicia la producción de IL-10 y de TGF- β por parte de los Th3, los linfocitos T reguladores y las CD4, quienes son los encargados de la regulación de la fuerte respuesta pro-inflamatoria frente al parásito. Sin esta respuesta reguladora, la respuesta Th1 terminará, eventualmente, matando al hospedero (Correa, 2007).

De 3 a 10 días después de la infección por el parásito, las inmunoglobulinas del tipo IgM empiezan a aparecer en el suero, sin importar la cepa parasitaria, la edad o el sexo del hospedero. Los anticuerpos IgM se presentan exclusivamente en la fase aguda de la enfermedad, no obstante, pueden hallarse en suero hasta varios meses e inclusive hasta años después del primer contacto, esto se vuelve característico en aquellos hospederos que presentaron linfadenopatía (Del Bono, 1989; Gorgievski-Hrisoho, 1996; Correa, 2007).

La siguiente inmunoglobulina en presentarse es la IgA y persiste en sangre hasta por 6-7 meses (algunos autores mencionan que máximo podrían durar hasta cuatro meses: de Morais, 2015), pudiendo variar según el tipo de hospedero y el tipo de infección; la IgA es regulada por la producción de IL-10 y TGF- β . Mayoritariamente, esta inmunoglobulina aparece antes de que se dé la presencia de IgG (Francis, 1993; Gorgievski-Hrisoho, 1996; Sensini, 2006; Correa, 2007).

En la fase aguda, igualmente, los anticuerpos IgE son detectables en sangre y dependen de la síntesis de IL-4, aparecen casi en sincronía con las IgM; asimismo y gracias a la producción de IFN- γ y regulación por parte de la IL-4 e IL-13 (marcador de la fase crónica), en esta etapa se originan grandes cantidades de IgG, pero van disminuyendo hasta un título estable casi dos años después. Las subclases de IgG involucradas son las IgG1 (esta prevalece), IgG2, IgG3 e IgG4 (Godard, 1990; Nguyen, 1998; Correa, 2007; de Morais, 2015; Quevedo, 2020).

1.2.6 Antígenos de *Toxoplasma gondii*

Para la supervivencia del parásito, existen tres organelos esenciales para la invasión celular: gránulos densos, roptrias y micronemas, estos dedican parte de su metabolismo para

sintetizar diferentes proteínas. Estas llevan el nombre de proteínas GRA, ROP y MIC, respectivamente; además existen otras que son cruciales para la adherencia del parásito a la célula hospedera: SAG (“Surface AntiGens”, -antígenos de superficie), GPI (antígenos de superficie anclados por glucosilfosfatidilinositol), SRS (“SAG1-related sequences”, -relacionadas a secuencias SAG1) y las proteínas SUSAs (“SAG-unrelated surface antigens”, -aquellas que no están relacionadas con las SAG) (Muñiz, 2009; Díaz, 2010; Costa, 2014; Berdión, 2015).

1.2.6.1 Antígenos de superficie (SAG)

Son también nombradas con base en su peso molecular aparente cuando fueron corridas por primera vez en electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés, PAGE), por ejemplo: la proteína SAG1 también es denominada p30 debido a que su peso molecular fue de 30 KDa (kilo daltones) (Fatoohi, 2004; Costa, 2014).

Actualmente, se conocen 21 proteínas de este tipo y pueden hallarse expuestas en la superficie de la membrana de *Toxoplasma gondii*, están ancladas mediante las proteínas GPI; además, se sabe que participan en la adherencia a las células hospederas y que algún cambio conformacional podría influir en la capacidad de unión a la membrana. Están íntimamente relacionadas con la virulencia de las diferentes cepas del parásito. La presencia de las variantes de esta proteína se asocia a diferentes estadios parasitarios, por ejemplo, la proteína SAG1 (P30) y SAG3 son específicas de los taquizoitos; por otra parte, las SRS9, BSR4 (P36) y las SAG4A son exclusivas de los bradizoitos; sin embargo, algunas familias de proteínas pueden ser sintetizadas por ambos estadios parasitarios, es el caso de la proteína SAG2 (P22) (Lekutisa, 2001; Correa, 2007; Costa, 2014; Berdión, 2015).

SAG1 es el antígeno de superficie de mayor importancia a pesar de sólo representar del 3 al 5% del total de proteínas sintetizadas por el parásito, genera una respuesta inmune efectiva de tipo celular y humoral y la mayoría de los anticuerpos son reactivos frente a SAG1 durante la infección (Bulow, 1991; Khan, 1991; Velge-Roussel, 1994; Debard, 1996; Berdión, 2015).

En el 2004 Fatoohi y cols., demostraron que el antígeno SAG1 fue capaz de generar una respuesta inmune en 13 de 22 muestras (59%) analizadas, provenientes de pacientes del Hospital Croix-Rousse en Francia y concluyeron que, para futuras vacunas, se pueden considerar antígenos cuyo peso sea de entre 26 y 37 KDa, ya que proteínas que posean esa característica podrían estimular una respuesta inmune más efectiva (Fatoohi, 2004).

En otro estudio por Hotop y cols., en el que se inocularon a pollitos de 7 a 8 semanas de edad y a pavos de entre 4 y 8 semanas de edad con diferentes cepas y antígenos recombinantes de *Toxoplasma gondii*; se llegó a la conclusión de que las inmunoglobulinas Y anti rSAG1 estuvieron presentes en altas cantidades entre los días 7 a 10 días post-inoculación, perdurando hasta los 86 días después de aplicado el inóculo. Los antígenos rSAG1, rSUB y rGRA1 poseen características inmunogénicas importantes (Gross 1992; Aubert, 2000; Golkar, 2008; Hruzik, 2011).

1.2.7 Métodos diagnósticos en México y su relevancia clínica

Se clasifican en dos grupos: los métodos directos y los indirectos: los primeros se agrupan de dos formas y su objetivo es 1) demostrar la presencia o no del parásito en líquidos corporales (líquido cerebrospinal, exudado peritoneal, pleural, placentario, bronquial), en excreciones y en los tejidos (pápulas cutáneas, humor acuoso del ojo, biopsias) de personas

potencialmente positivos a la infección. Incluyen la prueba de histopatología e inmunohistoquímica (IHQ). En los tejidos representativos de lesiones se pueden encontrar focos de necrosis, inflamación y acúmulos de bradizoitos, en quistes tisulares, o de taquizoitos (**Morales E; Eustaquio, 2014**). Sin embargo, el estudio microscópico debe diferenciarse de otros parásitos con morfología similar: *Sarcocystis*, que son dos veces más grandes que *Toxoplasma gondii* y poseen una pared quística, las formas leishmánicas de *Trypanosoma cruzi* tienen un cinetoplasto y un centrosoma característicos, mientras que *Besnoitia* se caracteriza por núcleos gigantes de la pared quística que contiene a los microorganismos (**Trigo, 2015**).

Aislar al agente por medio de la inoculación en animales de laboratorio, como lo son ratones, conejos, cobayos, hamsters, etc., o en cultivos celulares con preparados de tejidos que sean sugerentes a la infección por *Toxoplasma gondii*; así como también la inoculación en embriones de pollo, y con esto poner de manifiesto la presencia de ADN del agente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (**Morales E; Eustaquio, 2014**). Entre las desventajas que acompañan estos métodos diagnósticos son que no son sencillas de llevar a cabo, necesitan de personal capacitado y no las realizan en todos los laboratorios. (**Eustaquio, 2014**).

Por otro lado, se cuentan con pruebas a través de 2) métodos indirectos, siendo el objetivo principal de estos la detección de anticuerpos específicos contra el agente, estos pueden evidenciarse en suero, plasma, leche, lágrimas, saliva y líquido cerebroespinal, amniótico e intraocular. La detección de anticuerpos IgG indica una infección de tipo crónica, mientras que evidenciar anticuerpos IgM nos habla de una infección de tipo aguda, la IgA se ha asociado a infecciones agudas, aunque puede persistir por largos periodos de tiempo,

detectándolas en 33% de los casos crónicos (**Montoya, 2008**). La prueba de avidéz de los anticuerpos (basada en la distinta fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo) descrita por Hedman en 1989, demuestra que cuando se hallan predominantes los anticuerpos IgG de baja avidéz, la prueba corresponde a una infección de tipo aguda, mientras sucede lo contrario con la fase crónica (**Morales; Lappalainen, 1993; Holliman, 1994**). En esta prueba se utiliza un agente desestabilizante de puentes de hidrógeno, por ejemplo, la urea, y la reacción resultante es la disociación de la unión entre IgG específicas y el antígeno (**Markelt, 2000**).

Las pruebas más usadas son 1) prueba de Sabin y Feldman, conocida como prueba del colorante, cuyo objetivo es teñir a los toxoplasmas con colorante de May-Grun-Wal-Giemsa, considerándola de gran importancia clínica, efectividad y sensibilidad, el inconveniente que presenta es que se requiere mantener viable al parásito a través de pases sucesivos en ratones (**Sabin, Echenwal, 1952; Pangalos, 1956; Eustaquio, 2014**). 2) aglutinación en látex, 3) la hemoaglutinación, 4) aglutinación inmunoabsorbente (ISAGA), 5) la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), que presenta como desventaja requerir un microscopio con luz ultravioleta y globulinas anti-especie para cada especie (**Quiroz, 1988**), 6) ELISA, 7) fijación del complemento: consiste en obtener al antígeno por medio de electroforesis del cultivo de *Toxoplasma gondii* en embriones de pollo, la desventaja que presenta es que posee poca sensibilidad y es complicada de realizar (**Warren, 1942; Westphal, 1951**), 8) Western Blot y 9) la prueba de la reacción V (*Lr*), utilizando al *Lebistes reticulatus* (pez Guppy), entre las ventajas que presenta son que es muy sensible, es fácil de elaborar y es de bajo costo (**Morales; Eustaquio, 2014**). Existe otra prueba, pero es mucho menos común y su disponibilidad es menor: prueba intradermo-reacción a la toxoplasmina (**Frankel, 1948**), su

desventaja es que causa reacciones cruzadas con otras proteínas y se ha limitado a encuestas epidemiológicas (Eustaquio, 2014).

Actualmente, la mayoría de las pruebas diagnósticas que se elaboran en laboratorios de México para diagnóstico humano y animal, son las pruebas de quimioluminiscencia (QM): basado en un inmunoensayo tipo sándwich con captura de clases de inmunoglobulinas, utilizando tecnología quimioluminiscente y la gran ventaja es que posee 96.5% de sensibilidad y 98.6% de especificidad (en el caso del fabricante *Advia Centaur Siemens*) (Gribaudo, 2017). El costo promedio de esta prueba es de \$1192 pesos mexicanos para laboratorios de diagnóstico humano.

Otra prueba diagnóstica es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero muy pocos laboratorios la manejan y el costo es elevado, oscilando los \$5000 pesos mexicanos.

Por último, otra prueba que se maneja es el ELISA para detectar anticuerpos IgG, IgM, IgE o IgA, y así poder diferenciar las infecciones agudas de las crónicas (Maeltek, 2000).

1.2.7.1 Prueba de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA, -Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay)

Los anticuerpos sintetizados por un organismo y secundarios a un estímulo por contacto con antígenos del medio o de una vacuna, pueden ser medidos mediante técnicas *in vivo* o *in vitro*. Las primeras se encargan de medir directamente la respuesta biológica en animales de laboratorio, poseen una gran sensibilidad y especificidad; sin embargo, son caras. Por otro lado, tenemos a las pruebas *in vitro*, un ejemplo de estas es la prueba ELISA (Ochoa, 2012).

En la técnica de radioinmunoensayo (por sus siglas en inglés, RIST: Radioimmunosorbent Techniques), para la detección cuantitativa de un antígeno o de anticuerpos, se necesita del uso de un marcaje radioactivo con radioisótopos ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{125}I , ^{57}Co , etc. Representando un riesgo medioambiental, para el operador y las personas que se vieran involucradas en este tipo de procedimientos. De aquí surgió la necesidad de buscar alguna alternativa más segura para el medio ambiente, así como también que para poder ejecutarla se pudiera usar equipo más sencillo y que fuera menos costoso (**Voller, 1978; Lequin, 2005; van Weemen, 2005; Goers; Fernández, 2007**).

La prueba de ELISA, descrita por primera vez en 1971 por Eva Engvall y Peter Perlmann, es un sistema en donde un antígeno o anticuerpo se adsorben a una fase sólida (microplaca de poliestireno o a una membrana de nitrocelulosa) y es sobre la cual se llevan a cabo las reacciones (**INDRE, 2000**).

El ELISA representa una técnica de elección a la hora de medir analitos (anticuerpos, antígenos, proteínas, glicoproteínas, hormonas, etc.) por su alta sensibilidad, detectabilidad y especificidad; es de fácil elaboración, es reproducible, puede llegar a adaptarse a casi cualquier laboratorio y gracias a la gran variedad de sustratos y cromógenos adquiere la ventaja de ser versátil. Utiliza un tiempo de elaboración reducido, para realizarse se requiere una pequeña cantidad de muestra (en μ), las enzimas son menos costosas y no implican un riesgo para el operador y puede llegar a automatizarse (**Voller, 1978; Lequin, 2005; van Weemen, 2005; Goers; Fernández, 2007; Ochoa, 2012**).

Este tipo de ensayo se basa en tres características biológicas importantes: la especificidad de los anticuerpos hacia al antígeno (se conjugan con una enzima), el poder catalítico (catalizar

una reacción en la que el sustrato genera un color) y la alta especificidad de las enzimas **(INDRE, 2000; Ochoa, 2012)**.

Un anticuerpo es un tipo de proteína que se produce por el sistema inmune de un individuo y posee una región específica que se une a un antígeno. Este último es también una proteína, pero proviene de una fuente desconocida para el cuerpo y que induce a una cascada de eventos orquestada por el sistema inmune **(Alhajj, 2022)**.

La reacción consiste en la unión antígeno-anticuerpo y es detectable mediante una reacción colorimétrica o de emisión de luz, gracias a la interacción entre la enzima y el sustrato. La intensidad de color es directamente proporcional a la intensidad y es medible en un espectrofotómetro **(INDRE, 2000; Ochoa, 2012)**.

El ELISA se produce en una placa de poliestireno, típicamente con 96 pozos a los cuales la proteína se unirá fuertemente. Dependiendo del tipo de ELISA, se requiere de un anticuerpo primario y/o secundario, un analito o antígeno, un recubrimiento del antígeno o anticuerpo, un amortiguador (buffer), solución de lavado y un sustrato o cromógeno. El anticuerpo primario corresponde a aquel que se unirá a la proteína de interés, mientras que el anticuerpo secundario refiere a un anticuerpo que está conjugado a una enzima y que reacciona y se une al anticuerpo primario o al antígeno, dependiendo de la variante que se esté elaborando **(Engvall, 2010; Shah, 2016; Konstantinou, 2017; Alhajj, 2022)**.

Existen cuatro etapas generales en una prueba ELISA:

- Recubrimiento de la placa con un anticuerpo o un antígeno.
- Bloqueo, mayoritariamente con la adición de albúmina sérica bovina (BSA, bovine seric albumin)

➤ Detección: reacción generada por la inclusión de un sustrato (enzima) cromógeno. Los más usados gracias a su estabilidad y reproducibilidad de resultados son: la peroxidasa de rábano (HRP, horseradish peroxidase), fosfatasa alcalina (ALP, alkaline phosphatase) y β -galactosidasa (BG). Los sustratos para la enzima HRP son el peróxido de urea o el peróxido de hidrógeno, estos sufren una reacción de reducción y para que generen color, se les acompaña de cromógenos que se oxidan durante la reacción enzimática (la más usada es la orto-fenilendiamina). Los sustratos para la ALP son el p-nitrofenil fosfato (pNPP, P-Nitrophenyl-phosphate), este genera un color después de ser incubado a temperaturas mayores de 30°C durante 15 a 30 minutos como resultado de haber sido degradado por la enzima. Existe otro sustrato llamado 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato, utilizado ampliamente en los ELISA en tubo o en dot-ELISA.

➤ Lectura de la absorbancia

Entre cada uno de los pasos anteriores se realizan lavados con una solución amortiguadora, un ejemplo es la solución amortiguadora de fosfatos (PBS, phosphate-buffered saline) y con un detergente no iónico para remover material residual, el número de lavados depende del protocolo que se esté llevando a cabo (**INDRE, 2000; Ochoa, 2012; Alhajj, 2022**).

Actualmente existen 4 variantes de la prueba ELISA (**Figura 15**):

1) Directo, en el que el anticuerpo específico está unido a la enzima (conjugado), y que reaccionará con el antígeno que se encuentra unido a la placa de poliestireno. Entre las ventajas que posee la prueba son que se elimina la posibilidad de reacción cruzada con el anticuerpo secundario y que su elaboración es más sencilla y rápida. Una desventaja al

realizar esta variante es que su sensibilidad es menor al momento de compararla con otros tipos de ELISA (INDRE, 2000; Engval, 2010; Shah, 2016; Kohl, 2017; Alhajj, 2022).

2) Indirecto, en el cual el anticuerpo unido a la enzima reaccionará con un primer anticuerpo (anti- anticuerpo) que ya reaccionó previamente con el antígeno que se encuentra unido a la placa. Posee, comparado con el ELISA directo, una mayor sensibilidad; además, implica un costo menos elevado y es más flexible a la hora de seleccionar los anticuerpos secundarios (conjugados). La desventaja que adquiere esta prueba es que existe un riesgo de reacción cruzada para la detección de los anticuerpos primarios (los que contiene la muestra, si es que los tuviera) (INDRE, 2000; Engval, 2010; Ochoa, 2012; Shah, 2016; Kohl, 2017; Alhajj, 2022).

3) De captura de antígenos o también conocidos como ELISA sándwich, consiste en adsorber un primer anticuerpo a la fase sólida, los antígenos de interés (que se encuentran en la muestra de interés) se unirán específicamente a esos anticuerpos de fase sólida, a continuación, se agrega el anticuerpo primario y después al conjugado anticuerpo-enzima, que reaccionará con el anticuerpo primario. Posee la mayor sensibilidad de entre las diferentes pruebas ELISA, pero requiere más tiempo y costos variablemente elevados por la necesidad de adquirir los anticuerpos secundarios y a los antígenos divalentes o multivalentes (INDRE, 2000; Engvall, 2010; Ochoa, 2012; Shah, 2016; Kohl, 2017; Alhajj, 2022).

4) Competitivo, su fundamento se basa en que el anticuerpo o antígeno unido a la fase sólida, se unirá al conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, respectivamente, pero esa reacción puede ser inhibida por un analito no marcado en la muestra. Tiene una baja especificidad y no puede ser empleada en muestras diluidas. Sin embargo, los

beneficios de su uso incluyen el que se necesita una menor purificación de la muestra, se pueden medir diferentes antígenos y tiene menor variabilidad (Engvall, 2010; Ochoa, 2012; Kohl, 2017).

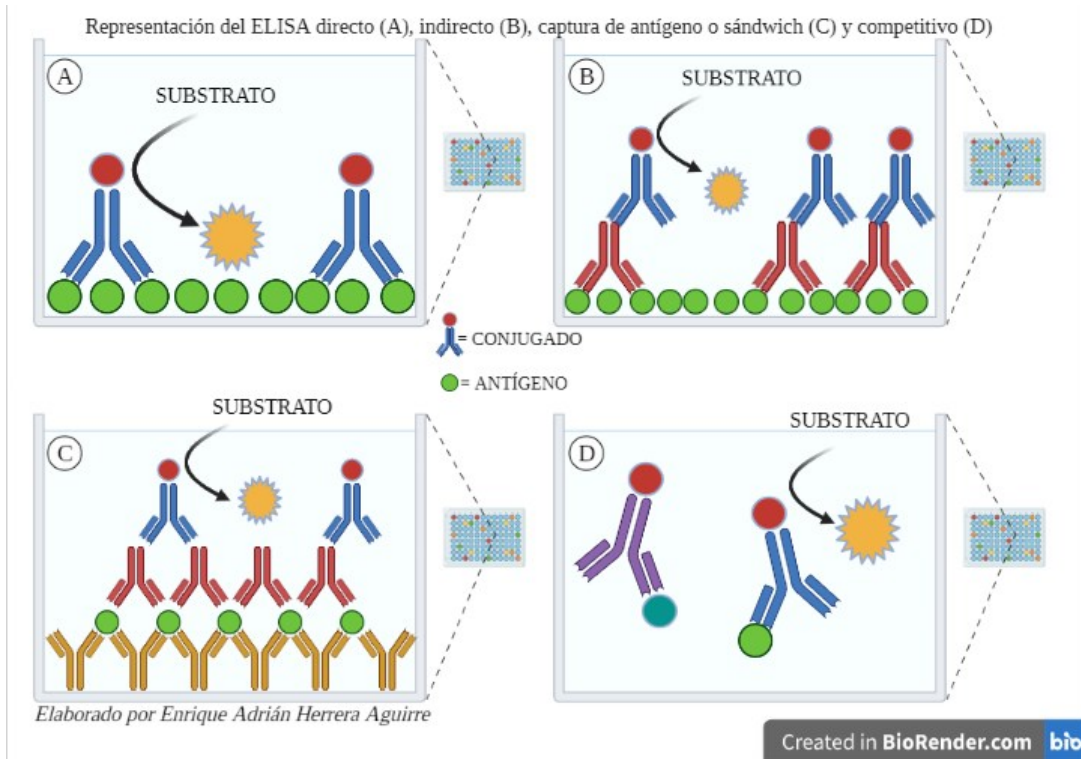


Figura 15. Tipos de ELISA. Elaborado por Herrera, 2022. Basado en: INDRE, 2000; Engvall, 2010; Ochoa, 2012; Kohl, 2017; Alhajj, 2022.

1.3 Planteamiento del problema

En cualquier sistema de producción animal es muy importante implementar medidas de bioseguridad para evitar las infecciones que involucren a agentes patógenos, en este caso al parásito *Toxoplasma gondii*. Existen ciertos factores de riesgo, en especial la presencia del gato dentro de producciones no controladas; así como la contaminación de agua y del forraje

que se les proporciona como alimento a los animales dentro del proceso productivo (**Stelzer, 2019**).

La prevalencia del parásito en producciones de cerdos, en general, es de <1% en aquellas producciones donde los animales están en confinamiento y con buenas medidas de bioseguridad, previniendo que accedan a las producciones animales vectores o reservorios como los son algunos roedores o los mismos gatos; por otra parte la prevalencia aumenta hasta un 60% o más cuando estas medidas no se practican adecuadamente o en producciones de traspatio con bioseguridad no regulada (**Dubey, 2008; Bacci, 2015; De Berardinis, 2015; Papatsiros, 2016; De Berardinis, 2017**).

En los pequeños rumiantes, en especial en los ovinos, el parásito puede generar una muerte embrionaria temprana o la reabsorción; así como también es capaz de causar muerte fetal, momificación, abortos y muerte neonatal. La severidad de los signos depende de la etapa en la que se produzca la infección, mientras más temprana se presente, las consecuencias son más severas. Debido a las afecciones que puede generar este protozoario, en distintos países, como Nueva Zelanda, Australia, Reino Unido y Estados Unidos, es considerado una de las causas más importantes de pérdidas productivas y económicas en estos pequeños rumiantes, generando pérdidas económicas significativas (**Dubey, 2009**).

Un indicador de contaminación del medio ambiente y los recursos que se utilizan en producciones de aves es la presencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii*, existiendo una mayor prevalencia del parásito en aquellas producciones de traspatio o de aves libres de jaula, que en producciones de tipo de intensivo (**Yang, 2012; Guo, 2015; Schares, 2017; Stelzer, 2019**). En general, los pollos, pavos, patos y los gansos ocasionalmente desarrollan signos después de haberse infectado con el parásito; sin embargo, se ha mencionado que pollitos de

un mes de edad infectados con ooquistes de *T. gondii* tipo I (cepa GT1), han desarrollado la enfermedad y signos clínicos asociados a la misma, mientras que aquellos que fueron infectados con el tipo II (cepa ME49) no desarrollaron signos clínicos (**Dubey, 1993**). Por otra parte, un estudio realizado con pollos de diez días de edad, que fueron inoculados vía intraperitoneal con 5×10^8 , 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 taquizoitos de cinco cepas diferentes: RH, CN, JS, CAT2 y CAT3, demostró que a dosis mayores de 1×10^8 , pueden presentarse signos asociados a una toxoplasmosis aguda (**Wang, 2015**).

Los reportes de toxoplasmosis clínica en el ganado bovino son poco comunes, debido a que se sugiere que estos animales son de cierta manera resistentes a infecciones por el parásito; sin embargo, los casos de toxoplasmosis reportados en los que se aisló al parásito, se han asociado a abortos (**Canada, 2002**).

1.4 Justificación

Los animales de granja representan una fuente directa de infección para los humanos debido al consumo de carne cruda o mal cocida. Además, estos animales son un posible reservorio para el parásito *T. gondii* siendo el responsable de pérdidas económicas en diferentes regiones del mundo, en particular en aquellas donde se llevan a cabo sistemas de pastoreo, la importancia por controlar a este agente infeccioso ha ido en aumento (**Stelzer, 2019**).

Dada la importancia del parásito *Toxoplasma gondii*, en el presente trabajo se purificaron IgY específicas contra la proteína rSAG1 del parásito a partir de yemas de huevos producidos por gallinas inmunizadas con dicho antígeno. Su obtención puede ser a gran escala y sin afectar el bienestar del ave. Con los anticuerpos obtenidos de esta forma se podrán desarrollar herramientas diagnósticas que permitan monitorear en animales de producción, en animales

de compañía y en humanos la infección con este parásito, con lo que se podrían identificar precozmente y llevar a cabo las medidas pertinentes para controlar o mitigar los daños económicos y de salud que la infección pueda causarle a los animales de granja o a los humanos.

1.5 Objetivos

1.5.1 General

Obtener y purificar inmunoglobulina Y contra la proteína rSAG1 del parásito *Toxoplasma gondii* mediante la inmunización de gallinas.

1.5.2 Particulares

- Inmunizar gallinas con el antígeno rSAG1 de *Toxoplasma gondii*
- Purificar IgY total de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas con el antígeno rSAG1
- Corroborar la presencia de IgY específica anti-rSAG1 mediante la prueba de ELISA

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Producción de IgYs

Material utilizado

- 10 gallinas SPF, también conocidas como Aves Libres de Patógenos Específicos (ALPES)

- 10 jaulas para postura con bebederos de niple
- 3 timer con sus respectivos focos
- Alimento concentrado especial para gallinas ALPES para postura fase 2
- Inmunógeno, proteína recombinante SAG1 (rSAG1)
- Jeringas de 1 mL con aguja del 22 de ¼ de pulgada
- Bolsas plásticas nuevas para almacenar el huevo
- Refrigerador

Métodos

Recepción del lote de gallinas sexualmente maduras a hiperinmunizar.

Se realizó la recepción de 10 gallinas ALPES de 50 semanas de edad, 2 semanas antes de iniciar la hiperinmunización, con el objetivo de regresar al estado basal la presencia de catecolaminas en sangre y con ello, estabilizar la presencia de estrógenos en sangre.

Una vez habituadas las aves, se realizó la hiperinmunización, empleando como antígeno a la proteína rSAG1 de *Toxoplasma gondii* desarrollado por el Instituto Nacional de Pediatría.

La inmunización se realizó mediante la aplicación de tres dosis vía intramuscular (IM) en el músculo de la pechuga a un volumen total de 0.2 mL de antígeno recombinante SAG1 por aplicación. La segunda aplicación 2 semanas después de la primera y la tercera una semana después de la segunda. A partir de la primera semana de aplicación de las dosis del inmunógeno, se recolectaron todas las piezas de huevo producidos por las gallinas hasta la finalización del proyecto que duró 23 días posteriores a la última inoculación, y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Se obtuvo una recolecta total de 152 piezas de huevo.

2.2 Purificación de IgY de yemas de huevos utilizando polietilén glicol (PEG) 6000 de acuerdo con Amro y cols. (2017)

Material utilizado

- Huevos de gallinas hiperinmunizadas
- Contenedor de plástico con capacidad de 1 o 2 L
- Papel absorbente de 26.8 x 11.3 cm aproximadamente
- Botella de plástico con capacidad de 1 L, la característica deseada de la misma es que sea rígida y que al ser deformada pueda regresar parcialmente a su forma normal
- 1 cuchara sopera
- Puntas para micropipeta con capacidad de 200 μ L-1000 μ L
- Polietilenglicol 6000 grado biología molecular (PEG 6000)
- Solución amortiguadora de fosfatos 1x (PBS 1x)
- Vasos de precipitado con capacidad de 500 mL
- Matraz Erlenmeyer con capacidad de 1 L
- Papel filtro de la marca Whatman™
- Gasas
- Embudo de vidrio
- Vórtex
- Centrifuga modelo 5810 R de la marca eppendorf™
- Tubos cónicos de la marca Corning™ o Neptune™ con capacidad de 15 mL y 50 mL
- Báscula analítica modelo Adventurer™ de la marca OHAUS

Métodos

- 1.- Romper el cascarón con ayuda de alguna superficie o de la misma cuchara y verter el contenido dentro del contenedor de plástico y succionar la yema con la botella de plástico o, en su defecto, con ayuda de la cuchara obtener la yema y retirar la mayor cantidad posible de la clara utilizando puntas para micropipeta, teniendo sumo cuidado de no romper la yema.
- 2.- Colocar la yema sobre papel absorbente y desplazarla para limpiar la mayor cantidad de proteínas que se encuentre alrededor de la yema.
- 3.- Con las puntas para micropipeta, romper la membrana perivitelina de la yema y depositar su contenido en tubos cónicos de 50 mL o en vasos de precipitado de 500 mL
- 4.- Adicionar PBS 1x al doble del volumen total obtenido de las yemas.
- 5.- Agregar PEG 6000 a una concentración de 3.5% del volumen total.
- 6.- Mezclar de manera manual y con ayuda de un vórtex durante 10 minutos y hasta que se haya disuelto por completo el PEG 6000.
- 7.- Llenar los tubos cónicos a un volumen homogéneo y centrifugar a 3100 fuerzas g (RCF) durante 20 minutos a 4°C.
- 8.- Decantar el sobrenadante en otro tubo cónico de 50 mL filtrando con papel Whatman™ o, en su defecto, con gasas y apoyándose de un embudo de vidrio.
- 9.- Con base en el nuevo volumen obtenido, agregar PEG 6000 a una concentración de 8.5%.
- 10.- Mezclar de manera manual y con ayuda del Vórtex durante 10 minutos y hasta que se haya disuelto por completo el PEG 6000.

- 11.- Llevar a volúmenes iguales los tubos cónicos y centrifugar a 3100 fuerzas g (RCF) durante 20 minutos a 4 °C.
- 12.- Decantar y descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 µL de PBS 1x con ayuda de una micropipeta y puntas de 1000 µL.
- 13.- Mezclar de manera manual y con Vórtex durante 10 minutos y llevar a un volumen total de 10 mL cada tubo.
- 14.- Agregar PEG 6000 a una concentración del 12%.
- 15.- Mezclar de manera manual y con Vórtex durante 10 minutos y hasta que se haya disuelto por completo el PEG 6000.
- 16.- Centrifugar a 3100 fuerzas g (RCF) durante 20 minutos a 4°C.
- 17.- Decantar y descartar el sobrenadante y después resuspender el pellet en 800 µL de PBS 1x con ayuda de una micropipeta y puntas con capacidad de hasta 1000 µL.

2.3 Precipitación con Sulfato de Amonio (NH₄)₂SO₄ de acuerdo con Wingfield (2016)

Material utilizado

- Microtubos graduados de polipropileno con capacidad de 1.5 mL
- Micropipetas y puntas con capacidad de 20-200 µL y de 200-1000 µL
- Sulfato de Amonio (NH₄)₂SO₄

- Báscula analítica modelo Adventurer™ de la marca OHAUS
- Vórtex
- PBS 1x
- Microcentrífuga para microtubos de 1.5 mL de la marca Hermle Z, modelo 300 K

Métodos

1.- De los 4 tubos obtenidos como resultado de la purificación de IgY por grupo de muestra, llevar a un volumen total de 3 mL con PBS 1x y distribuir en microtubos con capacidad de 1.5 mL con ayuda de una micropipeta y puntas de hasta 1000 μ L; obteniendo así 2 microtubos por grupo de muestras y un total de 8 microtubos.

2.- Agregar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración del 40% para cada microtubo.

3.- Mezclar de manera manual y con ayuda de un vórtex durante 10 minutos y hasta que se haya disuelto por completo el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.- Almacenar a 4°C durante 1 hora.

5.- Centrifugar a 16037 fuerzas g (RCF) durante 30 minutos a 4°C.

6.- Decantar y descartar el sobrenadante.

7.- Resuspender el pellet, que es el que contiene precipitadas las inmunoglobulinas Y con 100 μ L de PBS 1x.

8.- Mezclar de manera manual y con el Vórtex durante unos minutos.

2.4 Obtención de la concentración de IgY en mg/mL mediante espectrofotometría con NanoDrop™

Se utilizó un espectrofotómetro de la marca NanoDrop modelo ND-1000.

2.5 ELISA indirecta para la determinación del título de anticuerpos IgY contra *Toxoplasma gondii*, con base en lo descrito por Correa y cols. (2000)

Material utilizado

- Placas de poliestireno con 96 pozos de fondo plano
- Micropipetas multicanal con capacidad para diferentes volúmenes, marca eppendorf y BIOHIT
- Canaletas o depósitos de reactivos para micropipetas multicanal
- Máquina de lavado para placas de ELISA de la marca BioRad, modelo 1575, ImmunoWash
- Tubos cónicos de la marca Corning™ o Neptune™ con capacidad de 50 mL
- Micropipetas con diferentes volúmenes de capacidad de las marcas eppendorf y BIOHIT
- Incubadora que maneje temperaturas de 37 °C
- Solución amortiguadora de carbonatos con pH 9.6
- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)
- PBS-Tween
- Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1%, como solución de bloqueo
- Anticuerpos primarios obtenidos de gallinas hiperinmunizadas con antígeno rSAG1
- Antígeno de Extracto Crudo de *Toxoplasma gondii* (ECTg) a una concentración de 2 mg/mL

- Antígeno rSAG1 a una concentración de 1.29 mg/mL
- Conjugado, que en este caso contiene a la IgG de cabra anti IgY de pollo, asociado a una enzima llamada peroxidasa de rábano o HRP, por sus siglas en inglés de la marca Synbiotics Corporation®
- Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa: 4 mg de orto-fenilendiamina, 5 mL de ácido cítrico 0.1 M y citrato de sodio 0.1 M y 4 µL de H₂O₂ al 30%
- Solución de ácido sulfúrico: A 850 mL de agua bidestilada se le agregan 98.08 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), posteriormente se afora a un volumen total de 1000 mL, como solución de *stop*

Métodos

1.- Diluir con solución amortiguadora de carbonatos al antígeno rSAG1 y al antígeno de ECTg, a una concentración de 8 µg/mL mediante un análisis dimensional utilizando la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

2.- Sensibilizar los pozos de la columna número 11 con 100 µL de la solución de antígeno y a partir de la columna 10 realizar diluciones seriadas 1:2. A excepción de la columna 12, a la cual no se le colocó ningún antígeno.

3.- Dejar incubando la placa durante toda la noche a 4°C.

4.- Eliminar la solución vertiendo su contenido y secando el excedente con gasas.

- 5.- Realizar tres lavados con PBS-Tween con un volumen de 200 μL por pozo con ayuda de una máquina para lavado de placas ELISA y entre cada uno de ellos se repitió el paso 4.
- 6.- Agregar la solución de bloqueo, la cual contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 1%.
- 7.- Dejar incubar durante 2 horas a 37 °C.
- 8.- Repetir los pasos 4 y 5.
- 9.- Diluir al anticuerpo primario a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, preparar la solución y agregar a la fila A y B un volumen total de 100 μL a cada pozo, a partir de la fila B realizar diluciones seriadas 1:2 hasta la fila G, en la fila H no se colocó anticuerpo primario.
- 10.- Dejar incubar durante toda la noche
- 11.- Repetir los pasos 4 y 5.
- 12.- Agregar a todos los pozos un volumen total de 100 μL del anticuerpo secundario con título de 1:2500, este corresponde al conjugado.
- 13.- Incubar durante 2 horas a 37°C y posteriormente realizar los pasos 4 y 5.
- 14.- Colocar 100 μL de solución de cromógeno sustrato para peroxidasa en cada uno de los pozos.
- 15.- Dejar incubar durante 30 minutos (en el caso de la peroxidasa en la oscuridad).
- 16.- Transcurrido el tiempo, detener la reacción enzimática con ácido sulfúrico con 50 μL por pozo.
- 17.- Leer la absorbancia en un lector de ELISA a 490 nm.

3. RESULTADOS

1.- Después de recolectar el huevo cada día antes y después de la hiperinmunización, se clasificaron de acuerdo con el periodo de tiempo en el que fueron inoculadas las gallinas con el antígeno, es decir, recolecta basal, recolecta después de la primera inoculación, recolecta después de la segunda inoculación y, por último, recolecta después de la tercera inoculación, quedando de la siguiente manera:

Clasificación	Número de huevos totales
Basal	3
P1a	15
P2a	49
P3a	85

Cuadro 1. Conteo total de piezas de huevo con base en el tiempo de inmunización de las aves. La columna de la izquierda hace referencia al momento en el cual se recogieron las piezas de huevo: Basal; P1a, pos-primera inoculación; P2a, pos-segunda inoculación; P3a, pos-tercera inoculación. En la columna de la derecha se muestra el número de piezas recogidas según el momento de la colecta de las mismas.

La cantidad final de huevos que se obtuvieron y que se sometieron al proceso de purificación fue de 152 piezas totales.

2.- Al término de la purificación con PEG 6000, la cantidad total de tubos que se obtuvieron fueron cuatro, clasificados de la misma manera:

1.- Basal.

2.- Pos primera inoculación (P1a).

3.- Pos segunda inoculación (P2a).

4.- Pos tercera inoculación (P3a).

3.- Como resultado de haber precipitado las IgY con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la suspensión de IgY se colocó en microtubos de 1.5 mL, dando un total de 8 microtubos, es decir, 2 microtubos por grupo de muestras, el rótulo de estos fue el siguiente:

Basal IgY anti *Toxoplasma gondii* {
➤ 1/2
➤ 2/2

P1a IgY anti *Toxoplasma gondii* {
➤ 1/2
➤ 2/2

P2a IgY anti *Toxoplasma gondii* {
➤ 1/2
➤ 2/2

P3a IgY anti *Toxoplasma gondii* {
➤ 1/2
➤ 2/2

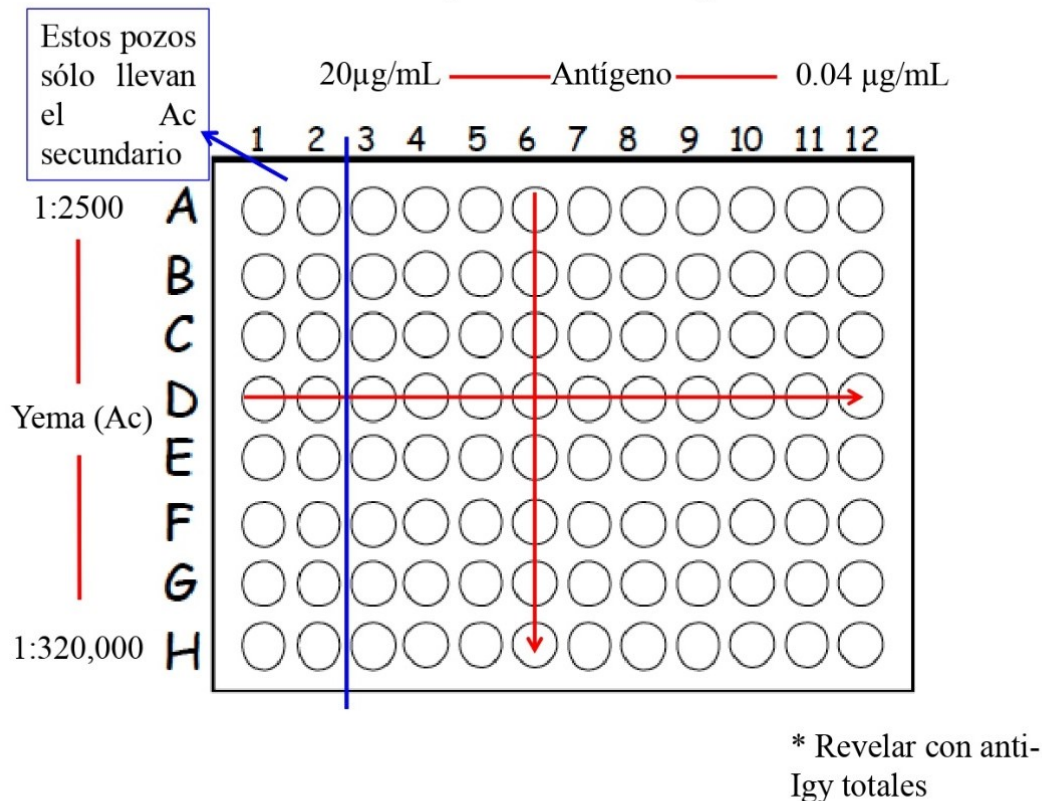
4.- Medimos la concentración de IgY mediante espectrofotometría (NanoDrop™):

- 1) 1/2 Basal IgY anti *Toxoplasma gondii*: 1.06 mg/mL
- 2) 2/2 Basal IgY anti *Toxoplasma gondii*: 0.68 mg/mL
- 3) 1/2 P1a IgY anti *Toxoplasma gondii*: 1.23 mg/mL
- 4) 2/2 P1a IgY anti *Toxoplasma gondii*: 0.97 mg/mL
- 5) 1/2 P2a IgY anti *Toxoplasma gondii*: 6.02 mg/mL
- 6) 2/2 P2a IgY anti *Toxoplasma gondii*: 6.92 mg/mL
- 7) 1/2 P3a IgY anti *Toxoplasma gondii*: 22.25 mg/mL
- 8) 2/2 P3a IgY anti *Toxoplasma gondii*: 5.44 mg/mL

5.- Por último, cuando se realizó la prueba de ELISA indirecta, se diseñaron tres placas: la primera fue una variante de ELISA indirecta con el objetivo de titular el anticuerpo secundario, la segunda tendría como antígeno al extracto crudo de *Toxoplasma gondii* (ECTg) y para la última, el antígeno que se utilizó fue el recombinante SAG1; además, se trabajó con la concentración de 22.25 mg/mL del anticuerpo primario, correspondiente a la muestra al 1/2 P3a IgY anti *Toxoplasma gondii*, esta concentración fue diluida hasta obtener 200 µg/mL; de igual forma, la concentración con la que se trabajaron a los antígenos rSAG1 y ECTg fue de 8 µg/mL.

El modelo de la placa de ELISA para titular al anticuerpo secundario se muestra en la **figura 16**.

Titulación del anticuerpo secundario por ELISA indirecto



1

Figura 16. Descripción esquemática del modelo de la placa de ELISA para la titulación del anticuerpo secundario.

En esta imagen se describe que, en los pozos de las columnas número 1 y 2, no se colocó anticuerpo primario, esto da como resultado que, en dichas columnas, no se obtenga ninguna absorbancia significativa debido a que el anticuerpo secundario o conjugado no se unió al anticuerpo primario. El objetivo principal de no haber colocado al anticuerpo primario en los pozos antes mencionados fue para identificar a esas columnas como controles negativos de la prueba. A partir de la columna 3 se colocó en cada pozo al anticuerpo primario a una

concentración de 20 µg/mL y se hicieron diluciones seriadas 1:2 hasta la última columna, finalizando con una concentración de 0.04µg/mL en la columna número 12. El antígeno se colocó en la fila A con título de 1:2500, para posteriormente hacer diluciones 1:2 hasta la fila H, quedando un título final de 1:320,000.

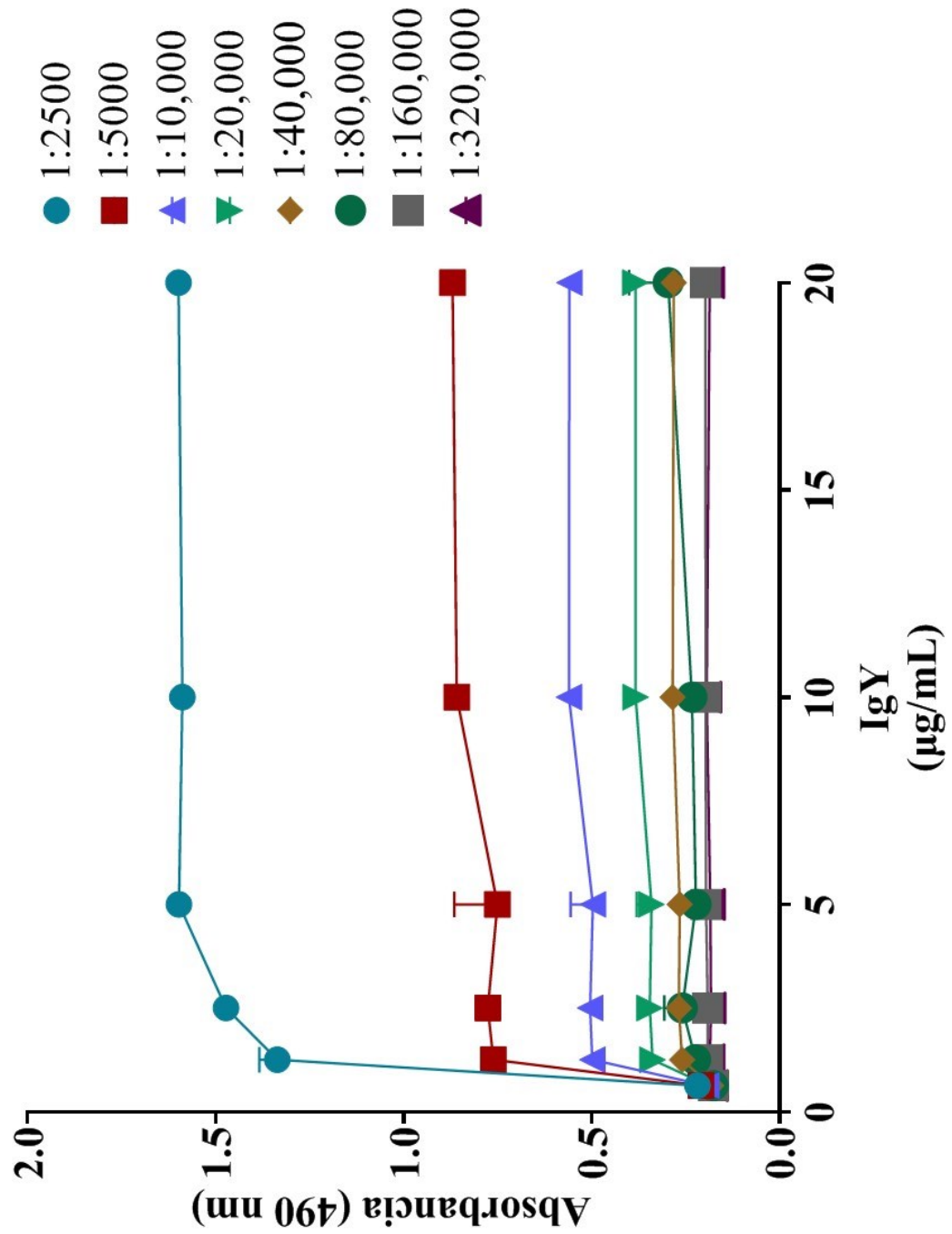
Al finalizar la prueba, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 490 nm (**Cuadro 2**)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.233	0.205	1.611	1.587	1.575	1.603	1.620	1.576	1.496	1.450	1.303	1.370
B	0.208	0.211	0.862	0.878	0.867	0.851	0.832	0.669	0.778	0.775	0.742	0.781
C	0.188	0.203	0.556	0.563	0.564	0.558	0.539	0.455	0.510	0.499	0.499	0.498
D	0.189	0.190	0.371	0.396	0.381	0.385	0.369	0.313	0.345	0.346	0.335	0.342
E	0.183	0.182	0.284	0.280	0.288	0.282	0.282	0.250	0.266	0.271	0.255	0.264
F	0.178	0.176	0.224	0.370	0.235	0.232	0.228	0.217	0.293	0.225	0.224	0.224
G	0.170	0.182	0.192	0.203	0.194	0.200	0.197	0.195	0.191	0.192	0.186	0.198
H	0.174	0.179	0.186	0.187	0.189	0.200	0.182	0.187	0.181	0.185	0.182	0.189

Cuadro 2. Valores de la absorbancia (densidad óptica) de la prueba de ELISA para la titulación del anticuerpo secundario.

Para interpretar de manera efectiva y eficiente los resultados de la tabla anterior se elaboró una gráfica (**Gráfica 1**). En el eje de las ordenadas se incluyó a la absorbancia desde las 0 unidades hasta las 2.0, y en el eje de las abscisas se plasmó la concentración de la IgY en µg/mL, correspondiente al anticuerpo primario y a las diluciones seriadas que se prepararon. Y la serie de puntos que se encuentran en la gráfica describen que a partir de un título de 1:10,000 el anticuerpo secundario posee la capacidad de evidenciar, mediante la densidad

óptica, a la presencia de la IgY en un sustrato y que para llevar a cabo una prueba de ELISA, es potencialmente útil elaborarla con los títulos 1:2500, 1:5000 y 1:10,000.



Gráfica 1. Representación gráfica de los resultados de la absorbancia (densidad óptica) obtenida a partir de la titulación del anticuerpo secundario.

El modelo de placa para elaborar la prueba de ELISA, con la que se tituló al antígeno y al anticuerpo primario, se expone en la **figura 17**.

Titulación de antígeno y Ac primario por ELISA indirecto

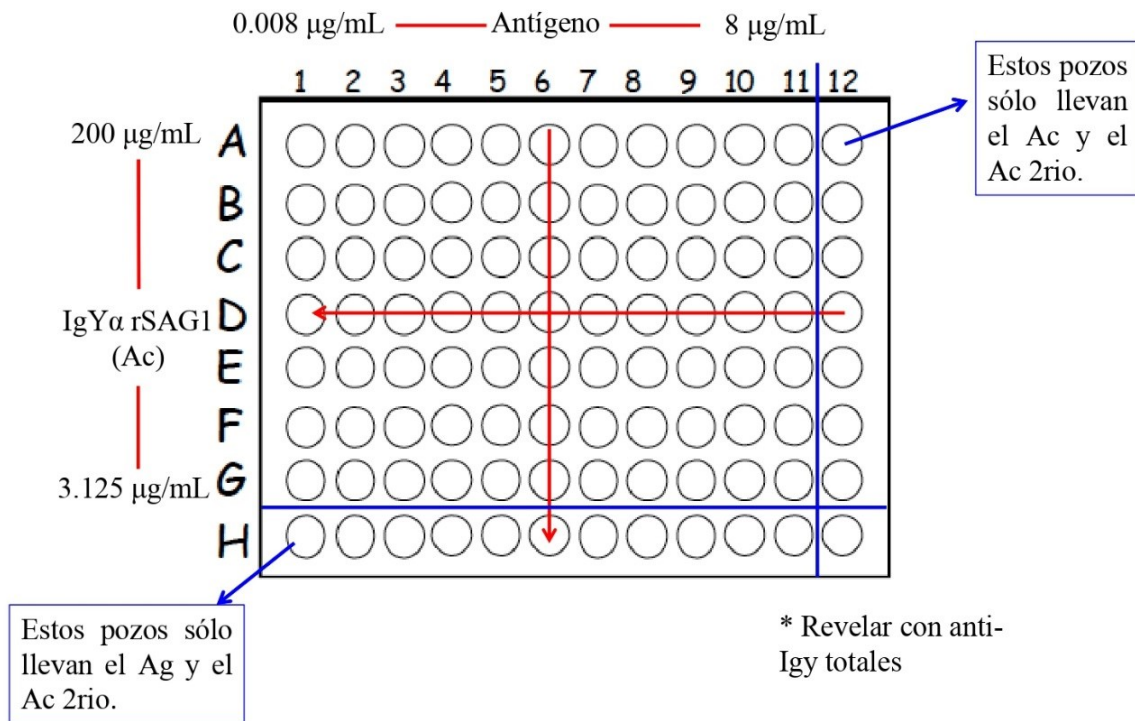


Figura 17. Descripción esquemática del modelo de la placa de ELISA para la titulación del anticuerpo primario y del antígeno.

En este esquema se demuestra que en la columna de pozos número 12 únicamente se depositó al anticuerpo primario y al secundario, como consecuencia no se obtuvo de esos pozos una respuesta colorimétrica significativa, la causa de esto fue que no pudo llevarse a cabo la reacción antígeno anticuerpo y, por los lavados que se realizan en la prueba, el anticuerpo primario y secundario no pudieron permanecer en la placa, fungiendo así esta columna como control negativo de la prueba.

Asimismo, en la fila con la letra H no se puso al anticuerpo primario, por lo tanto, en esta fila tampoco se generó dicha reacción antígeno anticuerpo, así que la anti IgY de pollo, a pesar de ser un anticuerpo, no pudo reaccionar con el antígeno, en respuesta a la gran especificidad que poseen los anticuerpos por los epítopes correspondientes. Esta fila también funcionó como control negativo de la muestra.

En la columna número 11 se colocó al antígeno correspondiente a 8 µg/mL y a partir de la columna 10 se fueron realizando diluciones seriadas 1:2 hasta la columna 1, cuya concentración final fue de 0.008 µg/mL; además, se agregó al anticuerpo primario a una concentración de 200 µg/mL en todos los pozos de la fila A y B, a partir de esta última se hicieron diluciones seriadas 1:2 hasta llegar a la fila G. Por último, se añadió al conjugado a un título de 1:2500 en todos los pozos.

Los valores de la absorbancia obtenidos después de terminadas las pruebas se plasmaron en los cuadros 3 y 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.450	0.457	0.486	0.445	0.428	0.479	0.422	0.389	0.385	0.372	0.320	0.440
B	0.384	0.375	0.392	0.371	0.356	0.359	0.350	0.347	0.326	0.330	0.295	0.355
C	0.318	0.318	0.306	0.328	0.301	0.314	0.306	0.297	0.280	0.262	0.272	0.295
D	0.262	0.260	0.252	0.271	0.262	0.257	0.242	0.240	0.236	0.230	0.236	0.250
E	0.248	0.245	0.241	0.235	0.243	0.237	0.241	0.249	0.228	0.233	0.217	0.234
F	0.224	0.227	0.205	0.336	0.229	0.228	0.213	0.214	0.233	0.212	0.209	0.208
G	0.224	0.211	0.196	0.219	0.217	0.220	0.218	0.224	0.243	0.219	0.195	0.219
H	0.198	0.196	0.199	0.199	0.201	0.193	0.187	0.191	0.192	0.198	0.193	0.204

Cuadro 3. Valores de la absorbancia (densidad óptica) de la prueba de ELISA para evidenciar la presencia de IgY anti Toxoplasma gondii utilizando como antígeno al ECTg.

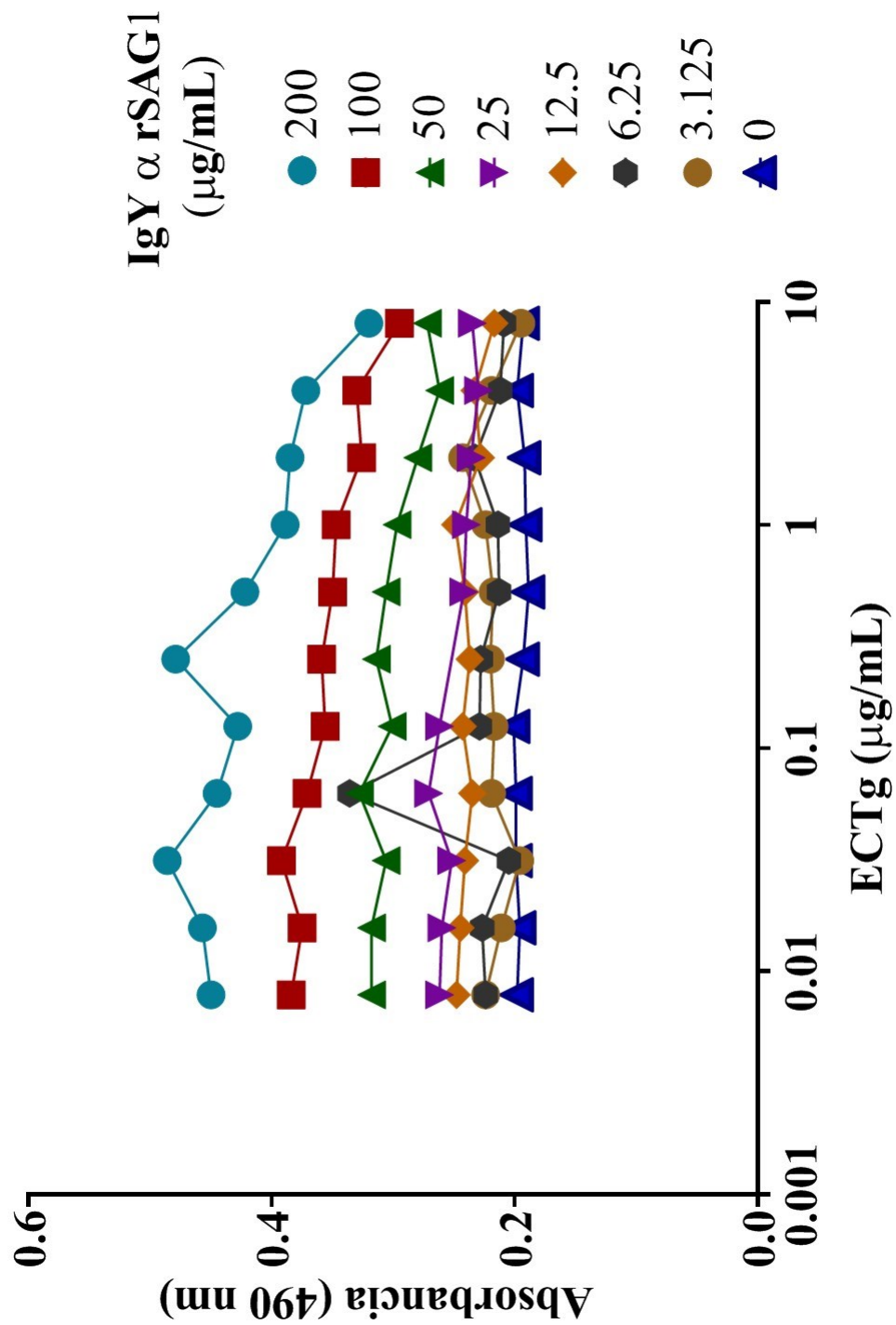
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.419	0.399	0.454	0.463	0.489	0.655	0.753	0.887	0.966	1.110	1.186	0.390
B	0.314	0.339	0.355	0.379	0.442	0.560	0.736	0.834	0.975	1.060	1.155	0.304
C	0.263	0.268	0.271	0.312	0.369	0.479	0.647	0.764	0.915	0.993	1.121	0.249
D	0.227	0.220	0.963	0.277	0.315	0.415	0.538	0.713	0.857	0.967	1.029	0.205
E	0.206	0.194	0.200	0.226	0.268	0.335	0.459	0.619	0.747	0.828	1.059	0.204
F	0.177	0.172	0.179	0.217	0.230	0.291	0.366	0.490	0.603	0.678	0.782	0.178
G	0.169	0.173	0.161	0.179	0.186	0.240	0.286	0.362	0.451	0.506	0.576	0.157
H	0.168	0.165	0.159	0.162	0.161	0.162	0.156	0.160	0.160	0.162	0.154	0.167

Cuadro 4. Valores de la absorbancia (densidad óptica) de la prueba de ELISA para evidenciar la presencia de IgY anti Toxoplasma gondii utilizando como antígeno al rSAG1.

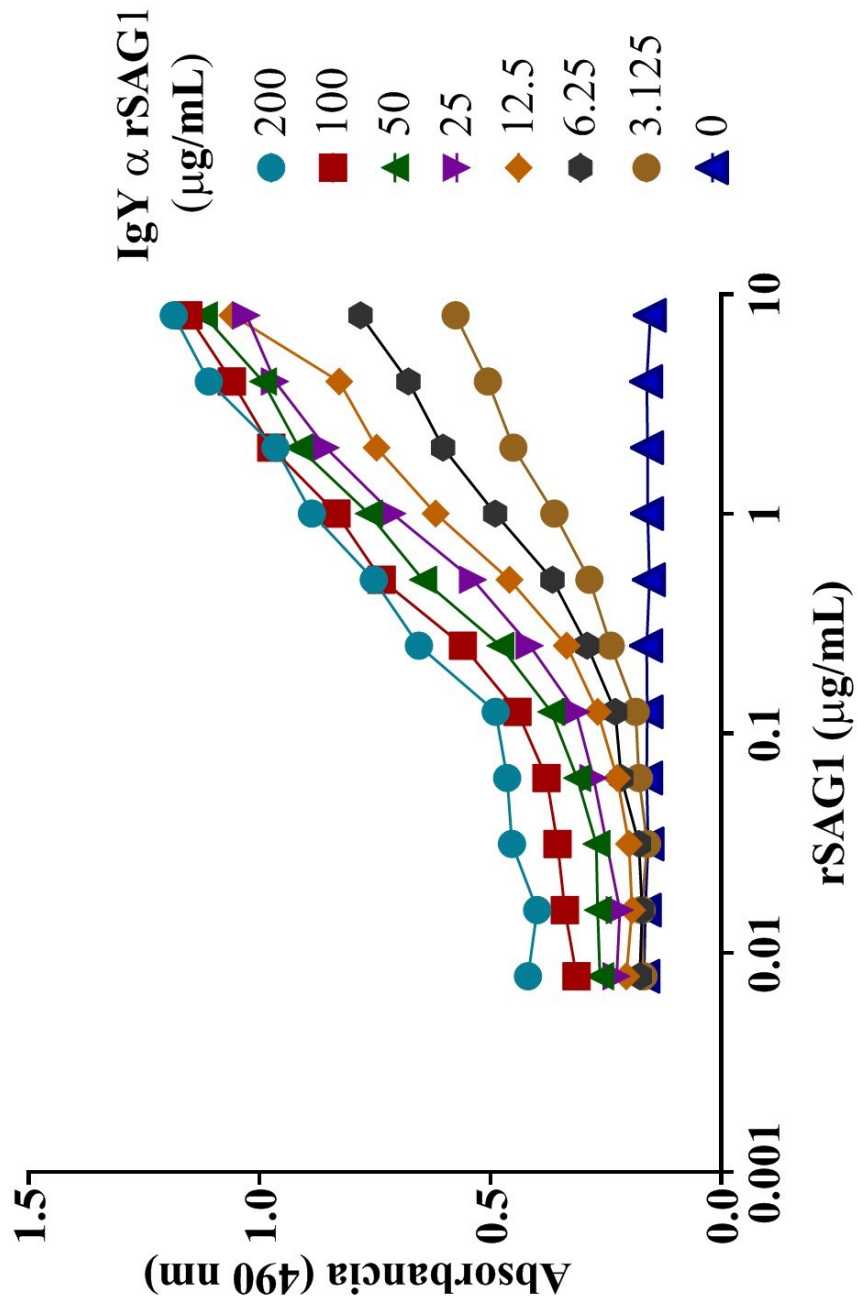
Nótese que en cada una de las tablas marcadas con el número 2 y 3, los valores que se encuentran en la columna 12 y en la fila H, no son significativos comparados con los valores que se encuentran en los pozos que difieren de los mencionados previamente.

Para comprender mejor los resultados obtenidos con el espectrofotómetro al terminar la prueba de ELISA, se diseñaron dos gráficas (**Gráficas 2 y 3**); en el eje de las abscisas se representó a la concentración del antígeno en $\mu\text{g/mL}$ y en el eje de las ordenadas se colocaron valores de absorbancia.

Otro de los objetivos por el que se elaboraron las gráficas fue para evidenciar la presencia de la IgY anti *Toxoplasma gondii* a diferentes concentraciones utilizando diferentes antígenos como lo fueron el ECTg y el antígeno rSAG1.



Gráfica 2. Representación gráfica de los valores de absorbancia de la prueba de ELISA para evidenciar la presencia de la IgY anti Toxoplasma gondii, utilizando como antígeno al ECTg.



Gráfica 3. Representación gráfica de los valores de absorbancia de la prueba de ELISA para evidenciar la presencia de la IgY anti Toxoplasma gondii, utilizando como antígeno al rSAG1

4. DISCUSIÓN

Los resultados de la concentración de IgY expresado en mg/mL, después de realizada la purificación, difirieron a los descritos por Sunwoo y col., 2002, en los que habla que el promedio de la concentración de anticuerpos IgY en la yema es de 15.73 mg/mL, con un rango de 8-25 mg/mL, considerando que la yema de huevo pueda tener un volumen de 15 mL aproximadamente, el total de IgY por yema de huevo tendría que ser de por lo menos 120 mg totales. En contraste, en este proyecto obtuvimos un valor promedio de 5.57 mg/mL de IgY por pieza de huevo, sin embargo, en este resultado se están incluyendo a los datos de las IgY basales y de la post--primera inoculación; teniendo en cuenta lo descrito por Patterson y col., 1962. En este artículo se hace mención de que los anticuerpos aparecen en la yema 8 días después de la primo inoculación y presentan un pico en el día 12, podemos omitir de nuestro promedio la concentración de anticuerpos a los huevos que se hayan recolectado antes de la segunda inoculación (dos semanas después de la primera). El resultado del promedio de la concentración de las IgY de los huevos que fueron recolectados después de la segunda inoculación fue de 10.15 mg/mL, acercándose aún más al resultado promedio que mencionan Sunwoo y col., 2002; Rose y col., 1974 en sus trabajos.

Cabe destacar que el adyuvante utilizado en este experimento, solamente fue agua inyectable; por lo que, en estudios que se lleven a cabo en un futuro, se pueden emplear diferentes adyuvantes según la clasificación propuesta por Schijns, 2000. Alguno de los ejemplos de los adyuvantes más utilizados son el adyuvante completo de Freund, 1936, y otros como los que describe Batista y cols., 2014 en su trabajo.

Padilla y cols. 2008, inocularon a conejos con una enzima llamada óxido nítrico sintetasa de *Toxoplasma gondii* (NOS-Tg-r), la cual fue administrada con dos diferentes adyuvantes vía

intramuscular y comparó la absorbancia obtenida con la prueba de ELISA después de purificar a los anticuerpos contra dicha enzima. Dando como resultado valores promedio de 0.64 para el adyuvante completo de Freund y 0.47 para el adyuvante de hidróxido de aluminio. Este fenómeno obedece a que el primer adyuvante genera una reacción inmunológica mayor, como consecuencia de generar un depósito en el sitio de inyección, estimulando a las células productoras de anticuerpos durante un mayor tiempo. En contraste, el hidróxido de aluminio está formado a base de agua, siendo más débil y ligero en cuanto a su capacidad para poder generar una respuesta inmune más efectiva (Vogel y cols. 1995); así que, en ensayos posteriores, se podrían manejar diferentes adyuvantes que potencialicen la respuesta inmune de las aves, pero que no generen un daño adverso que influya en la productividad de estas.

La concentración de los dos diferentes antígenos, -rSAG1 y ECTg-, utilizados en esta prueba ELISA (de 8µg/mL), permitieron evidenciar la presencia de las inmunoglobulinas Y, gracias a la buena sensibilidad y especificidad que posee esta prueba; precisamente como lo demostró Cardona N, 2005; estandarizando una prueba ELISA para detectar anticuerpos IgG contra *Toxoplasma gondii*, en dicho estudio demostró que los valores de absorbancia significativos fueron aquellos en los que el antígeno estaba a una concentración de 10 y 20 µg/mL. Sin embargo, en estudios posteriores se podría estandarizar una prueba ELISA para detectar anticuerpos contra la proteína recombinante rSAG1 de *Toxoplasma gondii* y obtener el punto de corte para detectar a sueros o, como en este caso, a huevos provenientes de gallinas, que sean positivos a la seroconversión generada por contacto con el parásito y poder diferenciarlos de aquellos que sean negativos.

Este trabajo también abre las puertas para marcar inmunológicamente a taquizoitos de *Toxoplasma gondii* con inmunofluorescencia para poder observar la presencia o no de la proteína rSAG1, parecido al trabajo que realizó Padilla, 2008. Estudio en el cual se marcaron a taquizoitos para detectar a la enzima NOS-Tg-r de *Toxoplasma gondii*.

5. CONCLUSIONES

Se pudo evidenciar la presencia de IgY contra el antígeno específico rSAG1 de *T. gondii*; los valores de la absorbancia son los que más datos nos aportan a nuestra conclusión porque el promedio de los valores arrojados con el antígeno de ECTg fue de 0.284 y el promedio de los valores con el antígeno rSAG1 fue de 0.525, estos dos resultados hacen referencia a que la inmunoglobulina Y obtenida fue específica para el antígeno rSAG1.

La proteína SAG1 se encuentra presente tanto en el ECTg como en el preparado de rSAG1 utilizados en el proyecto; sin embargo, la cantidad de dicha proteína es menor en el ECTg que en el rSAG1, debido a que en el primero, la cantidad de antígenos es más diversa y no únicamente posee a la proteína SAG1, sino que también contiene otras proteínas que forman parte del parásito; caso contrario en el antígeno rSAG1, cuya única proteína que se encuentra es la de interés. Podemos reafirmar estos resultados porque las concentraciones usadas en las pruebas, se estandarizaron a un solo valor: 8µg/mL de antígenos, 200 µg/mL de anticuerpo primario y un título de 1:2500 de antígeno secundario.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A, EI-Kafrawy S, Sohrab S, Azhar E. IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum Vacci Immunother.* 2018; 15: 264-275.
2. Abbas A, Litchman A, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8va edición. Elsevier; 2014.
3. Alba D, Londoño L, Matallan J, Sarmiento G, Suescún S, Tarin A. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en mujeres en edad fértil no embarazadas de la Universidad de Boyacá. 2011; 14 (2): 427.
4. Alhajj M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. StatPearls Publi [internet]. 2022 [citado 30 marzo 2022]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/#_NBK555922_pubdet
5. Alvarado C, Campillo F, Liesenfeld O. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in migrant agricultural workers living in poverty in Durango, Mexico. *Paras Vect.* 2013; 6: 113.
6. Alvarado C, Liesenfeld J, Marquez A, Estrada S, Dubey J. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in workers occupationally exposed to water, sewage, and soil in Durango, Mexico. *J Parasitol.* 2010; 96: 847-850.
7. Ameghino E. En: producción de rumiantes menores: alpacas. Perú: Resúmen; 1991.
8. Amor W, Al-Qaisi W, Al-Razem F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *JoGEaB* [internet]. 2017 [citado 13 enero 2022]; 16 (2018): 99-103. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X1730077X>

9. Anon. Fachgerechte und tierschutzkonforme Antikörperproduktion *en* Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren. Richtlinie Tierschutz 3.04, ho-800.116-3.04. Liebefeld-Bern, Switzerland: Bundesamt für Veterinärwesen; 1999.
10. Arimitsu H, Sasaki K, Kohda T, Shimizu T, Tsuji T. Evaluation of Shiga toxin 2e-specific chicken egg yolk immunoglobulin: Production and neutralization activity. *Microbiol Immunol*. 2014; 58: 643-648.
11. Attias M, Teixeira D, De Souza W, et al. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parast & Vect* [internet]. 2020 [citado 15 marzo 2022]; 13 (588). Disponible en: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04445-z#Fig2>
12. Aubert D, Maine G, Villena I, Hunt J, Howard L, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1144-1150.
13. Aykar I. Seroprevalence and coinfections of *Toxoplasma gondii* in childbearing age women in Turkey. *Iran J Pub Hea*. 2011; 40 (1): 63-67.
14. Bacci C, Vismarra A, Mangia C, Bonardi S, Bruini I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *Int J Food Microbiol*. 2015; 202: 54-56.
15. Balleño A, Ríos N, Aranda F, Morales J, Mendizábal E, Katime I. Hidrogeles de alginato-quitosano y alginato-sulfato de quitosano para la remoción de iones de cobre. *Rev Iberoam de Políme*. 2016; 17 (6): 255-265.
16. Balls M. The principles of human experimental technique: Timeless insights and unheeded warning. *ALTEX*. 2010: 19-23.

17. Batista A, Lastre M, Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enf Infec y Microbio Clín* [internet]. 2014 [citado 10-03-2022]; 32(2). Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-adyuvantes-inmunologicos-determinantes-el-balance-S0213005X1200434X>
18. Berdión E. Un parásito intracelular: *Toxoplasma gondii*. [tesis]. Madrid (Esp): Universidad Complutense de Madrid; 2015.
19. Bliss S, Butcher B, Denkers E. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol*. 2000; 165: 4515-4521.
20. Blood D, Henderson J, Radostits O. *Medicina Veterinaria*. 6a edición. México; 1986.
21. Brady D, Gaines S, Fenelon L, Mcpartlin J, O'Farrelly C. A lipoprotein-derived antimicrobial factor from hen-egg yolk is active against streptococcus species. *J Food Sci*. 2002; 67: 3096-3103.
22. Bulow R, Boothroyd J. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen and liposomes. *J Immunol*. 1991; 147: 3496-3500.
23. CABI, *Toxoplasma gondii*. *Fallopia japonica*, Invasive Species Compendium [internet]. 2021 [citado 13 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/61379>
24. Canada N, Meireles C, Rocha A, da Costa J, Erickson M, Dubey J. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses. *J Parasitol*. 2002; 88: 1247-1248.

25. Carlander D, Kollberg H, Wejaker P, Larsson A. Perioral Immunotherapy with Yolk Antibodies for the Prevention and Treatment of Enteric Infections. *Immuno Resear.* 2000; 21 (1): 1-6.
26. Carlander D. Avian IgY antibody. In Vitro and In Vivo. Uppsala, Sweden (University of Uppsala): Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1119; 2002.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory identification of parasites of public health concern [internet]. 2020 [citado 17 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>
28. Chacana P, Terzolo H, Gutiérrez E, Schade R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevos de gallina. *Rev Med Vet.* 2004; 85 (5): 179-189.
29. Chang H, Ou-Yang R, Chen Y, Chen C. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). *J Agric Food Chem* [internet]. 1999 [citado 10 abril 2022]; 47: 61-66. doi: 10.1021/jf980153u.
30. Constantin C, Neagu M, Supeanu D, Chiurciu V, Spandidos D. IgY – turning the page toward passive immunization in COVID-19 infection (Review). *Exp Ther Med.* 2020; 20: 151-158.
31. Correa D, Mandujano A, Medina Y. Manual de técnicas modernas en inmunología teoría y práctica. México; 2000.
32. Correa D. Toxoplasmosis. *Ciencia* [internet]. 2017 [citado 13 marzo 2022]; 68 (2): 54-57. Disponible en: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_1/PDF/Toxoplasmosis.pdf

33. Cortés A, Aguirre N. Toxoplasmosis aguda diseminada fatal en una paciente inmunocompetente proveniente del Pacífico colombiano. *Biom* [internet]. 2018 [citado 15 marzo 2022]; 38 (2). Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/843/84359091004/html/>
34. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol*. 2009; 70: 326-336.
35. Costa J. Estudio de la utilidad de las proteínas P22, P30 y P35 de *Toxoplasma gondii* para el diagnóstico de fase aguda de la toxoplasmosis. [tesis doctoral]. Santa Fe (Arg): Universidad Nacional del Litoral; 2014.
36. Cser L, Gladkih I, Hädige D, Ambrosius H. X-ray small-angle scattering study of general structure of chicken immunoglobulin Y. *Immunol Lett*. 1982; 4: 15-19.
37. Dabritz H, Miller M, Atwil E, et al. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *JAVMA*. 2007; 231 (11): 1676-1684.
38. Dávila-Vasques S, Barroso I, Ramos S, Uriarte W. Encefalitis por toxoplasmosis en el contexto de pacientes inmunodeprimidos (VIH/SIDA). *Sing Edu*. 2020.
39. De Berardinis A, Paludi D, Pennisi L, Vergara A. *Toxoplasma gondii*, a Foodborne Pathogen in the Swine Production Chain from European Perspective. *Foodbor Patho and Disea* [internet]. 2017 [citado 21 abril 2022]; 20 (20): 1-12. doi: 10.1089/fpd.2017.2305.
40. De Berardinis A, Vergara A, Cannistrá M. *Toxoplasma* spp nella filiera delle carni suine. *Industrie Alimentari*. 2015; 54: 3-12.
41. De Morais O, Silva B, Reis C, Gomes A, et al. Evaluation of colostrum as an alternative biological simple for the diagnosis of human congenital toxoplasmosis. *BMC Infect Dis* [internet]. 2015 [citado 24 marzo 2022]; 15: 519. Disponible en:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4647675/pdf/12879_2015_Article_1242.pdf

42. Debard N, Buzoni-Gatel D, Bout D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cyst after oral infection. *Infect Immun*. 1996; 64: 2158-2166.
43. Del Ángel F. Películas para recubrimiento de alimentos base pectina, alginato y quitosano. [tesis de maestría]. Madero (Tamaulipas): Tecnológico Nacional de México; 2019.
44. Del Bono V, Canessa A, Bruzzi P, Fiorelli M, Terragna A. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 2133-2135.
45. Díaz L, Zambrano B, Chacón G, Rocha A, Díaz S. Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2010; 70: 190-205.
46. Dubey J, Jones J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*. 2008; 38: 1257-1278.
47. Dubey J, Lappin M. Toxoplasmosis and neosporosis. *En: Greene CE. Enfermedades infecciosas en perros y gatos*. 2da ed. St. Louis, MS: Saunders Elsevier; 2006.
48. Dubey J, Ruff M, Camargo M, Shen S, Wilkins G, Kwok O, Thulliez P. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am J Vet Res*. 1993; 54: 1668-1672.
49. Dubey J. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *PlumX Met* [internet]. 2002 [citado 13 marzo 2022]; 8 (10): 634-640. Disponible en: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)62509-X/fulltext#relatedArticles](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)62509-X/fulltext#relatedArticles)

50. Dubey J. Toxoplasmosis in sheep-The last 20 years. *Vet Parasitol* [internet]. 2009 [citado 22 abril 2022]; 163: 1-14. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.02.026.
51. Dubey J. Toxoplasmosis of animals and humans. 2da edición. Maryland. CRC Press; 2010.
52. Dubey J. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*. 1994; 205 (11): 1593-1598.
53. Dumétre A, Dardé M. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003; 27 (5): 651-661.
54. Engström P, Larsson A, Norhagen-Engström G, Smith C, Sällberg M, Heigeland K, Hammarström L. Specificity and levels of oral and systemic antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*. 1993; 10.
55. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971; 8 (9): 871-874.
56. Engvall E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinic Chem*. 2010; 56 (2): 319-320.
57. Erhard M, Schade R. Short introduction to hen's humoral immune system. In *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY Technology*. Berlin, Germany; Heidelberg, Germany; New York, USA: Springer Lab Manuals; 2000.
58. Eustaquio R. Métodos y pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la toxoplasmosis. *Salud Públ Méx*. 2014; 11 (2): 361-364.
59. Faith R, Clem L. Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. *Immunol*. 1973; 25: 151-164.
60. Fatoohi A, Cozon G, Peyron F. Heterogeneity in cellular and humoral immune responses against *Toxoplasma gondii* antigen in humans. *Clin Exp Immunol*

- [internet]. 2004 [citado 25 marzo 2022]; 136 (3): 535-541. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1809048/#__ffn_sectitle
61. Flores L, Córdova R, Condarco A, Egiies E. Respuesta *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica de mujeres embarazadas infectadas con *Toxoplasma gondii*. Gac Med Bol. 2015; 38 (2).
 62. Frenkel J. Adoptive immunity to intracellular infection. J. Immunol. 1967; 98: 1309-1319.
 63. Galván R, Troyo S, Roman, Cavillo C, Bernal R. A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. Paras Vect. 2012; 5: 271.
 64. Gatica R, Slebe J, Ulloa J, Yáñez A. Comparison of two immunization routes for the production of chicken antibodies against fructose-1,6-bisphosphatase. Arch. Med. Vet [internet]. 2004 [citado 08 marzo 2022]; 36 (1). Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2004000100005#a25
 65. Gazzinelli R, Wysocka M, Hayashi S, Denkers S. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1994; 153: 2533-2543.
 66. Giraldo M. Toxoplasmosis. Medic & Lab [internet]. 2008 [citado 15 marzo 2022]; 14 (7-8): 359-375. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl087-8c.pdf>
 67. Goers J. Immunochemical Techeniques. Laboratory Manual.
 68. Golkar M, Azadmanesh, Khalili G, Khoshkholgh-Sima B, et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using enzyme-

- linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 61 (1): 31-39.
69. Gómez F. Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alto Urgel. [tesis doctoral]. Barcelona (Esp): Universidad de Barcelona; 2004.
70. González E, Carmona J, Castañeda M, Cortés A, et al. Introducción a la zootecnia del pollo y la gallina. México: UNAM; 2018.
71. Gorgievski-Hrisoho M, German D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 1506- 1511.
72. Grandía R, Entrena A, Cruz J. Toxoplasmosis en *Felis catus*: etiología, epidemiología y Enfermedad. *Rev investig vet*. 2013; 24(2).
73. Gross U, Appoldt D, Heesemann J. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. *J Clin Microbiol*. 1992; 30 (6): 1436-1441.
74. Gruber F, Hartung T. Alternatives to animal experimentation in basic research. *ALTEX*. 2004; 21: 1-31.
75. Guo M, Dubey J, Hill D, Buchanan R, Gamble H, Jones J, Pradhan A. Prevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Meat Animals and Meat Products Destined for Human Consumption. *Jour of Food Protect* [internet]. 2015 [citado 22 abril 2022]; 78 (2): 457-476. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-328.
76. Harley C, Vieira R. Antibody fragment technology and avian IgY antibodies: a powerful combination. 2016; 3: 62-66.
77. Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T, Ebina T. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic

- enzymes. Biosci Biotechnol Biochem [internet]. 1993 [citado 10 abril 2022]; 57: 1077-1081. doi: 10.127/bbb.57.1077.
78. Hotop A, Buschtöns S, Bangoura B, Zöllner B, et al. Humoral immune response in chickens and turkeys after infection with *Toxoplasma gondii* by using recombinant antigens. Parasitol Res. 2014. doi: 10.1007/s00436-014-3788-x.
79. Hruzik A, Asif A, Gross U. Identification of *Toxoplasma gondii* SUB1 antigen as a marker for acute infection by use of an innovative evaluation method. J Clin Microbiol. 2011; 49 (7): 2419-2425.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4416365/#__ffn_sectitle
80. INDRE, SSA, Medina E, Mata O, Carpio J, Zavala A, Ruiz A. Manual de técnicas modernas en inmunología teoría y práctica. Correa D, Mandujano A, Medina Y, editores. México: 2000.
81. Jacobs L, Lunde M. Hemagglutination test for toxoplasmosis. Science. 1957; 125: 3256-1035.
82. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. 5th edition. Heidelberg & Berlin, Germany: Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
83. Jazmín N. Estudio de los mecanismos de acción utilizados por las células T reguladoras durante la fase aguda de la infección con *Toxoplasma gondii*. [tesis doctoral]. CDMX (Méx.): UNAM; 2015.
84. Jin L, Baidoo S, Marquardt R, Frohlich A. *In vitro* inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998; 21: 313-321.

85. Jones J, López A, Wilson M. Congenital Toxoplasmosis. Am Fam Physician [internet], 2003 [citado 13 marzo 2022]; 67 (10): 2131-2138. Disponible en: <https://www.aafp.org/afp/2003/0515/p2131.html#afp20030515p2131-b10>
86. Käpyaho K, Tanner P, Weber T. Effect of complement binding on a solid-phase immunometric TSH assay. Scand J Clin Lab Invest. 1989; 49: 211-215.
87. Kastern W, Holst E, Nielsen E, Sjöbring U, Björk L. Protein L, a bacterial immunoglobulin-binding protein and possibly virulence determinant. Infect Immun. 1990; 58: 1217-1222.
88. Katz D, Lehrer S, Kohn A. Use of chicken and rabbit antibodies in a solid phase protein. A radioimmunoassay for virus detection. J Virol Methods. 1985; 12: 59-70.
89. Khan I, Ely K, Kasper L. A purified parasite antigen (P30) mediates CD8⁺ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunol. 1991; 147: 3501-3506.
90. Klemperer F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. Arch Für Exp Pathol Pharmakol. 1893; 31: 356-382.
91. Kohl T, Ascoli C. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Cold Spring Harb Protoc. 2017; 7.
92. Kohl T, Ascoli C. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Cold Spring Barb Protoc. 2017; 6.
93. Kohl T, Ascoli C. Indirect Immunometric ELISA. Cold Spring Harb Protoc. 2017; 5.
94. Konstantinou G. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Methods Mol Biol. 2017; 1592: 79-94.
95. Larsson A, Balow R, Lindahl T, Forsberg P. Chicken Antibodies: Taking Advantage of Evolution-A Review. Poultry Science [internet]. 1993 [citado 13 abril 2022]; 72

(10): 1807-1812. Disponible en:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0032579119451997?token=BDC94B0FA22FDF9DA26BC14A304DDDD560AF4B68AA957CB01458BF4681EDFE33A5A1238BDC75337403D4210233804F29&originRegion=us-east-1&originCreation=20220413220104>

96. Larsson A, Carlander D, Wilhelmsson M. Immune response in chicken with different amounts of antigen. *Food Agricult Immunol*. 1998; 10: 29-36.
97. Larsson A, Mellstedt. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by human antimouse antibodies in ELISA after in vivo treatment with murine monoclonal antibodies. *Hybridoma*. 1992; 11: 33-39.
98. Lee E, Sunwoo H, Menninen K, Sim J. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poult Sci* [internet]. 2002 [citado 20 abril 2022]; 81: 632-641. doi: 10.1093/ps/81.5.632.
99. Lee K, Chang S, Lee Y, Lee J, Koo N. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J Biochem Mol Biol* [internet]. 2002 [citado 10 abril 2022]; 35: 488-493. doi: 10.5483/BMBRep.2022.35.5.488.
100. Leiva C, Gallardo M, Casanova N, Terzolo H, Chacana P. IgY technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. *Int Immunopharmacol*. 2020; 81: 106269.
101. Lekutisa C, Ferguson D, Grigga M, Campsa M, Boothroyd J. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol*. 2001; 31: 1285-1292.
102. Leónidas C, Gallardo M, Casanova N, Terzolo H, Chacana P. IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. *Internat Immunopharmac*. 2020; 8: 106269.

103. Lequin R. Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinic Chem.* 2005; 51 (12): 2415-2418.
104. Leslie G, Clem L. Phylogeny of immunoglobulin structure and function: immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med.* 1969; 130: 1337-1352.
105. Li X, Jin L, Uzonna J, Li S, Liu J, Li H, et al. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): *in vivo* evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Vet Immunol Immunopathol* [internet]. 2009 [citado 10 abril 2022]; 129: 132-136. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.12.016.
106. Lindahl T, Festin R, Larsson A. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: An improved method for detection of platelet activation. *Haemostasis.* 1992; 68: 221-225.
107. Lundqvist M, Middleton D, Radford C, Warr G, Magor K. Immunoglobulins of the non-galliform birds: Antibody expression and repertoire in the duck. *Dev Comp Immunol.* 2006; 30: 93-100.
108. Maekelt A, Mauriello L, Días M, Díaz Z. Evaluación de la prueba ELISA-avidez- IgG como inmunodiagnóstico serológico de la infección toxoplasmática reciente (+). *RFM.* 2000; 23 (2).
109. Martínez J. *Inmunología Bases moleculares y celulares.*
110. Mittal V, Ichhpujani R. Toxoplasmosis – An update. *Trop Parasitol* [internet]. 2014 [citado 20 marzo 2022]; 4(1): 69. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3593470/#!po=3.73134>
111. Mitteness B, Phillips C. Inventors: Camas Incorporated, assignee: Compositions Against Bacterial Toxins. World Intellectual Property Organization patent WO 2013009843. 2013.

112. Morales E. Toxoplasmosis. Departamento de Patología, FMVZ, UNAM.
113. Moreno M. *Toxoplasma gondii*. México: Manual Moderno; 2013.
114. Muñiz S, Mondragón R. *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. REB [internet]. 2009 [citado 17 marzo 2022]; 28 (2): 52-58. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2009/reb092d.pdf>
115. Nguyen T, Bigaignon G, Van Broeck J, et al. Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses. *Infect Immun*. 1998; 66: 2991-2995.
116. Nie R, Wu D, Hu G, Zhang J, Yang H, Wen Z. Effect of specific egg yolk immunoglobulins on phagocytosis by neutrophils. *Chin J Vet Med*. 2004; 12: 23-25.
117. Niguelie Z, Hernández S, Solís O, González C. Toxoplasmosis cerebral asociado a VIH/SIDA. Revisión de literatura y reporte de un caso. *UYC*. 2017; 9 (14): 22-30.
118. Noll F, Lutsch G, Bielka H. Structure of IgG and IgY molecules in ribosome-antibody complexes as studied by electron microscopy. *Immunol Lett*. 1982; 4 (3): 117-123.
119. Ochoa R. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. Betancourt V, redacción y corrección. Cuba: Finlay Ediciones; 2012. Disponible en: <https://www.paho.org/cub/dmdocuments/PubFINLAY-LIBROTecInmunoParaEClinVacunas2012.pdf>
120. Padilla J, Trejos J, Coronado S, Cardona N. Producción de anticuerpos policlonales IgG contra una proteína con actividad de óxido nítrico sintetasa de *Toxoplasma gondii* recombinante (NOS-Tg-r) y marcación inmunológica en

- taquizoitos. Infect [internet]. 2008 [citado 10-03-2022]; 12 (2). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922008000200005
121. Pangalos G, Pavlatos M, Mercier P. The Sabin Feldman dye test. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1956; 50 (6): 583-586.
 122. Papatsiros V, Athanasiou L, Stougiou D, Papadopoulos E, Maragkakis G, et al. Cross-sectional serosurvey and risk factors associated with the presence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs in Greece. Vect Borne Zoonotic Dis. 2016; 16: 48-53.
 123. Pappas G, Roussos N, Falagas M. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Internat Jour for Parasit. 2009; 39: 1385-1394.
 124. Patterson R, Younger J, Weigle W, Dixon F. Antibody Production and Transfer to Egg Yolk in Chickens. J. Immunol. 1962; 89 (2): 272-278.
 125. Petersen E, Dubey J. Biology of toxoplasmosis. *En: Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide.* Joyson D, Wreghitt T (editores). Reino Unido: Cambridge University Press; 2001.
 126. Pinon J, Toubas D, Marx C, et al. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 1990; 28: 1739-1743.
 127. Quiroz H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México: Limusa; 1988.
 128. Rahman S, Nguyen S, Kodama Y. Oral passive IgY-based immunotherapeutics. A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. Hum Vaccin & Immunother [internet]. 2013 [citado 13 abril 2022]; 9

- (5): 1039-1048. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3899138/#__ffn_sectitle
129. Rivera N, García P. The role of cats in toxoplasmosis. Reality and responsibility. Rev Fac Med [internet]. 2017 [citado 17 marzo 2022]; 60 (6). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0026-17422017000600007&script=sci_arttext#f4
130. Romero P, Magnoli A, Peralta M. Biotecnología de la inmunoglobulina Y (IgY) en animales domésticos como preventivo o terapéutico en enfermedades entéricas. REDVET [internet]. 2013 [citado 13 abril 2022]; 15 (1). Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63637992007.pdf>
131. Rose M, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. Eur. J. Immunol. 1974; 4: 521-523.
132. Sabin A, Feldman H. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma gondii*). Science. 1937; 85: 336-338.
133. San Miguel M, Ferreira J, Figueredo N, Fleitas D, Canese A. Prevalencia de toxoplasmosis y Chagas en pacientes con VIH/SIDA. Rev Inst Med Trop. 2010; 5 (2): 10-15.
134. Sánchez A, Cobos D, Sánchez L, Miranda A, et al. La toxoplasmosis observada como un problema no resuelto. Rev Cub de Invest Biom [internet]. 2016 [citado 24 marzo 2022]; 6 (5): e01155-15. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002016000300006&nrm=iso

135. Schade R, Behn I, Erhard M, Hlinak A, Staack C. Chicken egg yolk antibodies, production and application. *Spring Lab Manua*. 2000; 255.
136. Schade R, Gutiérrez E, Sarmiento R, Chacana P, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo H. Chicken egg yolk antibodies (IgY technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim* [internet]. 2005 [citado 06 abril 2022]; 33: 129-154. doi: <https://doi.org/10.1177/026119290503300208>
137. Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, et al. La producción de anticuerpos aviares (yema de huevo): IgY: Informe y recomendaciones del taller ECVAM 21 1,2. *Altern Lab Anim*. 1996; 24: 925-934.
138. Schade R, Terzolo H. IgY-technology: application and trends [internet]. 2006 [citado 06 abril 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/267702265_IgY-technology_application_and_trends
139. Schade R, Zhang X, Terzolo H. Use of IgY antibodies in human and veterinary medicine. *Bioact Egg Comp*. 2007; 23: 213-222.
140. Schares G, Bangoura B, Randau F, Goroll T, et al. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and probability of detection tissue cysts in backyard laying hens compared with hens from large free-range farms. *Int J Parasitol* [internet]. 2017 [citado 22 abril 2022]; 47 (12): 765-777. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.07.003.
141. Schinjs V. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12: 456-463.
142. Schmidr A, Oberle N, Krammer P. Molecular mechanisms of Tregs-mediated T cell suppression. *Front Immunol*. 2012; 3: 1-20.

143. Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. Clin Microbiol Infect. 2006; 12: 504-512.
144. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. Br J Hosp Med. 2016; 77 (7): 98-101.
145. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nat Immunol. 2002; 3: 135-142.
146. Shimizu M, Nagashima H, Sano K, Hashimoto K, et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. Biosci, Biotech and Biochem. 1992; 56: 270-274.
147. Sousa R, Hieny C, Scharon K, et al. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. J Exp Med. 1997; 186: 1819-1829.
148. Spillner E, Braren I, Greunke K, Seismann H, Blank S, du Plessis D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnosis and therapy. Biologicals. 2012; 40: 313-322.
149. Stelzer S, Basso W, Benavides S, Ortega L, Maksimov P, et al. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. Food and Waterborne Parasitol [internet]. 2019 [citado 23 abril 2022]; 15. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2405676618300441?token=1A1503030DDF730F74862EE2C693454B4346C9C86B500DA33076A46C4D2A7C01ACB5287E14FF512EE2505B43E9E7DB49&originRegion=us-east-1&originCreation=20220423143533>

150. Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun of Mass Spectrometry*. 2001; 15: 708-712.
151. Sunwoo H, Lee E, Menninen K, Suresh M, Sim J, Growth Inhibitory Effect of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. *J of Food Sci*. 2002; 67 (4): 1486-1494.
152. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD2⁺ - CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte- associated antigen. *J Exp Med*. 2000; 192: 303-310.
153. Tenter A. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem do Inst Oswal Cru*. 2009; 104 (2): 364-369.
154. Terzolo H. Aplicaciones de tecnología de las inmunoglobulinas de yema de huevo (IgY) de gallina. *ResearchGate*. 2010: 173-183.
155. Thirumalai D, Visaga S, Vieira R, Xiaoying Z, Sekaran S, Krishnan U. Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections – A review. *Int J Biol Macromol*. 2019; 136: 755-763.
156. Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen P, Moser C, Hoiby N. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies induce specific bacterial aggregation and internalization in human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* [internet]. 2015 [citado 21 abril 2022]; 83: 2686-2693. doi: 10.1128/IAI.02970-14.
157. Thu H, Myat T, Win M, et al. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) for Prophylaxis and Treatment of Rotavirus Diarrhea in Human and Animal Neonates: A Concise Review. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2017; 37: 1-9.

158. Tipantiza N, Torres M. Tecnología IgY: Estrategia en el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas. *Latin Amer Jour of Biotechnol and Life Scien* [internet]. 2021 [citado 13 abril 2022]; 6 (3): 2061-2075.
159. Trigo F, Romero L, Candanosa I, García L, Juárez M, Martínez I, et al. *Patología Sistémica Veterinaria*. 6a edición. México: UNAM; 2015.
160. Van de Winkel J, Capel P. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol*. 1993; 14: 215-221.
161. Van Weemen B. The Rise of EIA/ELISA. *Clinic Chem*. 2005; 51: 12.
162. Varela G, Palencia L, Vázquez A. Utilización del pez *Lebistes reticulatus* (Guppy) en el diagnóstico de la toxoplasmosis. *Rev Inst Salub Enf Trop*. 1957; 12 (2): 75-80.
163. Velge-Roussel F, Chardés T, Mévélec P, Brilard M, Hoebeke J, Bout D. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. *Mol Biohem Parasit*. 1994; 66: 31-38.
164. Vogel F, Powell M. A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients. Plenum Publishing Corp. 1995: 234-250.
165. Voller A. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A.). W O H. 1978; 2 (1).
166. Wam E, Sama L, Ali I, Ebile W, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* IgG and IgM antibodies and associated risk factors in women of child-bearing age in Njinikom, NW Camaroon. *BMC Res Notes*. 2016; 9 (1): 406. doi: 10.1186/s13104-016-2206-0.

167. Wang S, Zhao G, Wang W et al. Pathogenicity of Five Strains of *Toxoplasma gondii* from Different Animals to Chickens. Korean J Parasitol [internet]. 2015 [citado 22 abril 2022]; 53 (2): 155-162. Disponible en:
168. Warren J, Sabin A. The complement fixation reaction in toxoplasmosis infections. Proc Soc exp Biol Med. 1942; 51 (11).
169. Wingfield P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. Curr Protoc Protein Sci [internet]. 2016 [citado 13 enero 2022]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817497/>
170. Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, You J, Wang L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. Biotechnol Adv [internet]. 2011 [citado 21 abril 2022]; 29: 860-868. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.003.
171. Yang N, Yang M, Bin J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered chickens, ducks, and geese in Shenyang, northeastern China. Parasit and Vect [internet]. 2012 [citado 22 abril 2022]; 5 (237). Disponible: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/1756-3305-5-237.pdf>
172. Zhang H, Mine Y. Chapter 11: Antiviral properties of egg components. In: Eggs as Functional and Nutraceuticals for Human Health. Reino Unido: Royal Society of Chemistry; 2019.
173. Zhen Y, Jin L, Guo J, Li X, Lu Y, Chen J, Xu Y. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. Vet Microbiol [internet]. 2008 [citado 21 abril 2022]; 130: 126-133. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.12.014.