"PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgY DE YEMA DE HUEVO CONTRA VIRUS JUNÍN COMO ALTERNATIVA 3R AL USO DE MAMÍFEROS"

Trabajo Final de Grado
de la alumna

VERDAGUER MARÍA LUZ

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de

Licenciado en Genética

Carrera

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

“PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgY DE YEMA DE HUEVO CONTRA VIRUS JUNÍN COMO ALTERNATIVA 3R AL USO DE MAMÍFEROS”

Trabajo Final de Grado
de la alumna

VERDAGUER MARÍA LUZ

Dra. Zulma Canet
Evaluador

Bioq. Julia Marina Brignone
Evaluador

Bioq. María Alejandra Morales
Evaluador

Dra. Maiza Andrea
Co-Directora

Dra. Saavedra María Del Carmen
Directora

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

ÍNDICE

Página

PORTADA 1

ÍNDICE 3

AGRADECIMIENTOS 5

INTRODUCCIÓN 6

HIPÓTESIS 15

OBJETIVO GENERAL 16

OBJETIVO ESPECÍFICO 16

MATERIALES 17

MÉTODOS 18

1. Esquema de inmunización de las gallinas 18

2. Extracción de las IgY anti VJ 19

3. Medición de proteínas totales 20

4. Prueba de neutralización por reducción del 80% ($PRNT_{80}$) de unidades formadoras de placas (UFP) 20

a) Materiales 20

b) Procedimiento 21

c) Titulación de fondo de la cepa vacunal C#1 22

d) Cálculo del título de Ac. NT anti VJ 23

5. Determinación de la eficacia del reactivo basado en IgY para ser utilizado en un control de calidad de la vacuna C#1 24

RESULTADOS 27

1. Medición de proteínas totales 27

2. Tabla de resultados 28

3. Determinación de la eficacia del reactivo 29

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN 30

ABREVIATURAS 34

BIBLIOGRAFÍA 35

AGRADECIMIENTOS

Después de haber transcurrido más de un año de aprendizaje, tanto teórico como práctico en el campo de la ciencia dentro del Instituto MAIZTEGUI, queda reflejado en esta sección el agradecimiento de la responsable de esta tesina a las siguientes personas:

- En primer lugar a la tutora Dra. Carmen Saavedra, cuyo ofrecimiento fue que integrara su equipo, por todo el apoyo recibido para la realización de esta tesina.
- A la co-directora Dra. Andrea Maiza por su colaboración y solidaridad en cada momento que fue necesario.
- A las demás integrantes del equipo Graciela y Herminia, por el apoyo recibido de ambas.
- A la U.N.N.O.B.A. como hilo conductor, que permite la posibilidad de desarrollar eficientemente, las distintas ramas de la ciencia, abriendo sus puertas a quienes están interesados en dedicarse a estos aprendizajes.
- A los compañeros con quienes se compartieron tantas oportunidades llevando adelante temas atractivos y enriquecedores.
- Y por último a la familia para quien sólo hay una palabra y en mayúscula "GRACIAS"

INTRODUCCIÓN

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), es una enfermedad infecciosa endémica producida por el virus Junín (VJ), cuyo reservorio es un roedor silvestre de la especie *Calomys musculinus* (Sabattini *et al.*1982). Se trata de una enfermedad endemo–epidémica exclusiva de una zona geográfica limitada de nuestro país que abarca las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y La Pampa. Se estima una población en riesgo de 5 millones de personas (Ambrosio *et al.* 2006).

El VJ fue aislado en 1958 y pertenece a la familia *Arenaviridae* y reciben su nombre (del latín arenosus) debido al aspecto granuloso que presentan los viriones cuando son observados al microscopio electrónico. Esta familia está compuesta por un número creciente de Virus incluyendo hasta el momento 18 miembros reconocidos por el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV).

De acuerdo al sitio geográfico de aislamiento, la reactividad serológica cruzada y la información genética, los arenavirus fueron clasificados en dos grandes grupos. Estos grupos se podrían homologar con géneros incluidos en la familia.

La división separa a los arenavirus del Viejo Mundo de aquellos del Nuevo mundo. El grupo de los arenavirus del Viejo Mundo incluye al virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) y a los virus Ippy, Lassa, Mobala y Mopeia. Por otra parte, el grupo de los arenavirus del Nuevo Mundo comprende a los virus Amapari, Flexal, Guanarito, Junín, Latino, Machupo, Oliveros, Paraná, Pichindé, Sabiá, Tacaribe, Tamiami y Whitewater Arroyo.

El virus LCM es el prototipo de esta familia y es el único arenavirus que posee una distribución amplia en todo el mundo. En cambio el resto de los miembros de la familia están restringidos geográficamente. Es interesante notar que el área de distribución de los arenavirus está en relación con la distribución geográfica de los hospedadores y es probable que este sea un factor determinante en la co-evolución de los mismos. En este sentido, todas las especies de arenavirus tienen como reservorios naturales a los roedores; con excepción del virus Tacaribe, cuyo reservorio es un quiróptero (Albariño, 1997).

Los arenavirus son una familia de virus caracterizados por poseer un genoma lineal de ARN de cadena simple. Posee 2 segmentos genómicos: uno de 7,5 kb denominado «L» (del inglés large, grande), y otro de 3,5 kb, denominado «S» (del inglés small, pequeño) (Figura 1) (Cann *et al.* 2005). Cada una de las moléculas de ARN difieren en tamaño y poseen dos marcos de lectura abiertos, no superpuestos y de polaridad opuesta. Esto representa una de las características más sobresalientes de la familia, determinando además su estrategia tan particular de replicación “ambisentido” (Martínez, 2010).

Los extremos 5' y 3' del RNA S y L poseen secuencias nucleotídicas complementarias que podrían formar una estructura de doble cadena, denominada Panhandle. El apareamiento en los extremos forma una estructura pseudocircular, que permite explicar la forma circular observada al microscopio electrónico. Las partículas víricas son esféricas y tienen un diámetro promedio entre 110 y 130 nanómetros, todos recubiertos de una membrana lipídica (Albariño, 1997).

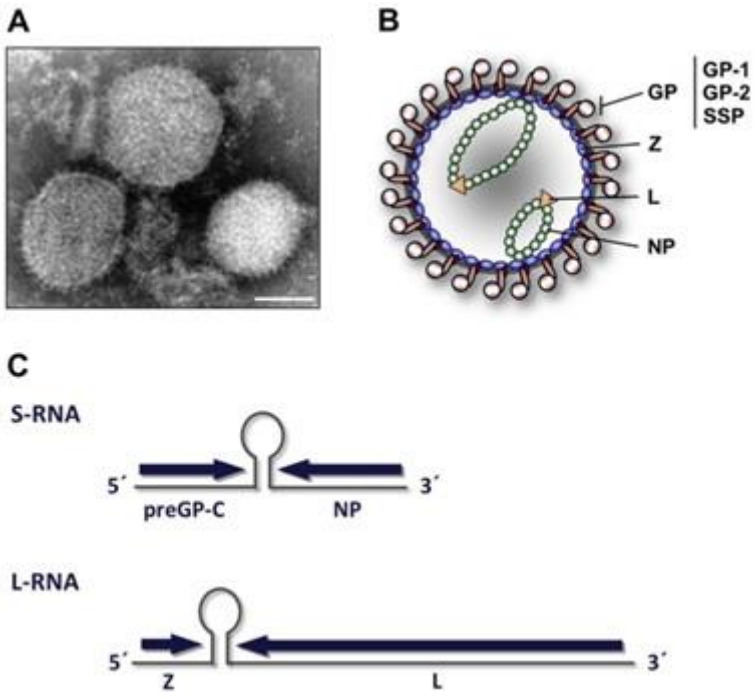

Figura 1: Estructura de un Arenavirus (Fehling *et al*. 2012)

Localizadas en el interior del virión se encuentran las otras proteínas del arenavirus. La proteína mayoritaria N, está asociada a los ARN´s virales y forma las nuclocápsides. Además, se encuentran en cantidades minoritarias, otras dos proteínas, la RNA polimerasa (replicasa), llamada proteína L y una proteína pequeña denominada Z por contener motivos estructurales del tipo RING finger. Junto con estas proteínas, son encapsidadas dentro de la partícula viral ribosomas. El significado y la posible función de los ribosomas es desconocida pero, se piensa que no sean componentes esenciales de los arenavirus y que sean incorporados durante la brotación debido a la falta de especificidad en el proceso.

En los roedores infectados, el virus cumple un ciclo que asegura su mantenimiento en la naturaleza. En general, se encuentran altos títulos virales en casi todos los órganos y en los fluidos corporales como la sangre y, en particular, la saliva del animal. En la mayoría de los arenavirus, los roedores presentan infecciones crónicas inaparentes, con eliminación persistente del virus al medio ambiente. De esta manera se contagian los roedores sanos y, ocasionalmente se infecta al hombre,

El ciclo de infección viral comienza con la unión de los viriones a la membrana de la célula blanco. Esta unión depende la interacción entre las proteínas de la superficie del virión y una proteína de la membrana plasmática que actúa como receptor viral. La segunda etapa es el ingreso del virus dentro de la célula que ocurre por un proceso de fusión de membranas (Posik, 2004).

La entrada del virus a la célula se produce por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y dependiente de vesículas recubiertas con clatrina (Martínez, 2010).

Posteriormente, la progresiva acidificación del endosoma que contiene al virión hace que a pH 5,3-5,5 (endosoma tardío) se produzca la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal, un cambio de conformación irreversible en una glicoproteína (G1) que lleva a la disociación del complejo G1 y G2, la formación de un poro y la liberación de las nucleocápsides y las proteínas asociadas (Z y L) al interior de la célula. Posteriormente, se produce la disociación del complejo proteína N-ARN y se inicia una serie de eventos en la célula infectada que incluye: la transcripción de los genes virales, la

traducción de los ARNm y la replicación del ARN genómico. Estos llevan, finalmente, al ensamblado de las nucleocápsides, a la encapsidación (mecanismo del cual se conoce poco) y la brotación de los nuevos virus (Posik, 2004).

El hombre adquiere la enfermedad por contacto con roedores infectados (Chiappero M. *et al.* 2018). La inhalación de aerosoles de las excretas de los reservorios infectados es considerada la vía más importante de infección, la transmisión interhumana si bien es muy infrecuente, puede ocurrir (Enria *et al*. 1998).

Uno de los aspectos epidemiológicos más relevantes de la enfermedad es la extensión progresiva de su área endémica. En 1958, la zona afectada estaba circunscripta a 4 partidos de la provincia de Buenos Aires, con una superficie de 16.000 km^2 y una población a riesgo estimada en 270.000 habitantes (Figura 2).

En la actualidad, el área endémica de la FHA cubre un área de aproximadamente 150.000 km^2, con una población a riesgo estimada en 5.000.000 de habitantes (Maiztegui y Sabattini 1977; Enria *et al.*1998).

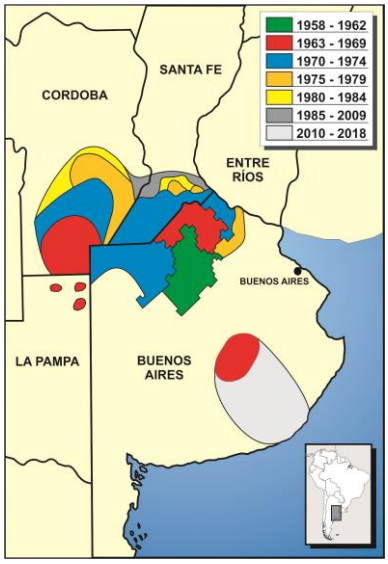

Figura 2: Extensión progresiva del área endémica de la FHA (Reunión anual de FHA 2018)

La incidencia de esta enfermedad varía en dependencia del lugar y el tiempo, ya que su diseminación es focal y depende de la presencia y de la cantidad de roedores

infectados (Maiztegui *et al.* 1986; Mills *et al*. 1992; García *et al.* 1996). En los comienzos de la FHA, dicha enfermedad era 4 veces más frecuente en hombres que en mujeres y el 90% de los casos se presentaban en la población rural; aproximadamente el 10% de las personas afectadas eran menores de 14 años (Enria *et al.* 1998).

Entre 2001 y 2010 se han producido cambios relativos en el patrón epidemiológico clásico (género, edad, ocupación y distribución rural urbana de la FHA) que, en algunos casos, se han atribuido a las intervenciones sanitarias descriptas (por ejemplo, aumento de la proporción en mujeres por haber centrado la vacunación en varones), mientras que otros, como la emergencia en localidades no históricas y no endémicas como La Dulce (Partido de Necochea) y Mar del Plata (Partido de General Pueyrredón) en la provincia de Buenos Aires, permaneciendo sin ser explicadas (Mastrangelo *et al.* 2014). También se modificaron los patrones de riesgo (Briggiler *et al.* 2015).

A pesar que se pueden observar casos de FHA durante todos los meses, hay anualmente brotes estacionales que se producen en el otoño y el invierno, con un pico en el mes de mayo (Briggiler *et al.* 2015).

El periodo de incubación es entre 6 a 14 días, con un rango de 4 a 21 días. Existe un tratamiento específico para la FHA que se basa en la transfusión de plasma con alto contenido de anticuerpos específicos contra el virus Junín, reduciendo la mortalidad del 15-30% al 1-3% cuando se administra tempranamente (Enria *et al*. 1998), aunque presenta los riesgos propios de los hemoderivados (Maiztegui *et al*.1979; Enria *et al.* 1984). El 10% de los pacientes tratados pueden desarrollar el síndrome neurológico tardío (Enria *et al.* 1985).

La FHA es una enfermedad zoonótica no erradicable debido a que su reservorio se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (Briggiler *et al.* 2015). En 1978 con el Decreto 663/78 se inició una investigación dirigida a la obtención de una vacuna contra la FHA. Se firmó un convenio internacional destinado a obtener una vacuna a virus vivo atenuado, en un plazo estimado de 3 años.

El gobierno argentino, la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP), el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) y el United Army Medical Research Institute

of Infectiuos Diseases de los Estados Unidos participaron de esta iniciativa. El convenio estipulaba que la caracterización del virus fuera realizada en Estados Unidos por un científico argentino, y que, una vez obtenida la semilla y realizados los controles correspondientes, la vacuna sería producida en la Argentina, utilizando esta misma semilla en el Instituto Nacional de Enfermedades Humanas Dr. Julio I. Maiztegui (INEVH) (Ambrosio *et al.* 2006).

En 1978 el médico microbiólogo Julio Barrera Oro logró aislar en los Estados Unidos la cepa Candid#1 (C#1) luego de distintos procedimientos de atenuación, diferentes métodos de clonado y la utilización de huéspedes de calidad certificada, tales como ratones de laboratorio libres de patógenos específicos (spf) y cultivos de células diploides certificadas. En 1983 la cepa vacunal fue entregada a la Argentina, comenzaron los estudios preliminares en animales y luego los ensayos clínicos en voluntarios humanos, de manera simultánea en los Estados Unidos y en nuestro país.

En diciembre de 1986, 14 voluntarios fueron inoculados en Pergamino con la vacuna C#1 producida en EEUU y luego de comprobar la ausencia de efectos adversos, la prueba se amplió a residentes del área endémica y demostró ser inmunogénica. Entre 1988 y 1990 se evaluó la eficacia de C#1 en un estudio prospectivo aleatorio a doble ciego, que estipuló su eficacia en un 95,5% (Ambrosio *et al.* 2006).

En el 2003 se produjeron en el INEVH los 2 primeros lotes de C#1 para uso en humanos, liberados en planta e inspeccionados por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) (subsidio de la Secretaría de Ciencia, Técnica e Innovación Productiva). En el 2005 se realizó “Estudio clínico puente, en fase III, en voluntarios humanos sanos, de entre 15 y 65 años de edad, de ambos sexos, a riesgo de adquirir FHA, aleatorio, a doble ciego, para evaluar la comparabilidad entre vacuna C#1 producida en Argentina y en EEUU”.

Este estudio permitió que la vacuna C#1 fuera registrada por ANMAT en el año 2006 e incorporada en el Calendario Nacional de Vacunación en el 2007.

La vacuna C#1 actualmente se produce en el INEVH (Ambrosio *et al*. 2006; Ambrosio *et al.* 2011; Saavedra *et al.* 2017). Cada lote de vacuna C#1 que se produce en

el INEVH, debe ser liberado para ser utilizado en humanos. Para ello se requiere la realización de diferentes controles de calidad. Uno de ellos es la prueba de seguridad en animales y en cultivos celulares, en donde la vacuna C#1 a controlar, debe ser neutralizada con un suero hiperinmune anti-VJ (Anti C#1), que en la actualidad se obtiene en conejos siguiendo un protocolo de inmunización, que consiste en múltiples y sucesivas inoculaciones de una cepa patógena de VJ y de C#1, durante aproximadamente 2 meses.

Durante las inmunizaciones los conejos son sometidos a sangrías exploratorias para evaluar el título de anticuerpos anti VJ (anti C#1). Finalizado el esquema de inmunización los conejos son sangrados a blanco por punción intracardíaca para obtener el mayor volumen posible de líquido inmune.

El uso de estos animales presenta algunas dificultades tales como: generan cantidades reducidas de suero y son de difícil mantenimiento por su talla, alto costo de dieta y difícil manipulación. Además un punto importante a tener en cuenta es la recomendación de los Comités de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL), quienes evalúan si existen otras técnicas menos invasivas o que reemplacen el uso de animales, especialmente mamíferos, de manera de cumplir con los principios de Russel y Burch de las 3 R´s (reemplazo, reducción y refinamiento) (Russell y Burch 1959; AfifeMrad de Osorio 2006).

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos que demuestran que el modelo aviar ha desarrollado Ac. específicos para diferentes virus, tales como el virus Sendai, Chikungunya, Dengue y otros (Bizhanov y Vyshniauskis 2000; Dalmacio Leslie Michelle M. *et al*. 2016; Sri Agus Sudjarwo *et al*. 2012), pensamos en la posibilidad de que el mismo podría ser un candidato viable para el desarrollo de Ac. específicos anti VJ.

En 1893, Klemperer demostró por primera vez que la inmunización de una gallina daba como resultado la transferencia de anticuerpos específicos del suero a la yema de huevo (Figura 4).

Existen 3 clases de inmunoglobulinas, que se distinguen en concentración, estructura y función inmunoquímica en aves: IgA - IgM - IgY.

Las IgA e IgM son similares en aves y mamíferos en peso molecular, estructura y movilidad electroforética. Históricamente, la IgY, la principal clase de inmunoglobulina

presente en el suero y la yema de huevo aviar se denominó IgG, debido a su función y concentración en suero en comparación con la IgG de mamífero. Sin embargo, ha quedado claro que esto es inapropiado, especialmente debido a las diferencias estructurales fundamentales entre las moléculas IgG e IgY (Raja *et al.* 2009).

La estructura general de la molécula de IgY, que consta de 2 cadenas ligeras y 2 pesadas, es comparable a la de las inmunoglobulinas de los mamíferos. La cadena pesada está indicada por la letra griega Y o v, y contiene un dominio variable y 4 dominios constantes, en contraste con los 3 dominios constantes de la cadena pesada de IgG. Se determinó que el peso molecular de IgY por espectrometría de masas era 167,250 Da (el de IgG es aproximadamente 160,000 Da).

La electroforesis en gel de poliacrilamida dio resultados algo diferentes. La cadena ligera consta de un dominio variable y un dominio constante (peso molecular, 18,660 Da), la cadena pesada tiene un peso molecular de 65,105 Da, y el fragmento Fab tiene un peso molecular de 45,359 Da. (Rüdiger *et. al* 2005).

Existe un interés creciente en el uso de la yema de huevo de gallina para la producción de anticuerpos policlonales por razones prácticas y económicas. Las ventajas que presentan en relación al uso de mamíferos son: alto rendimiento, técnica económica, no invasiva y no estresante para el animal, ya que no se requieren sangrados para la obtención de la inmunoglobulina. El uso de este modelo sería un método alternativo que cumpliría con los principios de Russel y Burch de las 3 R´s (Russell y Burch 1959; AfifeMrad de Osorio 2006). Es decir:

Alternativas de reemplazo:

Las alternativas de reemplazo abarcan los métodos que permiten que se logre un objetivo determinado sin realizar experimentos u otros procedimientos científicos en animales;

Alternativas de reducción:

El término alternativas de reducción describe métodos para obtener niveles comparables de información del uso de menos animales en procedimientos científicos o

para obtener más información de un número dado de animales, de modo que, a la larga, se necesitan menos animales para completar un proyecto de investigación determinado;

Alternativas de refinamiento:

Las alternativas de refinamiento abarcan aquellos métodos que alivian o minimizan el dolor y la angustia potencial y mejoran el bienestar de los animales (Zurlo *et al.* 1996).

Los anticuerpos de yema de huevo de gallina (IgY) se han aplicado con éxito para estudios científicos, diagnósticos, profilácticos y con fines terapéuticos.

Debido a la distancia filogenética entre las aves y los mamíferos, las proteínas de los mamíferos a menudo son más inmunogénicas en las aves que en otros mamíferos y la síntesis de anticuerpos se estimula fácilmente en las gallinas (Bizanov y Normantiene 2006).

Considerando todo lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta que no hay estudios realizados en la obtención de Ac. específicos contra ningún arenavirus utilizando el modelo aviar, se cree de suma importancia investigar la posibilidad que las gallinas ponedoras pudieran ser productoras de Ac. IgY anti VJ a partir de las yemas de huevos y así poder reemplazar el uso de mamíferos, tales como conejos, cobayos, ratones, animales que actualmente se utilizan en el INEVH para la obtención de Ac. policlonales específicos para VJ, para uso diagnóstico y para diferentes pruebas in vitro e in vivo que se realizan para liberar los lotes de vacuna C#1 producidos.

HIPÓTESIS

La inmunización de gallinas ponedoras con antígenos de VJ de diferente virulencia permite obtener anticuerpos específicos (IgY) a partir de la yema de huevo, con títulos comparables a los sueros hiperinmunes obtenidos por inmunización de mamíferos (ratón, cobayo, conejo), cumpliendo así con la alternativa de refinamiento para aliviar o minimizar el dolor y la angustia del animal, mejorando su bienestar.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que las gallinas inoculadas con VJ producen Ac. IgY específicos anti VJ, permitiendo de esta manera reemplazar el uso de mamíferos por el modelo aviar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inmunizar gallinas con cepas de VJ para obtención de anticuerpos específicos;
- Purificar Ac. IgY a partir de yema de huevos;
- Determinar la presencia de Ac. IgY anti VJ en las yemas purificadas, mediante la titulación de Ac. Neutralizantes;
- Evaluar la eficacia del reactivo basado en Ac. IgY anti VJ para ser utilizado en diferentes ensayos biológicos.

PALABRAS CLAVE

- Arenavirus
- Modelo aviar
- Anticuerpos Neutralizantes

MATERIALES

- Gallinas ponedoras de alrededor de 20 semanas de edad alojadas individualmente en jaulas ubicadas en el Bioterio de experimentación perteneciente al INEVH. Las aves recibieron alimento y agua ad libitum (Figura 3).

Figura 3: Gallinas ubicadas en jaulas en el Bioterio de experimentación.

- **Cepa P3790:** *
  Suspensión de cerebro de ratón recién nacido (Rrn) con buffer fosfato de cepa patógena de Virus Junín. (Título: 10^{8} UFP/ ml). Se conservó hasta su utilización a -70°C.
- **Cepa vacunal C#1:** *
  Pool obtenido con 10 viales de un mismo lote de la vacuna C#1. (Título: 1,65 10^{4} UFP/ ml). Se conservó hasta su utilización a -70°C.
- **Adyuvante Completo e Incompleto de Freund.**
- **Células Vero C76:** *
  (monocapa epitelial de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiopis*) con 70-80% de confluencia, sembradas en placas de 6 pocillos. Las células fueron cultivadas en Eagle´ s Minimal Essential Médium con sales de Earle (EMEM),

suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA), 5% de suero fetal bovino (inactivado por calor a 56 ºC durante 30 minutos), 293 µg/ mL. de L-glutamina 2mM, 100 UI de Penicilina/mL. y 100 µg/ mL. de estreptomicina. Las líneas celulares utilizadas son certificadas en su identidad y en no poseer contaminantes extraños (bacterias, hongos, mycoplasma y virus).

- **Diluente:** *

  Eagle´ s Minimal Essential Médium con sales de Earle (EMEM), suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA), 5% de suero fetal bovino (inactivado por calor a 56 ºC durante 30 minutos), 293 µg/ mL. de L-glutamina 2mM, 100 UI de Penicilina/mL. y 100 µg/ mL. de estreptomicina.

MÉTODOS

1. Esquema de inmunización de las gallinas;
2. Extracción de las IgY anti VJ;
3. Medición de proteínas totales (cuantificación fluorométrica);
4. Prueba de neutralización por reducción del 80% ($PRNT_{80}$) de unidades formadoras de placas (UFP).

1) Esquema de inmunización de las gallinas:

El día 0 se inocularon 4 gallinas ponedoras de 20 semanas: 2 con diluyente (gallinas control C1 y C2) y 2 con una emulsión de la cepa patógena de VJ (P3790) y adyuvante completo de Freund (ACF) en proporción 1:1 (gallinas en estudio G1 y G2).

El día 28 a las Gallinas G1 y G2 se las inoculó con una emulsión de la cepa vacunal C#1 y adyuvante incompleto de Freund (AIF) en proporción 1:1.

Las inmunizaciones se llevaron a cabo por vía subcutánea e intramuscular.

Se extrajo sangre de las alas, a las gallinas C1, C2 y G1, G2 previo a la primera inoculación y en los días 16 y 51 post inoculación (pi) de la cepa P3790. Se recolectaron los huevos previos a la primera inoculación y entre los días 39 al 47 pi de la cepa P3790.

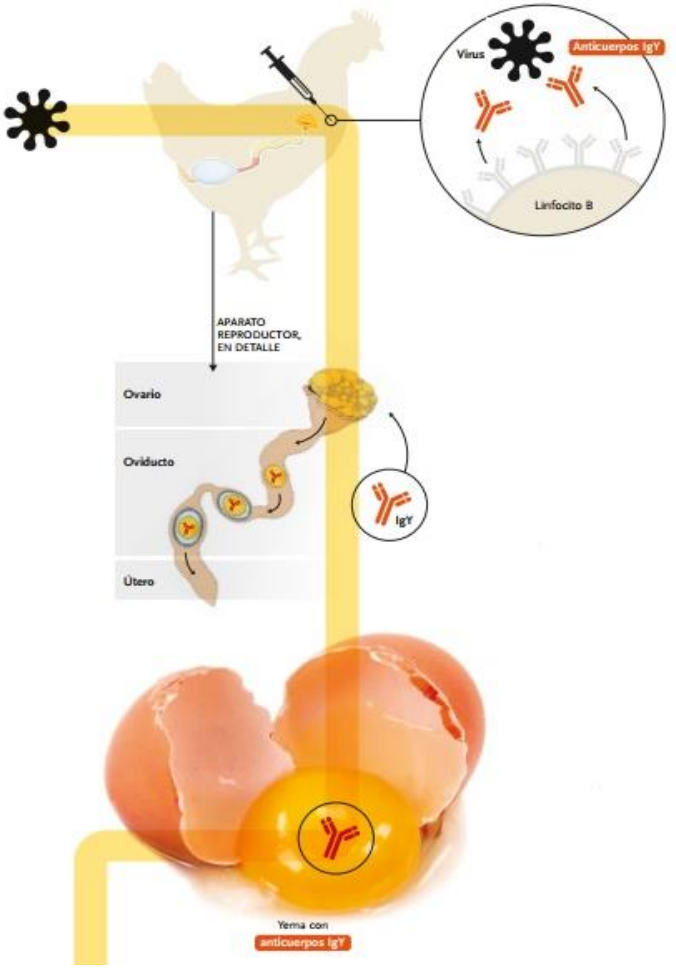

Figura 4: Inmunización de gallinas (Morel Gerardo, 2019)

2) Extracción de las IgY anti VJ:

Se separó la yema de cada huevo y se realizó una dilución (1:5) con agua destilada seguida por la precipitación de las proteínas con sulfato de sodio (Akita y Nakai, 1992)

Se centrifugó a 8000 RPM durante 12 minutos y se descartó el precipitado. Las inmunoglobulinas en el sobrenadante se precipitaron con Sulfato de Amonio (0.24 g/ml). Luego se purificaron las IgY realizando una diálisis a 4 °C durante 3 días con PBS sin Ca^{+2} y sin Mg^{+2} a pH 7,4 efectuando 2 cambios de PBS por día. El extracto se conservó a -20 °C.

Figura 5: Obtención del purificado de Ac. IgY

3) Medición de proteínas totales (cuantificación fluorométrica)

Para evaluar que las inmunoglubulinas no se perdieron durante el procedimiento de diálisis, se determinó la concentración de proteínas totales del extracto purificado mediante SDS-page y mediante espectrometría, midiendo la absorbancia a 280 nm.

4) Prueba de neutralización por reducción del 80% ($PRNT_{80}$) de Unidades Formadoras de Placas (UFP):

a) Materiales:

1. Placas de 6 pocillos de células Vero C76, con 70-80% de confluencia.
2. Diluente de las muestras: EMEM + 1% Pen-Estrep + 1% L-glutamina 300 mM + 2% Suero fetal bovino
3. Primer overlay: 60% de medio para placas y 40% de agarosa + 1% P (Penicilina) + S (Estreptomicina).

4. Segundo overlay: 50% de Agua para inyectables, 50% de agarosa y 2,3% de Rojo neutro.

b) Procedimiento:

1. Dilución de las muestras (dializado de las yemas de huevo)

1/10	1/50	1/250	1/500	1/1000
0.1 ml. de muestra	0.5 ml. (Dil. 1/10 de la muestra)	0.5 ml. (Dil. 1/50 de la muestra)	0.7 ml. (Dil. 1/50 de la muestra)	3 ml. (Dil. 1/500 de la muestra)
0.9 ml. Dlt.	2 ml. Dlt.	2 ml. Dlt.	6.3 ml. Dlt.	3 ml. Dlt.

2. Preparación de la dilución de la cepa vacunal C#1

1:10
0.1 ml. C# 1 + 0.9 ml. Dlt.

3. Incubación de cada tubo (mezcla dilución muestra + dilución de la cepa vacunal C#1) 1 hr. a 37°C y 5% CO2.

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
0.3 ml. (Dil. 1/250 de la muestra)	0.3 ml. (Dil. 1/500 de la muestra)	0.3 ml. (Dil. 1/1000 de la muestra)
0.3 ml. Dil. 1 /10 de la cepa vacunal C# 1	0.3 ml. Dil. 1 /10 de la cepa vacunal C# 1	0.3 ml. Dil. 1 /10 de la cepa vacunal C# 1

4. Descarte del medio de mantenimiento de las células Vero. Inoculación por duplicado de 200 µl. de cada mezcla (punto 3) en el pocillo correspondiente de la monocapa de células Vero.

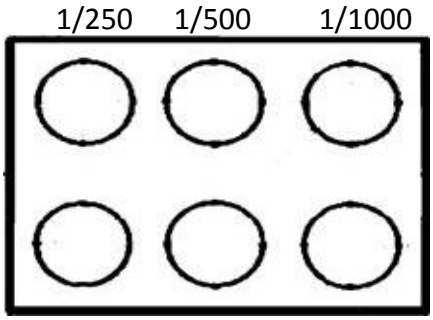

Figura 6: Placa de 6 pocillos sembradas con monocapas de células Vero.

5. Incubación de las placas del punto 4 a 36 ± 0.5ºC durante 1:30 horas para permitir la adsorción de virus a las células.
6. Agregado del Primer overlay de agar (3 ml. por pocillo)
7. Incubación de las placas durante 5 días a 36 ± 0.5ºC bajo una atmósfera húmeda con 5 % de CO_2
8. Agregado del Segundo overlay de agar (3 ml. por pocillo)
9. Incubación de las placas durante 1 día a 36 ± 0.5ºC bajo una atmósfera húmeda con 5 % de CO_2

c) Titulación de fondo de la cepa vacunal C#1

1. Preparación de las diluciones factor 2 a partir de la dilución 1/10 de la cepa vacunal

SD (1/10 de la cepa vacunal C# 1)	1/4	1/8	1/16	1/32
2 ml. Dil. 1/10 de la cepa vacunal C# 1	1 ml. SD	2 ml. (1/4).	2 ml.(1/8)	2 ml. (1/16)
2 ml. Dlt.	3 ml. Dlt.	2 ml. Dlt.	2 ml. Dlt.	2 ml. Dlt.

2. Inoculación de las diluciones del punto 1 en monocapas de células Vero y continuar el procedimiento indicado en el punto 4 al 9.

A los efectos de calcular el título de la cepa vacunal de VJ es necesario utilizar un colorante vital como es el rojo neutro donde las células vivas toman el colorante y las

células muertas (destruidas o lisadas por el virus), no se colorean y forman manchas transparentes denominadas UFP (figura 7), se asume que cada placa fue producida por una partícula de virus. Se cuentan las UFP con un transiluminador en la dilución que mejor se vean. Luego se hace un promedio del contaje de los dos pocillos, y se multiplica por la inversa de la dilución.

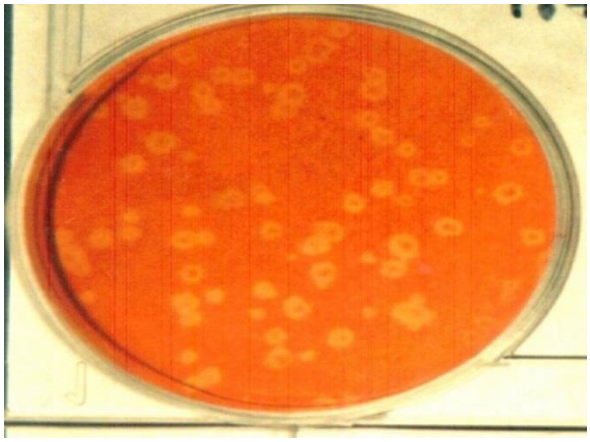

Figura 7: UFP producidas por el Virus Junín en monocapas de células Vero.

d) Cálculo del título de Ac. NT anti VJ por reducción del 80% de UFP

- Cálculo del $PRNT_{80}$ a partir de la titulación de fondo de la cepa vacunal C#1

R1: Promedio de las UFP.

D: Inversa de la dilución donde se realizó el recuento de las UFP.

V: Volumen inoculado en cada pocillo.

Ejemplo:

$PRNT_{80}$: R1 X D X V

R1: 17,75 D: 16 V: 0.2

$PRNT_{80}$: 17.75 X 16 X 0.2: **56.8**

Dil. De la muestra	Promedio del recuento de UFP	
1:250	4	
1:500	15	PC1
1:1000	48	PC2

- El título de Ac. NT anti VJ (C#1) será la dilución más alta que cause una reducción del 80% en el N° de placas.

$$\text{Título de Ac. NT: Antilog} \left\{ \text{log de la inversa Dil. de PC1} + \frac{PRNT_{80} - PC_1}{PC_2 - PC_1} \text{ x log factor de dil.} \right\}$$

$$\textbf{Log 500} + \frac{\textbf{57 – 15}}{\textbf{48 – 15}} \textbf{ x Log 2} = \textbf{3,08}$$

Título de Ac.: Antilog 3,08 = 1205

5) Determinación de la eficacia del reactivo basado en IgY para ser utilizado en un control de calidad de la vacuna C#1:

Uno de los controles de calidad que se requieren para liberar un lote de vacuna C#1 es la Prueba de Seguridad en Rrn. Esta prueba se realiza para demostrar la

ausencia de Virus adventicios. Se inoculan Rrn con la vacuna C#1 a controlar, neutralizada con suero inmune anti VJ (anti C#1) obtenido en conejo.

Ese mismo inóculo neutralizado se titula mediante la prueba de potencia in vitro, para asegurar que la totalidad de la vacuna fue neutralizada. El hallazgo de animales muertos indica la presencia de virus adventicios ya que al encontrarse neutralizada la vacuna no puede asociarse al VJ la causa del deceso de los mismos.

La prueba consistió en la inoculación de Rrn por vía intracerebral (ic) según el siguiente esquema:

- Caja 1 (C1): 10 Rrn con la cepa vacunal C#1 a controlar. Título 1.65 x 10^4 UFP/ml. (Control positivo)
- Caja 2 (C2): 10 Rrn con suero hiperinmune de conejo anti VJ (Título: 1071)
- Caja 3 (C3): 10 Rrn sin inocular (control de ambiente)
- Caja 4 (C4): 10 Rrn con la cepa vacunal C#1 a controlar neutralizada con el suero que contiene Ac. NT IgG anti VJ obtenido en conejos. Se tituló el neutralizado de la vacuna C#1 con Ac. NT IgG anti VJ. (Tabla 3).

Para evaluar si los Ac. NT Ig Y anti VJ obtenidos en yema de huevo (con un título de Ac. NT comparable al obtenido en conejo) se comportan de la misma manera que los Ac NT IgG anti VJ obtenidos en suero de conejo, se agregaron 30 Rrn (10 por caja) y se inocularon por vía ic como se indica a continuación:

- Caja 5 (C5): 10 Rrn con extracto purificado obtenido de yema de huevos hiperinmune (IgY) anti VJ. Título: 3583
- Caja 6 y 7 (C6 y C7) 10 Rrn en cada caja, con el la cepa vacunal C#1 a controlar neutralizada con el extracto obtenido de yema de huevos que contiene Ac. NT IgY anti VJ. Se tituló el neutralizado de la cepa vacunal C#1 con Ac. NT IgY anti VJ. (Tabla 3).

Se observaron diariamente durante 20 días para detectar y registrar signos de enfermedad o muerte. La prueba se considera satisfactoria si al menos el 80% de los Rrn inoculados permanecen sanos y sobreviven sin mostrar evidencia de un agente trasmisible o de infección viral, excepto la esperada en aquellos Rrn inoculados con C#1.

El valor aceptable en la titulación de anticuerpos neutralizantes obtenido en conejos es ≥ a 500. El título se establece en un rango (3 +/- 0.30) (Chale, 2015).

RESULTADOS

1. Medición de proteínas totales (cuantificación fluorométrica)

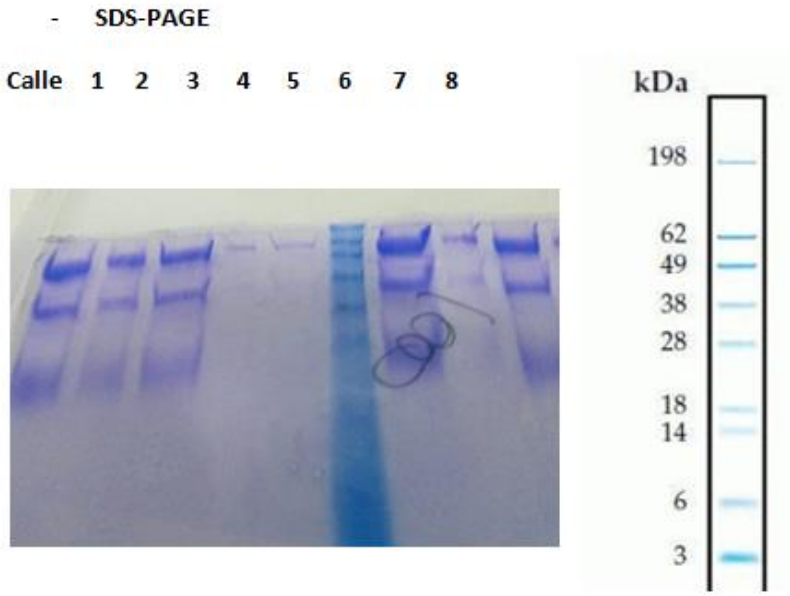

Figura 7: Medición de proteínas totales.

- Calle 1, muestra gallina Inmunizada Dil. Final 1:200;
- Calle 2, muestra gallina Inmunizada Dil. Final 1:400;
- Calle 3, muestra gallina No Inmunizada Dil. Final 1:200;
- Calle 4, muestra gallina No Inmunizada Dil. Final 1:400;
- Calle 5, sin siembra;
- Calle 6, marcador de peso molecular MARKER SEE BLUE Prestained. Invitrogen;
- Calle 7, muestra gallina Inmunizada Sin título. Dil. Final 1:200;
- Calle 8, muestra gallina Inmunizada Sin título Dil. Final 1:400.

La presencia de bandas permite comprobar la existencia de proteínas en las muestras dializadas. No se observan diferencias, ni en cantidad de bandas ni en su intensidad en las muestras derivadas de gallinas inmunizadas y control. En todas las muestras pueden visualizarse 2 bandas que se corresponden aproximadamente a las alturas 62 y 38 KDa del marcador de peso molecular. Las mismas se asemejan a los pesos moleculares descriptas por (Rüdiger *et al.* 2005) para las cadenas pesadas y livianas de la IgY, respectivamente.

2. Tablas de resultados

Tabla 1: Título de Ac. NT anti VJ en suero de gallinas

Gallinas	Pre inoculación P3790	16 días pi P3790	51 días pi P3790 / 27 días pi C#1
G1	Neg	Neg	1738
G2	Neg	Neg	Neg
C1	Neg	Neg	Neg
C2	Neg	Neg	Neg

Tabla 2: Título de Ac. NT IgY anti VJ en extracto purificado de yema de huevos de gallinas

Gallinas	Pre inoculación P3790	39-47 días pi P3790 /11-19 días pi C#1
G1	Neg	3583
G2	Neg	Neg
C1	Neg	Neg
C2	Neg	Neg

El título de Ac. NT anti VJ en el suero de la gallina G1 fue Negativo tanto en la muestra pre inoculación como a los 16 días pi P3790 y se obtuvo un título de 1738 a los 51 días pi P3790/27 días pi C#1. El título de Ac. NT IgY anti VJ en el extracto purificado de la yema de huevos de la gallina G1 recolectados previo a la inoculación de P3790, fue Negativo mientras que entre los 39 y 47 días pi P3790/11-19 días pi C#1, el título promedio de Ac. NT fue 3583.

En la gallina G2 y en las gallinas C1 y C2 los resultados fueron negativos tanto en las muestras pre como en las muestras pi P3790. Esto indica que sólo 1 de las 2 gallinas respondió a la inmunización con VJ dando un título de anticuerpos NT anti VJ equivalente al obtenido en conejos.

3. Determinación de la eficacia del reactivo basado en IgY para ser utilizado en un control de calidad de la vacuna C#1:

Durante los 20 días de observación posteriores al inicio del ensayo, se observó que los 10 Rrn inoculados con la cepa vacunal C#1 (C1), comenzaron a presentar síntomas y signos compatibles con la FHA (movimientos descoordinados, erráticos, desorientación, pelo erizado).

El día 13 pi comenzaron a morir los ratones y en el transcurso de los 20 días todos murieron. Se realizó la titulación (Potencia) e identificación de VJ (Identidad) en la suspensión de cerebro de los ratones muertos, obteniéndose resultados compatibles con VJ.

El día 14 pi dos ratones de las cajas C6 y C7 comenzaron a manifestar síntomas y signos de la FHA. Se hallaron dos ratones muertos el día 15 en la C6 y durante los 20 días de observación la mayoría de los ratones presentaron síntomas y signos de la FHA.

El día 20 pi se sacrificó el lote completo de Rrn. Se realizó la titulación (Potencia) e identificación de VJ (Identidad) en la suspensión de cerebro de los ratones muertos, obteniéndose resultados compatibles con VJ.

Todos los Rrn de las cajas C2, C3, C4, C5 permanecieron saludables durante todo el experimento.

Se tituló el neutralizado de la cepa vacunal C#1 con los Ac. NT IgG anti VJ obtenidos en conejo y con los Ac. NT IgY anti VJ obtenidos en yema de huevo purificada. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Estos resultados demuestran que los Ac. IgG anti VJ obtenidos en suero de conejo neutralizaron totalmente la cepa vacunal C#1, a diferencia de los Ac. IgY anti VJ obtenidos en yema de huevo que no alcanzaron a neutralizar totalmente el virus. Esto fue evidenciado al evaluar el comportamiento de los Rrn inoculados con el neutralizado de la cepa vacunal C#1 con los Ac. IgY obtenidos en yema de huevo.

Tabla 3: Título del neutralizado de la cepa vacunal C#1 con suero de conejo y con yema de huevo purificada.

Cepa vacunal C#1	Cepa Vacunal C#1 neutralizada con Ac.IgG anti VJ	Cepa Vacunal C#1 neutralizada con Ac. IgY anti VJ
1.65×10^4 UFP/ ml	0 UFP/ml	120 UFP/ ml

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Actualmente científicos argentinos están trabajando en el desarrollo de anticuerpos policlonales, obtenidos de la yema de huevo, para el diagnóstico y el tratamiento preventivo y terapéutico de la enfermedad causada por el virus SARS CoV-2. Estos anticuerpos se producen en gallinas hiperinmunizadas con antígenos seleccionados, que pueden ser bacterias, virus, parásitos o proteínas. Dichas Ig séricas se transfieren en forma activa a la yema de los huevos donde se acumulan en gran cantidad, hasta 100 mg por huevo, y son de fácil extracción y purificación.

Las inmunoglobulinas de yema de huevo (IgY) son un desarrollo del INTA apto para numerosas aplicaciones incluyendo kits de diagnóstico y terapias específicas para enfermedades veterinarias e incluso humanas.

En 2017, Bioinnovo, la primera empresa público-privada de base tecnológica formada por el laboratorio veterinario Vetanco y el INTA, presentaron el primer producto biológico del mundo de origen nacional, basado en anticuerpos IgY, lo que representó una solución sanitaria a la diarrea neonatal, que puede afectar hasta el 60% de los terneros en rodeos de cría y al 100% en tambos (Vega C. G. *et al.* 2020).

Si bien existen reportes en la literatura respecto de la obtención de Ac. IgY específicos frente a la inmunización de gallinas con diferentes virus (Bizhanov y Vyshniauskis 2000; Dalmacio Leslie Michelle M. *et al*. 2016; Sri Agus Sudjarwo *et al*. 2012), los resultados obtenidos en esta tesina muestran la primera evidencia de obtención de Ac. IgY específicos contra un Arenavirus como es el VJ.

En este trabajo el esquema de inmunización de las gallinas utilizado es el mismo que actualmente se utiliza en los conejos. En un principio se inmunizaron a los conejos solamente con la cepa vacunal Candid#1, y los títulos de Ac. NT obtenidos fueron muy bajos, por lo cual posteriormente se cambió el esquema de inmunización incorporando una una primera inoculación con una cepa patógena para poner en marcha rápidamente el sistema inmunológico y una posterior inoculación con la cepa vacunal C#1 para

exacerbar esta respuesta, dando anticuerpos específicos de interés para su posterior utilización en los ensayos biológicos.

El ensayo biológico que probamos para comprobar su eficacia, fue el uso de este líquido inmune para neutralizar la vacuna C#1, siendo este un paso necesario para detectar la presencia de virus adventicios en la muestra de vacuna C#1 a controlar, uno de los ensayos que se requiere para la liberación de un lote de vacuna producido.

El título de Ac. NT obtenido en gallina no fue suficiente para neutralizar la totalidad de VJ presente en la muestra. Es por eso que hay que seguir ensayando la obtención de títulos mayores de IgY que nos permita reemplazar el conejo por el modelo aviar y poder hacer uso de este método tan productivo, ya que 1 sola gallina permite la producción de 1 litro y medio de solución proteica en el término de 1 año (lapso considerado para la vida productiva de una gallina) mientras se necesitarían 45 conejos para llegar a ese volumen.

La importancia de este trabajo radica en el logro obtenido de Ac. policlonales específicos anti VJ mediante un método no invasivo y no estresante para el animal, como es el uso de gallinas ponedoras, siendo este método una alternativa al uso de mamíferos. Además tiene la ventaja de ser una técnica económica y de alto rendimiento.

Otro resultado de suma importancia es haber demostrado que estos Ac. IgY neutralizan el VJ, lo que permite pensar en una terapia alternativa para los pacientes con FHA, pudiendo ser una vía de resolución al problema actual de la falta de donantes de Plasma inmune (PI) de convalescientes, siendo la transfusión de PI el único tratamiento específico que existe para los enfermos de FHA.

Concluyendo:

La inmunización de gallinas ponedoras con antígenos de VJ permite obtener anticuerpos específicos (IgY) a partir de la yema de huevo con títulos comparables a los sueros hiperinmunes obtenidos por inmunización de mamíferos (ratón, cobayo, conejo) permitiendo reemplazar a los mismos por el modelo aviar, confirmando así la hipótesis planteada.

Además estos resultados demuestran que las IgY especificas anti VJ pueden ser producidas en gran escala en gallinas inmunizadas con VJ, permitiendo la posibilidad de ser utilizadas como reactivo biológico tanto en los controles de calidad de la vacuna C#1, en pruebas de diagnóstico, como en el tratamiento para la FHA.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Ac	Anticuerpos
C#1	Candid#1
Dil	Dilución
Dlt	Diluente
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle
FHA	Fiebre Hemorrágica Argentina
IC	Intracerebral
ICTV	Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus
IgY	Inmunoglobulina Y
LCM	Cariomeningitis linfocitaria
NT	Neutralizante
Pi	Post-inoculación
PRNT	Prueba de neutralización por reducción de placas
Rrn	Ratones recién nacidos
Spf	Libre de patógenos específicos
SD	Sin diluir
UFP	Unidades formadoras de placas
VJ	Virus Junín

BIBLIOGRAFÍA

- Akita & Nakai. 1992. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. Journal of food science. Volumen 57, N°3, pág. 629.
- AfifeMrad de Osorio. 2006. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. Revista Colombiana de Bioética, vol. 1, núm. 1, enero-junio, pp. 163-183.
- Ambrosio, A. M.; Saavedra, M. C.; Riera, L. M.; Fassio, R. M. 2006. La producción nacional de vacuna a virus Junín vivo atenuado (Candid#1) anti-fiebre hemorrágica argentina. Acta Bioquím. Clín. Lat. 40 (1), 5-17. (ISSN 0325-2957).
- Ambrosio, AM.; Saavedra, MC.; Mariani, MA.; Gamboa, G.; Maiza, AS. 2011a. Argentine Hemorrhagic Fever Vaccines. *HumVaccin.* 7: 694-700.
- Albariño César G. 1197. Caracterización molecular de variantes del Virus Junín con diferentes grados de virulencia. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Bizanov, G.; Vyshniauskis, G. 2000. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens inmmunized with Sendai virus. 24(2):103–113.
- Bizanov, G.; Normantiene, T. 2006. Development of antibodies to Sendai virus in chickens and their isolation from yolk. Biologija. Nr.2 P. 68-71.
- Briggiler A.; Sinchi A.; Coronel F.; Sánchez Z.; Levis S.; Taylor J.; Enria D. (2015) Los nuevos escenarios de transmisión de la Fiebre Hemorrágica Argentina desde la introducción de la vacuna a virus Junín vivo atenuado (Candid #1): una experiencia en trabajadores golondrinas. RevPeruMedExp Salud Pública: 133-139.
- Cann, A. J. (2005). Principles of Molecular Virology (4 edición). Burlington, USA: Elsevier. ISBN 0-12-088787-8.
- Chale, Julieta. 2015. Aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos de liberación por control de calidad de la vacuna a virus vivo atenuado Candid#1 contra la fiebre hemorrágica argentina (FHA).
- Chiappero, M.; Piacenza, M.; Provenzal, M.; Calderón, G.; Gardenal, C.; Polop J. (2018) Effective population size differences in *Calomysmusculinus*, the host of Junín

virus: relationship with the epidemiological history of Argentine hemorrhagic fever. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene.

- Dalmacio Leslie Michelle M.; Corales Laarni Grace M.; Cruz Maria Katrina Diana Yangkong Raquel Anne A.; Del Rosario Joanne Marie M.; Estacio Rhodora C. 2016. Production of avian immunoglobulin Y (IgY) against the linear epitope E2EP3 of chikungunya virus. International Journal of Research in Biosciences. Vol. 5 Issue 4, pp. (56-68).
- Enria, D.A.; Briggiler, A.M. y otros. 1984. Importance of dose of neutralizing antibodies in treatment of Argentine hemorrhagic fever with inmune plasma. En: Lancet, Vol.8397, p.255-256.
- Enria, D.A.; Damilano Alba J. y otros. 1985. Sindrome neurológico tardío en enfermos de fiebre hemorrágica argentina tratados con plasma inmune. Medicina (Buenos Aires) Vol. 45, no. 6; p.615-20.
- Enria, D.A.; Briggiler, A.M. y otros. 1998. An overview of the epidemiological, ecological and preventive hallmarks of Argentine Hemorrhagic Fever (Junín virus). En: Bull Inst Pasteur, Vol.96, p.103-114.
- Fehling Sarah Katharina, Lennartz Frank y Strecker Thomas. 2012. Multifunctional Nature of the Arenavirus RING Finger Protein Z. *Viruses* 4, no. 11: 2973-3011.
- García, J., Calderón, G. y otros. 1996. Infección por virus Junín (VJ) de Calomysmusculinus (Cm) en áreas con diferente situación epidemiológica para la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). En: Medicina (Buenos Aires), Vol.56, p.624.
- Maiztegui, J.I. y Sabattini, M.S. 1977. Extensión progresiva del área endémica de Fiebre Hemorrágica Argentina. En: Medicina (Buenos Aires) Vol.37, p.162- 166.
- Maiztegui, J.I.; Fernández, N.J., y otros.1979. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine Hemorrhagic Fever and association between treatment and late neurological syndrome. En: Lancet Vol.8154, p.1216-1217.
- Maiztegui, J.I.; Feuillade, M.R. y otros. 1986. Progressive extension of the endemic area and changing incidence of Argentine Hemorrhagic Fever. En: MedMicrobiolInmunol, Vol.175, p.149-152.
- Martínez, María Guadalupe. 2010. Estudio de las etapas tempranas del ciclo de replicación del Virus Junín. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

- Mastrangelo, A.; Tagliabue, P.; Berro, L.; De Carolis, D.; Sinchi, A.; Digilio, C.; Enria D. 2014. Estudio cualicuantitativo de las variables sociales que definen escenarios de transmisión de la fiebre hemorrágica argentina en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, 2001-2010. Salud Colectiva, 10 (2): 171-184).
- Mills, J.N.; Ellis, B.A. y otros. 1992. A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine Hemorrhagic Fever. En: Am J TropMedHyg, Vol. 47, p.749-763.
- Morel Gerardo. 2019. Cómo combatir enfermedades animales a partir de huevos [Infografía]. https://intainforma.inta.gob.ar/infografia/como-combatir-enfermedades-animales-a-partir-de-huevos/
- Posik Diego Manuel, 2004. Caracterización molecular de arenavirus del área endémica de la fiebre hemorrágica argentina: aislamientos de pacientes con diferentes patrones clínicos de FHA y nuevos arenavirus.
- Raja C.; Beckers, Y.; Portetelle, D.; Théwis, A. 2009. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 13(2), 295-308.
- Rüdiger, S.; Gutierrez, E. C.; Sarmiento, R.; Chacana, P. A.; Porankiewicz-Asplund, J.; and Terzolo, H.R. 2005. Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. ATLA 33, 1–26.
- Russell, W. M. S. and Burch, R. L. 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen.
- Saavedra, M. C.; Riera, M. L.; Bottale, A. J.; Mariani, M. A.; Maiza, A. S.; Ambrosio, A. M. 2017.Estabilidad de la vacuna Candid#1 para prevenir la fiebre hemorrágica Argentina. Medicina (Buenos Aires) 77: 353-357.
- Sabattini, M.S. y Contigiani, M.S.1982. Ecological and biological factors influencing the maintenance of arenaviruses in nature, with special reference to the agent of Argentine Hemorrhagic Fever. En: Pinheiro FD (ed) International Symposium on Tropical Arbovirus and Hemorrhagic Fevers, Academia Brasilera de Ciencias, Rio de Janeiro, p. 251-262.

- Sri Agus Sudjarwo; Koerniasari Eraiko Sudjarwo; Koerniasari. 2012. Purification and characterization protein of anti-dengue specific immunoglobulin Y for diagnostic kit of dengue. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 2 (12), pp. 007-012.
- Vega Celina Guadalupe; Bok Marina; Ebinger Maren; Rocha Lucía Alejandra; Rivolta Alejandra Antonella; Thomas Valeria González; Muntadas Pilar; D'Aloia Ricardo; Pinto Verónica; Parreño Viviana; Wigdorovitz Andrés. 2020. A new passive immune strategy based on IgY antibodies as a key element to control neonatal calf diarrhea in dairy farms. BMC Veterinary Research Volume 16, Article Number 264.
- Zurlo, J.; Rudacille D. and Goldberg A. M. 1996. The Three Rs: The Way Forward. Environmental Health Perspectives. Volume 104, Number 8.

VILLALÓN José Gastón
Digitally signed by VILLALÓN José Gastón
Date: 2021.04.09 13:09:47 -0300