UNIVERSITAS SCIENTIARUM
Revista de la Facultad de Ciencias
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Vol. 10, No. 1, 37-44

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES IgY ANTIPARVOVIRUS CANINO A PARTIR DE YEMA DE HUEVO DE GALLINA

Pinto, J.[*]; Barco, M.[*]; Afanador, M.C.[*]; Merchán, A.M.[*]; Montañez, M.F.*; Andrade, F.*; Torres, O*[1].

[*]Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA), Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C. – Colombia;
[**]Purificación y Análisis de Fluidos Ltda. Bogotá, D. C. – Colombia.

*Orlando Torres - *[1]Correspondencia: Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana - Carrera 7 No. 43 – 82 Bogotá D. C. – Colombia. FAX. (57 – 1) 3208320 Ext. 4021*

E-mail: otorres@javeriana.edu.co

RESUMEN

Inmunizando un grupo de diez gallinas de postura raza Lohmann de 16 semanas de edad con parvovirus canino (CPV) cepa vacunal, se obtuvieron anticuerpos IgY policlonales contra CPV en yema de huevo.

En la extracción de los anticuerpos de la yema se requirieron dos pasos, el primero para la remoción de lípidos y el segundo para la precipitación de proteínas. Para la remoción de lípidos se usó el método PBS:Cloroformo y para la precipitación de los anticuerpos solubles (Inmunoglobulinas-IgY) se usó el método de salting-out con sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$). La evaluación del proceso se efectuó empleando el método comercial estándar "EGGstract IgY Purification System®" de PROMEGA.

La metodología empleada permitió la obtención de anticuerpos IgY policlonales contra CPV a partir de yema de huevo de gallina en concentraciones altas por mililitro de yema, con una pureza aceptable y títulos altos; los resultados fueron comparables con el método comercial.

Palabras claves: anticuerpos de gallina; deslipidación; IgY; Parvovirus canino; precipitación; yema de huevo.

ABSTRACT

After immunizing a group of ten 16-week old laying hens of the Lohmann breed with a canine parvovirus (CPV), vaccine strain, polyclonal IgY antibodies were obtained against CPV in the egg yolk. For the extraction of the antibodies from egg yolk, the two steps of lipid removal and protein precipitation were performed; the first with the chloroform PBS technique and he second by salting-out with ammonium sulfate ($NH_{4)2}SO_{4)}$ for the precipitation of the soluble antibodies (IgY Immunoglobulins). The standard commercial method, "EGGstract IgY Purification System®" from PROMEGA, was used for the evaluation of the process. The methodology used permitted the obtaining of polyclonal IgY antibodies against CPV from chicken egg yolks in high concentrations per milliliter of yolk, with an acceptable purity and high titers. The results were comparable with the commercial method.

Keywords: Canine Parvovirus; egg yolk; hen antibodies; IgY; lipid removal; precipitation.

INTRODUCCIÓN

Además de la importancia que la producción de anticuerpos (Ac) tiene en la terapia médica, los anticuerpos policlonales y monoclonales son de gran interés en el diagnóstico y la investigación científica; por tanto, hoy en día se hace más exigente no solo su calidad sino también la metodología empleada para su producción (Schade, R., et al. 1996).

La producción de Ac requiere normalmente del uso de animales de laboratorio (conejo, ratón, rata, etc.) o de animales de mayor tamaño (cabra, oveja, caballo, etc.). Goueli en 1990, sostuvo que los métodos de obtención de inmunoglobulinas por inmunización de animales de laboratorio como conejos, ratones, cobayos, equinos, cabras, etc., son más complejos que la producción de los mismos en aves, pues estos métodos son generalmente invasivos, y en la mayoría de los casos llevan a la muerte del animal.

El uso de aves en la producción de anticuerpos policlonales se ha reconocido en las últimas décadas (Polson *et al*., 1980; Jensenius *et al*., 1981), cobrando mayor demanda hoy día.

La distancia filogenética que existe entre las aves y los mamíferos resulta potencialmente ventajosa para la producción de un alto porcentaje de anticuerpos específicos contra antígenos mamíferos o de antígenos patógenos (Jensenius *et al*., 1981; Akita y Nakai, 1992); por otro lado, también se refina el proceso mismo de producción, remplazando el sangrado de los animales por la deslipidación de yema de huevo para la liberación de la inmunoglobulina que es soluble.

La alta concentración de inmunoglobulinas aviares (IgY) presente en la yema de huevo con respecto al suero (Larsson *et al*., 1993), invita a disminuir el uso de otros animales en este proceso.

La vía de inmunización, la cantidad de antígeno a usar y la cinética de generación de anticuerpos en aves, con el propósito de obtener inmunoglobulina IgY, se compara con la usada en conejos (Song *et al*., 1985).

Varios métodos han sido descritos para la purificación de IgY a partir de yema de huevo de gallina (Polson *et al*., 1980, Jensenius *et al*., 1981, Akita y Nakai, 1992 y 1993; Hassl y Hatta *et al*., 1988); comúnmente estos protocolos emplean el fraccionamiento de proteínas por técnicas como salting-out, precipitación alcohólica, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis, etc., que generalmente se las emplea en forma combinada para obtener mejores resultados.

El trabajo buscó obtener anticuerpos policlonales IgY contra el parvovirus canino (CPV) en yema de huevo, inmunizando gallinas de raza Lohmann con virus vacunal de parvo virus canino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunización

Vía intramuscular (I.M.) se inmunizaron diez gallinas de 16 semanas de edad de raza Lohmann, según el esquema estándar enunciado por Schade *et al*. (1996), en el que se aplicaron 4 inoculaciones por ave de 150 µg/dosis de proteína viral, con un intervalo entre aplicación de 7 días cada uno. La primera inoculación fue una mezcla a volúmenes iguales de antígeno con adyuvante completo de Freund (Difco) (volumen final de 0.5ml), el virus vacunal de parvovirus canino (Vacuna Parvovirus Cachorros – virus vivo modificado Cepa NL 35-D, con título de $10^{6.5}$ $TCID_{50}$ por dosis –

FIRST DOSE CPV* de Pfizer, fue usado como antígeno para este protocolo.

Al día 56 de la primera inoculación se cosecharon los huevos para la extracción de los anticuerpos propósito.

Extracción de IgY de yema de huevo

El proceso involucró tres pasos; el primero, liberación manual de la yema de la ovalbumina y de la membrana que la recubre; el segundo, la remoción de los lípidos de la yema, y el tercero, la precipitación de la proteína IgY.

Para la remoción de lípidos se empleó el método descrito por Polson (1990), en el que se mezcló un volumen de yema por tres volúmenes de suspensión PBS- cloroformo (un volumen de cloroformo por tres volúmenes de PBS pH 7.2), la suspensión luego fue sometida a vortex por 5 minutos, posteriormente centrifugada a 3000g por 15 minutos a 4°C y finalmente, la fase acuosa fue recuperada en un tubo nuevo.

Precipitación de IgY por salting-out

Sobre la fase acuosa recuperada en el proceso anterior, se adicionó lentamente en agitación constante a 4°C un volumen igual de solución al 50% de saturación de sulfato de amonio $(NH_4)_2 SO_4$ en PBS pH 7.2, la agitación y la temperatura fueron mantenidas sobre la mezcla final durante toda la noche; al día siguiente, se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 3000g para cosechar el precipitado proteico; el sobrenadante se descartó y el precipitado se reconstituyó en PBS 1X pH 7.2 a un volumen igual al inicialmente tomado de yema; este se precipitó nuevamente con una solución al 30% de saturación con $(NH_4)_2 SO_4$ y luego éste se sometió a diálisis contra PBS 0.5X pH 7.2 a 4ºC, realizándose seis cambios de buffer en un período de 24 horas.

Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteínas extraídas de la yema de huevo fue determinada por el método de Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina fracción V como control estándar (Sigma).

La lectura fue hecha a 595 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad® (Modelo 3550).

Electroforesis de proteínas

Para determinar la presencia de proteína IgY, se empleó una electroforesis no reductora en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7% según la metodología descrita por Laemmli (1970).

Se sembraron 10µg de proteína total por pozo en buffer de carga 1X no reductor, y como control se usó una inmunoglobulina IgY comercial (PROMEGA®) y un marcador de peso molecular para proteína de 6 a 200 KD de SIGMA® (Ref. M3788).

El corrido electroforético fue hecho en una cámara Hoefer a 100 V, 50 mA y 15 W por una hora a 4°C; finalmente, las proteínas fueron reveladas por tinción del gel con Coomasie blue R-250 de SIGMA®.

Titulación del anticuerpo anti-CPV

Para determinar el título de IgY anti-CPV se utilizó el método de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) en placa de la siguiente manera; a partir del extracto de IgY anti-CPV obtenido, se prepararon diluciones seriadas de 50 µl desde 1:2 hasta 1:4096 en una placa de 96 pozos de fondo en U, a cada una, les fue adicionado 50 µl con 8 unidades hemoaglutinantes de antígeno (Carmichael, 1980), posteriormente, la placa se incubó a temperatura ambiente por una hora, al cabo de la cual se agregó a cada pozo 50 µl de una suspensión al 1%

de glóbulos rojos de cerdo en buffer HA y la lectura fue hecha 4 horas después.

RESULTADOS

Obtención de IgY

El proceso de inmunización citado por Schade *et al*. (1996) resultó de gran aplicabilidad para la obtención de IgY en yema de huevo; el método mostró producción de anticuerpos contra el parvovirus canino a la segunda semana de aplicado el esquema; sin embargo, se alcanzó una concentración óptima al día 56 de iniciado éste.

La separación de la inmunoglobulina aviar de 180 Kd, que coincide con lo descrito por Leslie *et al.* (1969), del resto de las proteínas solubles se logró por precipitación con sulfato de amonio al 50% y 30% de saturación; sin embargo, este método por si sólo no fue suficiente para obtener una proteína completamente pura, como se pudo observar en la electroforesis no reductora SDS-PAGE del 7% (Fig. 1).

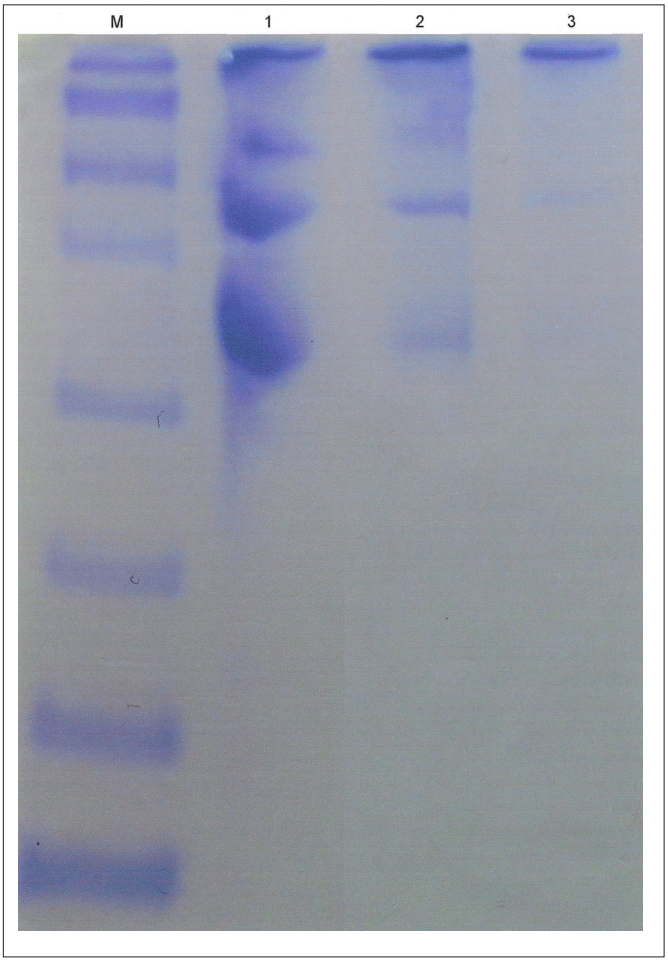

FIGURA 1

Después del tratamiento, se obtuvo una concentración de 21,7 mg de proteína soluble por mililitro de yema, determinada por el método de Bradford.

Por el método de inhibición de la hemoaglutinación (IH) se obtuvo un título de IgY anti–CPV de 1:1024.

DISCUSIÓN

Esquema de inmunización

La obtención de IgY a partir de yema de huevo de gallina, resulta ser un método alternativo en las ciencias biomédicas (Manouchehr & Pharm, 2002) por los bajos costos, ya que se reduce el sufrimiento del animal implicado, pues no se requiere la colección de sangre, sino que se obtiene una gran cantidad de anticuerpos policlonales específicos a partir de la yema de huevo.

El esquema de inmunización empleado en el estudio fue de 56 días, en el que se aplicaron 4 dosis intramusculares a un volumen final de 0,5 ml; el método mostró producción de anticuerpos contra Parvovirusis canino a la segunda semana post-inoculación; sin embargo, la óptima concentración se halló al día 56 de iniciado el esquema. Diferentes métodos de inmunización aplicados en gallinas son reportados en la literatura; intramuscular (Akita y Nakai, 1993), intrabursal subcutáneo (Svendsen, 1995) y oral, como también se ha reportado que las aves sufren inflamaciones y desarrollan granulomas en las áreas de inoculación (Svendsen, 1996). La vía de inoculación aplicada a las aves en este trabajo (I.M.) no causó ningún malestar, ni proceso inflamatorio, debido a que se respetó un volumen por dosis moderadamente bajo para la especie, resultado que fue congruente con lo reportado por Gassman *et al.* (1990).

Extracción de IgY a partir de yema de huevo

La literatura reporta varios métodos de obtención de anticuerpos tipo IgY, incluyendo los métodos comercialmente disponibles como el Kit EGGstract IgY Purification System® de Promega, el cual resulta ser un método relativamente costoso pero eficiente y ventajoso al reducir el tiempo de extracción, en los que se siguen cuatro pasos fundamentales: remoción total de la albúmina, extracción de la membrana de la yema, extracción de las lipoproteínas y lípidos de la yema y aislamiento de la IgY (Alarcón, 2000). El estudio siguió el mismo proceso mencionado.

El método de deslipidación aplicado a la yema de huevo en este trabajo (PBS: Cloroformo en relación 1:3), resultó eficiente y no produjo daño alguno sobre la proteína de interés. Este método tiene la ventaja de no requerir ambientes exigentes, ya que maneja volúmenes relativamente bajos de cloroformo. Una metodología similar, sólo que remplazando el PBS por Metanol fue usada con iguales resultados por Wessel *et al.* (1984) y Yokoyama *et al.* (1992).

El cloroformo puede llegar a remplazar a un componente muy empleado en la extracción de IgY como es el Dextran sulfato, ya que su porcentaje de pureza es muy similar (70-90%) (Ntakarutimana, 1992).

El sulfato de amonio para la precipitación de IgY, se emplea generalmente entre un 30% a un 36% de saturación (Akita and Nakai, 1993; Crosby *et al*., 1994). En este trabajo, la precipitación de la IgY resulto muy eficiente al usar un porcentaje de saturación de sulfato de amonio a pH 7.2 primero del 50% seguida de una del 30%; Sin embargo, este procedimiento por sí solo, no es suficiente para obtener una proteína totalmente purificada. En comparación con el kit de Promega, los resultados mostraron

que este puede ser ocasionalmente sustituido por el método de salting-out, en casos de no requerirse una alta pureza de la proteína (datos no mostrados).

Dependiendo del uso que se dé a la IgY, se hace necesario o no aplicar otros métodos de purificación más eficientes como la cromatografía de afinidad en columna.

CONCLUSIONES

- La metodología empleada es eficiente y económica para la obtención de anticuerpos policlonales IgY contra parvovirus canino.

- El uso de cloroformo como deslipidante, disminuye el tiempo de proceso y permite un alto grado de deslipidación, liberando de las grasas de la yema las proteínas solubles; además, este solvente orgánico no alteró estructural ni funcionalmente las proteínas IgY.

- La diálisis aplicada a las proteínas precipitadas por metodologías como el salting-out, garantiza que estas queden libres de sales, lo que no sucede con métodos en los que se usa el polietilenglicol.

- La precipitación con sulfato de amonio, a pesar de haber mostrado resultados electroforéticos bien definidos para la inmunoglobulina aviar de 180Kd, no asegura un proceso completo de purificación del anticuerpo IgY, lo que hace necesaria la aplicación de otros procedimientos complementarios como la cromatografía de afinidad.

LITERATURA CITADA

ALARCÓN, C.; HURTADO, H., y CASTELLANOS, J. 2000. Anticuerpos aviares: alternativa en producción y diagnostico. *Biomédica*; 20: 338-343.

AKITA, E. M. and NAKAI, S. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci*. 57: 629-634.

AKITA E. M. and NAKAI S. 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized whit an enterotoxigenic. *Journal of Immunological Methods*, 160: 207-214.

BRADFORD, M. M. The Bradford assay. 1976. *Anal. Biochem*. 72: 248

CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C.; POLLOK, R.V.H. 1980. Hemagglutination by Canine Parvovirus: Serologic Studies and Diagnostic Aplications. *Am J Vet Res* 41(5): 784-790.

CROSBY, M. J.; DIAZ, D.; REYES, J. 1994. Alternativas de la inmunología como herramienta de investigación y diagnostico: gen reacción, aislamiento y purificación de anticuerpos específicos en huevo de gallina. *Diógenes*, 1: 137-149.

GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER T. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. Fase b J 4. : 2528-2532.

GOUELI, S.A. 1990. Polyclonal antibodies agains rat liver cylosolic casein kinase II (CK-2) cross-react with Ck-2 from other tissues and nuclear form (Pk-N2) of the enzyme. *Biotech. Internati*. 21, 635.

HASSL, A. and ASPOCK H. 1988. Purification of egg yolk immoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *Journal of Immunological Methods*, 110 : 225-228.

HATTA, H.; SIM, J. S. and NAKAI, S. 1988. Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water-soluble proteins. *J. Food Sci*. 53: 425-427.

JENSENIUS J.; ANDERSEN I. and HAUN J. 1981. Conniently packaged antibodies, methods for purification of yolk IgG. *Journal of Immunological Methods*, 46: 63-68.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of he head of bacteriophage T4. nature 227: 680-685.

LARSSON, A.; BÅLÖW, R.M.; LINDAHL, T.; FORSBERG, P.O. 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution-a review. *Poultry Science*, 72: 1807-1812.

LESLIE, G. A. and CLEM, W. L. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function: Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med*. 130:1337-1352.

MANOUCHEHR, M. & PHARM, R. 2002. Purification of anti-HbsAg from egg yolks of immunized hens and its application for detection of HBsAg. *Arch Iranian Med*. 5(2): 91-93.

NATAKARUTIMANA, V.; DEMEDTS, P. and SANDE, VAN. 1992. A simple economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferring from egg yolk. *Journal of Immunological Methods*, 153: 133-140.

POLSON, A, VON WECHMAR, M.B.; Van Regenmortel, M.H. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Common; 9(5): 475-493.

POLSON, A. 1990. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol Invest Jun*, 19(3): 253-258.

SCHADE R., STAAK C., HENDRIKSEN C., ERHARD M., HUGL H., KOCH G., LARSSON A., POLLMANN W., REGENMORTEL M., RIJKE E., SPIELMANN H., STEINBUSCH H., STRAUGHAN D. 1996. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop. *European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)*. 24: 925-934.

SONG, C. S.; YU, J. H.; BAI, D. H.; HESTER, P.Y. and KIM, K. H. 1985. Antibodies to the a-subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J. Immunol*. 135: 3354-3359.

SVENDSEN, L.; CROWLEY, A.; HAU, J. 1996. Antibodies production in rabbits and chickens immunized with human IgG a comparison of titer and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvant. *Journal of Immunological Methods* 191: 113-120.

VAINIO, O. and IMHOF, A. 1995. The immunology and developmental biology of the chicken. *Immunology today*. 16: 365-370.

WESSEL, D and FLUGGE, U. I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry* 138: 141-143.

YOKOYAMA, H.; PERALTA, R.; DIAZ, R. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and immunity*, Mar.: 998-1007.

Recibido: 11-11-2003
Aceptado: 2-02-2005