

Obtención, purificación y caracterización de inmunoglobulina “Y” (IgY) específicas con fines diagnósticos y profilácticos

Toso, R. E.; Neher, B.; Alvarez Rubianes, N.; Toribio, M. S.; Boeris, M. A. Gastaldo M. F.; Ardoino, S. M.; Oriani, D. S.

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.

Correspondencia: retoso25@hotmail.com

Recibido: 25 de noviembre de 2016

Aceptado: 07 de diciembre de 2016

Resumen

Lawsonia intracellularis (L) es una bacteria intracelular obligada que causa enteropatía proliferativa en los cerdos. Esta bacteria no crece en cultivos convencionales y el desarrollo en cultivos celulares, a baja tensión de oxígeno, resulta excesivamente complejo y caro. Es una enfermedad de difícil diagnóstico donde la tecnología de las IgY podría ser utilizada para el desarrollo de técnicas más eficaces y de menor costo. Hiperinmunizando gallinas ponedoras con cepas de esta bacteria ha sido posible la obtención de IgY específicas. En este trabajo, se evaluó la capacidad de producir IgY específicas contra L empleando una vacuna comercial de cultivo vivo atenuado. Se aplicó un esquema de hiperinmunización a gallinas ponedoras de la Línea Brown Nick. La IgY se aisló de la yema utilizando el método de PEG-precipitación y los extractos obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. La inmunofluorescencia indirecta confirmó la presencia de IgY específicas contra L determinando que la vacuna comercial utilizada como antígeno puede ser utilizada en reemplazo de cepas de la bacteria para la obtención de anticuerpos específicos.

Palabras Claves: Gallinas ponedoras, *Lawsonia intracellularis*, Inmunoglobulina Y

Obtaining, purification and characterization of specific immunoglobulin Y with diagnostic and prophylactic aims

Abstract

Lawsonia intracellularis is an obligate intracellular bacterium that causes proliferative enteropathy in pigs. The bacterium do not growth in standard mediums, its develop in cellular cultures; under low oxygen tension nevertheless is expensive and complex. It is a difficult diagnosis disease where de IgY technology might be useful in the development of lower cost and more efficacy assays. Throughout the immunization of hens with the strain of the bacterium it is possible to obtain specific IgY. In the present work, it was evaluated the capacity of yield specific IgY against *Lawsonia intracellularis* by immunizing Brown Nick hens with a commercial live attenuated vaccine. Thereafter, IgY was isolated by precipitation – PEG methodology and the extract were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The indirect immunofluorescence confirmed the presence of IgY specific against *Lawsonia intracellularis* establishing that the commercial vaccine could be utilised as antigen, instead of the strain of bacterium, as a source of antigen to induce specific immunoglobulins.

Keywords: hens, *Lawsonia intracellularis*, Immunoglobulin Y

Introducción

La inmunoglobulina “Y” (IgY) de las aves es la responsable de transferir inmunidad activamente a la descendencia desde el suero a la yema del huevo, proceso que ocurre en los folículos ováricos (Yamamoto, 1997).

Estas características permiten hiperinmunizar gallinas ponedoras con distintos antígenos para obtener IgY específicas. Este procedimiento, descubierto por Klemperer en el año 1893, en la actualidad es motivo de investigaciones por sus potenciales aplicaciones terapéuticas y profilácticas.

El control de infecciones producidas por ciertos agentes tales como, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Salmonella*

entérica son ejemplos de tratamientos profilácticos por inmunización pasiva. La incorporación en la dieta de huevos de gallinas hiperinmunizadas con los mencionados agentes, permite prevenir y tratar estas enfermedades intestinales (De Meulenaer *et al.*, 2001). Las aplicaciones de este método se están extendiendo a distintas especies de animales destinados a la producción de alimentos. Como ejemplo, puede citarse el trabajo realizado por Gao *et al.* (2016) quienes lograron controlar la mortandad de camarones blancos administrando por vía oral IgY específica contra *Vibrio spp.*

El potencial uso de IgY en tratamientos de enfermedades intestinales podría evitar o reducir el empleo de antibióticos, reduciendo los fenómenos de resistencia antimicrobiana (Chalghoumi *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2013).

La administración de las IgY con fines de transferencia pasiva de inmunidad se realiza por vía oral. Esta vía de administración requiere del empleo de técnicas farmacotécnicas protegiendo a las IgY de los jugos digestivos, por ejemplo con hidrogeles poliméricos (Alustiza *et al.*, 2016).

Las IgY pueden utilizarse también con fines diagnósticos. El método consiste en hiperinmunizar a gallinas ponedoras y luego aislar las IgY específicas de la yema del huevo para utilizarlas en reacciones antígeno anticuerpo. Empleando la técnica de ELISA se están logrando cada vez más aplicaciones, como el diagnóstico de la Diarrea Viral Bovina (Zhang *et al.* 2016). Un ensayo realizado por Naqid *et al.* (2016) permitió diferenciar entre los anticuerpos producidos en aves infectadas por *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* de aquellos producidos en aves vacunadas. Esto abre un interesante campo de aplicación en las estrategias que deben aplicarse en la vigilancia serológica y la vacunación para el control de enfermedades infecciosas de los animales de producción de alimentos.

Los métodos que deben emplearse en estos procedimientos requieren del desarrollo de una serie de técnicas conocidas, pero que deben ser adecuadas para cada caso en particular, con la finalidad de lograr IgY específicas en cantidades terapéuticas y comercialmente viables.

Teniendo en cuenta lo expuesto, en este trabajo se describen las metodologías empleadas para hiperinmunizar gallinas ponedoras y aislar IgY específicas contra *Lawsonia intracellularis*. El objetivo de este trabajo fue obtener IgY específicas contra

Lawsonia intracellularis que puedan ser empleadas posteriormente en la preparación de un kit de diagnóstico de la ileítis por ELISA.

La ileítis, causada por *Lawsonia intracellularis* es una enfermedad de difícil diagnóstico en los cerdos. Los métodos empleados en la actualidad consisten en análisis por PCR de muestras de materia fecal y exámenes histológicos e inmunohistoquímicos de muestras de intestino obtenidas por necropsia. También se desarrollaron pruebas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFA) en placa y el ensayo en monocapa de la inmunoperoxidasa (IPMA), el "ileitest", una prueba IFA en vidrio, LPS-ELISA desarrollada en Ames, Iowa, y ELISA bloqueantes (blocking-ELISA) desarrollada en Alemania (Guedes, 2008). Todas estas pruebas serológicas emplean *Lawsonia intracellularis* como antígeno puro, siendo una complicación ya que lamentablemente existen pocos laboratorios a nivel mundial que disponen y cultivan esta bacteria, lo cual hace que su costo sea alto.

Ante esta perspectiva, producir IgY específica contra *Lawsonia intracellularis* hiperinmunizando gallinas ponedoras utilizando vacunas contra la ileítis, resulta una alternativa promisoriosa para obtener anticuerpos con fines diagnósticos.

Materiales y Métodos

Hiperinmunización de gallinas ponedoras con *Lawsonia intracellularis*

Animales de experimentación: se utilizaron 10 gallinas ponedoras Línea Brown Nick que fueron divididas equitativamente en un Grupo Control (GC) y un Grupo Tratado (GT).

Esquema de hiperinmunización: los animales del Grupo Tratado recibieron dosis de "Vacuna *Lawsonia intracellularis*, cultivo vivo, atenuado Enterisol® Ileitis Boehringer Ingelheim S.A. Argentina" como se indica en el Cuadro 1. Los animales pertenecientes al GC no recibieron ningún tratamiento. Las dosis vía oral se administraron con ayuda de una sonda gástrica directamente en el buche. La administración intramuscular se realizó en los músculos pectorales.

Cuadro 1: Esquema de administración de vacuna contra *Lawsonia intracellularis* que recibió el Grupo Tratado.

Día	Dosis	Vía de administración
1	1 ml	Oral
7	1ml	IM izq
14	1ml	IM der

Ref.: IM izq, IM der: vía de administración intramuscular de los músculos pectorales lado izquierdo y derecho respectivamente. La vacuna se administró inmediatamente luego de su reconstitución.

Recolección de muestras (huevos): se recolectaron huevos diariamente de ambos grupos, se identificaron y conservaron en heladera a 4 °C hasta el momento de realizar los ensayos.

Protocolo - IgY-extracción mediante PEG-precipitación

Se empleó la técnica descrita por Pauly *et al.* (2011) mediante PEG-precipitación, con modificaciones. Este protocolo realiza la extracción de IgY de yema de huevo por medio de un procedimiento de precipitación descrito por Polson *et al.* 1980. El método implica dos etapas. En la primera, se eliminan los lípidos por precipitación con polietilenglicol 6000. En una segunda etapa se procede a precipitar el total de IgY a partir del sobrenadante obtenido en la etapa uno. El precipitado es dializado con un tampón de PBS. El extracto de IgY obtenido se almacena a -20 °C para ensayos posteriores. La pureza del extracto lograda es de alrededor de 80%.

Determinación de la presencia de IgY en los extractos obtenidos a partir de yema de huevos hiperinmunizados. SDS-PAGE

Análisis electroforético en geles SDS-PAGE.

Se empleó la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-polyacrilamide gel electrophoresis) sistema Mini protean III de Bio-Rad Life Science, siguiendo el protocolo descrito por Laemmli, (1970).

La corrida electroforética se realizó con geles SDS 10 % acrilamida bis-acrilamida aplicando un campo eléctrico de 120 Volts durante 70 minutos.

Se utilizó como patrón de Peso Molecular un Kit Precision Plus Protein™ Dual color Standar, Bio Rad Life Science. Todas las muestras de extracto obtenido de huevos del Grupo Control y Grupo Tratado fueron diluidas de igual forma según las instrucciones del fabricante.

Confirmación por inmunofluorescencia indirecta de IgY específica contra *Lawsonia intracellularis* en yema de huevos hiperinmunizados

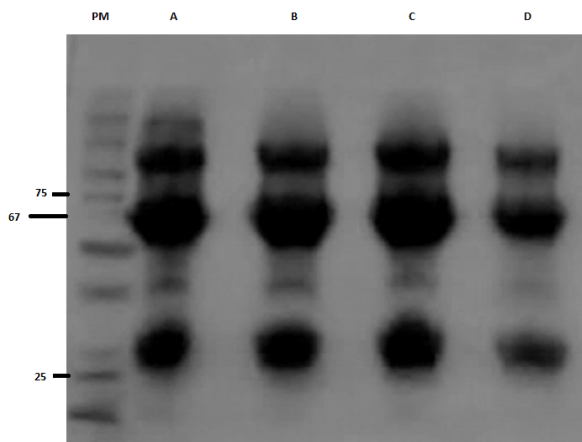
Preparación de portaobjetos con antígeno de Lawsonia intracellularis
Se reconstituyó y centrifugó durante 15 minutos a 10.000 rpm y 4°C la Vacuna *Lawsonia intracellularis*, cultivo vivo, atenuado Enterisol® Ileitis Boehringer Ingelheim S.A. Se fijó en los portaobjetos con acetona en heladera durante 10 minutos, se lavaron e incubaron a 35 - 37°C. Pasados 30 minutos se lavaron dos veces durante 5 minutos con PBS y se incubaron con una anti IgY marcada con isotiocianato de fluoresceína "Anti-Chicken IgY (IgG) (whole molecule) - FITC antibody produced in rabbit. Sigma Aldrich", durante 30 minutos a la misma temperatura de incubación. Los portaobjetos se montan con glicerina bufferada y se observan con microscopio de Inmunofluorescencia con objetivo 100x.

Resultados

Determinación de la presencia de IgY en los extractos obtenidos a partir de yema de huevos preinmunes e hiperinmunizados por SDS-PAGE

En la Fig. 1 se muestra el análisis por SDS-PAGE de extracto de yema de huevo de animales pertenecientes al Grupo Control y al Grupo Tratado hiperinmunizados con *Lawsonia intracellularis*.

Figura 1: Análisis por SDS-PAGE. Los canales A, B y C corresponden a extractos de huevos recolectados en diferentes tiempos pos-inmunización (14, 21 y 28 días) El Canal D corresponde a extractos de huevos del Grupo Control. El Canal PM corresponde al patrón de Peso Molecular. Las marcas a la izquierda del canal PM (75 kDa y 25 kDa) muestran las bandas proteicas del patrón de Peso Molecular. La marca 67 kDa corresponde al Peso Molecular Promedio de las bandas observadas en los canales A – D.



Confirmación de IgY específica contra Lawsonia intracellularis en los extractos obtenidos a partir de yema de huevos hiperinmunizados por inmunofluorescencia indirecta

Se corroboró la presencia de IgY contra *Lawsonia intracellularis* mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Discusión

En la Fig. 1 se muestra la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de los extractos obtenidos de huevos de gallinas del Grupo Control y Grupo Tratado. Se observan dos bandas características a una altura aproximada de 67 y 25 kDa que se corresponderían con las cadenas pesada y liviana de la IgY (Gregory *et al.*, 1995). El SDS-PAGE muestra un aumento progresivo en el tamaño de las bandas desde el inicio de la inmunización hasta el día 28. El aumento de tamaño observado en el Canal D con respecto al Canal A es consistente con el tiempo necesario para que los animales inmunizados comiencen a producir anticuerpos y los transfieran al huevo (Patterson *et al.*, 1962; Erhard *et al.*,

1997). Considerando que se colocó en todos los canales la misma cantidad de muestra, el aumento de la intensidad y tamaño de las bandas de los Canales A – C correspondería a un aumento de la concentración de IgY (Actis *et al.*, 2006).

La inmunofluorescencia indirecta permitió determinar la presencia de IgY específicas contra *Lawsonia intracellularis* determinando que la vacuna comercial utilizada como antígeno en este trabajo, puede ser utilizada en reemplazo de cepas de la bacteria para la obtención de anticuerpos específicos. Asawakarn *et al.* (2007) demostraron que la inoculación de cultivos de la cepa PHE / MN1-00 sirvió como fuente del antígeno para producir IgY específica contra *Lawsonia intracellularis*. En ese estudio, los anticuerpos específicos producidos en huevos de gallina fueron capaces de reducir la incidencia de infección de células cultivadas después del desafío con bacterias de *Lawsonia intracellularis*. Estos mismos autores señalaron, que en ensayos llevados a cabo con hámster y en desafíos con cerdos, que la alimentación con huevos que contienen anticuerpos puede reducir con éxito la pérdida de producción encontrada como resultado de la ileítis.

Conclusiones

La vacuna contra *Lawsonia intracellularis*, “Enterisol® Ileitis Boehringer Ingelheim S.A”, produce el aumento de anticuerpos específicos a partir de los 14 días pos inmunización.

Los resultados de este trabajo sugieren que la inmunización de gallinas ponedoras con la vacuna contra *Lawsonia intracellularis* puede ser empleada para la obtención de IgY con fines diagnósticos y terapéuticos.

Bibliografía

- Actis, A. B.; Simbrón, A.; Brunotto, M.; Gómez de Ferraris, M. E. 2006. Concentración de proteínas totales en saliva de jóvenes consumidores sociales de alcohol. Acta Odontológica Venezolana, 44: 171-175.
- Alustiza, F.; Bellingeri, R.; Picco, N.; Motta, C.; Grosso, M. C.; Barbero, C. A.; Acevedo, D. F.; Vivas, A. 2016. IgY against enterotoxigenic *Escherichia coli* administered by hydrogel-carbon nanotubes composites to prevent neonatal diarrhoea in experimentally challenged piglets. Vaccine, 34: 3291-3297.

- Asawakarn, T.; Asawakarn, S.; Wattanaphansak, S.; Connie J. Gebhart, C. J. 2007.** *In vitro* activity of the chicken egg antibody (IGY) against *Lawsonia Intracellularis*. Proceedings Chulalongkorn University Veterinary Science, Annual Conference. P. 113.
- Chalghoumi, R.; Théwis, A.; Portetelle, D.; Beckers, Y. 2008.** Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. Poultry Science, 87: 32-40.
- De Meulenaer, B.; Huyghebaert, A. 2001.** Isolation and Purification of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins: A Review. Food and Agricultural Immunology, 13: 4 - 14.
- Erhard, R. E.; Delitto, A.; Cibulka, M. T. 1994.** Relative effectiveness of an extension program and a combined program of manipulation and flexion and extension exercises in patients with acute low back syndrome. Physical Therapy, 74: 1093-1100.
- Gao, X.; Zhang, X.; Lin, L.; Yao, D.; Sun, J.; Du, X.; Li, X.; Zhang, Y. 2016.** Passive Immune-protection of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* infections with anti-vibrio egg yolk (IgY) encapsulated feed. International Journal Molecular Science, 17: 5.
- Gregory, W. W.; Katharine, E. M.; Higgins, D. A. 1995.** IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunology Today, 16: 392-396.
- Guedes, R. 2008.** Epidemiología y diagnóstico de la Enteritis Proliferativa Porcina Publicación Trimestral de Actualización Científica y Tecnológica No. 13 Guadalajara Jalisco México. Realizado por VIRBAC MÉXICO S.A. de C.V. División Cerdos y Aves. <http://www.webveterinaria.com/virbac/news14/cerdos.pdf>
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature, 227: 680 - 685.
- Naqid, I. A.; Owen, J. P.; Maddison, B. C.; Spiliotopoulos, A.; Emes, R. D.; Warry, A.; Flynn, R. J.; Martelli, F.; Gosling, R. J.; Davies, R. H.; La Razione, R. M.; Gough, K. C. 2016.** Mapping B-cell responses to *Salmonella enterica* serovars *typhimurium* and *enteritidis* in chickens for the discrimination of infected from vaccinated animals. Scientific Reports, 6: 31186.
- Pauly, D.; Chacana, P. A.; Calzado, E. G.; Brembs, B.; Schade, R. 2011.** IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG). Precipitation. Journal of Visualized Experiments, 51: 3084.
- Patterson, R.; Youngner J. S.; Weigle, W. O.; Dixon, F. J. 1962.** Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. Journal of Immunology, 89: 272-278.
- Polson, A.; von Wechmar, M. B.; van Regenmortel, M. H. 1980.** Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunology Communication, 9: 475-493.
- Romero, P.; Magnolia, A. P.; Peralta, M. F. 2013.** Biotecnología de la Inmunoglobulina Y (IgY) en animales domésticos como preventivo ó terapéutico en enfermedades entéricas. REDVET. Vol. 15. N° 01 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010114.html>
- Yamamoto, T. 1997.** Editor Hen eggs: their basic and applied science. Boca Raton: CRC Press. P. 204.

Zhang, X.; Diraviyam, T.; Li, X.; Yao, G.; Michael, A. 2016. Preparation of chicken IgY against recombinant E2 protein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and development of ELISA and ICA for BVDV detection. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(12): 2467 – 2472.