

ARTÍCULO ORIGINAL

Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*

Dabeiba Adriana García ¹, Rubén Santiago Nicholls ¹,
Adriana Arévalo ¹, Orlando Torres ², Sofía Duque ¹

¹ Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

² Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El desarrollo de anticuerpos policlonales requiere de animales de laboratorio, generalmente, el conejo, que deben sangrarse para su obtención. Como alternativa, se han utilizado las gallinas.

Objetivo. Desarrollar anticuerpos policlonales IgY anti-*Giardia duodenalis* y evaluar diferentes métodos para su purificación a partir de yema de huevo.

Materiales y métodos. Se inmunizaron tres gallinas intramuscularmente con trofozoítos del parásito: las inmunizaciones se realizaron a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 días. Se recolectaron huevos en cada etapa de la inmunización y se purificó la IgY por deslipidación (D) y precipitación (P) mediante cinco protocolos diferentes: M1: (P: sulfato de amonio/D: dextrán sulfato-cloruro de calcio), M2: (D: dextrán sulfato-cloruro de calcio/P: sulfato de amonio), M3: (D: cloroformo/P: sulfato de amonio 50%), M4: (D: solución A/P: solución B) y M5: (D: cloroformo/P: sulfato de amonio 30%). Se realizó evaluación inmunoquímica de la IgY anti-*Giardia duodenalis* mediante inmunodifusión, contrainmunoelectroforesis e inmunolectrotransferencia (*Western blot*); la pureza de IgY por SDS-PAGE en presencia y ausencia de reductor y la concentración de la inmunoglobulina (mg/mL) por espectrofotometría y densitometría.

Resultados. La IgY anti-*G. duodenalis* mediante evaluación inmunoquímica presentó títulos hasta de 1:32. La inmunoglobulina en ausencia de reductor mostró una banda de 180 kd y en su presencia bandas de 30 y 68 kd, características de sus cadenas liviana y pesada, respectivamente. Las mayores concentraciones de inmunoglobulina se recuperaron con el método dos (M2), 4,6 mg de IgY por mL de yema de partida.

Conclusiones. Por su facilidad y economía de producción en gallinas, los anticuerpos policlonales IgY anti-*Giardia* así obtenidos podrán utilizarse para desarrollar inmunoensayos que detecten el parásito en eluídos de heces.

Palabras clave: *Giardia*, yema de huevo, anticuerpos antiprotozoarios.

Obtention, purification and characterization of IgY polyclonal antibodies, developed in hens, directed against Colombian isolates of *Giardia duodenalis*

Introduction. The development of polyclonal antibodies requires laboratory animals, as the usually rabbits, which are bled for obtaining the immunoglobulins. Hens are an alternative to developing IgY polyclonal antibodies.

Objective. In the current study, hens were used to develop IgY anti-*Giardia duodenalis* antibodies and to evaluate five protocols for its purification.

Materials and methods. Three hens were immunized intramuscularly immunized with Colombian *Giardia duodenalis* isolates trophozoites on day 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120. The hen eggs were collected before each immunization, and IgY purified from yolk by delipidation (D) and precipitation (P) using five different protocols: M1: (P: ammonium sulfate/D: dextran sulfate-calcium chloride), M2: (D: dextran sulfate-calcium chloride/P: ammonium sulfate), M3: (D: chloroform/P: ammonium sulfate 50%), M4: (D: solution A/P: solution B) and M5: (D: chloroform/P: ammonium sulfate 30%). The immunochemistry evaluation of IgY anti-*Giardia*

duodenalis was assayed by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis (CIE) and Western blot. The purity of IgY was assayed by SDS-PAGE under reducing and nonreducing conditions. Immunoglobulin concentration (mg/mL) was estimated by spectrophotometry and densitometry.

Results. IgY anti-*Giardia duodenalis* by CIE had titres up to 1:32. SDS-PAGE, without 2-mercaptoethanol showed a 180 kd band characteristic of the whole IgY and, with 2-mercaptoethanol, two bands of 68 and 30 kd, characteristic of its light and heavy chains, respectively. The greatest concentrations of immunoglobulin were recovered by method two (M2), producing 4.6 mg of IgY per mL of initial egg yolk.

Conclusions. The easy and inexpensive production of IgY anti-*Giardia duodenalis* in hens is an advantage for using it to develop immunoassays that detect the parasite in fecal eluates.

Key words: *Giardia*, egg yolk, antibodies protozoan.

La giardiosis es una infección intestinal causada por *Giardia duodenalis* (1) de distribución a nivel mundial. Según la primera encuesta nacional de morbilidad, 1965-1966, la prevalencia en la población colombiana fue de 11,9% (2), y de 13,7% en la segunda, 1977-1980 (3). Estudios realizados en niños colombianos de 12 a 59 meses de edad (4) y de 3 a 13 años alojados en asentamientos temporales (5) informaron prevalencias de 21,2% y de 65%, respectivamente.

La identificación de *G. duodenalis* se realiza tradicionalmente visualizando quistes o trofozoítos del parásito en materia fecal, considerada como la mejor muestra y la de más fácil consecución (6). Sensibilidades mayores a 85% para la identificación de *G. duodenalis* raramente se logran debido a la excreción intermitente de quistes, fenómeno inherente a la biología del parásito (7). Sin embargo, una alternativa para establecer la presencia de *G. duodenalis* es la detección de antígeno del parásito en heces mediante anticuerpos policlonales anti-*Giardia duodenalis* (8).

Se han desarrollado anticuerpos policlonales IgY contra antígenos específicos de péptidos y proteínas, de virus (rotavirus, enterovirus, picornavirus, arbovirus, paramixovirus, potivirus y adenovirus), de bacterias (*Escherichia coli* enterotoxigénica y enteropatógena, *Brucella abortus*) y de algunos parásitos (*Echinococcus*

granulosus, *Naegleria fowleri*, *Plasmodium falciparum*, *Sarcocystis gigantea*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma brucei brucei*) (9-13).

La producción de anticuerpos policlonales contra agentes infecciosos requiere de animales de laboratorio, generalmente, conejos, que deben ser sangrados periódicamente para su obtención. Como una alternativa menos invasiva se han utilizado gallinas, debido a que la sangría puede ser reemplazada por la recolección de huevos (14). Además, el uso de las gallinas para la producción de anticuerpos en contraposición al de mamíferos representa reducción en el número de animales porque éstas producen cantidades más altas de anticuerpos (1500 mg de IgY por mes) que los mamíferos pequeños (200 mg de IgG por mes). Las principales clases de anticuerpos en aves son IgM, IgA e IgG, también llamada IgY. Las aves son una excelente opción para el desarrollo de anticuerpos antimamífero (15-17) y constituyen modelos útiles en la investigación básica de la inmunología, ya que muchas de las funciones de su sistema inmune son similares a las del humano (18).

El propósito de este trabajo fue desarrollar anticuerpos policlonales IgY dirigidos contra aislamientos colombianos de *G. duodenalis*, hasta la fecha no desarrollados, y evaluar el método de purificación más eficiente para su obtención en términos de reconocimiento de antígeno de *Giardia*, pureza y concentración (mg/mL).

Materiales y métodos

Antígeno de *Giardia duodenalis*

Se realizó cultivo masivo de una mezcla de trofozoítos de veinticuatro aislamientos colombianos de *G. duodenalis* (19) provenientes

Correspondencia:

Sofía Duque

Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud

Avenida Calle 26 No 51-60, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: 2207700, extensión 455; Fax: 2200901

sduque@ins.gov.co

Recibido: 18/04/05; aceptado: 03/08/05

del banco de parásitos del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS). Se centrifugaron los trofozoítos a 1.400g a 18°C durante 8 minutos, se lavó el sedimento (parásitos) con solución salina fisiológica estéril (SSFE), se resuspendieron en 1 mL de ésta, se congelaron a -196°C, y se descongelaron a 18°C mediante vórtex. Se sometieron a disrupción por ultrasonido en un equipo Biosonik II A®, a una frecuencia de 20 kHz en tres ciclos de 30 segundos cada uno; se centrifugaron a 1.400g a 18°C durante 8 minutos y se retuvo el sobrenadante; luego se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford (20).

Inmunización de gallinas

Se siguieron las normas internacionales del *National Research Council*, 1996 (21) y las normas de Cedeño *et al.*, 1994 (22), utilizadas en el Instituto Nacional de Salud para el manejo y mantenimiento de animales. Se utilizaron tres gallinas de la línea Hy Line Brown (23) para el desarrollo de IgY anti-*G. duodenalis* y una gallina de la misma línea como control.

Se utilizó antígeno de trofozoíto de *G. duodenalis* con una concentración de proteínas de 4,65 mg/mL. Se tomaron 10,7 µL de éste para disolverlos con SSFE hasta completar un volumen de 100 µL y, luego, adicionarles 100 µL de adyuvante completo e incompleto de Freund para inóculo inicial e inóculos subsiguientes, respectivamente. Se mezcló el antígeno y los adyuvantes hasta obtener una emulsión homogénea utilizando un vórtex. Se realizó inmunización a tres gallinas en el músculo pectoral a una profundidad de 1 cm con 200 µL del inóculo (que contiene 50 µg de antígeno de *Giardia*) por sitio, y en cinco sitios diferentes de la gallina con la misma concentración y el mismo volumen (9, 24). La gallina control se inoculó con 200 µL de SSFE. Las inmunizaciones se realizaron a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 días (14,25). Se sangró cada gallina en la vena braquial antes de realizar las inmunizaciones y se recolectaron tres huevos; uno el día anterior, otro el día de la inmunización y el último huevo el día posterior a ésta por cada gallina y en cada etapa del esquema de inmunización. Se realizó un *pool* con las tres yemas de los huevos recolectados

(20 mL) y se utilizaron 4 mL de éste por cada método de purificación de IgY.

Purificación de la IgY a partir de yema de huevo

Se utilizaron por separado cinco métodos diferentes denominados como M1 (9), M2 (26-28), M3 (29, 30), M4 Estuche comercial (EGGstract® IgY purification system - Promega) y M5 (9, 30); todos ellos tuvieron en común el proceso de deslipidación (D) y el de precipitación (P) de la IgY para su purificación.

Método 1 (M1): precipitación (P) con sulfato de amonio y delipidación (D) con dextrán sulfato-cloruro de calcio

Se separó la clara de la yema de huevo y ésta se mezcló en proporción 1:9 v/v con agua destilada. Se ajustó la mezcla a pH 7,0, se congeló a -20°C durante 24 horas, se descongeló a 4°C, se centrifugó a 2.000g a 4°C durante 20 minutos y se retuvo el sobrenadante. Se precipitó la IgY con sulfato de amonio al 30%, incubado a 18°C mediante agitación constante durante 30 minutos. Se centrifugó a 2.000g a 4°C durante 20 minutos y se retuvo el sedimento. Se separaron las lipoproteínas de la IgY con dextrán sulfato al 0,2% incubado a 0°C durante 5 minutos, y posteriormente con cloruro de calcio al 0,1%, incubado a la misma temperatura durante 30 minutos. Se centrifugó a 2.000g a 4°C durante 20 minutos, y el sobrenadante (IgY) se dializó contra solución reguladora de fosfatos (PBS).

Método 2 (M2): deslipidación (D) con dextrán sulfato-cloruro de calcio y precipitación (P) con sulfato de amonio

Se separó la clara de la yema de huevo y ésta se mezcló en proporción 1:9 v/v con agua destilada. Se ajustó la mezcla a pH 7,0, se congeló a -20°C durante 24 horas, se descongeló a 4°C, se centrifugó a 10.000g a 4°C durante 20 minutos y se retuvo el sobrenadante. Se separaron de la IgY las lipoproteínas con dextrán sulfato al 10% incubando a 0°C durante 5 minutos y, posteriormente, con cloruro de calcio al 11,1%, incubando a la misma temperatura durante 30 minutos. Se centrifugó a 2.000g a 4°C durante 20 minutos, se retuvo el sobrenadante y se precipitó

la IgY con sulfato de amonio al 30%, incubando a 18°C mediante agitación constante durante 30 minutos. Se centrifugó a 2.000g a 4°C durante 20 minutos, se retuvo el sedimento (IgY), éste se disolvió con PBS en dilución 1:20, y se dializó contra solución reguladora de fosfatos.

Método 3 (M3): deslipidación (D) con cloroformo y precipitación (P) con sulfato de amonio al 50%

Se separó la clara de la yema del huevo. Se separaron los lípidos, mezclando 2 partes de la yema con 3 partes de una solución que contenía 3:1 v/v de PBS y cloroformo. Se incubó la mezcla a 18°C mediante agitación constante durante 15 minutos, se centrifugó a 3.000g a 4°C durante 20 minutos y se retuvo el sobrenadante. Se precipitó la IgY con sulfato de amonio al 50%, incubado a 4°C mediante agitación constante durante 18 horas, se centrifugó a 3.000g a 4°C durante 20 minutos, se retuvo el sedimento (IgY), éste se disolvió con 1 mL de PBS, y se dializó contra solución reguladora de fosfatos.

Método 4 (M4): estuche comercial (EGGstract® IgY purification system - Promega)

Se separó la clara de la yema del huevo. Se separaron los lípidos, mezclando 1 parte de la yema con 3 partes de solución A, se incubó la mezcla a 18°C mediante agitación constante durante 5 minutos, se centrifugó a 10.000g a 4°C durante 10 minutos y se retuvo el sobrenadante. Se precipitó la IgY con solución B en proporción 3:1 v/v, incubando a 18°C durante 5 minutos, se centrifugó a 10.000g a 4°C durante 10 minutos, se retuvo el sedimento (IgY), y éste se disolvió con PBS en un volumen igual de la yema al inicial.

Método 5 (M5): deslipidación (D) con cloroformo y precipitación (P) con sulfato de amonio al 30%

Se separó la clara de la yema del huevo. Se separaron los lípidos, mezclando 2 partes de la yema con 3 partes de una solución que contenía 3:1 v/v de PBS y cloroformo. Se incubó la mezcla a 18°C mediante agitación constante durante 15 minutos, se centrifugó a 3.000g a 4°C durante 20 minutos y se retuvo el sobrenadante. Se precipitó la IgY con sulfato de amonio al 30%, incubando a 4°C mediante agitación constante durante 18 horas, se centrifugó a 3.000g a 4°C durante 20

minutos, se retuvo el sedimento (IgY), éste se disolvió con 1 mL de PBS, y se dializó contra solución reguladora de fosfatos.

Evaluación inmunoquímica de la IgY

Se determinó mediante inmunodifusión (ID), contrainmunolectroforesis (CIE) e inmuno-electrotransferencia (Western blot).

Inmunodifusión

Se elaboraron dos geles de agarosa al 1,3%. El primer gel con solución salina estéril (SSE) 0,15 M para confrontar antígeno de *Giardia* con IgY anti-*Giardia* presente en el suero de gallina, y el segundo gel con 1,5 M de SSE para dirigir IgY anti-parásito purificada a partir de yema de huevo contra antígeno del parásito. Se eliminaron las bandas inespecíficas con citrato de sodio al 5% y a las 72 horas se colorearon las bandas correspondientes a la unión antígeno-anticuerpo con azul de Coomassie (28,31).

Contrainmunolectroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 1,3% (Sigma tipo IV®) con solución reguladora de acetato de sodio - ácido acético pH 5,6. Se realizaron diluciones seriadas al medio de la IgY anti-parásito, que fueron confrontadas con el antígeno de trofozoito de *G. duodenalis* mediante CIE a 51 voltios, a una temperatura de 4°C durante 3 horas, para determinar la dilución máxima a la cual precipita el complejo. Se eliminaron las bandas inespecíficas con citrato de sodio al 5% y se colorearon con azul de Coomassie (32).

Inmunolectro transferencia (Western blot)

Se realizó mediante el procedimiento descrito por Laemmli (33) y Towbin *et al.* (34). Se utilizó antígeno de trofozoitos de *G. duodenalis* con una concentración de (0,8 mg/mL). Se dispensaron 28 µg de antígeno en el carril y se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE (12,5%) con y sin el agente reductor 2-mercaptoetanol (2-ME) y, luego, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (MNC) mediante *Western blot* a una temperatura de 4°C, con una corriente de 200 mA y 130 voltios durante 2 horas. Se verificó la transferencia de proteínas con rojo Ponceau S. Se bloqueó la MNC con leche descremada/PBS-

Tween 20 al 0,1% (PBS-T) a 18°C durante una hora.

Se confrontaron las proteínas de *G. duodenalis* presentes en la MNC con IgY anti-parásito (1:400) de las gallinas inmunizadas y de la gallina control independientemente, incubando a 18°C durante 18 horas, tiempo después del cual se adicionó anti-IgY unida a fosfatasa alcalina (Promega®) en dilución 1:10.000. Para el reconocimiento de antígenos de trofozoíto de *G. duodenalis* por la IgY anti-parásito purificada a partir de yema de huevo se adicionó 5-bromo 4-cloro 3-indol fosfato (BCIP) y azul de nitrotetrazolio (NBT).

Determinación de la pureza de la IgY

Se determinó la pureza de IgY mediante SDS-PAGE (26,27,35-39). Se elaboraron el gel concentrador de poliacrilamida (5%) y los geles separadores al 7,5% sin 2-ME y al 12,5% con 2-ME. El marcador de peso molecular, la albúmina sérica bovina (BSA) (1 mg/mL) y la IgY (1:10) se sometieron a electroforesis bajo las siguientes condiciones: temperatura, 18°C; amperaje, 35 mA; voltaje, 75 voltios; duración, 45 minutos. Los geles obtenidos se colorearon con azul de Coomassie.

Concentración (mg/mL) y porcentaje (%) de recuperación de la IgY

La concentración de IgY se determinó mediante espectrofotometría y densitometría y el porcentaje de recuperación por esta última, como se describe a continuación.

Espectrofotometría

Se estableció, por triplicado, el valor de la densidad óptica de la IgY (1:10) a una longitud de onda de 280 nm con un espectrofotómetro (Beckman modelo DU 640) (40). Se determinó la concentración en mg/mL de la IgY promediando los 3 valores de densidad óptica, multiplicando el promedio por el factor de dilución y dividiendo este producto por el coeficiente de extinción de la IgY disuelta en PBS 0,01M, que es de 13,2 (40,41).

Densitometría

Se digitalizaron los geles procesados mediante SDS-PAGE que contenían tanto la IgY 180 kd como sus cadenas liviana y pesada, de 30 y 68 kd, respectivamente. Se utilizó el programa para

procesamiento y análisis de imágenes «ImageJ», (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>); se determinó la intensidad relativa de color de la banda patrón de BSA, y las correspondientes a la IgY total (180 kd) y sus cadenas pesada y liviana (68 y 30 kd), así como las de las áreas contiguas a cada una de ellas (ruido de fondo). La diferencia de la intensidad relativa de estas bandas con la del ruido de fondo determinó el valor neto de la intensidad de color del patrón y de la IgY. La concentración de la IgY se definió como el cociente de la intensidad relativa neta de la IgY y la intensidad relativa neta del patrón. Se realizó control de calidad a la determinación de la concentración (mg /mL) de la IgY recuperada por cada uno de los métodos de purificación utilizados, y por el que presentase el mayor título en la evaluación inmunoquímica, sometiéndola a SDS-PAGE.

Se determinó por separado el porcentaje de recuperación de la IgY obtenida en cada uno de los métodos de purificación (M1-M5), dividiendo el valor de la intensidad relativa de la inmunoglobulina entre la suma de las intensidades relativas de todas las bandas obtenidas por SDS-PAGE y multiplicando por 100 los valores obtenidos.

Resultados

Evaluación inmunoquímica de IgY anti-Giardia duodenalis

La IgY anti-*Giardia duodenalis* en suero y purificada de yema de huevo se unió inmunoquímicamente con el antígeno del parásito en los días 30, 45, 60, 90 y 120 posinmunización sólo en las yemas de huevos obtenidos de las gallinas inmunizadas, y no se hizo ninguna unión inmunoquímica en la gallina control (cuadro 1).

La máxima dilución detectada de unión entre antígeno (trofozoíto del parásito) y anticuerpo (IgY anti-*G. duodenalis*) fue de 1:32 al día 30 posinmunización utilizando el método 2 de purificación (cuadro 1).

La IgY purificada a partir de yema de huevo utilizando el método 2 reconoció, en condición no reductora, los antígenos de trofozoíto de *G. duodenalis* de pesos moleculares de 24, 56, 64,

Cuadro 1. Evaluación inmunoquímica de IgY anti-*Giardia duodenalis* en suero y yema de huevo en la gallina inmunizada No. 1 en diferentes días de inmunización y según los diferentes métodos utilizados para la purificación de la IgY.

Inmunización (Día)	IgY a partir de yema de huevo											
	IgY suero		Método 1		Método 2		Método 3		Método 4		Método 5	
	ID	CIE	ID	CIE	ID	CIE	ID	CIE	ID	CIE	ID	CIE
0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
30	(+)	(+)	(+)	1:4	(+)	1:32	(-)	SD	(-)	1:16	(-)	(-)
45	(+)	(+)	(+)	SD	(+)	SD	(-)	SD	(-)	1:2	(-)	SD
60	(+)	(+)	(+)	1:4	(+)	1:8	(-)	SD	(-)	1:8	(-)	SD
90	(-)	(+)	(-)	1:4	(-)	1:2	(-)	1:4	(-)	1:4	(-)	(-)
120	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1:2	(-)	SD	(-)	1:8	(-)	(-)

ID: inmunodifusión; CIE: contrainmunolectroforesis; SD: sin diluir; (-): negativo.

Gallina control: todos los resultados de la evaluación inmunoquímica de la IgY purificada a partir de yema de huevo fueron negativos.

67, 74, 86, 165, y 170 kd, y en presencia de 2-ME, los antígenos de 25, 35, 43, 49, 52, 60, 65, 72, 78, 82, 99 y 170 kd (figura 1).

Pureza de la IgY

En condición no reductora

La banda de 180 kd, correspondiente al peso molecular de la IgY, se obtuvo utilizando todos los métodos de purificación (M1-M5); también se obtuvieron bandas adicionales con pesos moleculares entre 62 y 98 kd (figura 2A).

En condición reductora

Las cadenas liviana y pesada de la IgY, con pesos moleculares de 30 y 68 kd, se lograron purificando la IgY mediante los 5 métodos empleados, con los cuales se obtuvo también una banda adicional de 48 kd. Bandas adicionales de 40, 170 y 180 kd se obtuvieron utilizando los métodos M1, M2 y M5, y una banda adicional de 56 kd sólo con M3 (figura 2B).

Concentración de la IgY

Espectrofotometría

La concentración de IgY en el día 0, día preinmunización, fue mayor a la del día 15 posinmunización, día a partir del cual la concentración de IgY incrementó hasta el día 45 y disminuyó paulatinamente hasta el día 120, con picos máximos en los días 30, 45 y 60 posinmunización. Las concentraciones de

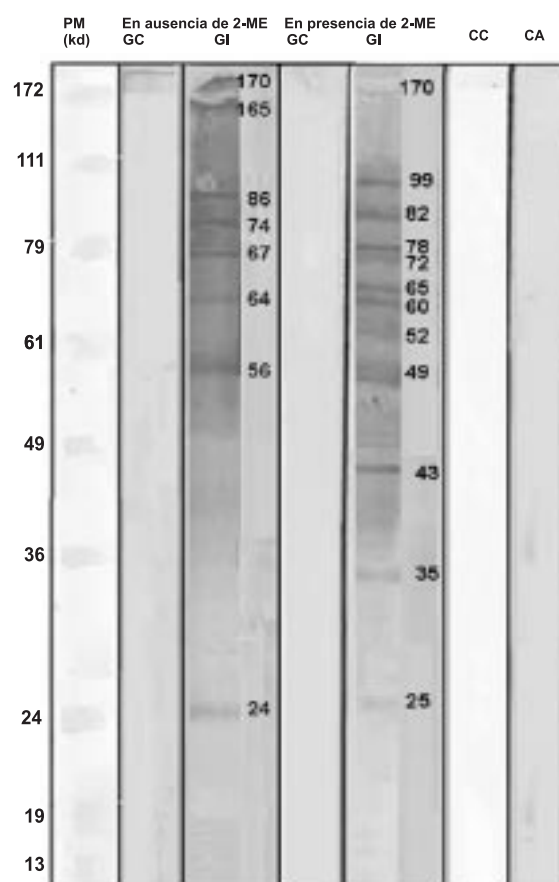
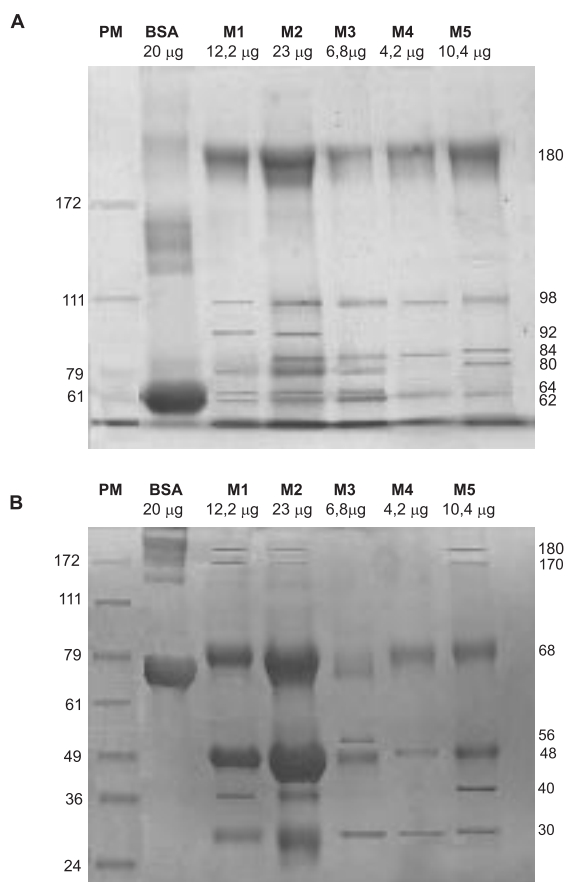


Figura 1. Identificación mediante inmunoelectrotransferencia de antígenos de trofozoíto de *Giardia duodenalis* por anticuerpos IgY presentes en yema de huevo mediante el método de purificación 2 en la gallina No 1.



PM: Marcador de peso molecular

Figura 2. Determinación de la pureza de IgY obtenida mediante los cinco métodos de purificación a partir de yema de huevo en la gallina No 1. A. SDS-PAGE en condición no reductora. B: SDS-PAGE en condición reductora.

immunoglobulina variaron entre los ejemplares y los métodos de purificación utilizados (cuadro 2).

Densitometría

La concentración de IgY total recuperada por cada uno de los métodos de purificación se describen en el cuadro 2.

Control de calidad de la determinación de la concentración (mg/mL) de la IgY

La máxima unión antígeno de *Giardia* e IgY anti-parásito fue obtenida en el día 30 del esquema de inmunización y determinada por CIE, presentando un título de 1:32 (cuadro 1); las concentraciones de recuperadas por cada uno de los métodos de

purificación, en condición no reductora y reductora, se mencionan en el cuadro 3.

Porcentaje de recuperación de la IgY mediante los cinco métodos de purificación utilizados

La IgY anti-*G. duodenalis* con mayor unión al antígeno del parásito fue desarrollada por la gallina inmunizada No. 1 en el día 30 de inmunización con título de 1:32. El porcentaje de IgY recuperada con respecto a los contaminantes presentes en los dializados por cada uno de los métodos de purificación utilizados se especifican en el cuadro 3.

Discusión

Anteriormente se han desarrollado IgY anti-agentes infecciosos (9) utilizando diferentes protocolos. Sin embargo, la comparación entre protocolos es difícil por la variedad de antígenos y las concentraciones utilizadas, así como también por las vías de inoculación y frecuencias empleadas en las inmunizaciones. Durante el desarrollo de la IgY anti-aislamientos colombianos de *Giardia*, el presente estudio mantuvo constante el adyuvante, la calidad y la concentración del antígeno, el volumen de inóculo, el sitio y la frecuencia de inoculación, el número e intervalo de inmunizaciones y la edad de los ejemplares, que son los parámetros requeridos para tal fin.

El presente trabajo utilizó por sitio de inoculación, una concentración de 50 µg de antígeno de trofozoito de *G. duodenalis* en 0,2 mL de adyuvante completo e incompleto de Freund para inóculo inicial y refuerzos, respectivamente. La concentración de antígeno y volumen utilizados se encuentran dentro de los rangos de 10 ng a 1 mg (14) y de 0,1 mL a 0,25 mL, respectivamente (14, 42), los cuales son los recomendados para la inmunización de gallinas. La IgY desarrollada en el estudio corresponde a IgY anti-*Giardia*, lo que fue comprobado por la unión específica del antígeno al parásito, y visualizada en la evaluación inmunoquímica por ID, CIE y WB.

Se ha demostrado en gallinas que, después de la primera inmunización, los títulos IgY anti-bacterias alcanzan un pico en la semana 4 en suero, y entre las semanas 6 a 8 en yema de huevo, que luego descienden en la semana 12. Sin embargo, los

Cuadro 2. Concentración de IgY a partir de la yema de huevo determinada mediante espectrofotometría y densitometría.

mg de IgY por mL de yema de partida				
Inmunización (Día)	Espectrofotometría		Densitometría	
	Método de purificación 1 (M1) (SA/DS-CC)			
	Precipitación (P): Sulfato de amonio/ Delipidación (D): Dextran Sulfato-Cloruro de Calcio			
	Gallina inmunizada	Gallina control	Gallina inmunizada	Gallina control
0	4,3	2,8	8,0	3,6
15	1,8	1,2	7,3	2,1
30	3,8	6,3	4,9	4,3
45	9,6	5,6	7,1	3,5
60	2,8	4,6	5,7	1,7
90	2,6	2,4	5,1	1,3
120	1,8	2,8	5,4	1,6
Método de purificación 2 (M2) (DS-CC/SA)				
D: Dextran Sulfato-Cloruro de Calcio/ P: Sulfato de amonio				
0	2,4	2,8	2,6	3,0
15	1,1	1,9	4,3	2,3
30	7,2	2,9	5,1	1,6
45	3,8	1,3	3,8	2,1
60	3,8	2,5	4,4	1,9
90	4,4	2,2	3,5	1,8
120	3,7	4,4	3,3	1,3
Método de purificación 3 (M3) (C/SA 50%)				
D: Cloroformo/P: Sulfato de amonio 50%				
0	6,3	5,1	3,1	1,8
15	4,1	4,6	3,4	1,6
30	2,1	3,4	2,1	1,9
45	2,8	1,4	2,9	1,3
60	6,7	5,6	4,8	1,1
90	5,6	5,8	3,9	0,7
120	4,8	6,6	2,9	0,6
Método de purificación 4 (M4) (A/B)				
D: Solución A/P: Solución B				
0	0,6	0,3	2,2	0,5
15	0,4	0,5	1,6	0,8
30	1,3	0,3	3,5	1,0
45	1,1	0,9	3,4	0,9
60	3,3	3,3	5,5	1,3
90	4,4	5,1	5,4	2,0
120	3,6	3,7	3,7	1,7
Método de purificación 5 (M5) (C/SA 30%)				
D: Solución A/P: Solución B				
0	3,3	2,4	2,8	1,9
15	2,9	1,6	2,8	1,7
30	3,3	2,9	4,1	2,3
45	4,4	1,1	3,9	1,3
60	3,4	3,4	4,2	2,3
90	4,9	3,6	2,6	2,4
120	2,6	3,9	2,9	2,5

Cuadro 3. Concentraciones y porcentajes de recuperación de la IgY a partir de yema de huevo, utilizando diferentes métodos de purificación y determinados mediante densitometría.

Método de purificación	IgY					
	Concentración (mg/mL)			Mililitros recuperados	mg de IgY por mL de yema de partida	Recuperación (%)
	Cadena pesada	Cadena ligera	Cadena completa			
M1	12,7	7,5	4,5	2,5	2,8	63
M2	22,7	12,2	7,4	2,5	4,6	70
M3	5,1	1,7	2,8	2,5	1,7	62
M4	7,4	4,5	3,9	2,5	2,4	65
M5	11,7	6,8	5,5	2,5	3,4	68

títulos de la inmunoglobulina pueden aumentar re-inmunizando las gallinas en la semana 14 (43). En este estudio se alcanzaron títulos de IgY anti-*G. duodenalis* determinados mediante CIE sin diluir hasta una dilución máxima de 1:32 en la semana 4, lo que corresponde a la respuesta del segundo refuerzo de inmunización.

Los esquemas de inmunización con largos períodos de tiempo y con refuerzos repetidos incrementan el desarrollo de anticuerpos afines al antígeno inoculado, aunque también pueden inducir la producción de anticuerpos específicos contra otras moléculas presentes en la solución diluyente del antígeno (44). Por ello, de acuerdo con los resultados del estudio, se sugiere inmunizar a las gallinas con antígeno de trofozoíto de *G. duodenalis* hasta la semana 8, aplicando cuatro inmunizaciones con intervalo de dos semanas entre cada una de ellas.

El desarrollo de anticuerpos ante el estímulo de un antígeno es inherente de cada animal inmunizado (45). Generalmente, los animales utilizados para la producción de anticuerpos policlones son ejemplares exocriados porque éstos tienen un amplio rango de proteínas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II), que generan una respuesta inmune diferente y específica en cada animal (29). En 1996, Schade *et al.* (14) informaron que, después de una inmunización, entre 10% y 15% de gallinas exocriadas pueden no desarrollar anticuerpos contra el agente etiológico con las cuales fueron inmunizadas, o en otros casos, generar una producción de anticuerpos muy bajos ante el

estímulo de un antígeno. En el estudio se inmunizaron tres ejemplares exocriados, obteniéndose una producción de anticuerpos policlones IgY anti-*G. duodenalis* en todas las posinmunizaciones en dos de los ejemplares, la gallina No.1 y la gallina No.3. En cambio la gallina No.4 desarrolló IgY anti-*G. duodenalis* tan sólo en las dos primeras inmunizaciones, demostrándose una menor producción de anticuerpos policlones en relación a las otras dos inmunizaciones con el mismo volumen y la misma concentración de antígeno. Por ello, para garantizar el desarrollo de IgY anti-*G. duodenalis* siguiendo las pautas aquí establecidas, se recomienda inmunizar como mínimo dos ejemplares.

La recuperación de IgY no requiere de procedimientos invasivos como la sangría que se realiza en mamíferos, pues la postura de huevos es un proceso natural de las aves. Las gallinas pueden ser consideradas como fuente eficiente y una alternativa ideal para el desarrollo de IgY anti-*G. duodenalis*.

La IgY total obtenida en el estudio fue purificada a partir de yema de huevo por eliminación de las lipoproteínas (delipidación) y recuperada mediante precipitación, siguiendo los protocolos usualmente utilizados para tal fin (9,26-30). Existen diferencias en los procesos físicos y en los reactivos utilizados para delipidar y precipitar la IgY. La deslipidación se ha realizado mediante métodos físicos como congelación/descongelación y ultracentrifugación, o mediante métodos químicos que usan gomas naturales como el xanthan, agua

destilada acidificada o dextran sulfato/cloruro de sodio, azul dextran, cloroformo, polietilenglicol (PEG) 6000, PEG 8000 y propanol/acetona, o mediante cromatografía de intercambio iónico (9, 24,26-28,35,36,38,39,43,46-53).

La IgY contra parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Naegleria fowleri*, *Trypanosoma brucei brucei* y *Plasmodium falciparum* ha sido delipidada utilizando PEG 6000, cromatografía de interacción hidrofóbica o filtración en gel, o agua destilada acidificada (11,12,37,54).

Los lípidos son solubles en solventes orgánicos como el cloroformo, el éter, la acetona o el propanol, lo cual permite usarlos para removerlos (13), y las lipoproteínas forman complejos insolubles con compuestos polianiónicos, particularmente polisacáridos sulfatados como el dextrán sulfato en presencia de cationes divalentes como el calcio, el magnesio o el manganeso (Baykeev R, Muhamadiev F, Vasiliev G. Influence of the organic solvents on to the dynamic heterogeneity of lipids in the structure of biological membranes. Proceedings of the 15th European experimental NMR conference: 2000 Jun 12-17; University of Leipzig, Germany). La deslipidación de IgY en la fase acuosa de la yema de huevo, utilizando cloroformo como se realizó en el estudio, permitió recuperar 3,4 mg de la inmunoglobulina por mL de yema de partida, siendo esta concentración menor a la obtenida utilizando dextran sulfato/cloruro de calcio, que fue de 4,6 mg de IgY por mL de yema de partida. La IgY libre de lípidos ha sido recuperada mediante ultracentrifugación, filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico (27), y por cromatografía de afinidad (52), o mediante precipitación con PEG o con sulfato de sodio o sulfato de amonio (27,29).

Los resultados obtenidos permitieron inferir que la purificación de IgY se puede realizar utilizando cualquiera de los cinco métodos estudiados. Sin embargo, la eficiencia de los métodos analizada en términos de pureza y evidenciada en los geles SDS-PAGE difiere según el método utilizado y a si la IgY se somete o no a agentes reductores como el 2-ME. Así, la pureza de IgY en condición reductora presenta 5 bandas (contaminantes) y en condición no reductora presenta 6

contaminantes, sumados para el conjunto de los métodos. El método 4 (delipidación con solución A/precipitación con solución B) recuperó la IgY con la menor cantidad de contaminantes (tres bandas de 62, 84 y 98 kd). Estos pesos moleculares son lejanos al de 180 kd correspondiente al de la IgY en condición no reductora. Se infiere que estos contaminantes no alteran la naturaleza físicoquímica de la inmunoglobulina.

Separar la yema de la albúmina del huevo garantizó la ausencia de las inmunoglobulinas IgA e IgM en el proceso de purificación de la IgY total como lo habían experimentado Erhard y Schade en el 2001 (47). La unión de antígeno (trofozoíto de *Giardia duodenalis*) y de anticuerpo (IgY anti-parásito) visualizada mediante la formación de bandas de precipitación al utilizar las pruebas inmunoquímicas de inmunodifusión, contra-inmunolectroforesis y *Western blot* confirmó el desarrollo de IgY anti-*G. duodenalis* de aislados colombianos como respuesta inmune al estímulo de antígeno somático del parásito.

La visualización de la unión antígeno de *Giardia* e IgY anti-parásito mediante CIE en el día 15, que contrasta con su ausencia en inmunodifusión, puede explicarse en términos de: a) los anticuerpos policlonales IgY anti-parásito presentes en suero y en yema de huevo probablemente estén acompañados de otras moléculas, las cuales podrían interferir con la libre migración de la IgY, y b) la sensibilidad de las pruebas utilizadas. Así, se conoce que la CIE es diez veces más sensible que la ID para detectar la unión antígeno-anticuerpo (55,56), permitiendo observar la individualidad de la respuesta inmune que cada ser vivo desarrolla ante el reto de un antígeno.

El estudio permite inferir que la utilización de dextrán sulfato/cloruro de calcio en la deslipidación y de sulfato de amonio en la precipitación (método 2) es el mejor para la recuperación de la inmunoglobulina y ésto concuerda con lo observado por Rangel *et al.* en 1999 (44). En comparación con los otros métodos de purificación, el método 2 es el más eficiente en términos de concentración de la inmunoglobulina

recuperada, es decir, 4,6 mg de IgY por mL de yema de partida; de su pureza (70 %), y de su título 1:32, evaluado por la pruebas inmunoquímicas ID, CIE y WB.

Hasta donde se ha tenido acceso a la literatura científica existen muchos trabajos de producción de anticuerpos en gallina, pero de IgY anti-*Giardia*, y específicamente contra aislamientos colombianos del parásito, no se habían desarrollado con anterioridad. Sólo se habían producido anticuerpos policlonaes IgY contra las siguientes especies de parásitos: *Echinococcus granulosus*, *Naegleria fowleri*, *Plasmodium falciparum*, *Sarcocystis giganteae*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma brucei brucei* (9-13).

Por su facilidad, economía y rendimiento en la producción, los anticuerpos policlonaes IgY anti-aislamientos colombianos de *Giardia* pueden utilizarse para desarrollar inmunoensayos que detecten antígeno del parásito en eluidos de heces humanas o de animales infectados experimentalmente.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Javier Eduardo Gómez Meza, del Grupo Producción y Desarrollo Tecnológico de la Subdirección Industrial del Instituto Nacional de Salud, por su colaboración durante la realización de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no haber incurrido en ninguna situación de conflicto de intereses durante la realización de este trabajo.

Financiación

Este trabajo fue financiado en su totalidad por el Instituto Nacional de Salud.

Referencias

1. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 2001;14:447-75.
2. Galán R, Agualimpia C, Corredor A, Cáceres E. Parasitismo intestinal - Investigación Nacional de Morbilidad. Bogotá, D.E.: Instituto Nacional para Investigaciones Especiales-INPES; 1969.
3. Corredor A, Arciniegas E, Hernández CA, editores. Parasitismo intestinal. Santa Fe de Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2000.
4. Castro de Navarro L, Nicholls S. Deficiencia de hierro, vitamina A y prevalencia de parasitismo intestinal en la población infantil y anemia nutricional en mujeres en edad fértil Colombia 1995-1996. Santafé de Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 1998.
5. Torres E, Gallego ML, Gómez JE. Giardiasis en niños viviendo en asentamientos temporales en Armenia. Infectio 2002;6:89.
6. Duque S, Nicholls RS, Arévalo A, Guerrero R, Montenegro S, James MA. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:1165-8.
7. Faubert GM, Belosevic M. Animal model for *Giardia duodenalis* type organisms. En: Meyer EA, editor. Human parasitic diseases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Biomedical División; 1990. p.77-90.
8. Ungar BLP, Yolken RH, Nash TE, Quinn TC. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. J Infect Dis 1984;149:90-7.
9. Schade R, Pfister C, Halatsch R, Henklein P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk – an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. Altern Lab Anim 1991;19:403-19.
10. Morty RE, Lonsdale-Eccles JD, Mentele R, Auerwald EA, Coetzer THT. Trypanosome-derived oligopeptidase B is released into the plasma of infected rodents, where it persists and retains full catalytic activity. Infect Immun 2001;69:2757-61.
11. Herbst R, Ott C, Jacobs T, Marti T, Marciano-Cabral F, Leippe M. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. J Biol Chem 2002;277:22353-60.
12. Kang X, Szallies A, Rawer M, Echner H, Duszenko M. GPI anchor transamidase of *Trypanosoma brucei*: *in vitro* assay of the recombinant protein and VSG anchor exchange. J Cell Sci 2002;115:2529-39.
13. Merckx A, Le Roch K, Nivez MP, Dorin D, Alano P, Gutierrez GJ *et al.* Identification and initial characterization of three novel cyclin-related proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem 2003;278:39839-50.
14. Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugo H, Koch G, *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. Altern Lab Anim 1996;24:925-34.
15. Erhard ME, Schmidt P, Hofmann A, Stangassinger M, Losch U. Production and purification of mouse IgG subclass specific chicken egg yolk antibodies using a new indirect affinity chromatography method with protein G sepharose. ALTEX 1996;13:66-9.
16. Terzolo HR, Sandoval VE, Caffer MI, Terragno R, Alcain A. Agglutination of hen egg-yolk immunoglobulins

- (IgY) against *Salmonella enterica*, serovar enteritidis. Rev Argent Microbiol 1998;30:84-92.
17. **Alarcón CE, Hurtado H, Castellanos J.** Anticuerpos aviares: alternativa en producción y diagnóstico. Biomédica 2000;20:338-43.
 18. **Sharma JM.** The structure and function of the avian immune system. Acta Vet Hung 1997;45:229-38.
 19. **Duque S, Nicholls RS, Arévalo A, Guerrero R.** Serodiagnóstico de giardiasis: identificación de inmunoglobulina G anti-*Giardia duodenalis* en suero mediante Elisa. Biomédica 2001;21:228-31.
 20. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
 21. **National Research Council.** Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.:Institute of Laboratory Animal Resources; 1996.
 22. **Cedeño D, Lugo L, Muñoz J, Maldonado J.** Guía para el uso de animales de experimentación. Santafe de Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 1994.
 23. **Lastra IJ, Nuñez R, Enciso A, Gallardo JL, Ramírez R.** Importancia de los recursos genéticos pecuarios en la producción animal. Revista Claridades Agropecuarias 2001;91:3-26.
 24. **Ntakarutimana V, Demedts P, Van Sande M, Scharpé S.** A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk. J Immunol Methods 1992;153:133-40.
 25. **Altschuh D, Hennache G, Van Regenmortel MH.** Determination of IgG and IgM levels in serum by rocket immunoelectrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens. J Immunol Methods 1984;69:1-7.
 26. **Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C.** Eggs: Conveniently packaged antibodies methods for purification of yolk IgG. J Immunol Methods 1981;46:63-8.
 27. **Akita EM, Nakai S.** Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. J Immunol Methods 1993;160:207-14.
 28. **Jensenius JC, Koch C.** Antibodies packaged in eggs. In: Johnstone AP, Turner MW, editors. Immunochimistry. 1. A practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1997. p.89-104.
 29. **Harlow E, Lane D.** Antibodies: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Publications; 1988.
 30. **Svendsen Bollen L, Crowley A, Stodulski G, Hau J.** Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. J Immunol Methods 1996;191:113-20.
 31. **Ouchterlony O.** Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progress Allergy 1958;5:1-78.
 32. **McKinney KL, Rimler RB.** Immunoelectrophoresis employing avian antisera for the detection and quantitation of *Pasteurella multocida* antigens. J Immunol Methods 1981;43:1-13.
 33. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
 34. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4.
 35. **Bade H, Stegemann H.** Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. J Immunol Methods 1984;72:421-6.
 36. **Song CS, Yu JH, Bai DH, Hester PY, Kim KH.** Antibodies to the α -subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. J Immunol 1985;135:3354-9.
 37. **Hassl A, Aspöck H.** Purification of egg yolk immunoglobulins. A two step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. J Immunol Methods 1988;110:225-8.
 38. **Gassman M, Thömmes P, Weiser T, Hubscher U.** Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. FASEB J 1990;4:2528-32.
 39. **Greene CR, Holt PS.** An improved chromatographic method for the separation of egg yolk IgG into subpopulation utilizing immobilized metal ion (Fe³⁺) affinity chromatography. J Immunol Methods 1997; 209:155-64.
 40. **Margni RA.** Inmunología e immunoquímica. 5a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1996.
 41. **Leslie GA, Clem LW.** Chicken immunoglobulins: biological half-lives and normal adult serum concentrations of IgM and IgY. Proc Soc Exp Biol Med 1970;134:195-8.
 42. **Schwarzkopf C, Staak C, Behn I, Erhard M.** Immunisation. In: Schade R, Behn I, Erhard M, Hlinak A, Staak C, editors. Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY-Technology. Berlin:Springer; 2001. p.25-64.
 43. **Ermeling B, Steffen E, Fish R, Hook R.** Evaluation of subcutaneous chambers as alternative to conventional methods of antibody production in chickens. Lab Anim Sci 1992;42:402-7.
 44. **Rangel LE, Perera G, Lassala A, Zarco LA.** Desarrollo de un método de radioinmunoanálisis para cortisol, utilizando anticuerpos obtenidos y purificados de la

- yema de huevo de gallinas inmunizadas. Vet Mex 1999;30:289-95.
45. **Shin NR, Choi IS, Kim JM, Hur W, Yoo HS.** Effective methods for the production of immunoglobulin Y using immunogens of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Vet Sci 2002;3:47-57.
 46. **Leenaars PP, Hendriksen CF, De Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fisher R et al.** The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendation of ECVAM workshop 35. Altern Lab Anim 1999;27:79-102.
 47. **Erhard M, Schade R.** Short introduction to hens' humoral immune system. In: Schade R, Behn I, Erhard M, Hlinak A, Staak C, editors. Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY-Technology. Berlin:Springer; 2001. p.1-8.
 48. **Volken RH, Leister F, Wee SB, Miskuff R, Vonderfecht S.** Antibodies to rotaviruses in chickens eggs: A potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. Pediatrics 1988; 81:291-5.
 49. **Bizhanov G, Vyshniauskis G.** A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. Vet Res Commun 2000; 24:103-13.
 50. **Wallmann J, Staak C, Luge E.** Einfache methode zur isolierung von immunoglobulin (Y) aus eiern immunisierter hühner "A simple method for the isolation of immunoglobulin (Y) from the eggs of immunized hens". J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 1990;37:317-20.
 51. **O'Farrelly C, Branton D, Wanke CA.** Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. Infect Immun 1992;60:2593-7.
 52. **Behn II, Hommel U, Oertel M, Hauschildt S.** Kinetics of IgY formation after immunisation of hens with different protein antigens. ALTEX 1996;13:18-21.
 53. **Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J, et al.** General applicability of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α . FASEB J 1999;13:81-8.
 54. **Pinto J.** Obtención de anticuerpos policlonaes en huevos de gallina dirigidos contra *Parvovirus* canino (tesis). Bogotá DC: Pontificia Universidad Javeriana; 2001.
 55. **Penttilä IM, Voutilainen E, Laitinen P, Juutilainen P.** Comparison of different analytical and precipitation methods for direct estimation of serum high-density lipoprotein cholesterol. Scand J Clin Lab Invest 1981; 41:353-60.
 56. **Culliford BJ.** Precipitin reactions in forensic problems. A new method for precipitin reactions on forensic blood, semen and saliva stains. Nature 1964;201:1092-4.