

RESEÑA ANALÍTICA

Anticuerpos de yema de huevo (IgY) como herramientas para el diagnóstico y la terapéutica

Esteban Justo Gutiérrez Calzado.

LABEX, Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Calle 23 y Carretera del Caney s/n, Apartado Postal 4032, CP 90400, Santiago de Cuba, Cuba.

Recibido: 23 de septiembre de 1999.

Aceptado: 4 de octubre de 1999.

Palabras clave: IgY, inmunoglobulina de yema de huevo, anticuerpos de pollo, anticuerpos de gallina.

Key words: IgY, egg yolk immunoglobulin, chicken antibodies, hen antibodies.

RESUMEN. Se revisa el estado actual del conocimiento sobre la IgY, inmunoglobulina monomérica presente en las especies de vertebrados no mamíferos (aves, reptiles, anfibios, y probablemente, todos los peces pulmonados) y equivalente a la IgG de mamíferos. Se presentan los antecedentes de estos estudios, las características generales de estas inmunoglobulinas que demuestran el porqué de su nomenclatura IgY al diferir en su fragmento Fc con el de los monómeros de IgG de los mamíferos, características que ubican a estas inmunoglobulinas como un ancestro evolutivo para las clases IgG e IgE. Se demuestra la importancia de las aves como modelo animal para la producción de anticuerpos a partir de la yema de sus huevos, así como se describen las estrategias de inmunización más adecuadas para lograr títulos de anticuerpos específicos muy elevados, tanto para antígenos solubles como particulados. De la misma forma, se detalla el desarrollo de las estrategias de purificación que se han utilizado para su aislamiento, comparándose los primeros métodos usados para estos fines ampliamente tediosos y costosos con los actuales tan simples como el que se basa en el empleo de diluciones acuosas que permite un gran ahorro de tiempo y recursos. Se hace referencia a los usos potenciales de estas inmunoglobulinas en campos como el inmunodiagnóstico, en especial, para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades del Sistema Nervioso Central y aquellos en los que aplican técnicas inmunológicas en las que intervienen sueros de mamíferos, la inmunoterapia para el tratamiento de enfermedades diarreicas agudas y la inmunoprophilaxis de caries dentales, así como en la Cromatografía de Inmunoadinidad para la purificación de proteínas, tanto de origen natural, como de sistemas de fermentación. Finalmente, se hace un análisis económico de reactivos inmunodiagnósticos de origen aviar con relación a similares de otro origen, evidenciándose su ubicación a precios competitivos en el mercado.

ABSTRACT. A review of the current state of knowledge on the IgY, monomeric immunoglobulin present in the species of non mammals vertebrates (birds, reptiles, amphibians, and probably all lung fishes) that is the equivalent to the IgG of mammals is presented. The antecedents of these studies, the general characteristics of these immunoglobulins and their location in evolution are presented. This immunoglobulin is located in the filogenic like an evolutionary ancestral for IgG and IgE from mammals because IgY combine the functions of both (humoral defense against systemic infections and at the same time mediate anaphylactic reactions. For its structure and genetic IgY is similar to both, the number of CH domains is like IgE and the aminoacids of the hinge region are similar to IgG. This paper shows the importance of birds as animal models for the production of egg yolk polyclonal antibodies as so as describe the best immunization strategies to achieve high titles of specific antibodies for soluble antigens as well as particulates. In the same way the development of purification strategies that have been used for its isolation is presented comparing the first tedious and expensive methods with the current so simple like the use of water dilutions saving time and resources. This work deals with potential uses of these immunoglobulins in fields of research like immunodiagnostic in specially for diagnostic of diseases from the Nervous System and immunological methods where it is necessary to apply mammals sera, immunotherapy for the control of diarrhoea and prevention of dental caries as well as Immunoaffinity Chromatography for the purification of natural and recombinant proteins. Finally an economic analysis of reagents from avian species and its competitiveness in market is made.

INTRODUCCION

Existen reportes desde 1883 que reconocen a las aves como modelos capaces de transferir anticuerpos a la yema, proporcionando inmunidad pasiva al huevo hasta el desarrollo del sistema inmune post-natal. Un principio análogo opera en los mamíferos, pues los anticuerpos son transferidos al embrión por vía sanguínea durante la vida fetal y por la lactancia materna en el período neonatal.¹

Los primeros estudios desarrollados sobre las proteínas solubles de la yema del huevo datan de 1908 y refieren que esta fracción resulta heterogénea y constitutiva de tres componentes fundamentales, los cuales fueron llamados alfa, beta y gamma livetinas siendo expuesta la existencia de una similitud inmunológica entre las globulinas séricas y las livetinas hasta los estudios realizados por J. Williams en la década de los sesenta en que se identifica la gamma livetina de las proteínas solubles de la yema del huevo como una gamma globulina sérica^{1,2} momento a partir del cual se comienza a explorar el empleo de la yema de huevo como fuente de obtención de anticuerpos policlonales en la práctica de laboratorio.^{3,4}

La producción de anticuerpos policlonales requiere utilizar biomodelos animales (curieles, conejos, ovejos, caballos). Este proceso está caracterizado por dos fases: la inmunización y el desangrado.^{5,7}

El empleo de las aves en la producción de anticuerpos policlonales (IgY), posee ventajas con respecto

al mismo proceso en mamíferos. Representa un refinamiento y una reducción de los animales de laboratorio.¹ El primero está dado por la eliminación del desangrado de los animales para la obtención de los anticuerpos a partir de la yema. Y la segunda, por las grandes cantidades de anticuerpos que se obtienen en las yemas de huevos que al compararse es aproximadamente 30 veces mayor que las que brinda un conejo si se tiene en cuenta que 1 g de yema contiene alrededor de 10 mg de IgY y que una gallina produce unos 250 huevos al año, lo que se traduce en 4 kg de yemas que rinden 40 g de IgY, mientras que un conejo que se sangra generalmente una vez produce unos 40 mL de suero con una concentración de 35 mg/mL de IgG representando 1,4 g de inmunoglobulinas.^{1,8} La distancia filogenética entre aves y mamíferos permite una respuesta potente contra antígenos conservados de la especie.^{1,8,9}

Es destacable otro grupo de ventajas de los anticuerpos de aves como, la discapacidad para la unión a receptores del complemento, proteínas A, G y la falta de interferencia con el factor reumatoideo y la IgG de mamíferos.^{1,8,9}

Teniendo como premisa lo expuesto, colectivos de investigadores han dirigido sus esfuerzos a la obtención de anticuerpos policlonales en aves, fundamentalmente, contra antígenos solubles muy conservados, antígenos microbianos, linfocinas y anticuerpos de tipo terapéuticos contra enfermedades diarreicas agudas y caries dentales.^{7,11}

En América Latina, se ubican tres grupos que trabajan en la temática, uno de ellos, en el inmunodiagnóstico e inmunoterapia de enfermedades parasitarias autóctonas de México (triquinosis), otro en el mejoramiento de sistemas de purificación de IgY específicas a partir de yema con diversos inmunógenos,^{12,15} y el otro, en la producción de extractos de IgY para la serotipificación de bacterias enteropatógenas humanas, tema abordado por especialistas de países de Europa y Asia también.^{7,9}

En Cuba, los primeros trabajos sobre obtención y producción de IgY específicas contra antígenos solubles se realizaron en 1995,¹⁴ así como sobre sistemas de purificación y caracterización de la molécula y a partir de ellos, para la obtención de sistemas de control para la purificación de alérgenos.¹⁵

Estos antecedentes han motivado la realización de una exhaustiva recopilación e interpretación de conocimientos sobre el estado de desarrollo de la producción de anticuerpos policlonales en aves en el mundo con los objetivos siguientes:

- Dejar bien sentada la trascendencia desde el punto de vista científico por las múltiples ventajas que ofrece.
- Argumentar la necesidad de la generación de Sistemas de Inmunodiagnóstico, así como terapéuticos para humanos empleando anticuerpos policlonales (IgY) obtenidos en aves por las ventajas económicas que estos reportan.
- Evaluar y obtener estos reactivos para otros fines tales como su empleo en los Sistemas de Control de la Calidad de otras producciones biotecnológicas de importancia, así como su aprovechamiento en tecnologías afines como la Inmunofluorescencia para la purificación de sustancias de gran valor.

Características generales de la IgY

Las aves poseen tres tipos de inmunoglobulinas en el suero. Una, de elevado peso molecular tipo IgM y dos, con coeficientes de sedimentación 8S y 7S (una tipo IgA y otra tipo IgG, que es la más abundante en el suero).²

La yema del huevo está compuesta esencialmente de gránulos (lipoproteínas y fosvitina) dispersos en una fracción soluble (livetinas y lipoproteínas de baja densidad) y es en ésta donde se encuentran las proteínas con actividad de anticuerpos (inmunoglobulinas).¹⁶⁻¹⁹

Al caracterizar los sobrenadantes de yemas de huevos ricos en proteínas solubles,^{17,20} se puede observar un patrón electroforético en geles de poliacrilamida que se corresponde con:

Ovoalbúmina	(44,5 kDa).
Beta-livetina	(48 kDa).
Alfa-livetina	(80 kDa).
IgY (gamma-livetina)	(180 kDa).

En 1969, Gerrie Leslie y Bill Clem propusieron que la inmunoglobulina predominante en el suero de pollo debía ser llamada IgY más que IgG.²¹ Su razonamiento estaba dado en el conocimiento de que sus cadenas pesadas (H) eran más largas y antigénicamente distintas a las de los mamíferos. Inicialmente, no hubo entusiasmo hacia la adopción de esta nomencla-

tura. Primero, porque la molécula de IgY presente en el pollo se percibía como la homóloga funcional de la IgG y esta nomenclatura ya estaba bien sentada. Segundo, en este momento no había otra evidencia de la naturaleza de las diferencias entre las cadenas pesadas de la IgG y la IgY. Una cadena pesada más larga en la IgY de pollo favorecía esta hipótesis y se ofreció como modelo la IgG3 humana que posee una bisagra más extendida.^{19,21} Tercero, aún no existía conocimiento de la amplia distribución de la IgY entre los vertebrados no mamíferos. Sin embargo, ahora se sabe que la IgY es el anticuerpo sérico típico de bajo peso molecular (no IgM) de aves, reptiles, anfibios y probablemente de todos los peces pulmonados,^{20,21} mientras que la IgG, sólo se encuentra en los mamíferos. Se denominó IgY por la palabra inglesa "Yolk" que significa yema, aunque por su similitud con la IgG humana se denominaba IgG de aves, por lo que se define IgY como la inmunoglobulina capaz de transferirse de forma transovárica a la yema del huevo donde se encuentra el embrión.¹⁶⁻¹⁷

Pese a la denominación coincidente de la inmunoglobulina sérica de bajo peso molecular de las aves IgG aviar, por estudios moleculares se ha podido demostrar que el término es inapropiado, pues existen diferencias estructurales entre la IgG y la IgY.^{7, 21-23}

La IgG de mamíferos posee la estructura monomérica típica con dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) con un peso molecular aproximado de 150 kDa, las pesadas con un peso de 50 kDa y las ligeras de 25 kDa, las cadenas H poseen cuatro dominios estructurales: uno en la región variable V_H y tres en la región constante (C_H-1, C_H-2, C_H-3). El dominio C_H-1 está separado del C_H-2 por la región bisagra que le confiere la flexibilidad al fragmento Fab.^{22,23}

En contraste con esta estructura, la inmunoglobulina Y tiene dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que es la configuración típica H₂L₂ de todas las inmunoglobulinas de bajo peso molecular, aproximadamente 180 kDa. Las cadenas pesadas C_H (65 kDa) poseen típicamente un dominio de región variable y cuatro dominios de regiones constantes.²³

En las aves anseriformes (patos y gansos), algunos reptiles (particularmente las tortugas) y peces pulmonados, se encuentra un fragmento truncado de IgY de un peso mole-

cular aproximado de 120 kDa.²¹⁻²⁴ Tanto las formas truncadas como completas de IgY pueden coexistir en un individuo (como es el caso de algunas tortugas y aves anseriformes), o puede producirse exclusivamente una forma como en el caso de los pollos que producen solamente la forma completa y algunas tortugas que sólo producen la forma truncada. Esta forma de IgY pierde los dos dominios C terminal (Cε-3, Cε-4) de las cadenas pesadas. Luego, esta molécula es el equivalente estructural de un fragmento F(ab')₂, por lo que se sugiere la terminología de IgY(δ Fc) para la molécula intacta y Cε (δ Fc) para su cadena pesada.²¹⁻²⁴

Las comparaciones de secuencia de la región C en la IgG y la IgY muestran que los dominios Cy-2 y Cy-3 de la IgG están relacionados más estrechamente con los dominios Cy-3 y Cy-4 de la IgY respectivamente, y que el equivalente del dominio Cy-2 está ausente. Este dominio fue condensado probablemente para formar la región bisagra de la IgG.²¹⁻²⁴

La bisagra es una característica singular de la estructura de la inmunoglobulina de mamíferos: tanto la IgY como la IgA aviares poseen cuatro dominios de regiones C de cadenas pesadas y no tienen genes codificadores de bisagra.^{21, 23, 24}

En la IgY hay regiones cercanas a los límites de los dominios Cy-1- Cy-2 y Cy-2- Cy-3 que contienen residuos de prolina y glicina. Estas regiones tienen la potencialidad de conferir una flexibilidad limitada sobre la molécula de una manera análoga a las regiones de cambio descritas en algunas inmunoglobulinas de mamíferos.²¹⁻²³

Desde el punto de vista fisicoquímico, existen divergencias en propiedades de la molécula como resistencia al calor y a los cambios de pH. Se ofrecen consideraciones de su relativa resistencia a elevada temperatura y pH muy bajo,^{1,24} sin embargo, otras referencias plantean similitud en resistencia entre la IgY e IgG de conejo a pH elevados, así como a la digestión enzimática con tripsina y quimiotripsina y la relativa mayor resistencia de la IgG a la digestión enzimática con pepsina a pH = 4 y a temperaturas mayores de 60 grados, todo esto justificado en las diferencias estructurales de ambas moléculas.²⁷

Se han constatado diferencias en cuanto a punto isoeléctrico de la IgY, el cual resulta inferior al de la

IgG de conejo.^{27, 28} La composición en aminoácidos de la IgY en yema no difiere de la del suero de las aves, lo que sugiere que ésta al ser transferida hacia la yema no experimenta modificaciones sustanciales.²⁷⁻²⁹

La IgY posee dos sitios de unión antigénica, por lo que debe precipitar o aglutinar antígenos multivalentes. Esto no siempre ocurre. La mayoría de los anticuerpos de aves (IgY) se unen fuertemente al antígeno, pero muestran propiedades precipitantes sólo a concentraciones salinas elevadas (diez veces superior a la concentración fisiológica, o sea, es óptima a 1.5 mol/L aproximadamente).²²⁻²⁵

La conformación es una posible causa de los problemas de la precipitación de la IgY, los dos brazos Fab podrían estar tan estrechamente alineados como para obstaculizar por impedimentos estéricos, el entrecruzamiento de epítopes sobre dos antígenos grandes. El efecto de las condiciones que permiten la precipitación (condiciones salinas o pH bajos) sería la liberación de los brazos Fab, posibilitando la independencia funcional de los sitios de unión.²²⁻²⁵

El papel de la región Fc en la polimerización de los complejos IgY-antígeno inducida por sal, permanece sin aclarar. La mayoría de los fragmentos F(ab')₂ de IgY parecen contener el dominio Cε-2, el cual podría conferir alguna capacidad de agregación.²³

La IgY como ancestro evolutivo de los anticuerpos de mamíferos

Al igual que la IgM está distribuida ampliamente en el *Phylum vertebrata*, existen evidencias de que la IgY es el anticuerpo sérico típico de bajo peso molecular (No IgM) de vertebrados no mamíferos mientras que la IgG sólo se encuentra en los mamíferos.^{23, 30-33}

Además, las técnicas de clonaje molecular han suministrado recientemente clara evidencia de que la IgY no es solamente el ancestro evolutivo de la IgG, sino también, de la IgE, otra molécula exclusiva de los mamíferos.^{23, 30-34}

Las evidencias en este sentido, dirigen la atención hacia tres aspectos:

- a) la función de los anticuerpos.
- b) la estructura de la cadena pesada H.
- c) la estructura y expresión de los genes de cadena H.

En términos de actividad, este anticuerpo parece combinar las fun-

ciones de IgG e IgE. Semejante a la primera, es la principal línea de defensa humoral contra infecciones sistémicas y además, el principal en el suero. Al igual que la IgE es capaz de mediar reacciones anafiláticas.^{23, 30-34}

Desde el punto de vista estructural y genético, la IgY presenta similitudes con ambas moléculas, pues el número de dominios CH es igual al de la IgE y los aminoácidos de la región bisagra coinciden con los de la IgG.²³

Estas evidencias apuntan hacia la teoría de que la IgY por duplicación génica pudo convertirse evolutivamente en IgG e IgE. La existencia de condiciones específicas ocasionadas por mala adaptación en algunas de las funciones de este anticuerpo, lo llevaron a la aparición de la IgG como anticuerpo preferido en el suero de los mamíferos.^{22, 25, 26, 30-34}

No obstante, es difícil la generalización de las funciones de esta molécula, pues aparece en muchas especies; desde los vertebrados inferiores (anfibios y poiquilotermos) hasta las aves más avanzadas, siendo una inmunoglobulina fundamental como mecanismo de defensa y desempeña un papel crucial en la transferencia de inmunidad pasiva de forma materna. La mayoría de las especies que poseen IgY son ovíparas.^{23, 25, 26, 30-34}

Modelo animal para obtención de IgY en la yema de huevo

Es un conocimiento bien sistematizado que las aves poseen un Sistema Inmune organizado de modo diferente al de los mamíferos. Las diferencias principales están relacionadas con la falta de organización linfóide secundaria en nódulos y la presencia de un órgano especializado denominado **Bolsa de Fabricio** que posee entre 8 000-12 000 folículos. Esta bolsa se desarrolla desde la vida prenatal haciendo una meseta en el período comprendido entre 2 y 4 semanas e involuciona durante la madurez sexual (4 a 6 meses de edad).³¹⁻³²

Desde el punto de vista funcional, cumple con la expansión de la población de células B y la producción de un repertorio diversificado de inmunoglobulinas.

La diversificación del repertorio de reconocimiento en las aves, se efectúa a través de un mecanismo denominado conversión génica que se fundamenta en la existencia de un solo gen V y otro J funcionales, tanto para los loci de las cadenas pe-

sadas como las ligeras, modificados por un intercambio intracromosómico usando pseudogenes no funcionales como elementos donantes.³¹⁻³⁵ Se estima que este mecanismo ocurre durante el período de maduración en la **Bolsa de Fabricio** y que estos eventos se producen de cada 10 a 15 ciclos celulares. El único gen V funcional puede recibir entre 4 y 10 conversiones génicas sucesivas antes de migrar la célula con el receptor reordenado a la periferia. Teóricamente, este mecanismo es capaz de conferir un repertorio real de al menos 10¹¹ moléculas diferentes.³⁴⁻³⁶ Como reflexión principal de estas referencias, se observa que las aves son capaces de un sistema inmune humoral efectivo con un reducido número de precursores y el papel central en este proceso lo posee la permanencia en el período apropiado en la **Bolsa de Fabricio**. Sin embargo, este repertorio a pesar de ser aparentemente diverso pudiera tener límites de tolerancia a bajas y elevadas dosis con un intervalo muy estrecho, lo que obligaría al empleo de inmunógenos muy purificados y con una concentración intermedia.³³⁻³⁷

Para la obtención de los anticuerpos en yema, valorando las características fisiológicas de las aves, se prefiere el empleo de **Gallinas ponedoras Leghorns**, de 25 a 50 semanas de edad, aunque se han reportado buenos resultados con animales de 22 semanas.^{18,38-40}

Otro de los aspectos a resaltar es la calidad genética del biomodelo a pesar de la obtención de resultados satisfactorios en la producción de anticuerpos específicos en yema de huevo de aves destinadas a la producción comercial; se prefiere el empleo de gallinas consanguíneas, pues entre las que no lo son, existe entre un 10 y 15 % que no responden a ciertos antígenos. Por su parte, las consanguíneas exponen baja respuesta a: albúmina sérica, péptidos sintéticos y bacterias; no obstante, se han obtenido buenos resultados con estos inmunógenos en las líneas **B14, B17, B21 (consanguíneas)**.^{7,38-43}

En el aspecto de la calidad higiénico-sanitaria, se prefiere la utilización de animales de categoría convencional, reservando las aves libres de patógenos específicos para los anticuerpos de uso terapéutico, debido al costo elevado de estos biomodelos y a que en ocasiones existen enfermedades virales que provocan una inmunosupresión transitoria en ellas.^{7,38-43}

La proporción de anticuerpos en suero y yema debe ser semejante, aunque no siempre se reporta de esta manera por los diferentes grupos, pues está en relación con el método de purificación y recuperación empleado y la dinámica de paso de la molécula según el inmunógeno empleado.³⁸⁻⁴⁴

Estrategias de inmunización

Existen múltiples protocolos disponibles sobre procedimientos de inmunización en aves, pero la comparación entre los resultados es difícil por las diferencias de antígenos, esquemas, dosis y adyuvantes.

El tipo y la calidad del adyuvante es un aspecto crítico en la determinación de la respuesta inmune, la cual de forma ideal aspira a producir elevados títulos de IgY en suero y yema.

El adyuvante completo de Freund (FCA), pese a ser uno de los más usados experimentalmente, se reporta como productor de inflamación granulomatosa en el sitio de la inyección y retardo en la puesta.⁷ Por estas razones, muchos autores prefieren iniciar las inmunizaciones con adyuvante incompleto de Freund (FIA), el cual produce una respuesta efectiva reportada cuando se usa en la primera inmunización. Este efecto del FCA puede minimizarse con la aplicación de la inyección en varios sitios, al menos cinco sitios.^{7,42} Se reportan otros adyuvantes alternativos como Specol, PAM3-Cys-Ser-Lys⁴³⁻⁴⁴ con buenas respuestas ante antígenos particulados y solubles y bajas respuestas con el hidróxido de aluminio y las saponinas en las aves.⁷

Es difícil la discriminación de la dosis idónea, no obstante, existe un consenso en el empleo de dosis entre 10 mg y 1 mg; siendo preferidas las que se encuentran en el intervalo de 10 a 100 mg/mL en el caso de antígenos solubles. Cuando se emplean antígenos particulados (células de bacterias muertas en formalina), debe ajustarse la concentración a 1 · 10⁸ unidades formadoras de colonias por mililitro. Se recomienda la inmunización en al menos dos sitios con volúmenes de 0,5 a 1 mL, pues el volumen total afecta la reacción tisular local.^{7,18,24,28,45,46} Por razones prácticas y económicas, se prefiere el empleo de la vía intramuscular en la pechuga del animal, práctica que se exige fundamentalmente, en animales jóvenes. La vía subcutánea es preferida en animales adultos, pues es di-

fícil su utilización en los jóvenes. Se reporta el empleo además de las vías endovenosa e intraperitoneal, pero con resultados menos evidentes.^{18,24,28,39,46,47} La frecuencia y número de inmunizaciones depende del antígeno, dosis y del tipo de adyuvante. Se recomienda el empleo de al menos dos inmunizaciones y si los títulos decrecen durante la puesta, entonces se deben aplicar dosis de refuerzo durante el transcurso de ésta.⁷

La inmunización primaria y los refuerzos deben ser dados antes de la puesta de huevos con un intervalo de al menos 6 semanas para adyuvantes oleosos y cuatro para lipopéptidos.⁷

Estrategias de purificación

Desde la década de los sesenta, se comenzaron a realizar los primeros intentos de separación de las proteínas y livetinas de la yema de los huevos de gallina puesto que estas livetinas se habían reconocido como una fuente abundante de anticuerpos.^{2,3,29,48,49}

Los primeros métodos publicados incluían extracción con disolventes orgánicos y ultracentrifugación.³

Posteriormente, se desarrollaron métodos de purificación de la IgY más eficientes y convenientes. Los más prometedores consistían en la precipitación de las lipoproteínas con polietilenglicol,^{2,4,50,51,52} sulfato de dextrana³ y gomas naturales como el alginato de sodio, carragenano y xanthano.^{53,54}

Recientemente, se han desarrollado nuevos métodos que emplean simples diluciones en agua destilada del contenido de la yema bajo condiciones ligeramente ácidas,^{28,39} junto a posteriores pasos de purificación que envuelven precipitaciones salinas, alcohólicas o con polietilenglicol y ultrafiltraciones, seguidas de diversos tipos de cromatografía, con rendimientos de IgY que oscilan entre 4 y 9 mg/mL de inmunoglobulinas específicas con pureza del 89 al 94 %.^{1,7,28,39}

Por las grandes ventajas que ofrecen las yemas de huevos como fuente de anticuerpos sobre otras fuentes convencionales, se han desarrollado tecnologías para la producción a gran escala de estas inmunoglobulinas.²⁸ Estos métodos consisten en procedimientos de tres etapas que permiten el procesamiento simultáneo del contenido de decenas de yemas de huevos de una manera simple, económica y fácil-

mente automatizada en la que se puede lograr una pureza intermedia y elevada de las inmunoglobulinas (60 % y mayores del 95 %). Además, se han empleado esquemas con sulfato de amonio (entre 25 y 40 %) con buenos rendimientos y elevado grado de pureza.^{56,57}

Pese a la falta de afinidad de la molécula a sistemas de purificación con proteínas A y G^{14,6,11} se reporta en 1995 una proteína G con elevada afinidad para la IgY en el ámbito experimental.^{12,58}

Prestigiosas casas comerciales como Promega Co. (Minneapolis USA), Pharmacia-Biotech (Upsala-Sweden) han desarrollado paquetes preparativos basados en sistemas de precipitaciones selectivas sucesivas para obtener la IgY con un determinado grado de pureza y un considerable ahorro de tiempo.^{59,61}

No obstante las evidencias presentadas, debe realizarse un análisis más exhaustivo de los métodos de extracción de la IgY de la yema. Asimismo, los métodos de determinación de actividad biológica deben ser normalizados, pues existe tendencia a la evaluación de recuperación y concentración en yema por varios métodos con sensibilidades diferentes acorde a su límite de detección; inmunodifusión radial simple IDRS,¹¹ empleo de anticuerpos monoclonales anti-IgY⁶² y cromatografía por HPLC.⁶³

Empleos potenciales de los anticuerpos (IgY) específicos obtenidos en yema de huevos

Los anticuerpos policlonales (IgY) específicos obtenidos de yemas de huevo de gallinas inmunizadas pudieran ser utilizados en:

- a) Inmunoterapia pasiva.
- b) Sistemas de inmunopurificación de uso industrial.
- c) Sistemas inmunoanalíticos.

Como se conoce, las inmunoglobulinas de la yema son resistentes a medios ácidos y al calor y como el daño de sus moléculas respectivas durante las digestiones tripticas y quimiotripticas es moderado, se evidencia una retención de la actividad en mucosas para prevenir infecciones patógenas en el intestino cuando alcanza esa porción del tracto digestivo,²⁷ además, los reportes sugieren que el intestino del neonato es permeable a algunas moléculas como las proteínas y teniendo en cuenta que el pH estomacal de los infantes sobre los 5 meses de edad permanece entre 4 y 5, aún dos o tres horas después de in-

gerida la leche, no se aprecia una inactivación de la IgY en el estómago de éstos, por lo que de hecho, pudiera emplearse en la fortificación de fórmulas infantiles para prevenir infecciones gastrointestinales en sujetos con alteraciones transitorias o permanentes de segmentos de la respuesta inmune: recién nacidos, niños con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas.^{27,64,68} Estas fórmulas fortificadas podrían ser utilizadas también en adultos que hayan contraído inmunodeficiencias por quimioterapia, malnutrición, o por el propio envejecimiento, aunque en este caso, sería necesario encapsular la IgY para protegerla de la digestión estomacal.^{37,64} Todo esto se justifica por las bases de la inmunización oral que se atribuye a la interferencia de las inmunoglobulinas con la adherencia bacteriana y la neutralización de toxinas producidas por los patógenos. El efecto protector debiera conferirse tanto a la molécula de IgY completa o a los fragmentos de unión al antígeno, puesto que ambos son capaces de potenciar las funciones. En efecto, esto fue demostrado en trabajos con fragmentos Fab de anti-CFA/I (antígeno factor de colonización) los cuales reducen la colonización, así como las manifestaciones diarreicas de forma similar a la fracción inmunoglobulínica completa del suero.^{26,67,68}

Las inmunoglobulinas de la yema del huevo pueden ser utilizadas como una fuente más económica de anticuerpos específicos, aunque al poseer diferencias estructurales con la IgG de mamíferos podrían elevar el problema de la alergenicidad al ser administrada a humanos, especialmente a niños.^{28,39} Por consiguiente, sería importante encontrar formas para reducir esta alergenicidad, aunque incluso sea pequeño el número de personas alérgicas a las proteínas del huevo y como el fragmento Fc es la porción más antigénica de la molécula de inmunoglobulina aviar, la escisión de este fragmento sería beneficioso, pues reduciría el número de sitios alérgicos posibles sobre la molécula de IgY sin afectar adversamente su función.⁶⁹ De esta manera, se han desarrollado métodos eficientes para la preparación y purificación de los fragmentos Fab' de inmunoglobulina Y simples y rápidos y de fácil escalado, a los que se les ha comprobado su reacción de identidad en ensayos de inmunodifusión y actividades de unión a

antígenos mediante métodos de ELISA.^{28,68}

Otros empleos que podrían citarse, sería el tratamiento de las enfermedades entéricas en otros animales como es la colibacilosis entérica en cerdos neonatos,^{39,70} y enfermedades de peces de importancia económica,^{39,71} especialmente, bajo condiciones que limiten la utilización de antibióticos y otras drogas.

Una aplicación terapéutica potencial es la posible protección de caries dentales partiendo de los resultados obtenidos inicialmente en ratas¹⁰ y posteriormente, en voluntarios sanos en los que se demuestra el poder protector de la IgY contra el *Streptococcus mutans*.⁹

En lo que respecta a la cromatografía de inmunoafinidad, la IgY se está utilizando para separar componentes bioactivos de fuentes naturales o de sistemas de fermentación. Se han obtenido anticuerpos policlonales en yema de huevo que reaccionan con la albúmina sérica bovina (BSA) y han sido acoplados covalentemente a perlas de quitosano construyendo matrices de inmunoafinidad que posteriormente se han utilizado para remover la albúmina tanto de leche fresca como en polvo con vistas a la obtención de este producto libre de este componente cuyo consumo se ha asociado a la incidencia de diabetes juvenil.¹⁰

Se conoce del empleo de estos anticuerpos en la inmunoterapia pasiva de determinados tipos de neoplasias gástricas, lo que avala la posibilidad de la exploración terapéutica de las mucosas con estas moléculas.⁷¹

Con respecto a la utilización de estos anticuerpos para el seguimiento del estado de la respuesta inmune (segmentos humorales y celulares) existen expectativas avaladas por una interferencia mínima en el método analítico empleado,^{1,5,6,27} fenómeno que responde a la falta de afinidad por receptores Fc y del complemento, lo cual evidencia, además, muy escasos elementos de reactividad cruzada con la IgG de mamíferos.^{1,7,72-75}

Estos anticuerpos pueden ser usados en sistemas de inmunodetección con sueros de mamíferos con una interferencia mínima. Existen reportes de su empleo universal en la inmunoquímica desde métodos de primera generación como inmunoprecipitación y hemaglutinación, hasta los sistemas de radioinmunoanálisis (RIA), inmunoenzimáticos (ELISA) e inmuno-

transferencia (Western-blot),^{1,2,7,28,72-75} por la capacidad que poseen estas moléculas de estar glicosiladas, lo que permite su conjugación con fosfatasa alcalina y biotina⁷⁴ y la detección de proteínas valiosas muy conservadas como: activina A,⁷⁶ TGF- β ,⁷⁷ HSP-70,⁷⁸ antígenos bacterianos, cathepsina D,⁷⁹ entre otros. Se conoce también el empleo de sistemas de detección de contaminantes de proteína A y G en la validación de procesos de purificación industrial con el uso de estas moléculas.³⁰⁻³²

Existen pocos reportes sobre el empleo del sobrenadante de yemas delipado en técnicas de precipitación y aglutinación.⁸ Según la clasificación de los productores de anticuerpos para inmunodiagnóstico, estos reactivos pueden constituir lo que se denomina un **grado económico**, cuyo destino de empleo podrían ser las técnicas de primera generación antes mencionadas, ya que poseen condiciones de control menos estrictas, pues no necesitan una gran purificación ni concentraciones muy definidas de las proteínas que posee.³³

Entorno económico

En la pasada década, sólo la Sigma Co. Ltd. de los Estados Unidos suministraba escasos reactivos relacionados con la IgY utilizables para el estudio de estas inmunoglobulinas como los antisueros IgG anti-IgY para su uso en inmunodifusiones radiales, e IgG (anti-IgY) obtenidas en suero de conejo conjugada a fosfatasa alcalina.³⁴

Hoy, se observa un incremento de productos relacionados con esa fuente en el mercado de firmas de prestigio internacional como la Corporación Promega (USA), Spectral Diagnostic (Canadá), Willmar Poultry Co. (USA), Stolle Research and Development Co. (USA), NKK Co. (Japón), OEM Concepts Inc. (USA) y Charles River Ltd. (USA).

En la actualidad, existe un grupo considerable de productos en el mercado, que avalan su utilización, entre los que pueden citarse los sistemas de purificación de IgY, IgY como inmunoglobulina control, conjugados anti-IgY-fosfatasa alcalina, peroxidasa, anti-IgY inmovilizada, IgY anti-II-2R cg, anti-MCAF, además de un número de policlonales contra neurotrofinas y factores neurotróficos murinos y humanos.⁵⁸⁻⁵⁹

En el momento actual, la producción de anticuerpos policlonales en

aves es el 2 % del total registrado, lo que evidencia la no familiarización de los productores de estos reactivos con el biomodelo y las ventajas que ofrece.³³⁻³⁵ No obstante, existen desventajas asociadas al empleo de los anticuerpos IgY tales como la falta de afinidad a proteína A y G disponibles comercialmente, la no normalización de métodos de aislamiento y purificación de anticuerpos a partir de la yema comparable en cuanto a rendimiento y pureza, escalables desde el punto de vista productivo con un bajo costo y la relativa baja precipitación de estos anticuerpos que limita su uso en sistemas de diagnóstico automatizados.⁷

CONCLUSIONES

Es obvio que la tecnología de producción de anticuerpos policlonales a partir de yemas de huevo de aves de corral inmunizadas, constituye una revolución en este campo, siendo estratégica la sustitución escalonada por ellos de muchos reactivos que hoy se producen a partir de mamíferos gracias a la elevada especificidad que ofrecen, especialmente, en sistemas de detección en que intervengan sueros de mamíferos, así como para la determinación de proteínas muy conservadas de importante valor en el diagnóstico y seguimiento de diversas patologías humanas, específicamente relacionadas con el Sistema Nervioso Central.

Los anticuerpos de yema de huevo pueden constituir sustitutos novedosos en las tecnologías de producción de sueros antiglobulínicos humanos obtenidos de mamíferos que aunque tienen bien sentadas bases resultan tediosos y costosos. En la terapéutica constituyen herramientas de gran ayuda específicamente para el tratamiento de enfermedades microbianas y parasitarias del tracto digestivo. Estos anticuerpos por su modo de obtención, constituyen una alternativa para la producción de anticuerpos policlonales que armonizan con las regulaciones internacionales de cuidado y empleo de los animales de laboratorio, además por su forma de obtención en la actualidad constituyen reactivos muy nobles que pueden ser utilizados sin riesgo alguno para los receptores al igual que los subproductos que se obtienen en las diversas etapas de producción. Todas estas cualidades los hacen competitivamente muy superiores, si se tiene en cuenta además, que su fuente de

obtención es muy asequible y sus costos de producción muy baratos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos M. Gutiérrez Calzad, Director General del Centro Nacional de Investigaciones Científicas y a las compañeras María Magdalena Rodríguez, cariñosamente Mariita, y Sureya Ortiz Esteriz, quienes brindaron todo su apoyo, incluyendo la computadora de su oficina para la escritura original y los diversos arreglos necesarios a este texto.

Al Lic. Esteban Pérez Fernández, Director de Redacción de la Editorial CENIC, quien con gran rigor profesional hizo notables sugerencias para la corrección de este artículo.

A todos los colaboradores del Proyecto IgYen LABEX, Santiago de Cuba, en especial, al Dr. Ernesto Luna, Lic. Eduardo Cruz y al Dr. Tomás Samón, sin cuyas disquisiciones no se hubiera enriquecido este análisis.

BIBLIOGRAFIA

- Shade R., Pfister C., Halastch R. and Henklein P. Polyclonal IgY Antibodies from Chicken Egg Yolk An alternative to the production of Mammalian IgG type antibodies in rabbit. *Atla*, 19, 403, 1991.
- Jensenius J.C., Andersen I., Hau J., Crove M. and Koch C. Eggs: Conveniently package antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, 46, 115, 1981.
- Polson A., Von Wechmar M.B. and Van Regermortel M.H.V. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Communications*, 9, 475, 1980.
- Polson A., Coetzer T., Kruger J., Von Maltzahn E. and Van der Merwa K. J. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of egg laid by immunized hens. *Imm. Invest.*, 14, 323, 1985.
- Larsson A., Balow R.M., Lindhal T.L. and Forshberg P.O. Chicken Antibodies: Tasking advantage of Evolution. A Review. *Poultry Sci.*, 72, 1807, 1993.
- Larsson A. and Sjoquist J. Chicken IgY. Utilizing the evolutionary difference. *Comparative-Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 199, 1990.
- Shade R., Staak C., Hendricksen C., et al. The production of Avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *Atla*, 24, 925, 1997.
- Terzolo H.R., Sandoval V.E., Caffer M.I., Terragno R., Alcain A. Agglutination of hen egg yolk immunoglobulins (IgY) against *Salmonella enterica*, serovar enteritidis. *Rev. Argent Microbiol.*, 30, 84, 1998.

9. Hatta H. Passive immunization against dental plaque formation in humans: Effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 31, 268, 1997.
10. Lasso J.N. and Nakai S. International Food Technology Annual Meeting. Alberta, Canada, April, 1995.
11. Otake S., Nishihara Y., Makimura M., Hatta H., Kim M., Yamamoto T. and Hirasawa M. Protections of rats against dental caries by passive immunization with hen egg yolk antibodies (IgY). *J. Dent. Res.*, 70, 162, 1991.
12. Reyes V.H. y López M.F. Un método simple de obtener anticuerpos policlonales: Elaboración de anticuerpos de gallina. *B.E.B.*, 15, 270, 1996.
13. Reveles H.R., Saldívar S., Muñoz E. J., Moreno M.A. Purificación de anti-IgG de *T. spiralis*. *Avances en Biotecnología Moderna*, 4, 19, 1997.
14. Gutiérrez E. Anticuerpos en yema de huevo de gallina. Usos potenciales. III Congreso Nacional, V Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba, 201, 1997.
15. Diéguez R. Producción de Anticuerpos policlonales en gallinas. Purificación de IgY. *Avances en Biotecnología Moderna*, 4, 47, 1997.
16. Burley R.W. and Vadehra D.V. The Avian Egg. Chemistry and Biology. John Wiley and Sons, New York, 8, 7, 1989.
17. McCully K.A. and Mok C.C. Common R.H. Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hens egg yolk. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 40, 937, 1962.
18. Haak F.M. EGGstract™. Why IgY Chicken Polyclonal Antibody, an appealing alternative? *Promega Notes*, 5, 48, 1994.
19. Williams J. Serum proteins and the livetins of hens egg yolk. *Biochem. J.*, 83, 348, 1962.
20. Rose M.E., Orians E. and Buttress S. Immunoglobulin classes in the hens egg: Their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.*, 4, 521, 1974.
21. Leslie G.A. and Clem L.W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III Immunoglobulin of the chicken. *J. Exp. Med.*, 130, 1337, 1969.
22. Janson A.K., Smith C.I. and Hammarstrom L. Biological properties of yolk immunoglobulins. *Adv-Exp. Med. Biol.*, 371A, 885, 1995.
23. Gregory W.W., Katharine E.M., Higgins D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 16, 392, 1995.
24. Shimizu M., Fitzsimmons R.C. and Nakai S. Anti *E. Coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Science*, 53, 1360, 1988.
25. Bando Y. and Higgins D.A. Duck lymphoid organs: their contribution to the ontogeny of IgM and IgY. *Immunology*, 89, 8, 1996.
26. Parham P. Antibody structure. The duck's dilemma (news). *Nature*, 2, 6517, 1995.
27. Shimizu M.H. Molecular stability of chicken and rabbit IgG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56, 270, 1992.
28. Fichtali J., Charter E.A. and Nakai S. Purification of Antibodies from Industrially separated egg yolk. *Journal of Food Science*, 58, 6, 1993.
29. Otani H., Matsumoto K., Saeki A. and Hosono A. Comparative studies on properties on hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lebensm. Wissu. Technol.*, 24, 52, 1991.
30. Musmann R., Wilson M., Marcuz A., Courted M. and Du Pasquier L. Membrane exon sequences of three Xenopus Ig classes explain the evolutionary origin of mammalian isotypes. *Eur. J. Immunol.*, 8, 688, 1998.
31. Vainio O. and Imhof B.A. The Immunology and Developmental Biology of the chicken. *Immunology Today*, 16, 385, 1995.
32. Masteller L.E. Avian B cell Development. *Int. Rev. Immunol.*, 15, 185, 1997.
33. Arakawa H., Furosawa S., Ekino S. and Yamagashi H. Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal center. *Embo. J.*, 15, 2540, 1996.
34. Aveskogh M., Hellman L. Evidence for an early appearance of modern post switch isotypes in mammalian evolution: cloning of IgE, IgG e IgA from the marsupial *Monodelphis domestica*. *Eur. J. Immunol.*, 28, 2738, 1998.
35. Janeway C.A., Travers J. Immunobiology. The Immune System in Human Health and Disease. Second Edition. Oxford: Current Biology Ltd., 328-330, 1996.
36. Paul W.E. Fundamental Immunology 3rd Edition. New York, Raven Press, 95-101, 1993.
37. Thompson C.B. Creation of Immunoglobulin diversity by intrachromosomal gene conversion. *Trend. Genets.*, 8, 416, 1992.
38. Masteller E.L. Expression of syalyl Lewis X and Lewis X define distinct stages of chicken B cell maturation. *J. Immunol.*, 155, 5550, 1995.
39. Akita E.M. and Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid hens immunized with enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods*, 160, 207, 1993.
40. Anon Council Directive 24 November 1986 on the approximation of laws, regulation and administrative provision of the Member States regarding the protection of animal used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*, L358, 1, 1986.
41. Pink J.R.L. Avian Embryos in Immunology. *Imm. Methods*. (Ed. I Lefkowitz and Pernis) London, Academic Press; Vol. 3, 385-402, 1985.
42. Shade R. Avian egg yolk antibodies: The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kinds and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Alternativen zu Tierexperimenten*, 11, 75, 1994.
43. Shimizu M., Fitzsimmons R.C. and Nakai S. Serum and Egg antibodies responses in chicken to *Escherichia Coli*. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3233, 1989.
44. Carey H.W., Artwohl E.J. and Taylor B.B. Review of Polyclonal Antibody production procedures in Mammals and Poultry. *ILAR Journal*, 37, 93, 1995.
45. Erhard H.M., Schmidt P., Hofmann A., et al. The lipopeptide PAM₃Cys Ser (Lys-4). An Alternative Adjuvant to Freund's Adjuvant for the immunization of chicken to produce Egg Yolk antibodies. *Atla*, 25, 173, 1997.
46. Hatta H. Prevention of fish disease using egg yolk antibody (IgY) Symposium on Non Conventional Egg Uses and Newly Emerging Processing Technologies. Banff, Alberta, Canada, 23, 110, 1992.
47. Otake S., Nishihara Y., Makimura M., Hatta H., Kim M., Yamamoto T. and Hirasawa M. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen egg yolk antibodies (IgY). *J. Dent. Res.*, 70, 162, 1991.
48. Losch U., Schrammer I., Wanke R. and Jurgens L. The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. Series B(33)*, 609, 1988.
49. Gottstein B. and Hemmeler E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in serology of *Echinococcus*. *Z. Parasitenk.*, 71, 273, 1985.
50. Song C.S. Antibodies to the alpha subunit of insulin receptor from egg of immunized hens. *J. Immunol.*, 135, 3354, 1985.
51. Hassl A. and Aspöck H. Purification of egg yolk immunoglobulins A two step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. Immunol. Methods*, 110, 225, 1988.
52. Hatta H., Kim M. and Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody. *Agric. Biol. Chem.*, 154, 2531, 1990.
53. Hatta H., Sim J.S. and Nakai S. Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water-soluble proteins. *J. Food Sci.*, 53, 425, 1988.
54. Svedsen L. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Lab. Anim. Sci.*, 45, 89, 1995.
55. Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethyleneglycol procedure. *Immunological Investigations*, 19, 253, 1990.
56. Fischer M., Hlinak A., Montag T., Claros M., Schade R. and Ebner D.

- Vergleich von Standardmethoden zur Präparation von Dotterantikörpern: [Comparison of standard methods for the preparation of egg yolk antibodies]. *Tierärztl-Prax.* 24, 411, 1996.
57. Sehir B., Dubreil D., Higgins R. and Jaques M. Purification and Characterization of a 52 kDa Immunoglobulin G binding protein from streptococcus Swis capsular type 2. *J. Bacteriol.*, 177, 3830, 1995.
 58. Promega Co. Biological Research Products. Immunological Detection. Catalogue, 352-58, 1997.
 59. Promega Co. EGGstract purification system. *Technical Bulletin*, 7, 001, 1997.
 60. Pharmacia-Biotech. Gamma-bind yolk. Catalogue, 65, 1997.
 61. Erhard M.H. Development of specific enzyme linked immunosorbent antibody assay system for the detection of chicken immunoglobulin G, M and A using monoclonal antibodies. *Poultry Sci.*, 71, 302, 1992.
 62. Charter E.A., Fitchall J., Lo V.K. High Performance Liquid Chromatography Analysis of egg yolk immunoglobulins. *Int. J.B.C.*, 1, 199, 1995.
 63. Baintner K. Intestinal adsorption of macromolecules and immune transmission from mother to young. Boca Raton, FL: CRS Press Inc., 135-37, 1986.
 64. Nakai S. Study of digestion of milk protein and its improvement. Ph.D. Thesis; The University of Tokyo, 1962.
 65. Yolken R.H., Leister F., Wee S.B., Miskuff R., Vonderfecht S. Antibodies to rotaviruses in chicken eggs: A potential source of antiviral immunoglobulins for human consumption. *Pediatrics*, 81, 291, 1988.
 66. Ahren C.M. and Svennerholm A.M. Synergistic protective effect of antibodies against *E. Coli* enterotoxin and colonization factor antigens. *Infect. Immun.*, 28, 74, 1982.
 67. Ebina T. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. *Arch. Virol. Suppl.*, 12, 217, 1996.
 68. Sarnesto A., Ranta S., Sepälä I.J.T., Makela O. Relative immunogenicity in mice of different regions of the human IgG. *J. Immunol.*, 17, 507, 1983.
 69. Yokohama H., Peralta R.C., Díaz R., Sando S., Ikemori Y. and Kodama Y. Passive protection effect of chicken egg immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia Coli* infection in neonatal piglets. *Infect. Immun.*, 60, 998, 1992.
 70. Sugita K.Y., Shibata K., Yun S.S., Hara K.Y., Yamaguchi K. and Kumagai S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 886, 1996.
 71. Yang J., Jin Z., Yu Q., Yang T., Wang H. and Liu L. The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers. *Chin. J. Biotechnol.*, 13, 85, 1997.
 72. Larsson A., Karlsson P.A. and Sjöquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin. Chem.*, 37, 411, 1991.
 73. Larsson A. and Joquist J.S. Binding of complement components C_{1q}, C₃, C₄ and C₅ to a model immune complex in ELISA. *J. Immunol. Methods*, 119, 103, 1989.
 74. Larsson A. and Joquist J.S. False-positive results in latex agglutination test caused by rheumatoid factor. *Clin. Chem.*, 43, 767, 1988.
 75. Olovsson M. and Larsson A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in Elisa and Immunohistochemistry. *Comp. Immunol. Microbiol. & Infect. Dis.*, 16, 145, 1993.
 76. Murata T. Anti-activin A antibody IgY specifically neutralizes various activin A activities. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med. Jan.*, 21, 100, 1996.
 77. Danielpour D. and Roberts A.B. Specific and sensitive quantitation of transforming growth factor beta 3 by sandwich enzyme linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, 180, 265, 1995.
 78. Gutiérrez J.A. and Guerriero V. Quantitation of Hsp70 in tissues using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, 143, 81, 1991.
 79. Fortgens P.H., Dennison C. and Elliott E. Anti-cathepsin D chicken IgY antibodies: Characterization, cross-species reactivity and application in immunogold labelling of human splenic neutrophils and fibroblasts. *Immunopharmacology*, 36, 305, 1997.
 80. Godfrey M.A.J., Kwasowski P., Clift R. and Marks V. Sensitive Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) for detection of staphylococcal protein A (SpA) present as trace contaminant of murine immunoglobulins purified on immobilized protein A. *J. Immunol. Methods*, 149, 21, 1992.
 81. Knicker S.M. and Profy A.T. Immunoassay to measure staphylococcal Protein A in the presence of murine immunoglobulins. *J. Immunol. Methods*, 142, 53, 1991.
 82. Weir D. The Handbook of Experimental Immunology. Vol. 1. 5th Edition, Oxford Blackwell Scientific Publications, 115-128, 1996.
 83. Anon Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents, Eighth Edition 253. Santa Rosa, C.A.: W.D. Linscott. (1994/95).
 84. National Research Council. Guide for The Care and Use of Laboratory Animals. Washington D.C., Academy Press, 1-15, 1996.
 85. Camenish G., Tini M., Chilov D., Kvietikova I., Srinivas V., Caro J., Spielmann P., Wenger R.H., Gasmann M. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 alpha. *FASEB J*, 13, 81, 1999.