

Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino y evaluación en un sistema de aglutinación con látex

Jannet González-Figueredo,^{1*} David Rajme-Manzur,¹ Gilberto Negrín-Thomson,¹ José Raúl Dopico-Paz²

¹ Grupo Empresarial LABIOFAM. Empresa productora de vacunas virales y bacterianas. Ave. Independencia, km 161/2 Boyeros, La Habana, Cuba.

² Instituto Finlay. UEB Investigación y Desarrollo. Ave. Infanta, Centro Habana, La Habana, Cuba.

email: labiofamcuba@labiofam.co.cu

La parvovirosis canina es una de las principales infecciones que provoca gastroenteritis, fundamentalmente en cachorros, con altos índices de morbilidad. Los diagnosticadores más utilizados se basan en la detección de partículas virales excretadas durante la fase aguda de la enfermedad. Algunos requieren equipos especializados, lo que aumenta los costos y el tiempo de diagnóstico. Por esto, la simplificación de estos métodos con alta sensibilidad y especificidad es prioritaria. En Cuba solo se logra un diagnóstico presuntivo sin la completa confirmación de la enfermedad, principalmente por la escasez o ausencia de un medio diagnóstico en toda la red de consultorios y clínicas veterinarias, rápido, eficaz y ajustable a nuestras condiciones. Este trabajo tuvo como objetivo obtener anticuerpos policlonales IgY a partir de yema de huevo de gallina y evaluarlos mediante un sistema de látex-aglutinación, para su posible uso como terapia y principalmente en el diagnóstico. Se inmunizaron por vía intramuscular dos gallinas de raza Leghorn con una cepa atenuada de parvovirus canino (PVC) tipo 2. Se aplicaron 8 inoculaciones por ave cada 15 días. Se cosecharon los huevos y se purificaron los anticuerpos por el método de sulfato de dextransulfato de sodio. Se determinó el título de IgY anti-PVC por el método de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) y con antígeno de PVC acoplado a partículas de látex de poliestireno. Por IH se obtuvo un título de IgY anti-PVC de 1:1024. Las mezclas de anticuerpos con títulos alto y medio de ambas gallinas aglutinaron con los reactivos preparados con 230 y 460 µg/mL de antígeno. La mayor intensidad de la reacción y la mejor detectabilidad correspondieron a los reactivos elaborados con los anticuerpos de mayor título.

Palabras claves: IgY, parvovirus canino, aglutinación en látex.

Introducción

La tecnología IgY, término referido a la producción y uso de anticuerpos de ave, se ha convertido en los últimos años en una atractiva alternativa para el desarrollo de inmunorreactivos (1).

Los anticuerpos aviares tienen entre sus principales ventajas, la reducción de la intervención animal, obteniendo además una gran cantidad de anticuerpos. Por otra parte, las aves presentan mayor distancia filogenética entre sus antígenos y los de mamíferos, ofreciendo altos porcentajes de anticuerpos específicos (2).

Desde finales de los años 60 del siglo pasado, se vienen informando numerosas aplicaciones de la IgY, fundamentalmente en la terapéutica, la profilaxis y el inmunodiagnóstico (3, 4). Estas potencialidades de aplicación de los anticuerpos aviares, a las que se suman

las ventajas que ofrece la tecnología IgY en cuanto a costo y bienestar de los animales, vislumbran un futuro promisorio para la producción y utilización de los anticuerpos IgY. Resulta interesante y estratégico para la industria biofarmacéutica el empleo de estos anticuerpos en sistemas de diagnóstico rápido de enfermedades, por la disminución de reacciones inespecíficas (5).

La parvovirosis canina es una enfermedad infecto-contagiosa de etiología viral caracterizada por vómitos, diarreas, deshidratación y leucopenia que afecta fundamentalmente a los caninos menores de un año (6, 7). Es una enfermedad endémica y francamente estacional.

En Cuba los valores de las tasas de incidencia y mortalidad son inciertos, debido al alto índice de sub-reportes, falta de estudios sobre prevalencia y ausencia de diagnóstico confirmativo. Aunque se cuenta con vacunas para prevenir la enfermedad, como la cubana

* Licenciada en Microbiología. Especialista en Producciones Biofarmacéuticas. Labiofam, La Habana, Cuba.

ALYb®PVCan con efectividad de un 85%, no se garantiza la completa protección, fundamentalmente por interferencia de anticuerpos maternos (8). Por otra parte, muchas veces el diagnóstico es enmascarado y se llegan a crear confusiones debido a la existencia de otras patologías que cursan con un cuadro clínico similar y en la mayoría de los casos solo se logra un diagnóstico presuntivo sin la completa confirmación de la prevalencia de la enfermedad (7).

En vista de su alta morbilidad y mortalidad, se han desarrollado varios métodos para el diagnóstico de la parvovirosis canina. Los más utilizados se basan en la detección de partículas virales excretadas durante la fase aguda de la enfermedad. Algunos requieren equipos especializados, lo que aumenta los costos y el tiempo de diagnóstico. Por esto, la simplificación de estos métodos de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad es prioritaria (9).

Este trabajo tuvo como objetivo principal obtener anticuerpos policlonales IgY en yema de huevo de gallina y evaluarlos mediante un sistema de látex-aglutinación.

Materiales y Métodos

Protocolo de Inmunización para la obtención de los anticuerpos

Para la inmunización se emplearon dos gallinas ponedoras (G-1 y G-2) de 18 semanas de edad de raza Leghorn (L_{33}), con peso adecuado (1340 g), buena vitalidad, estado general y con programa de vacunación actualizado. Se alojaron en jaulas individuales de 3600 cm², el consumo de pienso (pienso de ponedora) fue de 150 g/día y el agua se administró a voluntad. Se les administró un total de 8 inmunizaciones, espaciadas entre 15 días cada una, por vía intramuscular en la región del muslo, alternando ambas extremidades.

El inmunógeno utilizado para la inmunización fue una cepa atenuada (aislado cubano) de parvovirus canino (PVC) tipo 2 conservada en el cepario de LABIOFAM, con un título viral de $10^{4.75}$ DICT₅₀/mL, determinado por la técnica de hemoaglutinación (HA) (9-11) y ELISA directo basado en un anticuerpo monoclonal antígeno específico (10, 11). Se utilizó el adyuvante Freund (Difco v/v), completo para la primera inoculación e incompleto para el resto.

El volumen total administrado fue de 0,5 mL, a partes iguales entre antígeno y adyuvante. El esquema de inmunización fue diseñado y aplicado de acuerdo con

lo recomendado por el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) (12) en el año 2000 (12).

Durante el tiempo que duro el experimento (15 semanas), los huevos se colectaron a los 7 y 14 días posteriores a cada inoculación (44 en total; 1 huevo/ave hasta la octava semana y dos huevos/ave las restantes semanas), los cuales se identificaron (gallina, fecha) y se almacenaron en refrigeración (2-8°C). Las fracciones de IgY de los 30 huevos colectados a partir de la cuarta inoculación, se mezclaron según su título.

Purificación de los anticuerpos IgY

El proceso de purificación se realizó por separado a cada uno de los huevos seleccionados, utilizando el método sulfato de dextrana-CaCl₂/sulfato de sodio, el cual en comparación con otros métodos de purificación, es el más eficiente en términos de concentración de la inmunoglobulina recuperada (13-15).

Determinación de la concentración y de la pureza de la IgY

A las fracciones obtenidas de cada uno de los huevos colectados se les midió la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Lambda EZ 201 Perkin Elmer y se calculó la concentración de inmunoglobulinas Y usando el coeficiente de extinción de la IgY $\xi=13,216$.

Los datos obtenidos se digitalizaron en una hoja de cálculo Excel del programa Microsoft Office y posteriormente fueron llevados al software Statgraphics 6.1 Plus (16) donde se efectuó un análisis estadístico descriptivo (media, desviación estándar). Además, se estudió el perfil electroforético en geles de poliacrilamida SDS-PAGE con empleo de geles de 7,5% a 250 Volt, 1,0 mA, 30 Watt, 15°C, 60 y 70 V/h, en un equipo PhastSystem de la firma Pharmacia (Suecia). Se empleó un patrón de alto peso molecular de 212, 170, 116, 76 y 53 KDa (Código 17-0615-01, AmerhamBiosciences, USA) y se revelaron las bandas con solución de nitrato de plata al 10%.

Titulación de los anticuerpos IgY

Se ajustaron las concentraciones de cada una de las fracciones de anticuerpos obtenidas a 1 mg/mL con solución amortiguadora glicina-NaCl 0,2 M pH 8,2.

Para determinar el título de IgY anti-PVC se utilizó el método de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) en placa de la siguiente manera: a partir del extracto de IgY

anti-PVC obtenido, se prepararon diluciones seriadas de 50 µL desde 1:2 hasta 1:4096 en una placa de 96 pozos de fondo en U. A cada pozo se adicionó 50 µL de antígeno (el mismo que fue utilizado para la inmunización) ajustado a 8 unidades de hemoaglutinación (según título de HA). Posteriormente, la placa se incubó a temperatura ambiente por una hora, al cabo de la cual se agregó a cada pozo 50 µL de una suspensión al 1% de glóbulos rojos de cerdo en amortiguador fosfato-salino y la lectura fue hecha cuatro horas después (10, 11).

Teniendo en cuenta los títulos de anticuerpos anti-PVC por IH, se agruparon y mezclaron las fracciones con niveles mayores, intermedios y menores de IgY específica, distribuyéndolas en tres preparaciones de anticuerpos: M-1 (títulos mayores de 1:512), M-2 (títulos entre 1:32 y 1:512) y M-3 (títulos menores de 1:32), para las dos gallinas independientes y para un total de seis mezclas de IgY.

Cada una de las preparaciones de anticuerpos IgY se tituló también con un reactivo de látex-antígeno de parvovirus canino (AgPVC). Para ello, partículas de látex de poliestireno de 0,8 µm al 10% (Polymer, UK) se sensibilizaron con 1840, 920, 460, 230 y 115 µg/mL de AgPVC en solución amortiguadora glicina-NaCl pH 0,2 M pH 8,2. A 1 mL de cada solución de AgPVC se le añadieron 100 µL de la suspensión de látex; se agitaron dos horas a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12000 rpm en el equipo Eppendorf 5415C y se lavaron tres veces en la misma solución amortiguadora.

Se evaluó la ocurrencia de autoaglutinación de cada variante con el criterio siguiente: en una lámina de fondo oscuro se depositaron en la zona de reacción 20 µL del reactivo de látex y 20 µL de solución amortiguadora, se mezclaron las 2 gotas y se observó la preparación durante cinco minutos; si se mantenía homogénea se consideraba estable, si se producía aglutinación se desechara (17).

Posteriormente, se enfrentaron a las mezclas de anticuerpos por gallina, y se seleccionaron para la titulación los reactivos de látex-AgPVC que fueron capaces de desarrollar aglutinación frente a las preparaciones de anticuerpos IgY sin diluir. La titulación de los anticuerpos se realizó de la manera siguiente: a las tres mezclas por gallina se les realizaron diluciones seriadas de 1 mL en glicina-NaCl pH 8,2 0,2 M 8,5 g/L desde 1:2 hasta 1:4096; cada una de estas diluciones fueron enfrentadas a los reactivos de látex preparados con 460 y 230 µg/mL de AgPVC.

Se procedió de la siguiente manera: volúmenes de reacción de 20 µL para las muestras y el reactivo de látex, mezcladas en una lámina de fondo oscuro con la ayuda de un aplicador hasta obtener una mezcla uniforme en todo el sector de la placa, agitación lenta de forma manual durante cinco minutos.

Las lecturas se realizaron a simple vista bajo una buena iluminación. La aglutinación se evaluó con cruces (1+, 2+, 3+ y 4+) en correspondencia con su intensidad. Se consideró como título la mayor dilución de los anticuerpos en que se pudo apreciar aglutinación.

Resultados y Discusión

La producción de anticuerpos requiere primeramente de la purificación del inmunógeno y su inoculación en un hospedero adecuado para la posterior obtención de los anticuerpos específicos a partir de esta fuente. En nuestro trabajo se utilizaron anticuerpos obtenidos en gallinas como animal donante debido a que, de acuerdo con varios autores (2, 3) resultan ventajosas, son económicas de mantener y fáciles de manipular a diferencia de los mamíferos y desde el punto de vista de las regulaciones de la protección de los animales resulta más factible su uso, ya que colectar huevos, en contraste con el sangrado de los mamíferos es un procedimiento no invasivo que no requiere personal especializado.

Durante el proceso de obtención y evaluación de la IgY anti-PVC, se mantuvo constante el adyuvante, la concentración del inmunógeno, el volumen de inóculo, el sitio, vía y la frecuencia de inoculación, el intervalo entre inmunizaciones, así como las condiciones de tenencia a las que fueron mantenidas las aves del experimento de acuerdo con lo establecido por las normas internacionales del National Research Council (18) y las normas de Cedeño y colaboradores (19), utilizadas en el Instituto Nacional de Salud para el manejo y mantenimiento de animales.

La dosis de antígeno para una buena respuesta inmunitaria fue objeto de análisis por Gassmann y colaboradores (20), quienes demostraron que pequeñas cantidades son suficientes para producir IgY específica. Generalmente se usa el adyuvante completo de Freund para emulsionar el antígeno que va a ser inoculado. En la literatura se reporta que desde el punto de vista de las regulaciones para la protección de los animales resulta más factible su uso, pues la inmunización con adyuvante de Freund es bien tolerada y no produce reacciones inflamatorias locales (21).

Las vías de inmunización más empleadas han sido la subcutánea y, más frecuentemente, la intramuscular en el músculo pectoral (22).

En nuestro estudio se empleó esta última vía, pero en la región del muslo y cabe señalar que no se produjeron reacciones adversas (granulomas, abscesos, hematomas) en ninguno de los puntos de inoculación.

La IgY total obtenida fue purificada a partir de yema de huevo por eliminación de las lipoproteínas (deslipidación) y recuperada mediante precipitación, siguiendo los protocolos usualmente utilizados para tal fin (23-25). Según varios autores (25) existen diferencias en los procesos físicos y en los reactivos utilizados para deslipidar y precipitar la IgY, siendo la utilización de sulfato de dextrana/cloruro de calcio en la deslipidación y de sulfato de sodio en la precipitación, el mejor procedimiento para la recuperación de la inmunoglobulina, sin ofrecer mayores complejidades técnicas.

El método de purificación seleccionado, sulfato de dextrana/sulfato de sodio, garantizó la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados. La concentración media de la inmunoglobulina Y obtenida en las fracciones fue de $9,85 \pm 0,81$ mg de IgY por mL de yema, lo que coincide con la literatura, que plantea que el rango de rendimiento se encuentra entre 6 y 20 mg/mL (26).

El perfil electroforético mostró una sola banda entre 162 y 196 KDa, lo cual coincide con la masa molecular de la IgY que se encuentra entre 160 y 190 KDa (26, 27). En todos los experimentos se repitió el mismo patrón electroforético, indicativo de una composición similar para todas las fracciones de IgY obtenidas. Estos resultados, junto con los rendimientos logrados, demuestran la reproducibilidad de la precipitación con sulfato de dextrana/sulfato de sodio y permiten concluir que este método de purificación es adecuado para los propósitos de la investigación.

El esquema de inmunización empleado resultó adecuado para la obtención de IgY en yema de huevo; obteniéndose anticuerpos específicos contra el PVC a partir de la segunda semana del esquema. Se alcanzó un título de IgY anti-PVC de 1:1024 luego de la séptima inoculación.

De acuerdo con varios reportes, los esquemas de inmunización con largos períodos de tiempo y con refuerzos repetidos incrementan el desarrollo de anticuerpos afines al antígeno inoculado (28).

El AgPVC resultó un buen inmunógeno, ya que se obtuvieron altos títulos, como se observa en la cinética de producción de anticuerpos (Tabla 1).

Es apreciable que el título máximo de anticuerpos para cada gallina tiende a llegar a un valor límite, lo cual concuerda con Gómez (28), quien señala que las inyecciones repetidas de inmunógeno no llevan, indefinidamente, a respuestas inmunitarias cada vez mayores. La cifra total de anticuerpos está muy regulada, y tiende a estabilizarse, aún después de repetidas dosis, o de la exposición a diferentes inmunógenos. Por otra parte, Flores (29) refiere que el esquema de inmunización no tiene regla general, casi todos los que se aplican con éxito han surgido del empirismo; el empleado en este estudio nos propició resultados satisfactorios.

La evaluación de los anticuerpos IgY específicos de las preparaciones M-1, M-2 y M-3 sin diluir de cada gallina, frente a los reactivos de látex-AgPVC preparados, dio como resultado que solo los reactivos preparados con 230 y 460 µg/mL dieron positivos a la técnica de aglutinación con las preparaciones M-1 y M-2 (títulos alto y medio, respectivamente) de ambas gallinas; no sucedió así con las preparaciones M-3 (título bajo) de las dos gallinas que no fueron capaces de agregar las partículas de látex de ninguna de las variantes (Tabla 2).

Tabla 1. Títulos de anticuerpos IgY anti-PVC detectados por IH en las fracciones de ambas gallinas.

Inoculaciones	Semanas	Título de Anticuerpos	
		Gallina 1	Gallina 2
1ra	1	-	-
	2	1:2	1:2
2da	3	1:2	1:2
	4	1:4	1:4
3ra	5	1:8	1:4
	6	1:8	1:8
4ta	7	1:16	1:16
	8	1:32	1:16
5ta	9	1:32	1:32
	10	1:128	1:64
6ta	11	1:256	1:128
	12	1:512	1:256
7ma	13	1:512	1:512
	14	1:1024	1:512
8va	15	1:1024	1:1024

Tabla 2. Evaluación de los anticuerpos IgY frente a los látex-AgPVC.

Anticuerpos sin diluir	Variantes de látex-AgPVC ($\mu\text{g/mL}$)				
	115	230	460	920	1840
G-1 M-1	-	+	+	-	-
G-1 M-2	-	+	+	-	-
G-1 M-3	-	-	-	-	-
G-2 M-1	-	+	+	-	-
G-2 M-2	-	+	+	-	-
G-2 M-3	-	-	-	-	-

G-1 y G-2, gallinas 1 y 2.

M-1, M-2 y M-3, mezclas de anticuerpos de títulos altos, medios y bajos respectivamente.

Esta conducta está en correspondencia con el principio de que la inmunoaglutinación está influenciada por la relación de concentraciones de los reactantes. Para cada sistema antígeno-anticuerpo, existen determinadas condiciones que favorecen su agregación.

En el caso de las reacciones de aglutinación, a mayores grados de recubrimiento de la partícula se favorece el fenómeno de zona por exceso de antígeno, que es lo que pudo haber sucedido con los látex preparados con 920 y 1840 $\mu\text{g/mL}$.

Es necesaria una adecuada sensibilización de las partículas para que se favorezca que los anticuerpos se unan por uno de los sitios Fab y quede el otro disponible para enlazar el antígeno sobre otra partícula adyacente.

Cuando hay gran disponibilidad de antígeno sobre la misma partícula, el anticuerpo tiene más posibilidades de unirse por sus dos regiones Fab a la misma partícula, lo que le impide desarrollar su actividad aglutinante (17).

Se apreciaron diferencias en los títulos de anticuerpo en relación con la concentración de recubrimiento de los

látex-AgPVC. A menor concentración de recubrimiento mayor título de anticuerpos para una misma preparación de IgY (Tabla 3).

Este comportamiento está dado por las razones ya explicadas. El látex-AgPVC que se preparó con 460 $\mu\text{g/mL}$ tiene un mayor grado de recubrimiento que el que se preparó con 230 $\mu\text{g/mL}$, de ahí que este último requiera de concentraciones mayores de anticuerpo para la aglutinación de las partículas.

En este trabajo se utilizó un ensayo de IH (prueba de referencia para Ac anti-PVC), pero también se estudió un sistema de látex-aglutinación en lámina, acoplando a las partículas de látex el antígeno utilizado (AgPVC), demostramos su utilidad para evaluar los títulos específicos de anticuerpos IgY, dado por su especificidad, simplicidad y la obtención de rápidos resultados.

Resulta novedosa e importante la aplicación de la tecnología IgY para nuestro país en Medicina Veterinaria, para la futura producción de medios de diagnóstico que sean rápidos, eficaces y económicamente factibles, para la parvovirosis canina.

Tabla 3. Título de los anticuerpos IgY frente a partículas de látex sensibilizadas con 460 y 230 $\mu\text{g/mL}$ de APC.

Anticuerpos	Título de anticuerpos	
	L-AgPVC (460 $\mu\text{g/mL}$)	L-AgPVC (230 $\mu\text{g/mL}$)
G-1 M-1	1:128	1:2048
G-1 M-2	1:32	1:512
G-1 M-3	Negativo	Negativo
G-2 M-1	1:128	1:1024
G-2 M-2	1:64	1:512
G-2 M-3	Negativo	Negativo

L-AgPVC: látex-antígeno de parvovirus canino.

Referencias

1. Crosby MJ, Diaz D, Reyes J. Alternativas de la inmunología como herramienta de investigación y diagnóstico: gen reacción, aislamiento y purificación de anticuerpos específicos en huevo de gallina. *Diógenes* 2004;1:137-49.
2. Pinto J, Barco M, Afanador MC, Merchán AM, Montañez MF, Andrade F, Torres O. Obtención de anticuerpos polyclonales IgY antiparvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina. *Revista de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana* 2005;10(1):37-44.
3. Alarcón C, Hurtado H, Castellanos J. Anticuerpos aviares: alternativa en producción y diagnóstico. *Biomédica* 2000;4(20):338-43.
4. Larsson A, Bälöw RM, LIndahl T, Forsberg PO. Chicken antibodies: taking advantage of evolution-a review. *Poultry Science* 2003;72(10):1807-12.
5. Carmichael L. Recent advances in canine infectious diseases. New York: Ed. Ithaca; 2009.
6. Boffil P, Ramírez W, Montañez J, Reinaldo G, Pérez M, Percedo María, Aveledo María Antonia; Enfermedades Infecciosas de los Animales. Enfermedades producidas por virus. Tomo II. La Habana: Editorial Félix Varela; 2011. p.341-62.
7. Castillo J. Comportamiento epizootiológico de la parvovirosis canina en el período 2004–2009 en el consejo popular Buenavista, Remedios, Cuba. *REDVET* 2012;13 (6). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060612B.htm>
8. Ariza S, Fuentes D, Vera V, Villamil L, Ramírez G. Aglutinación en látex, ELISA y hemoaglutinación: Alternativas para el diagnóstico de la Parvovirosis canina en heces. *Rev Med Vet Zoot.* 2005;52:5-11.
9. Carmichael LE, Joubert JC, Pollok RV. Hemagglutination by Canine Parvovirus: Serologic Studies and Diagnostic Applications. *Am J Vet Res* 1990;41(5):784-90.
10. Cazañas PJ. Agentes biológicos e inmunología veterinaria Tomo 2. La Habana: Ed Félix Varela; 2013.
11. Leenaars PP, Hendriksen CF, De Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fisher R. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendation of ECVAM workshop 35. *Altern Lab Anim*; 2000;27:79-102.
12. Jensenius JC. 2001 Eggs: Conveniently package antibodies: method for purification of yolk IgG. *J. Immunol Methods* 2001;46:63-8.
13. Schade R, Gutiérrez E, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo H. 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ATLA* 2005;33:129-54.
14. Schade R, Behn I, Erhrad M. 2001. Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-Technology .Springer Lab Manuals. Berlin: Springer-Verlag; Chapter 6.214-5
15. Leslie GA y Clem WL. Phylogeny of immunoglobulin structure and function: Immunoglobulins of the chicken. *J.Exp Med.* 1996;130:1337-52.
16. Statistical, Graphics Corporation 2013. Statgraphics Plus 6.1 for windows 7.professional. Ed.
17. Hechemy K, Michaelson E. Latex particle Assays in Laboratory Medicine. Part I. *Lab. Management*. 1984;22(6):27-40.
18. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.: Institute of Laboratory Animal Resources; 2011.
19. Cedeño D, Lugo L, Muñoz J, Maldonado J. Guía para el uso de animales de experimentación. Santafé de Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2004.
20. Gassman M, Thommomes P, Weiser T, Hubscher U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 2009;4: 2528-32.
21. Woolley JA, Landon J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *J. Immunol. Meth.* 2011;178: 253-65.
22. 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.
23. Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: Conveniently packaged antibodies methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods*. 2001;46: 63-8.
24. Bade H, Stegemann H. Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. *J Immunol Methods*. 1994;72:421-6.
25. Tini M, Jewel UR, Camnisch G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol* 2002;131(2):569-74.
26. Polsson A, Coetzer T, Kruger J, Maltzahn E, Merwe KJ. Improvement in the isolation of IgY from the yolks of egg laid by immunized hens. *Immunol Invest* 1995;14: 323-7.
27. Larson LR, Bradle JS. Inmunologic principles and inmunization strategy. *Comp Cant Ed Pract Vet* 2012;18:963-71.
28. Gómez E. Manual de Inmunología Veterinaria. Madrid: Prentice Hell; 2007.
29. Flores R. Parvovirosis canina y aspectos de inmunización. México DF: Laboratorios Litton de México; 2008.

Production of anti-canine parvovirus IgY polyclonal antibodies and evaluation of a latex agglutination system

Abstract

The canine parvovirosis is fundamentally one of the main infections causing gastroenteritis in puppies, with high morbilethality rates. The most used diagnostic tests are based on the detection of viral particles excreted during the acute phase of the disease. Some tests require specialized teams, which increases the costs and the time of diagnosis. For this reason, the simplification of these methods with high sensitivity and specificity has a priority. A presumptive diagnosis is only achieved in Cuba, without the complete confirmation of the disease, mainly for the shortage or absence of a diagnostic kit in the whole net of doctor's offices and veterinary clinics, quick, effective and adjustable to our conditions. This study aimed at obtaining IgY polyclonal antibodies from chicken egg yolk for its possible use in therapies and a latex agglutination diagnostic system. Two leghorn hens were intramuscularly hyper immunized with an attenuated strain of type 2 canine parvovirus (CPV). Eight inoculations were applied per bird every 15 days. The eggs were harvested and the antibodies were purified by the method of dextran sulfate/sodium sulfate. The titer of anti-CPV IgY was determined by the method of Hemagglutination Inhibition (HI) and with canine parvovirus antigen coupled to polystyrene latex particles. A title of IgY anti-CPV of 1:1024 was obtained by HI. Mixtures of antibodies with medium and high titers of both hens agglutinated with the reagents prepared with 230 and 460 µg/mL of antigen. The greatest intensity of the reaction and the best detectability corresponded to reagents prepared with the antibodies of higher titer.

Keywords: IgY, canine parvovirus, latex agglutination.

Recibido: Febrero de 2015

Aceptado: Mayo de 2015