

Obtención de un conjugado anti IgG de ratón - FITC mediante la tecnología IgY para uso como anticuerpo secundario en la detección de antígenos de superficie celular

Esteban J. Gutiérrez Calzado, Tomás Samón Chávez, Alejandro Miranda Ariza, George Fernández Duarte, David Higginson Clarke,* Gustavo Sierra González y Rüdiger Schade.*****

Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Instituto Superior de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba. *Departamento de Biología Molecular, Dirección de Neurociencias, Ciudad de La Habana. **Instituto Finlay de Sueros y Vacunas, Ciudad de La Habana, Cuba. ***Instituto de Toxicología y Farmacología, Universidad de Humboldt, Berlín (Charité).

Recibido: 20 de diciembre de 2005. Aceptado: 23 de agosto de 2006.

Palabras clave: IgY, inmunoglobulina de yema de huevo, inmunoglobulina de gallina, anticuerpo de yema de huevo, anticuerpos aviares.
Key words: IgY, egg yolk immunoglobulin, Hen's immunoglobulin, egg yolk antibody, avian antibodies.

RESUMEN. Desde el año 1996, el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos recomendó el uso de la IgY como sustituto de la IgG de mamíferos con el objetivo de reducir al mínimo las situaciones de daño que se les causa a los animales que se someten a la producción de anticuerpos (Acs). En 1999, la tecnología IgY se aprobó por la Oficina Federal Veterinaria del gobierno suizo como un método alternativo para sustentar el cuidado y bienestar de los animales. Muchas de las publicaciones relacionadas con IgY demuestran las características desde el punto de vista bioquímico de esta inmunoglobulina que la hace tomar ventajas sobre la IgG, entre las que refiere que los complejos inmunes que contienen Acs aviares, no pueden interactuar con los receptores Fc o del complemento sobre las células, por lo que el reemplazamiento de los Acs de mamíferos por sus similares en gallinas pudieran evitar interferencias en muchos ensayos diagnósticos. Este conocimiento ha sido la base objetiva de este trabajo que consistió en la obtención de Acs IgY anti IgG de ratón con elevado grado de pureza, los que fueron conjugados por unión covalente vía grupos amino primarios libres al isotiocianato de fluoresceína (FITC). Estos conjugados mostraron poseer una razón molar FITC/proteína en intervalos reportados para un buen desempeño. La dilución óptima de trabajo obtenida para ellos fue muy adecuada y demostró su utilidad como Acs secundarios en el conteo de antígenos de superficie celular linfocitario humano por sus resultados comparables con los reactivos similares de origen mamífero ensayados en paralelo.

ABSTRACT. Since 1996, the European Centre for Validation of Alternative Methods recommended the use of IgY for substitution of mammalian IgG to minimize harm situations in animal's experimentation for the production of polyclonal antibodies. In 1999, IgY technology was accepted by Federal Veterinarian Office of Swiss Government as an alternative method to support the care and healthy status of animals. Many publications show that IgY takes advantage over IgG to avoid interferences in several immunological assays for the fact that immune complexes that contain avian antibodies do not bind Fc or complement receptors on cells and IgY could replace a similar IgG. This knowl-

edge has been the basis of this work that has consisted of the conjugation of highly pure IgY anti mouse IgG with FITC by covalent junction via primary free amino groups of immunoglobulins. The conjugate obtained showed a good molar ratio FITC/protein for a recommended performance. The optimal working dilution obtained for the particular conjugate was rational demonstrating to be useful as secondary antibody in enumeration of human cellular surface antigens. The cellular enumeration was assayed simultaneously with similar reagents from mammalian source and results showed no significant differences by statistical analysis.

INTRODUCCIÓN

Con la aparición de los anticuerpos (Acs) monoclonales a finales de los setenta y su ulterior desarrollo en las décadas siguientes, se produce un mayor conocimiento de las características moleculares y antigénicas de las células. Asimismo, las técnicas de inmunofluorescencia que se venían realizando con sueros policlonales pasan a ser más específicas

Correspondencia:

Esteban Justo Gutiérrez Calzado

Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Calle 23 y Carretera del Caney, Reparto Vista Alegre, Apartado Postal 4032, Santiago de Cuba. Código Postal 90400. Teléfonos: 022 64 4462; 022 64 4463; Fax: 022 64 4464. Correo electrónico: esteban@cim.sld.cu

con el uso de los Acs monoclonales. En la inmunofluorescencia directa, por ejemplo, un Ac conjugado con un fluorocromo se une directamente a un antígeno celular y marca específicamente a la célula portadora de dicho antígeno. En la inmunofluorescencia indirecta, un segundo Ac especie-específico, conjugado con un fluorocromo, se une al primer Ac previamente fijado sobre el antígeno. Con esta técnica, generalmente se obtiene una mayor intensidad de fluorescencia, ya que al primer Ac se le une más de un segundo, produciendo un efecto de amplificación.

Se conoce que los receptores para el dominio Fc de las inmunoglobulinas suministran una importante unión entre la respuesta humoral específica y la parte celular del sistema inmune. La unión de la IgG a los receptores Fc puede producir diversas respuestas biológicas (fagocitosis, endocitosis, citotoxicidad celular dependiente de Acs, liberación de mediadores inflamatorios y el incremento de la presentación de antígeno).

Herramientas poderosas para definir y enumerar linfocitos, son la Citometría de Flujo y la Microscopia Fluorescente. Ambos sistemas utilizan Acs marcados con fluorocromos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) para la detección de antígenos sobre las superficies celulares, de forma tal que cuando el Ac reacciona con el antígeno se forma un complejo inmune.

Los complejos inmunes que contienen Acs de mamíferos pueden interactuar con los receptores Fc o del complemento sobre las células o al mismo tiempo unirse a otras inmunoglobulinas presentes en la muestra problema, pudiendo causar resultados erróneos en diversos ensayos para detectar sustancias de interés diagnóstico en el suero o plasma a investigar, así como en la cuantificación o enumeración de tipos celulares específicos. Esto ha sido probado en diversos inmunoensayos que contienen Acs de mamíferos.

Para evitar uniones inespecíficas a los receptores Fc de los linfocitos ha sido preferible utilizar fragmentos F (ab)₂, obtenidos por digestión con pepsina de estos Acs.

Dado al hecho de que los Acs de yemas de huevos puestos por gallinas inmunizadas se han reconocido como una excelente fuente de Acs policlonales, se ha desarrollado en las últimas décadas una explosión en el desarrollo de proyectos de inves-

tigación para utilizar pollos como un biomodelo apropiado en la producción de Acs policlonales (IgY) hacia proteínas de mamíferos, para usarlos en el campo del diagnóstico.¹⁻⁴ Hasta la fecha, no solo se han utilizado pollos para la producción de Acs policlonales aviares con fines diagnósticos. También han sido utilizadas codornices (*Coturnix quail*),⁵ así como Acs purificados de las yemas de huevos de los patos pekiñeses blancos (*Anas platyrhynchos*)⁶ para estos propósitos, de manera que se han podido demostrar las atractivas ventajas que ofrecen estas inmunoglobulinas aviares aisladas de la yema de sus huevos (denominadas IgY) sobre los Acs IgG convencionales obtenidos de fuentes de mamíferos.

Una de estas ventajas la constituye la cualidad de que los complejos inmunes que contienen Ac aviares, por las características estructurales que ellos poseen, no pueden interactuar con los receptores Fc o del complemento sobre las células por lo que el reemplazamiento de los Acs de mamíferos por sus similares en gallinas pudieran evitar estas interferencias.⁷

Todo lo anteriormente descrito ha sido la base del conocimiento para proponer en este trabajo un procedimiento de conjugación de Ac IgY anti IgG de ratón con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína, la caracterización de este conjugado y su uso como Ac secundario en la detección de antígenos de superficie celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de anticuerpos

Los Acs IgY anti IgG de ratón procedieron del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Santiago de Cuba. El grado de pureza de estos Acs fue garantizado por el proveedor para los fines de conjugación, ya que estos se lograron después de un proceso de purificación por inmutafinidad.

Conjugación con isotiocianato de fluoresceína

Se dializó toda la noche 1 mg del Ac purificado contra regulador bicarbonato (17,3 g/L NaHCO₃+ 8,6 g/L Na₂CO₃) (Böheringer Mannheim, Alemania). Se preparó 1 mg/mL de isotiocianato de fluoresceína (isómero FITC, Sigma F4274) en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), utilizando un frasco de vidrio ámbar. Se adicionó a la disolución del Ac, 50 µL de este preparado de FITC. Esta

mezcla fue incubada en la oscuridad toda la noche a 4 °C y paralelamente se garantizó una lenta rotación. Posteriormente, se sometió a una diálisis en regulador fosfato salino (PBS) por toda la noche a 4 °C para remover los reactivos no conjugados.

Determinación de la razón molar FITC/proteína (F/P)

La razón molar FITC/proteína (F/P) se calculó sobre la base de la medición de las absorbancias por espectrofotometría a longitudes de onda de 280 y 495 nm y mediante la expresión siguiente:

$$\frac{F}{P} = 3,1 \frac{OD_{495}}{OD_{280}} - 0,31 OD_{495}$$

Descripción de los métodos estándar para la caracterización del conjugado FITC basado de Acs de origen aviar

Primeramente, se aislaron linfocitos de sangre periférica de individuos normales y de los pacientes a analizar. En todos los casos, se prepararon suspensiones celulares de 10⁶ células/mL en 0,15 mol/L NaCl.

Se mezcló suavemente la suspensión celular y se adicionaron 100 µL en tubos de ensayo *Eppendorf* de 500 µL (cantidad de tubos según número de muestras a analizar, ya fuera para determinar la dilución de trabajo del conjugado o para realización del conteo propiamente). Se adicionaron 10 µL de Ac monoclonal específico (anti CD3 y CD4, IORTM de CIMAB S.A., Ciudad de La Habana). Se realizó una mezcla suave y se incubó por 30 min a 4 °C. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de una disolución de NaCl 0,15 mol/L y después se centrifugó a 8 000 g por 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se repitió la operación dos veces en disolución de NaCl 0,15 mol/L. Se adicionaron 10 µL del conjugado (Acs secundarios) - FITC de IgY de gallina en diversas diluciones (en el caso de la determinación de la dilución óptima de trabajo) y en la dilución óptima de trabajo, para la realización del conteo propiamente. Se mezcló suavemente y se incubó por 30 min a 4 °C en la oscuridad. Se adicionaron 2 mL de disolución 0,15 mol/L NaCl y después, se centrifugó a 8 000 g por 10 min a 4 °C. Se mezcló el precipitado con 200 µL de una disolución de flujo rápido (Fast Flow Solution, Becton Dickinson) y formaldehído 1 %.

Se realizó la determinación de la suspensión celular en un equipo FACScan (Becton Dickinson, U.S.A.)

equipado con un láser de ión - argón con enfriamiento de aire y emisión a 488 nm conectado a una computadora Power Machintosh 7300/200. Los resultados se colectaron y se analizaron mediante un programa propio (Becton and Dickinson Cell quest).

Los conteos celulares fueron comparados utilizando conjugados patrones de origen mamífero, tanto monoclonales primarios (anti CD3 y anti CD4), así como Ac secundario anti IgG de ratón de una fuente comercial (Sigma, U.S.A.).

Análisis estadístico

Se aplicó la prueba estadística no paramétrica de Mann - Whitney para analizar las diferencias en los resultados que arrojaron los conteos de poblaciones de linfocitos para cada ensayo con tipo de Ac conjugado utilizado para el marcaje. Se utilizó el paquete de programas estadístico y graficador profesional Graph Pad Prism.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de las eficiencias de conjugación de Acs de pollo con isotiocianato de fluoresceína

La conjugación con FITC de los Acs monoclonales y policlonales de mamíferos es una labor de rutina y se ha referido en muchos artículos⁸⁻¹² y constituye un material reproducible como procedimiento normalizado de operación por muchos laboratorios que se dedican a la producción de Acs conjugados con diversos fluorocromos. En la mayoría de estos reportes, se ha puntualizado que una razón molar FITC/proteína de los Acs conjugados con FITC, entre 5 y 8, es ideal para usarlos como marcadores en FACScan para varios propósitos de análisis celular (Procedimiento Normalizado de Operación). También se refiere esta razón con una amplitud entre 3 y 10 como predictiva de buen resultado de conjugación.⁹ En este trabajo, se realizaron las mediciones de DO a 280 nm y 495 nm mediante un procedimiento que permite la conjugación con FITC de Acs a bajas concentraciones (Tabla 1).¹⁰ Este reporte apunta como ideal en el acoplamiento molar FITC/proteína, un valor de alrededor de 5 en general. Aquí, la razón de acoplamiento molar se encontró entre 5 y 7, valor que se corresponde con el intervalo que se conoce. Se puede concluir que la metodología de conjugación de la IgY con FITC es reproducible en las condiciones utilizadas en el presente trabajo y los

indicadores obtenidos con el reactivo logrado, lo hacen recomendable para su empleo en propósitos prácticos en la clínica en técnicas como la Citometría de Flujo y en la Microscopia Fluorescente. Estos resultados concuerdan con trabajos recientemente publicados,^{11,12} en los que se emplearon conjugaciones de Acs IgY con FITC y aunque no describieron los indicadores de calidad utilizados para su caracterización, sí demostraron su utilidad como Ac secundario en técnicas FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter).

Determinación de la dilución óptima de trabajo del conjugado IgY anti-IgG de ratón-FITC por citometría de flujo

La titulación de un conjugado FITC es la primera labor que debe realizarse para la recomendación de uso en una dilución óptima de trabajo. Esta debe desarrollarse con cada reactivo sobre células para determinar la concentración de tinción óptima. Esto puede hacerse con el auxilio de técnicas de Microscopia Fluorescente o análisis por FACS. Normalmente se selecciona el conjugado con el que se obtengan las células positivas más brillantes y que posea bajo fondo sobre las células negativas.

El análisis por FACS suministra un método rápido y sensible para determinar la eficiencia de acoplamiento de los Acs con fluorocromos. Este método analiza una población de células en un tiempo muy corto, de hasta 10 000 células por segundo,¹³ 20 000 células por segundo^{14,15} o los equipos más modernos hasta 50 000 células por segundo¹⁶ como promedio.

En este trabajo se discuten los resultados de la conjugación de la IgY con FITC.

En él se presenta la prueba de diferentes diluciones del Ac secundario IgY-FITC para detectar Acs monoclonales del tipo IgG de ratón específicos contra antígenos de superficie linfocitaria CD4+ utilizando el sistema normalizado descrito en Materiales y Métodos. Los resultados permiten estimar las diluciones de trabajo del conjugado en estudio (Fig. 1).

El histograma de frecuencia es una de las formas de análisis de resultados que arroja el procesamiento de muestras por FACS, este muestra la fluorescencia relativa o las señales de luz esparcida, estos datos se colectan utilizando un amplificador logarítmico de cuatro décadas y se grafica el número de eventos en función de los resultados del amplificador.

El análisis de la fluorescencia de fondo en una muestra es factor importante para la toma de decisión en la selección y se toma como una premisa básica que esta fluorescencia de fondo (correspondiente a una muestra no teñida) descienda en la primera década de la escala logarítmica y que cualquier tinción sea específica o no, se mueva en crecimiento en la escala logarítmica. Después que esto se tiene establecido se utilizan marcadores para delimitar esta región correspondiente a la fluorescencia de fondo, de manera que en la muestra prueba, donde se debe apreciar una distribución bimodal (con un porcentaje de células teñidas con el Ac fluorocromo de interés y otros eventos que muestran baja fluorescencia) se pueda hacer incluso una compara-

Tabla 1. Densidades ópticas a 280 y 495 nm de diluciones 1 : 10 del conjugado IgY anti IgG de ratón para determinar la eficiencia de conjugación de los anticuerpos de yema de huevo de gallina con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

No.	Densidades ópticas		Razón F/P
	λ_{280}	λ_{495}	
1	0,198 4	0,229 3	5,616
2	0,171 4	0,231 2	7,186
3	0,183 6	0,227 1	6,219
4	0,193 2	0,241 3	6,317
5	0,170 3	0,238 7	7,683
Promedio			6,604

Cada densidad óptica se corresponde con diferentes conjugaciones realizadas independientemente utilizando en cada caso 1 mg de anticuerpos IgY de yema de huevo obtenidos del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Santiago de Cuba. F/P (FITC/proteína).

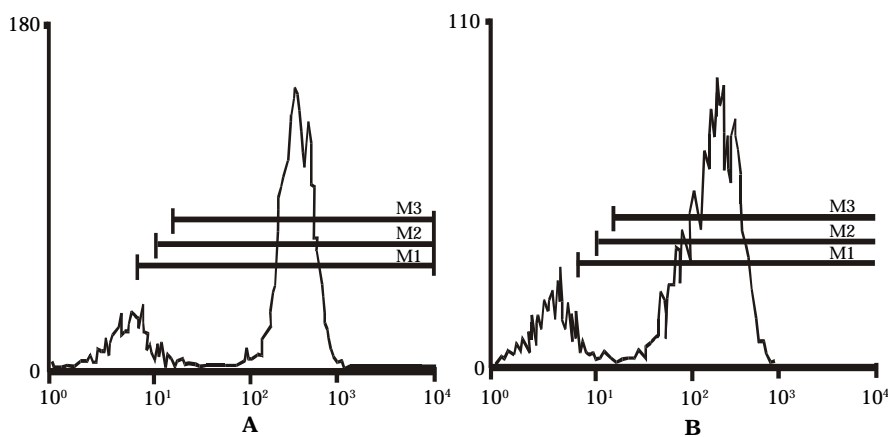


Fig. 1. Histogramas FACS que muestran la distribución bimodal de la prueba de dos diluciones de IgY anti IgG de ratón-FITC. Diluciones del conjugado: A) 1 : 40; B) 1 : 80.

ción visual para determinar la dilución de trabajo.

Se realizaron diversas diluciones del conjugado obtenido (1 : 200; 1 : 100; 1 : 80; 1 : 40) para detectar Acs monoclonales del tipo IgG murino contra antígenos de superficie linfocitaria CD4+ y mediante la medición por FACS, se pudo hacer un análisis del comportamiento de la fluorescencia de fondo en cada dilución por medio de los histogramas obtenidos (Fig. 1). Esto permitió decidir tomar la dilución 1 : 40 como óptima de trabajo, pues con ella se logran determinaciones con menos probabilidad de solapamiento entre eventos específicos e inespecíficos, lo que hace más confiables los resultados de cuantificación así obtenidos. Esta constituyó la dilución de trabajo para todos los posteriores ensayos realizados en este trabajo. No se muestran los gráficos de las demás diluciones probadas, porque el grado de solapamiento de las distribuciones era tal que casi las hacía indistinguibles, lo que a su vez demostraba la impracticabilidad de trabajar a esas concentraciones.

La comparación del número de linfocitos obtenidos por tres tipos diferentes de conjugados FITC (Acs monoclonales primarios marcados, y Acs secundarios anti IgG de ratón de conejo y pollo) usados en el experimento, no arrojó diferencias significativas entre los conjugados utilizados (Tabla 2). En todos los casos, los conteos obtenidos del número de células para individuos sanos, se correspondió con los intervalos que han sido reportados.¹⁷

Es necesario precisar, que sobre todo, los resultados del marcaje secundario IgY - FITC, al resultar similares a los del marcaje primario

para conteo de linfocitos humanos, dan muestra de su calidad para estos fines.

A pesar de que hoy día, la tendencia para la realización de conteos celulares por FACS, es el uso de Acs moleculares conjugados con diferentes fluorocromos para marcaje simultáneo primario,^{11,13-15} entre otros reportes, este método directo requiere de una amplia variedad de Acs monoclonales conjugados. La tecnología de producción de Acs monoclonales de por sí es de elevado costo, por lo que resulta privativa de países de gran desarrollo. Si a esto se une la necesidad de la conjugación de cada uno de ellos, los costos se elevarían mucho más, por lo que esto, junto con la calidad de los Acs secundarios IgY, que con frecuencia pueden decidir también sobre el límite de detección de un antígeno, son una razón de elección de estos últimos.

Los Acs IgY se obtienen y conjugan por métodos muy sencillos y con grandes rendimientos, al mismo tiempo que muestran raramente reacciones cruzadas.

Tabla 2. Valores promedios obtenidos en el conteo por Citometría de Flujo de subpoblaciones linfocitarias humanas en muestras de individuos normales.

Subpoblación linfocitaria (%)	D	I	C
CD3	80	84	83
CD4	43	40	45

Utilización de conjugado FITC basado en:
D Acs monoclonales de ratón como marcaje directo.

I IgG de conejo como Ac secundario.

C Ac IgY de yema de huevo de gallina como Ac secundario.

Estos resultados son comparables a los obtenidos también por Hommel y cols.¹¹ y Kritratanasak y cols.¹²

Cobra más importancia el uso de estos Acs secundarios IgY si se tiene en cuenta que las investigaciones en el campo de la Inmunología son muy importantes y al mismo tiempo, muy costosas, dígame en la dilucidación de algunos problemas actuales por resolver como los estudios en los cambios en la expresión de inmunoglobulinas de superficie¹⁸ y otros antígenos que se expresan en la superficie de las células de importancia en el sistema inmune, donde es necesario para estos fines, la Citometría de Flujo, conjuntamente con Acs marcados. Estos estudios permiten, además de precisar los órganos del sistema inmune donde se producen estos cambios, el momento preciso de su producción. Estas investigaciones pudieran aportar progresos de lo empírico a lo cada vez más científico, como los esquemas de inmunización en diversos modelos de experimentación para la posible producción de Acs policlonales, entre otros.

Por otro lado resultó de interés realizar el conteo de linfocitos en pacientes portadores de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), utilizando el Ac secundario IgY anti IgG de ratón - FITC en paralelo con el conteo realizado con el método convencional con Acs monoclonales primarios marcados. Con este fin, fue necesario precisar cómo se mueve el número de linfocitos en individuos sanos, así como los criterios de selección para pacientes con SIDA.

Los individuos sanos tienen aproximadamente 1 000 linfocitos T CD4+ por milímetro cúbico de sangre,^{13,17} en los pacientes SIDA, este número decrece en promedio de 40 a 80 linfocitos T CD4+ por año. Conforme a esto, se analiza una clasificación secuencial de los pacientes desde la Reunión de Inmunología de VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) e infecciones, llevada a cabo en Londres en 1991, donde se revisó el uso clínico del linfocito T CD4+ como un indicador de enfermedades debido a este efecto linfopénico del virus, visto solamente en SIDA.

Teniendo en cuenta estas recomendaciones se tomaron muestras de tres pacientes ya caracterizados, cuyos conteos debían oscilar entre las 200 y 500 células T CD4+ por milímetro cúbico de sangre.

Los resultados demostraron la gran comparabilidad en los conteos

linfocitarios obtenidos en ambos casos (el uso de Acs monoclonales primarios y los Acs IgY secundarios marcados) (Tabla 3).

Estos resultados permiten afirmar que los conjugados FITC basados en Acs IgY se pueden recomendar no solo para evaluar el número de linfocitos de sangre periférica en individuos sanos, sino también, en muestras de sangre de pacientes con desórdenes inmunológicos que requieran de este estudio como es el caso de los que son portadores de SIDA. Este resultado era de esperar puesto que los antígenos de superficie celular no experimentan cambios en su estructura en esta patología, solo disminuyen en número, por lo que los reactivos a los que se les demuestre su funcionalidad en muestras de individuos normales es extrapolable su uso para estudios de conteo linfocitario en otras patologías, no solo SIDA, sino además, otras como los linfomas y leucemias donde también se comprometen las poblaciones de estas células y su conteo es de un gran valor para su diagnóstico y seguimiento.

CONCLUSIONES

Los Acs IgY anti IgG de ratón purificados resultan factibles para conjugarse con fluorocromos como el FITC por los métodos convencionales establecidos, al igual que sus homólogos en mamíferos. Asimismo, resultan útiles como Acs secundarios marcados para detectar Acs monoclonales específicos en técnicas de Citometría de Flujo, por lo que constituyen una alternativa para el conteo de poblaciones de linfocitos en muestras de individuos sanos como en patologías donde es necesaria esta cuantificación. A pesar de que la tendencia actual para estos fines es el uso de marcaje simultáneo con Acs monoclonales primarios por la gran operatividad y ahorro de tiempo y trabajo, los Acs IgY, por presentar una gran especificidad y sensibilidad y las ventajas de su fácil obtención en enormes cantidades a partir de las yemas de huevo de las gallinas inmunizadas no deben ser soslayados, sobre todo, cuando la adquisición de los primeros se hace difícil por sus elevados precios en el mercado, como una herramienta universal en esos procedimientos y para el estudio de la expresión de antígenos celulares específicos por Citometría de Flujo en las investigaciones inmunológicas, así como para utilizarlos en otras técnicas como la Microscopia Fluorescente.

Tabla 3. Resultados de los conteos del número total de linfocitos CD4+ por milímetro cúbico de sangre periférica en muestras de tres pacientes dentro de un grupo de clasificación de enfermos SIDA.

Pacientes con SIDA	D	I
1	342	375
2	459	471
3	386	394

Conteo de linfocitos: D) utilizando el marcaje directo con Acs monoclonales primarios; I) utilizando Ac secundario IgY anti IgG de ratón conjugado con FITC.

Nótese que los conteos de linfocitos CD4+ se encontraron dentro del intervalo esperado para ambos casos de reactivos, según el grupo en que fueron clasificados de los pacientes (200 a 500 linfocitos CD4+ por milímetro cúbico de sangre periférica).

La diferencia entre ambos ensayos no fue significativa según la prueba de Mann - Whitney.

Los resultados hasta aquí expuestos no son concluyentes para proponer el uso en la clínica de estos Acs de pollo para esos fines, pero sí muy alentadores e invitan a la realización de ensayos de terreno aumentando el número de muestras para lograr razones convincentes desde el punto de vista estadístico que justifiquen su práctica generalizada.

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Esteban Pérez Fernández de la Editorial CENIC por la inestimable ayuda brindada en la revisión de este documento para que llegara a una feliz edición final.

Al Dpto de Diagnóstico del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" por brindarnos la posibilidad del uso de su equipo FACS para los estudios realizados con Citometría de Flujo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carlander D., Stalberg J. & Larsson A. Chicken antibodies. A clinical chemistry perspective. **Upsala Journal of Medical Science**, **104**, 179, 1999.
2. Gutiérrez E, Mariño E., Chávez T., Vázquez E., Ochoa Z & Schade R. Extraction of a monospecific Coombs reagent from chicken eggs. **Alternative Experimentation (ALTEX)**, **20**, 21, 2003.
3. Gutiérrez E., Garrido R. & Schade R. Human haemoclassification by use of specific egg yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood group antigens. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)** **29**, 717, 2001.
4. Wei-Wei Zhang. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, **8**, 8, 364, 2003.

5. Somowiyarjo S., Sako N. and Nonaka F. Production of avian antibodies to three potyvirus in coturnix quail. **Journal of Virological Methods**, **28**, 125, 1990.
6. Yun-Chien T., Guor-Yuan K., Chung-Li C., Fang-Yu L., Chien-Hsun H., San O., Mei-Huei Y., Chi-Pin W. and Neng C. Evaluation and Validation of a Duck IgY Antibody-based Immunoassay for High-Sensitivity C-reactive Protein: Avian Antibody Application in Clinical Diagnostics. **Clinical Chemistry**, **49**, 5, 810, 2003.
7. Larsson A., Balow R., Lindahl T. & Forsberg P. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution - A Review. **Poultry Science**, **72**, 1807, 1993.
8. Reisher J. & Orr H. Removal of fluorescein isothiocyanate from Sephadex after filtration of conjugated proteins. **Anal. Biochem.**, **26**, 178, 1968.
9. <http://www.molbiol.ox.ac.uk/www/pathology/tig/fitec.html>. Quick and simple method for conjugating mAbs. (Consultado: 15 de octubre de 2002.)
10. FITC conjugation of Antibodies: Brief Protocol. <http://www.drmm.com/abcon/FITC1.html>. (Consultado: 15 de octubre de 2002.)
11. Hommel U., Behn I. & Hauschildt S. IgY Antibodies as Secondary Reagent in FACS Analysis. **ALTEX**, **13**, 40, 1996.
12. Kritatanasak S., Chiampanichayakul S., Kasinrerk W. Production of IgY anti mouse IgG antibodies from chicken eggs. **Asian Pacific Journal Allergy Immunology**, **22**, 61, 2004.
13. Soto C., Alvarado F. La fenotipificación inmunológica (CD3+, CD4+ y CD8+) por Citometría de Flujo en el paciente VIH positivo: presentación gráfica simplificada. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, **14**, 3, 184, 1994.
14. Arjan G., Tibbe B., de Grooth J., Greve P, Liberti G. and Terstappen L. Cell Analysis System Based on Immunomagnetic Cell Selection and Alignment Followed by Immunofluorescent Analysis Using Compact Disk Technologies. **Cytometry**, **43**, 31, 2001.
15. Arjan G., Tibbe B., de Grooth J., Chandra R., Dolan G., and L. Terstappen L. Cell Analysis System Based on Compact Disk Technology. **Cytometry**, **47**, 173, 2002.
16. Watson J.V. Introduction to Flow Cytometry. **Cytometry**, **43**, 55, 2001.
17. Janeway A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. Fifth Edition. Garland Publishing. Taylor and Francis Group. Churchill Livingstone, 2001.
18. Yasuda M., Kajiwara E., Ekino S., Taura Y., Hirota Y., Horiuchi H., Matsuda H., Furusawa S. Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation. **Developmental and Comparative Immunology** (Secondary anti mouse antibody-FITC for researching), **27**, 159, 2003.