

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Aplicaciones experimentales de la inmunoglobulina Y. Su utilidad en diagnóstico

Blanco-Carrero CS^{1,2}, Díaz M¹, Figuera D¹, Palacios A² y Araujo Z².

RESUMEN

Introducción

La inmunoglobulina Y (IgY) es un anticuerpo obtenido de la yema del huevo de aves, no presente en mamíferos. Las diferencias estructurales y de purificación con respecto a la IgG de mamíferos hacen de la IgY un anticuerpo con mayores beneficios para la realización de ensayos con fines diagnósticos.

Objetivo

El objetivo de esta revisión es exponer las aplicaciones experimentales de la IgY en el diagnóstico de enfermedades humanas con el fin de incentivar el interés científico y promover la investigación y desarrollo de métodos que mejoren y faciliten el diagnóstico. Las ventajas del uso de IgY en diagnóstico con respecto al uso de IgG son: la extracción fácil mediante métodos no invasivos, el bajo costo, la presencia de altas concentraciones en la yema, la ausencia de reacciones cruzadas con factores reumatoideos y la no activación del complemento en mamíferos. Con base en esto se han desarrollado distintos ensayos inmunológicos dirigidos al diagnóstico de infecciones por patógenos como: *Trypanosoma cruzi*, *Giardia duodenalis*, *Salmonella enterica*, virus de la Hepatitis A, *Leptospira* spp., virus del Papiloma 16, SARS-CoV, *Escherichia coli* O157:H7 y enteropatógena, *Echinococcus* spp. y *Toxoplasma gondii*; enfermedades como: cáncer de mama y talasemia; y detección de biomarcadores y otras moléculas como: proteína C reactiva y morfina en orina.

Conclusión

La utilidad de la IgY en el diagnóstico de enfermedades humanas es variada y representa una fuente más económica y práctica para llevar a cabo estos procesos, por lo que deben continuarse los estudios con este anticuerpo para el logro de nuevos avances en profilaxis, diagnóstico y tratamiento.

Palabras clave: inmunoglobulina Y (IgY), diagnóstico.

¹Escuela de Medicina "José María Vargas", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

²Laboratorio de Inmunología de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Del Instituto de Biomedicina. Dirección: San Nicolás a Providencia, San José, 4043, 1010-Caracas. E-mail: zaraujogarcia@yahoo.com

Recibido: 10/10/12.
Aceptado: 10/01/14.
Publicado: 02/06/14.

INTRODUCCIÓN

La Inmunoglobulina Y (IgY) es un anticuerpo presente en aves. En estos animales, a diferencia de los mamíferos y seres humanos, sólo se presentan 3 tipos de inmunoglobulinas: la Inmunoglobulina M (IgM) y A (IgA) de características similares a las de los seres humanos, y la IgY que es la equivalente a la Inmunoglobulina G (IgG) en mamíferos [1,2]. Estas inmunoglobulinas viajan desde la sangre hasta el huevo, predominando la IgA y la IgM en la clara del huevo y la IgY en la yema. La transferencia de la IgY a la yema ocurre por un proceso activo donde los ovocitos captan mediante receptores específicos la IgY sérica. Este proceso tarda aproximadamente 5 días en realizarse (Figura 1) [1].

Muchos investigadores han desarrollado modelos de extracción de anticuerpos monoclonales y policlonales de IgY a partir de la yema del huevo con el fin de utilizarlos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, no sólo humanas sino también animales [1,2]. Los primeros experimentos donde se utilizó la IgY fueron realizados en el año 1893 por Klemperer. Se inocularon ratones con anticuerpos IgY extraídos de la yema del huevo de gallinas que fueron previamente inmunizadas con toxinas de *Clostridium tetani*. Los resultados mostraron, que el anticuerpo

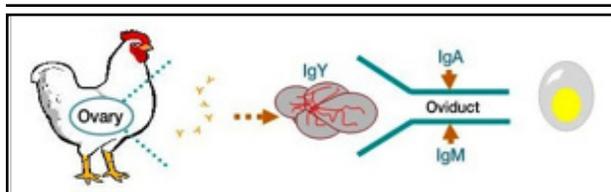


Figura 1. Transferencia de la IgY a la yema del huevo.

Fuente: Igybiotech.com [Internet]. Alberta: IgY Inc. Disponible en: <http://www.igybiotech.com/IgYOVerview/tabid/75/Default.aspx>

ejercía un efecto protector en ratones contra futuras infecciones por *C. tetani* [1]. No fue sino hasta el año 1979 con el crecimiento de la avicultura industrial que estos resultados tomaron importancia debido a la facilidad de obtención de gran cantidad de anticuerpos sin requerir métodos invasivos [1,2].

Actualmente existen kits comerciales creados para realizar una fácil extracción de los anticuerpos de IgY a partir de huevos de gallina [3]. Esto ha beneficiado el estudio de la IgY, por lo que ha sido posible conocer su estructura química, propiedades y aplicaciones en distintos ámbitos [1,2].

El objetivo de esta revisión consiste en exponer las aplicaciones a nivel experimental de la IgY que se han llevado a cabo para el diagnóstico de enfermedades humanas, con el fin de incentivar el interés científico a través de las ventajas que ofrece el uso de esta inmunoglobulina y de promover la investigación y el desarrollo de nuevos métodos que mejoren y faciliten el diagnóstico.

Inmunoglobulina Y

La estructura molecular de la IgY es similar a la de los mamíferos, presentando dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas que contienen dominios constantes y variables. La cadena pesada de la IgY está compuesta por 4 regiones constantes y una variable por lo que su peso molecular es mayor que el de la IgG, ya que esta última sólo presenta 3 regiones constantes (Figura 2) [1,2].

La utilización de los anticuerpos IgY adquiere gran relevancia debido a que:

1. Se pueden obtener de manera no invasiva a partir de la yema de huevo grandes cantidades de la inmunoglobulina en comparación con la IgG extraída de conejo. Esto es de utilidad ya que reduce el número de animales necesarios para obtener una determinada cantidad de anticuerpos, además de que no atenta contra la vida del

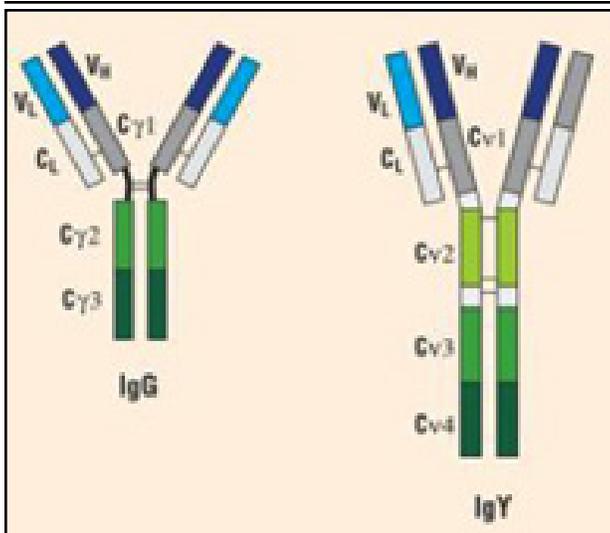


Figura 2. Estructura molecular de la IgG vs IgY.

Fuente: Chiou V. Duck antibodies for IVD applications: a naturally existing analog to mammalian antibodies offers an alternative with broad applications. IVD Technology 2002.

Disponible en: <http://www.ivdtechnology.com/article/naturally-existing-analog-mammalian-antibodies-offers-alternative-broad-applications>.

1. animal [1,2,4].
2. No reacciona en forma cruzada con el factor reumatoideo debido a que no posee los sitios de unión en la región Fc de la cadena pesada, a diferencia de la IgG, por lo que su uso contribuye a reducir los falsos positivos en la medición de algunos reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva [1,2,4].
3. No activan el sistema del complemento en mamíferos [1,2,4].
4. Son más específicos que los anticuerpos IgG para reconocer proteínas humanas, lo cual se debe la mayor distancia filogenética entre aves y humanos [1,2,4].
5. Su purificación es simple y no es costosa [1,2,4].

El proceso de obtención de anticuerpos IgY consta de dos fases: 1. inmunización y 2. extracción y purificación [1-4]. En la fase de

inmunización se inocula a la gallina con el antígeno que se desea estudiar, tomando en cuenta que debe administrarse en combinación con adyuvante completo o incompleto de Freund. Se deben repetir las inmunizaciones en días sucesivos (Por ejemplo: a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 días) y posteriormente recolectar los huevos en diferentes días [4].

Para la extracción y purificación existen diversos métodos que se adaptan a los requerimientos de la investigación, sin embargo, esta fase se basa en 4 principios: remoción total de la albúmina, separación de la membrana de la yema, extracción de lipoproteínas y lípidos (usando un detergente o solvente orgánico como cloroformo) y purificación de la IgY [2]. Para la fase final de purificación existen distintos métodos como precipitación con sulfato de amonio o polietilenglicol y técnicas de cromatografía de afinidad, entre otras [2].

Uno de los kit comerciales de extracción de la IgY describe los siguientes pasos (Figura 3) [3]:

1. Separación de la clara de la yema del huevo (remoción de la albúmina).
2. Mezclado de la yema con un reactivo deslipidante e incubación por dos horas a 4°C (extracción de lipoproteínas y lípidos).
3. Centrifugación de la muestra a 4°C por 15 minutos a 4000x g.
4. Mezclado en iguales cantidades del reactivo precipitante con el sobrenadante que quedó de la centrifugación (purificación de la IgY).
5. Centrifugación a 4°C por 15 minutos a 4000x g descartando el sobrenadante.
6. El precipitado se suspende en PbS en un volumen igual al original de la yema de huevo.

Obteniendo de esta forma una concentración de 4 a 7 mg/ml con una pureza del 90% o superior. La concentración de IgY en la yema de huevo es variable [1,4] y oscila entre 10 y 20



Figura 3. Proceso de obtención y purificación de la IgY.

Fuente: Adaptado de Gallusimmunotech.com [Internet]. North Carolina: Gallus immunotech Inc. Disponible en: <http://www.gallusimmunotech.com/IgY-Purification-Kit-Instructions>

mg/ml, lo que permite extraer hasta 200 mg por yema [4].

Una vez obtenidos los extractos de IgY, se pueden utilizar en distintos experimentos dirigidos hacia la detección del antígeno específico en muestras determinadas empleando técnicas como Western blot o Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA). Bajo estos principios, numerosos investigadores han desarrollado diferentes protocolos con el fin de estudiar la IgY como un anticuerpo capaz de sustituir la IgG para el diagnóstico de patologías humanas. Algunas utilidades de la IgY en el diagnóstico y en la detección de biomarcadores y otras moléculas

se describen a continuación.

IgY en el diagnóstico de infecciones por patógenos

Trypanosoma cruzi

En el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi*, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda realizar pruebas inmunológicas principalmente para la fase crónica. Por carecer de pruebas que tengan un 100% de especificidad y sensibilidad, la OMS propone el empleo de tres métodos inmunológicos para el diagnóstico confirmatorio, dentro de los que se encuentran la hemaglutinación indirecta [HAI], inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA. Las posibilidades de falsos positivos se incrementan debido a la presencia de reacciones cruzadas de *T. cruzi* con otros parásitos como *Leishmania* spp. y *Trypanosoma rangeli*, por lo que para el diagnóstico definitivo se necesitan que sean positivas al menos dos de las tres pruebas [5].

Estudios realizados en el Laboratorio de Protozoología de la Universidad de Carabobo en Venezuela, muestran la producción de anticuerpos IgY en gallinas posterior a la inmunización con epimastigotes de *T. cruzi*. Se compararon varias pruebas de purificación de IgY, cuyo mejor resultado se obtuvo con aquella que consistía en la emulsificación de lípidos con cloroformo y precipitación de IgY con polietilenglicol. Utilizando la técnica de ELISA, se encontró que, se requería de 7 ng de IgY por cada 1 µg de antígeno. Posteriormente, emplearon la técnica de Western blot para evaluar la reactividad de la IgY en presencia de antígenos de epimastigotes de *T. cruzi* encontrando, que una cantidad de 5 µg/ml de IgY poseían 11 antígenos diferentes en 8 µg de proteína total de epimastigotes [4].

Estos resultados muestran que efectivamente se pueden obtener anticuerpos IgY anti-*T. cruzi* y que en un futuro podrían sustituirse a los anticuerpos IgG utilizados en los métodos

convencionales de diagnóstico de *T. cruzi*, con el fin de disminuir la reactividad cruzada y superar la especificidad de las pruebas actuales.

Giardia duodenalis

La giardiosis es una infección intestinal causada por *Giardia duodenalis* (*Giardia lamblia* o *intestinalis*). El diagnóstico de esta enfermedad se realiza tradicionalmente visualizando quistes o trofozoítos del parásito en materia fecal [6]. Sin embargo, sensibilidades mayores a 85% para la detección del parásito por examen de heces al fresco raramente se logra, debido a que la excreción de quistes es variable; en algunos pacientes es constante mientras en otros pueden pasar largos períodos con la infección pero sin excretar tantos quistes. En este caso, es necesario repetir el estudio de heces, hacer un aspirado duodenal o una biopsia del intestino delgado [6,7].

Una alternativa para establecer la presencia de *G. duodenalis* es la detección de antígenos del parásito en heces mediante anticuerpos policlonales anti-*G. duodenalis* [6,8]. Actualmente, existen kits de detección de antígenos para utilizarlos en pruebas de ELISA con una sensibilidad que varía entre 85% a 98% y una especificidad entre 90% a 100% en los cuales se emplean anticuerpos IgG de conejos inmunizados [8].

También, ha sido reportado la producción de anticuerpos policlonales IgY para el diagnóstico de aislamientos provenientes de población colombiana, de *G. duodenalis* con el fin de obtener anticuerpos en gran cantidad con técnicas menos invasivas, mediante el uso de huevos de gallina. Los investigadores desarrollaron un experimento en el que inmunizaron tres gallinas vía intramuscular con trofozoítos del parásito, cuyas inmunizaciones se realizaron a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 días. Luego en cada etapa recogieron los huevos de la inmunización y purificaron la IgY por deslipidación y precipitación por medio de cinco protocolos diferentes. Seguidamente,

realizaron la evaluación inmunoquímica de la IgY anti-*G. duodenalis* mediante inmunodifusión, contraelectroforesis y Western blot [7].

De los 5 protocolos desarrollados, el más sensible al antígeno de *G. duodenalis* fue el protocolo que empleaba dextrán sulfato/cloruro de calcio en la deslipidación y de sulfato de amonio en la precipitación, obteniendo títulos de anticuerpos de hasta 1:32. Los autores sugirieron que la IgY anti-*Giardia* puede emplearse para la realización de inmunoensayos que identifiquen antígenos del parásito en muestras de heces humanas o de animales infectados experimentalmente [8].

Salmonella enterica

El género *Salmonella* spp. incluye a un grupo de bacilos gram negativos que incluye dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Dentro de la especie *S. enterica* existen varios serotipos de los cuales algunos de los más importantes, que causan la mayor parte de las patologías en humanos son *Typhi*, *Typhimurium*, *Paratyphi* y *Enteritidis* [9]. Diversos estudios han demostrado la capacidad de la IgY para detectar antígenos de *S. enterica*, principalmente *serovariedad Enteritidis* y otros, investigadores han encontrado la forma de inhibir in vitro el crecimiento de *Salmonella* spp. y de utilizar estos anticuerpos en la prevención de la colonización de esta bacteria en aves [10-14].

En una de estas investigaciones, se utilizó la IgY de huevos de gallina para aglutinar estos anticuerpos con antígenos de *S. enterica serovar Enteritidis* [14]. Los investigadores tomaron dos grupos de 6 gallinas; un primer grupo (V) se vacunó con dos dosis de una bacteriana contra *S. enterica serovari Enteritidis*, mientras el segundo grupo “testigo” (T) no se vacunó. Una vez purificados estos anticuerpos IgY anti-*Salmonella* se observó la reacción por aglutinación somática y flagelar, entre estos y 357 cepas de *S. enterica*, 10 cepas de diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae* y dos

cepas de la familia *Vibrionaceae*. Los extractos T fueron negativos para todas las cepas y especies; sin embargo, uno de los extractos del grupo V aglutinó a diversas cepas de *Salmonella* con estructura antigénica similar a la cepa vacunal, siendo negativo estos extractos con aquellas salmonelas con antígenos diferentes y otras especies de la familia *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*. Los autores sugirieron que la IgY puede ser empleada para identificar serovariedades de *S. enterica* [14].

Aunque el cultivo es el método diagnóstico tradicional para la identificación y aislamiento de *Salmonella* spp. [11], la confirmación de estas colonias requiere de tiempo y de la utilización de pruebas bioquímicas donde finalmente la mayoría de ellas no resultan ser salmonelas, sino otros géneros relacionados, como *Proteus* o *Citrobacter* [15], por lo que podría evaluarse la posibilidad de realizar inmunoensayos de detección de antígenos en muestras de heces o sangre, en busca de aligerar el proceso de diagnóstico y de crear métodos precisos que caractericen los aislamientos de salmonela hasta el nivel de serovariedad, cobrando importancia de esta forma, el empleo experimental de la IgY [14,15].

Por otro lado, la IgY no sólo serviría como un complemento en el diagnóstico de salmonela en humanos, sino también en aves [10-12], en las cuales, no sólo este anticuerpo ha sido estudiado para el diagnóstico, sino que además se ha investigado sobre la capacidad de la IgY para inhibir el crecimiento *in vitro* de *S. enterica* serovar *Enteritidis* y *Typhimurium* [10-12], así como sobre la ingestión en aves de un preparado con IgY específica junto con probióticos, en los que se encontró que la IgY reducía la colonización por *S. enteritidis* [13]. Esto último es de relevancia ya que representa un punto clave que permitiría disminuir la tasa de transmisión de la enfermedad desde el reservorio hacia los humanos por la ingesta de alimentos contaminados [10-13].

Escherichia coli

Escherichia coli O157:H7 es un serotipo conocido de *E. coli* enterohemorrágica, productora de gastroenteritis en el hombre mediante la liberación de numerosas toxinas que lesionan la mucosa intestinal. Esta variedad de la bacteria fue detectada por primera vez en una intoxicación por hamburguesas en Estados Unidos, en el año 1982. Se caracteriza porque puede sobrevivir en ambientes ácidos que suelen ser lesivos para otros patógenos, como el de los alimentos fermentados, y además el tiempo de supervivencia a temperaturas de refrigeración es mayor que a temperatura ambiente [16]. La enfermedad se transmite por la ingestión de carnes de vaca poco cocidas y en se ha documentado la transmisión mediante la ingestión de leche de vaca no procesada. [16,17]. A nivel mundial, estas infecciones se han hecho más características y relevantes en América del Norte, Europa y la región meridional de América del Sur [16].

Para el aislamiento, identificación y caracterización de serovariedades de *E. coli* se utilizan métodos tradicionales, *in vivo* e *in vitro* y de biología molecular. El aislamiento tradicional consiste en la toma directa de la bacteria en la materia fecal, para luego sembrarla en un medio de Agar Mc Conkey [17]. Los métodos de cultivo empleados para la detección de *E. coli* O157:H7 suelen ser laboriosos; generalmente incluyen un pre-enriquecimiento, seguido por un enriquecimiento selectivo y confirmación bioquímica, lo cual puede tomar días o semanas y además los microorganismos aislados necesitan ser confirmados serológicamente con antisueros O157 y H7 [18].

La identificación de las cepas se hace mediante pruebas bioquímicas en medios como Triple Sugar Iron, Lysine Iron Agar, Motility Indole Ornithine, citrato, sorbitol, mucato, urea, rojo de metilo, malonato y caldo manitol-rojo de fenol. Además, puede reconocerse la cepa O157:H7 por medio de serotipificación, producción

de toxinas, por cuantificación de anticuerpos contra el lipopolisacárido de la pared y por la demostración de factores de virulencia como p0157 [17].

Un estudio en la Universidad de Alberta en Canadá implementó un nuevo método de detección rápido, sensible y específico para el aislamiento de la bacteria, además de barato y fiable. Por medio de un ELISA sándwich se detectaron antígenos de *E. coli* O157:H7 usando anticuerpos tipo IgY de gallina. Estos anticuerpos IgY se obtuvieron a partir de huevos de gallinas inmunizadas con la cepa *E. coli* O157:H7 y se purificaron mediante métodos de dilución en agua y cromatografía con gel de Sephacryl S-300. Los resultados obtenidos indicaron que por medio de ELISA de captura se pueden detectar cantidades tan bajas como 40 UFC/ml de *E. coli* O157: H7 [19].

En el caso de *E. coli* O157:H7 no sólo se ha demostrado que la IgY puede ser utilizada para detectar antígenos de esta bacteria sino que además se ha afirmado la función antibacteriana de la IgY parece ser producto de su interacción con ciertos componentes de la superficie de la bacteria [20].

Otra de las cepas estudiadas para su detección utilizando IgY es *E. coli* enteropatógena específicamente su antígeno BfpA [21]. *E. coli* enteropatógena es uno de los principales organismos responsables de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, caracterizada por evacuaciones acuosas y en algunos casos vómitos y fiebre. Patogenéticamente, la bacteria debe unirse al epitelio intestinal para generar daño y esto se realiza por medio de la unión de fimbrias denominadas BfpA, cuya biogénesis requiere 14 genes codificados en el plásmido de virulencia denominado factor de adherencia o EAF, que permiten la formación de microcolonias [22].

Actualmente para el diagnóstico, la bacteria se aísla de muestras de heces en medios selectivos

y diferenciales como Agar Mc Conkey o de Eosina Azul de Metileno. En casos de sospechas de *E. coli* enteropatógena es necesario técnicas más especializadas, ya que se debe diferenciar desde el punto de vista bioquímico la bacteria aislada porque las distintas serovariedades son indistinguibles entre sí a simple vista. Para ello se utiliza serotipificación, ensayo de adherencia con células HEp-2, prueba de FAS (tinción fluorescente para actina) y técnicas de biología molecular que amplifican genes que codifican a proteínas de virulencia como reacción en cadena de la polimerasa y sondas genéticas, alcanzando en algunos casos especificidades de hasta 100% [22].

Se ha reportado una alternativa en diagnóstico con la utilización de subunidades recombinantes de BfpA que fueron inoculadas a gallinas, produciendo títulos elevados de anticuerpos en los huevos, de tipo IgY. Estos anticuerpos fueron capaces de reconocer proteínas purificadas o recombinantes de BfpA, bloquear la colonización celular in vitro por *E. coli* enteropatógena EAF+, identificar de manera específica *E. coli* enteropatógena EAF+ en heces e inhibir in vitro el crecimiento de *E. coli* EAF+. Es por esto que los autores sugieren, que la IgY anti-BfpA es potencialmente útil como un reactivo específico y de bajo costo inmunobiológico para el despistaje de *E. coli* enteropatógena en heces humanas [21].

Toxoplasma gondii

La toxoplasmosis es causada por la infección con *Toxoplasma gondii*, un parásito intracelular obligado, que puede encontrarse en casi todo el mundo, a excepción de la Antártida y produce una amplia variedad de síndromes clínicos en seres humanos [23].

T. gondii infecta a una gran proporción de la población mundial, pero poco frecuente causa una enfermedad clínicamente significativa, ya que en inmunocompetentes se desarrolla una infección latente. Algunas personas sin embargo, corren un alto riesgo de desarrollar

toxoplasmosis grave o potencialmente mortal, tales como los fetos, recién nacidos y pacientes inmunodeprimidos. De aquí deriva la importancia de un diagnóstico certero y fidedigno de la infección, ya que además, esta enfermedad es reconocida como una causa importante de morbilidad neurológica y de mortalidad entre los pacientes con enfermedad avanzada por el virus de inmunodeficiencia humana. Al igual que otros patógenos oportunistas, *T. gondii* causa infecciones asintomáticas o levemente sintomáticas en huéspedes sanos, pero rápidamente progresivas y mortales en pacientes inmunodeprimidos [23].

El diagnóstico de la infección se realiza mediante numerosas pruebas que incluyen métodos biológicos, serológicos, histológicos y moleculares [24]. Puede hacerse por medio de la demostración del parásito en sangre, fluidos corporales o tejidos, sobre todo en fase aguda aunque generalmente el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos de *T. gondii* en pacientes [23].

Existen múltiples procedimientos serológicos para la detección de anticuerpos, los cuales incluyen la prueba de Sabin-Feldman, la hemaglutinación indirecta, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la aglutinación directa, la prueba de aglutinación del látex, ELISA y la avidéz de IgG. IFI y ELISA se han modificado para detectar la IgM [25,26]; esta inmunoglobulina aparece poco después de la infección, antes que los anticuerpos IgG y desaparecen más rápido que los mismos después de la recuperación [24,25]. La prueba de Sabin y Feldman es altamente específica y sensible para medir anticuerpos de IgG, pero presenta dificultades técnicas y debido a que requiere de parásitos vivos, limitando su empleo a un reducido número de laboratorios especializados [27]. En contraparte, el método de ELISA presenta diversas ventajas sobre las otras pruebas como lo son: el hecho de que

se pueden analizar cantidades de muestras en forma simultánea utilizando equipos simples, posee alta sensibilidad y especificidad lo que la hace una prueba más confiable y detecta tanto infecciones recientes como latentes de toxoplasmosis, mediante la determinación simultánea de anticuerpos IgM e IgG [28].

Hassl et al (1985), con el objetivo de purificar anticuerpos específicos contra el parásito para usarlos en pruebas de ELISA, obtuvieron anticuerpos IgY específicos contra *T. gondii*. En el estudio, se comparó la extracción y purificación de IgY mediante tres métodos: medición de proteínas, filtración de gel e isoelectroenfoque, siendo la técnica más efectiva la filtración en gel que empleaba precipitación con polietilenglicol seguido de un tratamiento con alcohol. Los tres métodos comparados produjeron la misma cantidad de anticuerpos, pero la purificación no fue igual. La especificidad de los anticuerpos de yema se evaluó mediante un ensayo de hemaglutinación indirecta, una prueba de inmunodifusión e inmunoelectroforesis. Se comparó con la especificidad de anticuerpos IgG obtenidos de sueros de conejos hiperinmunizados y se encontraron diferencias en los patrones de precipitación de los anticuerpos IgY e IgG, siendo más específica la IgY [29].

Este experimento describe una forma conveniente y económica para la producción de anticuerpos específicos contra *T. gondii*. Los investigadores concluyeron que la especificidad de la IgY con respecto a la IgG puede ser distinta y alterar la confiabilidad de las pruebas serológicas, por lo que una condición esencial para que se reemplace el uso de anticuerpos IgG debería ser la inmunización de gallinas con antígeno del parásito circulante en sueros de pacientes infectados [29]. Otros investigadores lograron aislar también anticuerpos IgY específicos anti-*T. gondii* mediante el método de ELISA apoyando esto los resultados mostrados por Hassl [30].

Otros patógenos

Otros trabajos publicados con respecto a las aplicaciones de la IgY en el diagnóstico de patógenos se refieren a la detección del coronavirus causante del Síndrome Respiratorio Agudo (SARS-CoV), detección del virus del papiloma 16 tipo L1, detección de *Leptospira* spp., *Echinococcus* spp., y virus de la hepatitis A, entre otros [31-35].

IgY en el diagnóstico de enfermedades

Cáncer de mama

Investigadores del National Institute of Standards and Technology (NIST) en compañía del National Cancer Institute (NCI) y científicos de la firma SAIC en Estados Unidos, desarrollaron un nuevo método, utilizando IgY de gallina, para la detección de una forma agresiva de cáncer de mama que se acompaña con sobreproducción de proteínas HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) [36,37]. El oncogen HER2 codifica una proteína transmembrana de su mismo nombre, con actividad de tirosin-quinasa y cuya porción extracelular es capaz de interactuar con factores de crecimiento. La sobreexpresión de esta proteína genera un aumento en el número de mitosis de las células cancerígenas por lo que le confiere mayor agresividad [38].

El tratamiento de este tipo de cáncer de mama es específico y difiere de aquellos pacientes que no presentan una sobreproducción de esta proteína, además de que se caracteriza porque genera grandes efectos secundarios, en especial a nivel cardiovascular. Por ende, surge la necesidad de detectar las altas concentraciones de la proteína HER2 con el fin de esclarecer qué tipo de cáncer de mama presentan los pacientes [39].

Las pruebas utilizadas actualmente para la detección de esta proteína con anticuerpos IgG de mamíferos pueden ocasionar falsos positivos, por lo que los investigadores del

NIST en busca de soluciones a este problema, estudiaron la reactividad de la IgY ante la proteína HER2 por medio de Western Blot e inmunohistoquímica utilizando en vez de los marcadores fluorescentes convencionales un sistema de marcaje por puntos cuánticos. El estudio demostró que la sensibilidad de la IgY era un 40-50% mayor que la que presentaban los anticuerpos de mamíferos utilizados en las pruebas convencionales, ya que no reaccionaban con otras proteínas humanas que pudiesen dar falsos positivos [36,37].

Otra de las ventajas de utilizar este sistema de detección, es la capacidad de producir con rapidez y a gran escala estos anticuerpos y el marcaje más fidedigno a través de puntos cuánticos que a diferencia de los otros colorantes fluorescentes que han sido empleados, no pierden su color con el tiempo cuando se hacen las preparaciones inmunohistoquímicas. Actualmente, los investigadores del NIST se encuentran desarrollando un material de referencia para estandarizar esta prueba [36,37].

Talasemia

Las talasemias son un grupo de enfermedades caracterizadas por la alteración de la síntesis de una o más cadenas de globina de la hemoglobina (Hb). Las consecuencias hematológicas que esto conlleva consisten en hipocromía del glóbulo rojo y exceso relativo de la cadena desapareada, capaz de generar inclusiones intracelulares dentro de los hematíes que favorece la destrucción celular [40]. Dependiendo de la cantidad de genes afectados, se tienen distintas manifestaciones fenotípicas. En el caso de la supresión funcional de ambos pares de genes que codifican para las cadenas alfa de Hb, se desarrolla hidrops fetal o Hb de Bart, condición incompatible con la vida extrauterina [41].

Actualmente el diagnóstico se realiza por medio de niveles de Hb, conteo de reticulocitos, volumen corpuscular medio (VCM),

concentración de hemoglobina media (HCM), examen de sangre periférica y electroforesis de Hb, además de pruebas genéticas como ADN recombinante, reacción en cadena de la polimerasa y anticuerpos monoclonales [41].

En estudios realizados por científicos del Department of Biochemistry, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University en Tailandia, se utilizó la IgY para el diagnóstico de talasemia por medio de ELISA. En un inicio, se tomó el hemolizado purificado de un paciente con Hb de Bart o alfa-talasemia y fue utilizado para inmunizar a gallinas a las que posteriormente se le extrajo IgY de sus huevos. El anticuerpo IgY producido reaccionó con la cadena gamma de la globina, Hb de Bart, Hb F, con hemolizado normal de cordón y con Hb de Bart hidrops fetalis (Hb Bart más Portland) y en menor grado con la globina beta, la Hb A, Hb A2 y hemolizado en adultos, siendo negativo para la globina alfa. Posteriormente, estos investigadores purificaron aún más la IgY por cromatografía por afinidad utilizando CNBr-Sefarosa unida a Hb A, de la cual se obtuvo una IgY que reaccionaba sólo con Hb de Bart, Hb F y cadenas gamma de la globina, siendo negativa para Hb A y Hb A2. [42,43]. Los resultados mostraron que, de las 336 muestras de hemolizados de individuos con diferentes genotipos y fenotipos de talasemia y de individuos sanos, se encontró alta reactividad contra Hb F y Hb de Bart y baja contra los normales; confirmando de esta forma, la especificidad de la IgY obtenida ante la Hb F y Hb de Bart [42].

Otros investigadores de la misma universidad probaron el uso de ELISA de captura con anticuerpos monoclonales de ratón contra Hb de Bart como anticuerpo de inmunocaptura y la IgY contra cadenas gamma de globina como anticuerpo de detección; obtuvieron para la α -talasemia una especificidad de 71% y sensibilidad de 100% y en otros tipos de talasemia, del 98% [44]. Estos estudios indican

que la IgY no sólo tiene ventajas a nivel de producción y rendimiento de anticuerpos sino es capaz de proporcionar pruebas de diagnóstico más rápidas y específicas que las convencionales [42-44].

IgY en la detección de biomarcadores y otras moléculas

Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR) es sintetizada en el hígado y se eleva en forma temprana en procesos inflamatorios e infecciosos como sepsis, meningitis, pancreatitis, entre otros, por lo que funciona como un marcador de la fase inflamatoria aguda [45]. La inflamación de las arterias que se observa en las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis o la enfermedad arterial coronaria, genera también de forma progresiva aumento en los niveles de PCR. En estos casos, es necesaria la determinación de PCR de alta sensibilidad (hs-CRP) que independientemente del nivel de lípidos y de otros biomarcadores de la inflamación, ha demostrado ser un marcador de riesgo de enfermedades cardiovasculares, que se eleva de manera precoz, aún en ausencia de síntomas o enfermedad precedente [46,47]. Sin embargo, muchas veces la determinación de PCR y de hs-CRP puede dar falsos positivos debido a que los anticuerpos usados en los métodos convencionales (IgG de mamíferos) presentan reacciones cruzadas con el factor reumatoideo, lo que conlleva a establecer en ocasiones falsos diagnósticos y tratamientos incorrectos [46,48].

Se han realizado estudios utilizando la IgY como anticuerpo en inmunoensayos para determinar PCR en sueros humanos y de conejos. Cuando en estas investigaciones comparaban el uso de IgY en relación a la IgG, se observó una mayor especificidad por parte de la IgY que eliminó el número de falsos positivos [48,49].

En relación a la determinación de hs-

PCR, ya existe actualmente un kit comercial desarrollado en Taiwán llamado CRPex-HS C-Reactive Protein LIT assay®, el cual permite la detección de concentraciones en suero de esta proteína utilizando IgY obtenida de pato. Un estudio comparativo desarrollado en el mismo país, evaluó y validó la eficacia de esta prueba, comprobándose la reducción en el número de falsos positivos que ocurren con las pruebas convencionales que utilizan anticuerpos de mamíferos [46].

Morfina en orina

La morfina es un alcaloide derivado del opio, agonista de los receptores opioides, dichos fármacos se utilizan principalmente para inducir anestesia, analgesia, tratamiento de la diarrea, de las tos crónica, del dolor isquémico miocárdico y de la disnea asociada a disfunción ventricular izquierda aguda y edema pulmonar [50]. La sobredosificación aguda con la morfina se puede manifestar en los pacientes por sudoración profusa, miosis, depresión respiratoria, somnolencia que progresa al estupor o el coma, flacidez muscular, y en algunos casos edema pulmonar, bradicardia e hipotensión hasta progresar a la muerte [50,51].

El diagnóstico de una intoxicación por morfina, en las salas de emergencia, generalmente es clínico, sin embargo es importante confirmarlo con pruebas de laboratorio y establecer diagnósticos diferenciales (toxicidad con otros fármacos, enfermedad cerebrovascular del tronco encefálico, trastornos hidroelectrolíticos, enfermedad ulceropéptica, entre otros) debido a que en base a ello se decidirá un tratamiento específico. El diagnóstico a nivel de laboratorio se hace por medición de la droga en muestras de orina principalmente a través de pruebas como: cromatografía en capa fina, la cual tiene poca sensibilidad; ELISA y radioinmunoensayos, que tienen más sensibilidad pero son menos específicos porque existen relaciones cruzadas con otras moléculas; y por cromatografía

gas-líquido y cromatografía de gas por espectrometría de masas, que son muy sensibles y específicas pero son laboriosas y costosas [51]. Un ensayo a base de tira inmunocromatográfica que utiliza anticuerpos IgY fue desarrollado para la detección rápida de morfina en muestras de orina. El anticuerpo IgY con especificidad para la morfina fue generado mediante la inmunización de gallinas con la proteína de morfina monoacetil conjugada. Se marcó el anticuerpo por nanopartículas de oro y se utilizó como inmunosonda para la detección visual de la morfina con las varillas o tiras en muestras de orina. Las tiras fueron hechas usando tres membranas: una almohadilla de aplicación hecha de fibra de vidrio, una línea de prueba que genera una señal sobre la membrana de nitrocelulosa (zona de detección) y una membrana de celulosa usada como una almohadilla de absorción [52].

Cuando se introducen las tiras dentro de la orina, en el caso de la morfina o sus análogos, se forma un complejo antígeno-anticuerpo que luego cae por el flujo causado por la acción capilar en la línea de prueba y se genera una señal de color que luego es medida por un detector. Los investigadores midieron la eficacia de esta técnica y observaron que el rango de detección de morfina era entre 1 a 1000 ng/ml, siendo el límite de detección 2,5 ng/ml. De todo esto, concluyeron que la producción de estas tiras representaría una herramienta de alta sensibilidad para la determinación rápida de opioides en orina [52].

CONCLUSIONES

La IgY ha mostrado ser útil en múltiples pruebas como: ELISA, Western blots, radioinmunoensayos, citometría de flujo, entre otros; donde estos anticuerpos provenientes de gallinas inmunizadas permiten la identificación de ciertos antígenos presentes en algunos patógenos. La variabilidad en su uso se evidencia en las pruebas experimentales que

han permitido la detección de parásitos como: *T. cruzi*, *G. duodenalis*, *T. gondii*, *Echinococcus* spp.; bacterias como: serovariedades de *S. enterica*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* enteropatógena, *Leptospira* spp.; virus como: coronavirus-SARS, hepatitis A, virus del papiloma 16 tipo L1; moléculas y biomarcadores como: morfina y proteína C reactiva simple y de alta sensibilidad, así como de enfermedades genéticas como la talasemia y neoplásicas como el cáncer de mama.

Las ventajas del empleo de la IgY en el diagnóstico con respecto a la IgG están demostradas en la mayoría de las investigaciones realizadas, esto debido en parte a la puesta en evidencia de la mayor especificidad en el

reconocimiento de antígenos, ausencia de reacciones cruzadas con el factor reumatoideo, ausencia de reacción con el complemento de mamíferos y facilidad de extracción y purificación que aminoran los costos de mantenimiento de animales.

Finalmente, en vista de que la IgY de gallina ha mostrado tener una utilidad variada, además de ser económica su obtención, se deben continuar los estudios para evaluar su contribución en la mejora del diagnóstico de enfermedades en humanos y animales y lograr nuevos avances no sólo en esta área, sino además en la profilaxis y el tratamiento de las mismas.

Referencias bibliográficas

1. Chacana PA, Terzolo HR, Gutiérrez-Calzado E, Schade R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. *Rev Med Vet* 2004;85(5):179-89
2. Alarcón C, Hurtado H, Castellanos J. Anticuerpos aviares: alternativa en producción y diagnóstico. *Biomédica* 2000;20(4):338-43.
3. Gallusimmunotech.com [Internet]. North Carolina: Gallus immunotech Inc. [citado 2011 mayo 26]. Disponible en: <http://www.gallusimmunotech.com/IgY-Purification-Kit-Instructions>
4. Contreras V, De Lima A, Navarro M, Arteaga R, Graterol D, Cabello L, et al. Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas con epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Salus Online* 2005; 9(2):33-44
5. World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Tech Rep Ser. 2nd report. 2002; 905.
6. Weller PF. Infecciones intestinales por protozoos y tricomonosis In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al, editors. *Harrison: principios de medicina interna*. 2da ed. México: Mc Graw Hill; 2009. p. 1311-13.
7. García DA, Nicholls RS, Arévalo A, Torres O, Duque S. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. *Biomédica* 2005; 25: 461-63.
8. Duque S, Nicholl RS, Arévalo A, Guerrero R, Montenegro S, James MA. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in human fecal eluates by enzymelinked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:1165-8.
9. Katime AE. Reacción de Widal - interpretación clínica. *Rev Panam Infectol* 2006; 8(2):40-4.
10. Nelson T, Sheppard K. Salmonella IgY detection. *Canadian Poultry Magazine* 2009 Abr; sec PIC update:24-5
11. Cigoy L, Chacana P, Terzolo H. Inhibición del desarrollo in vitro de *Salmonella enteritidis* mediante anticuerpos de yema de huevo (IgY). 6º Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica; 2009 Ago 14-15: Mar de Plata, Argentina.
12. Rahimi S, Shiraz ZM, Salehi TZ, Karimi Mohammad A, Grimes JL. Prevention of *Salmonella* infection in poultry by specific egg-derived antibody. *International Journal of Poultry Science* 2007;6(4):230-235.
13. Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K, Sim JS. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poult Sci* 2002;81(5):632-41.
14. Terzolo HR, Sandoval VE, Caffer MI, Terragno R, Alcain A. Aglutinación de inmunoglobulinas de yema de huevo de gallina (IgY) contra *Salmonella enterica* serovariedad. *Rev argent microbiol* 1998;30(2):84-92
15. Velilla A, Terzolo H, Feingold S. Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella*: PCR aplicada a la avicultura y a la microbiología de los alimentos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 2004 Abr [citado 2011 may 22]. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/otras/aves/salmonella.htm>
16. Sánchez N. *Escherichia coli* O157:H7. Aspectos generales. Reporte Técnico de Vigilancia 1997;2(9).
17. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méx* 2002;44(5):464-75.
18. Luigi-Sandoval T. Aplicación de la técnica de separación inmunomagnética para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de leche. *Rev Soc Ven Microbiol* 2004;24(1-2):50-8.
19. Sunwoo HH, Wang WW, Sim JS. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using chicken immunoglobulin Y. *Immunol Lett* 2006;106(2):191-3.
20. Sunwoo HH, Lee EN, Menninen K, Suresh MR, Sim JS. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science* 2002;67(4):1486-94.
21. De Almeida CM, Quintana-Flores VM, Medina-Acosta E, Schrieffer A, Barral-Netto M, Dias da Silva W. Egg yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic *Escherichia coli*. *Scand J Immunol*

- 2003;57(6):573-82.
22. Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez Javier, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud pública Méx* 2007;49(5):376-86.
 23. Hőkelek M. *Toxoplasmosis* [Internet]. New York: Medscape References; c1994-2011 [actualizado 2009 Ene 27; citado 2011 May 10]. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/229969-overview>
 24. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002;8(10):634-40.
 25. Remington JS, McLeod R, Desmonts G. *Toxoplasmosis In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious disease of the fetus and newborn infant. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995. p. 140-267.*
 26. Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 1970;167(3919):893-6.
 27. Gómez FR. Determinación de la seroprevalencia de la toxoplasmosis en alpacas y llamas en la Estación Experimental Inia-Puno [Internet]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002 [citado 2011 May 10]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Salud/Gomez_O_F/Rev_Lit.htm
 28. Suárez F, Andrade H, Galisteo A, Miguel O. Concordancia de las pruebas de ELISA y hemaglutinación indirecta en el diagnóstico de la Toxoplasmosis porcina. *Rev investig vet* 2002;13(1):84-6.
 29. Hassl A, Aspöck H, Flamm H. Comparative studies on the purity and specificity of yolk immunoglobulin Y isolated from eggs laid by hens immunized with *Toxoplasma gondii* antigen. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 1987;267(2):247-53.
 30. Yang T, Li S, Pan H, He S. Production and identification of chicken egg yolk antibodies against *Toxoplasma gondii*. *Chinese Journal of Zoonoses* 2001;(5).
 31. Kammila S, Das D, Bhatnagar PK, Sunwoo HH, Zayas-Zamora G, King M, et al. A rapid point of care immunoswab assay for SARS-CoV detection. *J Virol Methods* 2008;152(1-2):77-84.
 32. Yang J, Zhang MJ, Qiang L, Su BS, Wang YL, Si LS. Preparation and activity detection of chicken egg yolk IgY antibody against human papillomavirus 16 type L1 main capsid protein. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2008;28(3):324-7.
 33. Vasconcellos FA, Coutinho ML, da Silva EF, Fernandes CP, Monte LG, Seyffert N, et al. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira* spp. in human blood serum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010;104(4):259-64.
 34. Gottstein B, Hemmeler E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Z Parasitenkd* 1985;71(2):273-6.
 35. de Paula VS, da Silva Ados S, de Vasconcelos GA, Iff ET, Silva ME, Kappel LA, et al. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *J Virol Methods* 2011;171(1):102-6.
 36. Newman M. NIST, NCI, SAIC partner on new method for detecting HER2 breast cancer. National Institute of Standards and Technology. 2008 Feb 19 [citado 2011 May 15]. Disponible en: http://www.nist.gov/public_affairs/techbeat/tb2008_0219.htm#her2
 37. Xiao Y, Gao X, Gannot G, Emmert-Buck MR, Srivastava S, Wagner PD, et al. Quantitation of HER2 and telomerase biomarkers in solid tumors with IgY antibodies and nanocrystal detection. *International Journal of Cancer* 2008;122(10):2178-86.
 38. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA: The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986;319(6050):226-30
 39. Herceptin.com [Internet]. California: Genentech USA, Inc.; c2011 [citado 2011 May 15]. Disponible en: <http://www.herceptin.com/>.
 40. Robbins S, Cotran R, Kumar V, Collins T. *Patología Estructural y Funcional*. 6ta ed. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2000. p. 645.
 41. Bleibel SA, Leonard RJ, Jones-Crawford JL, Kutlar A, Hendricks LK. *Thalassemia, Alpha* [Internet]. New York: Medscape References; c1994-2011 [actualizado 2009 Ago 26; citado 2011 Abr 27]. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/206397-overview#a0104>
 42. Jintaridith P, Srisomsap C, Vichittumaros K, Kalpravidh RW, Winichagoon P, Fucharoen S, Jisnusun Svasti MR, Kasinrerak W. Chicken egg yolk antibodies specific for the gamma chain of human hemoglobin for diagnosis of thalassemia. *Int J Hematol* 2006 Jun;83(5):408-14.
 43. Jintaridith P, Kalpravidh RW, Srisomsap C, Fucharoen S, Jisnusun MR, Kasinrerak M. Production of anti-hemoglobin Bart's antibody for thalassemia diagnosis from chicken egg [Internet]. Bangkok: ThaiScience; 2003 [citado 2011 Abr 27]. Disponible en: <http://www.thaiscience.info>
 44. Jintaridith P. Production of chicken IgY antibodies specific for hemoglobin gamma-chain and mouse monoclonal antibodies specific for hemoglobin Barts, for thalassemia diagnosis [Internet]. Bangkok: Mahidol University and Knowledge Center; 2005 [citado 2011 Abr 27]. Disponible en: <http://www.li.mahidol.ac.th/thesis/2548/cd386/4337489.pdf>
 45. Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *J Emerg Med* 1999;17(6):1019-25
 46. Tsen YC, Kao GY, Chang CL, Lai FY, Huang CH, Ouyang S, et al. Evaluation and validation of a duck IgY antibody-based immunoassay for high-sensitivity C-reactive protein: avian antibody application in clinical diagnostics. *Clin Chem* 2003 May;49(5):810-3.
 47. Comité Científico. Proteína C reactiva de alta sensibilidad, como prevención de enfermedades cardiovasculares [Internet]. México: Quest Diagnostics, Inc; c2000-2007 [citado 2011 May 20]. Boletín N°2. Disponible en: <http://www.questdiagnostics.com.mx/pdf/questinforma/pcr3.pdf>
 48. Rieger A, Burger W, Hiepe F, Shade R. Determination of human serum CRP using a chicken egg yolk antibody (IgY) to avoid interferences with rheumatoid factors. Comparison with mammalian antibodies. *Altex* 1996;13 Supl:57-61.
 49. Díaz L, Giralduino I, Choy K, la Rosa E, Vega F. Evaluación de anticuerpos anti-proteína C reactiva obtenidos en gallina en un ensayo de látex aglutinación. *Rev Cubana Farm* 2003;37(3):1.
 50. Martínez-Chacon JL. *Morfina-Farmacología* [Internet]. Madrid: La agenda del anestesiólogo. 1999 - [citado 2011 May 23]. Disponible en: <http://www.uam.es/departamentos/medicina/anesnet/agenda/farmacologia/morfina.htm>
 51. Preda A. Opioid abuse [Internet]. New York: Medscape References; c1994-2011 [actualizado 2011 May 17; citado 2011 May 23]. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/287790-clinical#a0217>
 52. Gandhi S, Caplash N, Sharma P, Raman Suri C. Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. *Biosens bioelectron* 2009;25(2):502-5.