



Revisión preliminar

Anticuerpos IgY para la identificación de *Escherichia coli* enteropatógena: avance de resultados

Rosabel González^{1*} , Yordi Boher¹ .

¹ Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina MPPS, Caracas, Venezuela.

Resumen

Escherichia coli enteropatógena (ECEP) es uno de los principales agentes causales de diarrea infantil. En Venezuela, los estudios muestran una importante prevalencia de la ECEP, pero, no se cuenta con técnicas de diagnóstico sensibles y rápidas. En este aspecto, la utilización de la inmunoglobulina IgY que se halla en la yema de los huevos de gallina es una alternativa. El Laboratorio de Enfermedades Entéricas de la Infancia del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit desarrolla un proyecto de investigación con el objetivo de producir anticuerpos IgY que permitan diagnosticar ECEP *in vitro*. El presente trabajo muestra un avance de los resultados generados al cumplirse un año de ejecución del proyecto. Con el fin de obtener antígenos que generen una respuesta IgY-específica, se determinó en 12 cepas de ECEP la presencia de los siguientes mecanismos de patogenicidad: estructura antigénica "O" completa, producción de biopelículas y presencia del pilis IV. Además, se estandarizó la metodología de extracción de las proteínas totales (precipitación por Polietilenglicol) a partir de yemas de huevos de gallinas no inmunizadas, obteniéndose concentraciones entre 117,9 a 168,6 mg de proteínas totales por yema, lo que constituye un alto rendimiento. La caracterización de las cepas y la estandarización de la metodología de extracción de las proteínas asegura la obtención de una importante concentración de IgY anti-ECEP específica. De esta manera, se dan los pasos iniciales para dar respuesta a la problemática que genera la dificultad del diagnóstico de enfermedades endémicas como las diarreas bacterianas.

Palabras clave: ECEP; diarrea aguda; inmunoglobulina; biopelícula; pilis.



CIENCIA EN REVOLUCIÓN

Recibido: 15 de mayo del 2023

Aceptado: 8 de junio del 2023

Publicado: 12 de septiembre del 2023

Conflicto de intereses: los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

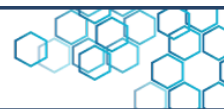
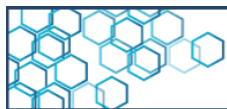
DOI: <https://www.doi.org/10.5281/zenodo.8335697>

***Autor para correspondencia:**

Rosabel González

e-mail:

gonzalezrosabel58@gmail.com



Preliminary review

IgY antibodies to identify enteropathogenic *Escherichia coli*: a preview of results

Rosabel González^{1*} , Yordi Boher¹ .

¹ Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina MPPS, Caracas, Venezuela.

Abstract

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the main causative agents of diarrhea in infants. In Venezuela, studies show a significant prevalence of EPEC, but there are no sensitive and rapid diagnostic techniques. In this regard, the use of IgY immunoglobulin found in the yolk of chicken eggs is an alternative. The Laboratory of Enfermedades Entéricas de la Infancia - Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit is developing a research project to produce IgY antibodies that allow EPEC diagnosed in vitro. The present work shows an advance of the results generated after one year of execution of the project. To obtain antigens that generate an IgY-specific response, the presence of pathogenicity mechanisms was determined in 12 EPEC strains: complete “O” antigenic structure, biofilm production, and presence of pilis IV. In addition, the total protein extraction methodology (precipitation by Polyethylene glycol) from non-immunized hen egg yolks was standardized, obtaining concentrations between 117.9 and 168.6 mg of total protein per yolk, which constitutes a high performance. The characterization of the strains and the standardization of the protein extraction methodology ensures that a significant concentration of specific anti-EPEC IgY is obtained. In this way, the initial steps are taken to respond to the problems generated by the difficulty of diagnosing endemic diseases such as bacterial diarrhea.

Keywords: EPEC; Acute diarrhea; immunoglobulin; biofilm; pilis.



Received: May 15, 2023

Accepted: June 8, 2023

Published: September 12, 2023

Conflict of interest: the authors declare that there are no conflicts of interest.

DOI: <https://www.doi.org/10.5281/zenodo.8335697>

***Corresponding author:**

Rosabel González

e-mail:

gonzalezrosabel58@gmail.com

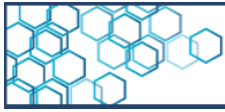


1. Introducción

La diarrea aguda infantil continúa siendo la segunda causa de muerte en la población menor de 5 años en el mundo; anualmente ocurren 1.569.600 muertes por esta infección, de las cuales el 34 % (533.800 eventos) corresponde a la población menor de 5 años [1]. De forma alarmante, el 80 % de las defunciones ocurren en los países más pobres del planeta, en donde los niños menores de tres años sufren en promedio tres episodios de diarrea al año [2].

La diarrea aguda generalmente se presenta acompañada de fiebre, vómitos y dolor abdominal, tiene una duración menor de 15 días y usualmente es causada por uno o varios agentes infecciosos (bacterias, virus o parásitos). Pero, los estudios han demostrado que la frecuencia de cada patógeno varía según el grupo de edad, la región y el grado de desarrollo del país [3]. Estas diferencias obligan a realizar trabajos para conocer en cada país o región los agentes más frecuentes que causan diarrea aguda.

Escherichia coli enteropatógena (ECEP), es una de las principales enterobacterias que causan diarrea aguda infantil, produciendo cuadros diarreicos de moderados a graves y asociándose a tasas importantes hospitalización y muerte [4-5]. ECEP posee una serie de mecanismos de patogenicidad característicos, como son la presencia de antígenos “O” específicos que forman parte de los lipopolisacáridos de la membrana externa bacteriana, la adhesina intimina localizada igualmente en la pared externa y que permite la adhesión final de la ECEP al enterocito y el pilis tipo IV, el cual está implicado en la

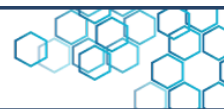
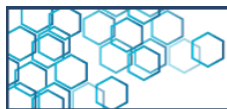


formación de microcolonias sobre las células infectadas y de biopelículas [6].

En Venezuela, son pocos los estudios que reportan las frecuencias de los principales microorganismos causales de diarrea infantil [7-9]. Sin embargo, es importante resaltar que, en dos de estos trabajos realizados en diferentes regiones del país, se observan frecuencias distintas para la ECEP; 8 % en Caracas y 18 % en el estado Sucre, lo que demuestra su importancia y la variabilidad en la incidencia del patógeno según las regiones.

A las problemáticas descritas (severidad del cuadro diarreico producido por ECEP y la variabilidad en la frecuencia del patógeno según las regiones) se anexa la dificultad para adquirir las distintas pruebas para el diagnóstico, debido en gran medida a que son productos importados. Estas problemáticas justifican con creces la búsqueda de alternativas que permitan la adecuada y oportuna identificación del enteropatógeno.

En este aspecto, la utilización de la inmunoglobulina IgY, principal anticuerpo sérico de las gallinas y que se haya en la yema de huevo del ave, es una alternativa ética y de bajo costo para la producción de anticuerpos específicos que pueden ser utilizados para identificación de los enteropatógenos *in vitro*. La producción de anticuerpos en pollos es mucho menos invasiva, ya que solo requiere de la recolección de huevos, en lugar de la toma de sangre, y por lo tanto es menos estresante para el animal [4]. Además, garantiza niveles de producción y especificidad importantes; una gallina inmunizada produce en promedio 300 huevos al año de los que se extraen entre 100 a 150 mg de IgY por yema con una especificidad del 5 al 10 % contra el antígeno



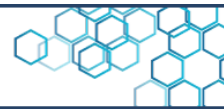
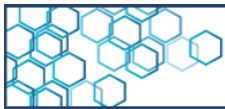
inoculado [10]. De esta forma, la aplicación de la tecnología IgY para la producción de anticuerpos que permitan la identificación de los principales enteropatógenos cumple el principio de las tres R; Reducir (el número de animales utilizados), Reemplazar (se sustituye el sangrado por la simple recolección de huevos) y Refinar (minimiza el estrés a los animales).

Por estos motivos, el laboratorio de Enfermedades Entéricas de la Infancia del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit (SAIB) y gracias al apoyo del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) a través del proyecto “Productos biológicos para el diagnóstico de enfermedades endémicas en Venezuela”, aprobado en el mes de marzo del 2022, se planteó el objetivo de producir anticuerpos IgY específicos frente a cepas de ECEP que permitan diagnosticar este enteropatógenos *in vitro*. El presente trabajo muestra los resultados generados al cumplirse el segundo semestre de ejecución del proyecto mencionado. Se describen y analizan los pasos seguidos, los resultados obtenidos al caracterizar las cepas que se inocularan en la gallina (inmunógenos) y la estandarización de la extracción de las proteínas totales a partir de yemas de huevos de gallinas no inmunizadas.

2. Metodología

2.1 Obtención de los antígenos de ECEP

2.1.1 Cepas utilizadas

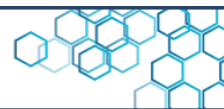
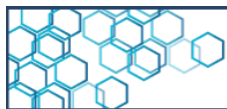


Para la producción de los antígenos se utilizaron catorce (14) cepas de referencia de ECEP pertenecientes a distintos serogrupos (O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O158, O26, O55, O86 y O88) las cuales fueron suministradas por el Instituto Adolfo Lutz de Sao Paulo, Brasil y que forman parte del cepario del Laboratorio de Enfermedades Entéricas de la Infancia del SAIB.

Estas cepas se caracterizaron para asegurar que expresaban sus principales mecanismos de patogenicidad. De esta forma, luego de ser identificadas mediante pruebas bioquímicas, se evaluó la expresión del fenotipo liso de las colonias, que no autoaglutinaran frente a solución salina, que fueran capaces de producir biopelículas y que expresaran el pilis tipo IV.

2.1.2 Reactivación de las cepas y prueba del fenotipo liso.

Las 14 cepas fueron inoculadas individualmente en tubos de caldo nutritivo (Nutrient Broth BD BBL) y luego incubadas a 37 °C en agitación por 18 horas. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a sembrar una asada del cultivo de cada tubo en placas de Petri con agar nutritivo (Nutrient Agar BD BBL), la siembra se realizó por estrías en superficie y luego fueron incubadas a 37 °C por 18 horas. Cumplido el tiempo de incubación, las colonias bacterianas se observaron bajo lupa estereoscópica (KYOWA OPTICAL Se. L) y se seleccionaron de cada

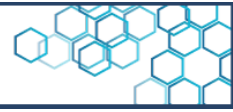
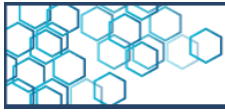


placa 5 colonias que presentaran una morfología de superficie lisa, convexa, bordes regulares, traslúcidas y brillantes.

Las colonias seleccionadas se inocularon en tubos con Agar Nutritivo (Nutrient Agar BD BBL) y se cultivaron a 37 °C por 18 horas. A partir del crecimiento de estos tubos, se realizaron las pruebas bioquímicas respectivas según técnicas descritas [11] y las pruebas de autoaglutinación con solución salina al 2 %. Las cepas que no autoaglutinaron se guardaron para realizar las pruebas siguientes y las que autoaglutinaron fueron descartadas, ya que son consideradas rugosas [12]. De esta forma, se aseguró que las bacterias expresaran una estructura antigénica somática “O” completa.

2.1.3 Capacidad de producción de biopelículas

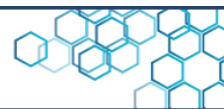
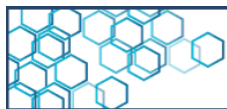
La capacidad de producción de biopelículas de las cepas de ECEP fue evidenciada según metodología descrita [13], con algunas modificaciones: las cepas seleccionadas se cultivaron a 37 °C, toda la noche en caldo nutritivo (Nutrient Broth BD BBL) y en condiciones estáticas. A partir de este crecimiento se realizó una dilución 1:10 de cada cepa y se colocaron 2 cc de la misma en placas de 6 pozos (Costar TM) que contenían cubreobjetos de vidrio estériles (la prueba se realizó por duplicado para cada cepa y el control). Estas placas fueron incubadas a 37 °C hasta cumplir dos horas. Transcurrido el tiempo, se extrajeron los discos, se lavaron bien con solución salina (0,85 %), se fijaron con metanol por 15 minutos y se tiñeron con solución de Giemsa por 20 minutos para luego observarlas y fotografiarlas al



microscopio (NIKON). Como control negativo se utilizó la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 35218 no formadora de biopelículas.

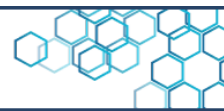
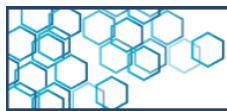
2.1.4 Evidencia del pilis tipo IV

Simultáneo a la prueba de producción de biopelículas se realizó el ensayo para evidenciar la presencia del pilis tipo IV. Las cepas se crecieron a 37 °C toda la noche en caldo nutritivo (Nutrient Broth BD BBL) más manosa al 1 %. A partir de este crecimiento se realizaron diluciones 1:10 en caldo nutritivo más manosa al 1 % y se colocaron 2 cc de esta dilución en las placas de 6 pozos (Costar TM) que ya contenían los cubreobjetos estériles (la prueba se realizó por duplicado para cada cepa y el control). A partir de este punto se siguieron todos los pasos descritos para la producción de biopelículas. Como control negativo se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC 35218. En este ensayo, la utilización de manosa es básica debido a que el pilis tipo IV, el cual media la adherencia inicial de la ECEP al enterocito, es resistente a este azúcar, contrario al resto de los pilis bacterianos que son bloqueados por la manosa [14], de esta manera, se garantizó que la adherencia observada se debía mayormente a la expresión del pilis tipo IV.



2.1.5 Cepas utilizadas

Después de comprobar que las cepas de ECEP presentaban fenotipo liso, que eran capaces de producir biopelículas y que expresaban el pilis tipo IV, se procedió a sembrar las cepas en caldo nutritivo y se incubaron a 37 °C con agitación por 24 horas. Luego cada tubo con el crecimiento bacteriano fue decantado sobre frascos Roux que contenían aproximadamente 120 mL de agar nutritivo y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Las bacterias se recogieron de la superficie del agar con 10 mL de solución salina (0,85 % p/v) formolada (0,5 % v/v) y guardadas a 4 °C por 72 horas para que el formol inactivara las bacterias. Cumplido el tiempo se realizó la prueba de esterilidad con el fin de asegurar la muerte bacteriana por el formol. Para esto, se sembraron 200 µL de la suspensión en caldo nutritivo a 37 °C con agitación por 24 horas. Luego se tomaron tres asadas del caldo cultivado y se sembraron en agar nutritivo, incubándose a 37 °C por 48 horas. Los cultivos negativos fueron lavados 4 veces con solución salina al 0,85 %, centrifugados en una microcentrífuga a 14.000 rpm y los sedimentos (antígenos) guardados en alícuotas a 4°C.

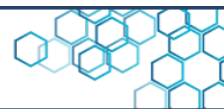
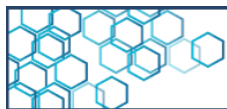


2.2 Estandarización de la metodología de extracción de proteínas totales a partir de la yema de huevo de gallinas ponedoras Isa Brown

En este ensayo se utilizó el volumen de yema obtenido de dos huevos de gallinas ponedoras Isa Brown sanas y sin inocular. El volumen de yema de cada huevo fue de 15 mL, los cuales fueron procesados por separado.

La extracción se realizó mediante precipitación con Polietilenglicol PEG-6000 (Polyethylene glycol 6000, Sigma-Aldrich), según protocolo descrito [15]. Pasos seguidos:

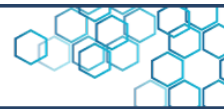
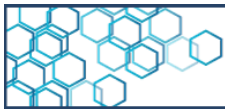
1. Se rompió la cáscara de huevo cuidadosamente y se separó la yema de la clara para eliminar la mayor cantidad de clara de huevo posible.
2. Se transfirió la yema a un papel de filtro para eliminar la clara de huevo restante y para cortar la membrana de la yema con una lanceta estéril. Se colocó la yema en un tubo de centrifuga (tubo Falcon™) de 50 mL y se registró el volumen (V1).
3. Se mezcló la yema con el doble del volumen (2V1) de Buffer Fosfato Salino 1x (PBS) y luego se añadió PEG 6000 3,5 % (en gramos, pulverizado) según el volumen total (2V1).
4. Se homogenizó la mezcla en un vortex (mezclador) y luego se colocó el tubo en un mezclador orbital (Lab-line Orbit Environ-Shaker) por 10 minutos, se centrifugó la mezcla a 4 °C durante 20 min (10.000 rpm según 13.000 x g, rotor de ángulo fijo).



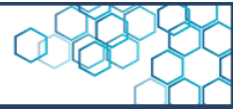
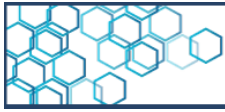
5. Se filtró el sobrenadante (V2) a través de un filtro (Whatman-1) y transfirió a un tubo nuevo de 50 mL.
6. Se añadió 8,5 % de PEG 6000 en gramos, calculado según el nuevo volumen (V2), para repetir el paso 4.
7. Se descartó el sobrenadante y se disolvió cuidadosamente el sedimento en 1 mL de PBS. Se añadió PBS hasta un volumen final de 10 mL.
8. La solución se mezcló con 12 % de PEG 6000 (p/v, 1,2 gramos) y se trató como el paso 4.
9. Se descartó el sobrenadante y se disolvió el sedimento con cuidado en 800 μ L de PBS. El extracto se transfirió a una cápsula de diálisis (MWCO 6-8000). Se enjuagó el tubo con 400 μ L de PBS y este volumen se sumó al que se colocó en el dispositivo de diálisis.
10. Se dializó el extracto durante la noche en solución salina al 0,1 % (1.600 mL) en agitación. Luego se reemplazó la solución salina por PBS y se dializó durante otras tres horas.
11. Se extrajo el dializado, que contiene las proteínas, de la cápsula de diálisis con una pipeta y se transfirió a tubos de 2 mL. Las alícuotas se guardaron a -20 °C.

2.2.1 Determinación de la concentración de proteína total en el dializado

Se utilizó el método de Pierce BCA (Thermo Scientific™ BCA), siguiendo el siguiente protocolo estandarizado en el laboratorio de Enfermedades Entéricas del SAIB.



1. Preparación de los estándares de Albúmina de Suero Bovino (BSA) para la curva de calibración: se realizaron 8 diluciones en solución salina estéril (0,9 %) de BSA (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) más el blanco (sin albúmina).
2. Preparación de diluciones del dializado de proteínas: se realizaron 7 diluciones del dializado en solución salina estéril (1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50) más el blanco (solo solución salina).
3. Preparación del reactivo de trabajo: este paso se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (Pierce™ BCA Portean Assad Kit, número de catálogo 23225) y teniendo en cuenta que cada dilución, tanto las del patrón como las de los dializados se probaron por duplicado.
4. Se colocaron 25 μL por pozo de cada dilución estándar, de las diluciones de los dializados y del blanco en microplacas de 96 pozos (Thermo Scientific™). Las diluciones estándar, las de los dializados y el blanco se probaron por duplicado. Se añadió a cada pozo 200 μL del reactivo de trabajo. Se incubó la placa por dos horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron las medidas a 590 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad IMARK™).
5. Se diseñó una curva estándar a partir de los valores de absorbancia de las distintas concentraciones de BSA. Esto permitió, a través del programa Excel, obtener la fórmula de la curva y el correspondiente valor de R^2 . A partir de la fórmula de la curva estándar se calcularon las concentraciones de las distintas diluciones del dializado, las cuales se multiplicaron al final por el respectivo factor de dilución.



3. Resultados

3.1 Caracterización de las cepas de ECEP

3.1.1 Prueba del fenotipo liso

En este trabajo se logró evidenciar la característica lisa en catorce cepas de ECEP pertenecientes a distintos serogrupos “O” (O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O158, O26, O55, O86 y O88). En la Figura 1, se observa el fenotipo liso de las colonias de la cepa O119 de ECEP crecida en agar nutritivo, las colonias se presentan translúcidas y brillantes. En la Figura 2, se presentan dos fotos obtenidas a través de una lupa (Kyowa Optical SE. L) de las colonias de la cepa ECEP O55, se observan colonias con superficie lisa (bordes regulares) y otras rugosas (bordes irregulares). De igual forma, se evidenció que todas las cepas con estructura antigénica completa (fenotipo liso) no autoaglutinaron en presencia de solución salina al 2 %, lo que comprueba el fenotipo descrito.

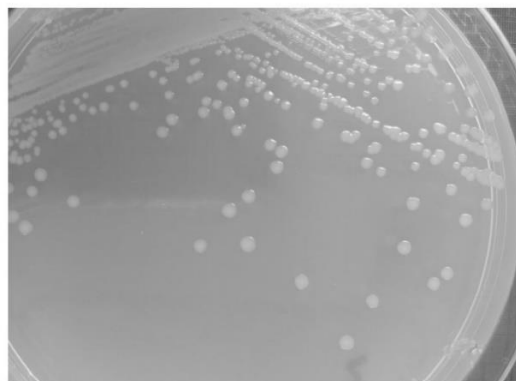
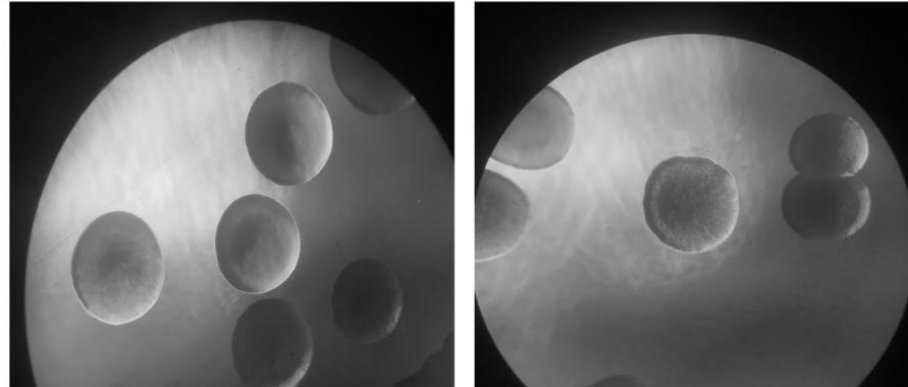


Figura 1. Colonias de *Escherichia coli* enteropatógena mostrando un fenotipo liso. Fuente: Elaboración propia de los autores (2023)



Cepas de ECEP con fenotipo liso

Cepas de ECEP con fenotipo rugoso

Figura 2. Características de las colonias de *Escherichia coli* enteropatógena con fenotipo liso y rugoso, vistas en la lupa estereoscópica. Fuente: Elaboración propia de los autores (2023)

3.1.2 Capacidad de producción de biopelículas

Doce de las catorce cepas de ECEP con fenotipo liso (O111, O114, O119, O125, O126, O127, O142, O145, O158, O55, O86 y O88) produjeron biopelículas en superficies de vidrio. Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridas a superficies, constituyendo un importante mecanismo de patogenicidad. La Figura 3 muestra la foto tomada al microscopio de luz (NIKON) con un aumento 40X, de la biopelícula formada por la cepa de ECEP O55, como control negativo se utilizó la cepa de *Escherichia coli* ATCC35218 no formadora de biopelículas.

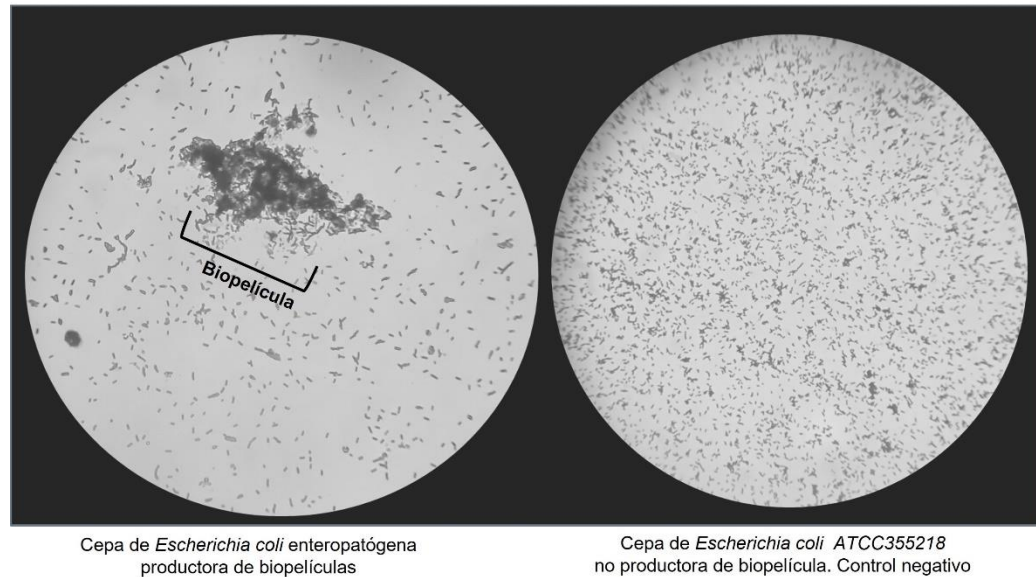
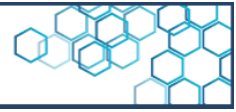
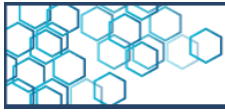


Figura 3. Producción de biopelículas de las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena. Fuente: Elaboración propia de los autores (2023)

3.1.3 Evidencia del pilis tipo IV

En las doce cepas de ECEP con fenotipo liso y productoras de biopelículas (O111, O114, O119, O125, O126, O127, O142, O145, O158, O55, O86 y O88) se evidenció la presencia del pilis tipo IV. La Figura 4 muestra la foto tomada al microscopio de luz (NIKON) con un aumento 40X, en donde se observa la formación típica del crecimiento bacteriano debida al pilis tipo IV en presencia de manosa al 1%. Este pilis permite el entrelazamiento entre las bacterias y la unión a las



superficies, estructurándose las líneas características de agregados bacterianos que se observan en la imagen al microscopio.

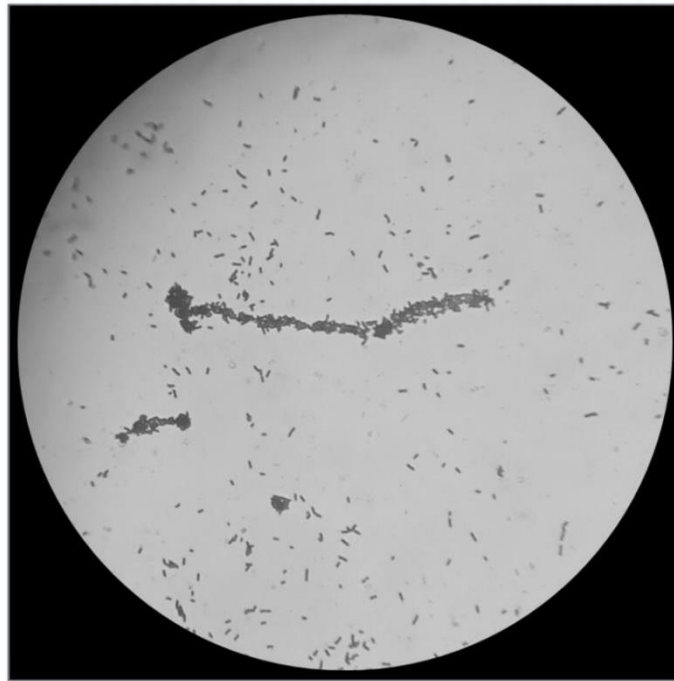
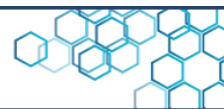
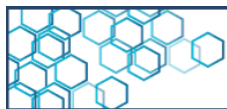


Figura 4. Entrelazamiento bacteriano debido a la pilis tipo IV en una capa de *Escherichia coli* enteropatógena. Fuente: Elaboración propia de los autores (2023)

3.2 Producción de los antígenos de ECEP

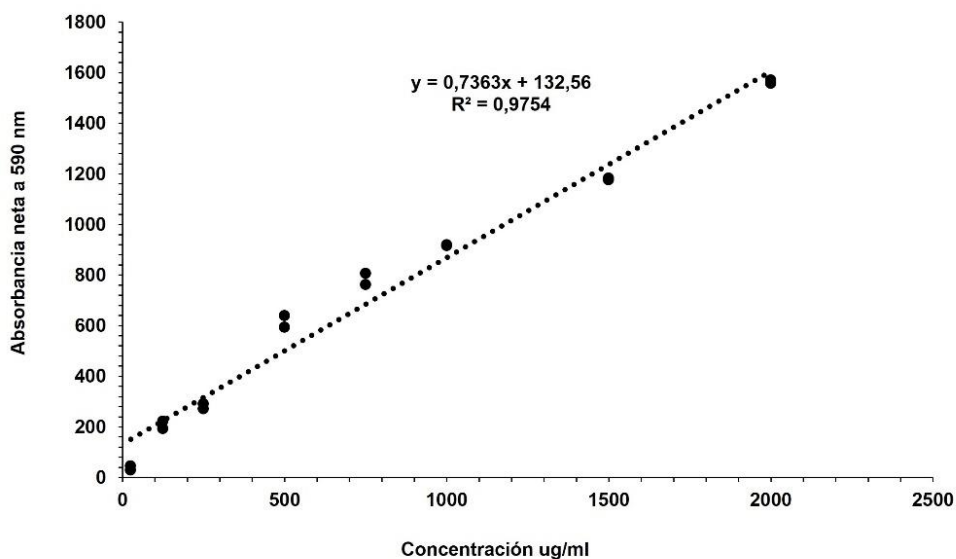
Para la producción de los antígenos se utilizaron las doce cepas de ECEP que presentaron el fenotipo liso, la capacidad de producir biopelículas y la expresión del pilis tipo IV (O111, O114, O119, O125, O126, O127, O142, O145, O158, O55, O86 y O88). Una vez inactivadas por formol



y siguiendo la metodología descrita se guardaron en alícuotas de 1 cc a 4 °C.

3.3 Concentración final de proteínas totales a partir de la yema de huevo

A través del método de Pierce BCA en microplacas, se determinó la concentración de proteínas totales de los 2 dializados obtenidos al realizar la precipitación de proteínas con el método del PEG 6000. La Figura 5 muestra la curva estándar generada a partir de las concentraciones conocidas de BCA. De igual forma, se observa la formula estimada para la curva y el valor de $R^2 = 0,9755$. El valor de R^2 obtenido indica una alta correlación entre los valores de absorbancia y las concentraciones de BCA de la curva.



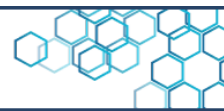
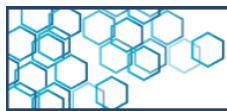


Figura 5. Curva estándar de los valores de absorbancia para concentraciones conocidas de Albúmina de Suero Bovino (BSA), utilizando el protocolo de microplacas de Pierce BCA. Fuente: Elaboración propia de los autores (2023)

Al despejar del valor de (x) de la fórmula y conociendo los valores de absorbancia a 590 nm obtenidos para cada dilución de los dos dializados (restando en cada caso el valor del blanco), se estimaron las concentraciones de proteínas totales correspondientes (Tabla 1).

Fórmula: $y = 0,7363 x + 132,56$, Dónde: $x = (y - 132,56) / 0,7363$, Siendo x = concentración de proteínas, y = absorbancia registrada en cada caso (menos el valor del blanco).

Se logró establecer que a la dilución 1/20 se obtiene la mejor estimación de la concentración de proteínas de los dializados. Para el dializado correspondiente al huevo número 1, a la dilución 1/20, se registró una concentración de proteínas totales de 11,24 mg/mL (Tabla 1), teniendo en cuenta que el volumen de yema trabajado fue de 15 mL, la concentración total de proteínas fue de 168,6 mg, mientras que, para el huevo número 2, con el mismo volumen de yema (15 mL) y a la misma dilución, la concentración fue de 117,9 mg. Estos resultados muestran el éxito en la estandarización de la metodología para extraer las proteínas a partir de la yema de huevo y utilizando PEG.

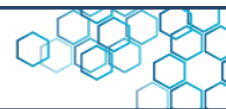
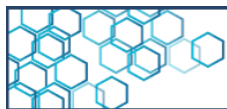


Tabla 1. Concentraciones de proteínas totales, según la dilución, para cada dializado

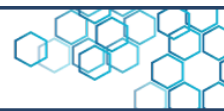
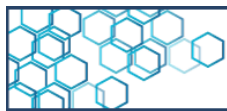
Dilución	Media de la absorbancia. Dializados (1 y 2)		Concentración (ug/ml). Dializados (1 y 2)		Concentraciones totales (mg/ml) * Dializados (1 y 2)	
	A ₁	A ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂
1/2	2920,5	2225,5	3786,42	2842,51	7,57	5,68
1/5	1594,5	1270,5	1985,52	1545,48	9,93	7,73
1/10	942,5	718,5	1100,01	795,79	11	7,96
1/20	546,5	422,5	562,19	393,78	11,24	7,86
1/30	339,5	249,5	281,05	158,82	8,43	4,76
1/40	286,5	197,5	209,07	88,2	8,36	3,53
1/50	248,5	143,5	157,46	14,86	7,87	0,74

*Concentraciones multiplicadas por el factor de dilución. Fuente: Elaboración propia de los autores (2023)

2. DISCUSIÓN

La identificación de la ECEP inicialmente se realizaba en función de la determinación de antígenos “O” mediante la utilización de sueros hiperinmunes obtenidos de mamíferos. Sin embargo, dada la enorme “plasticidad” de este patógeno hoy en día además de la identificación del antígeno “O”, es necesario determinar la presencia de otros marcadores de virulencia como la capacidad de formar biopelículas y la presencia del pilis tipo IV, el cual está implicado en la adherencia inicial de la ECEP a los enterocitos. Pero, realizar estas determinaciones en los laboratorios de rutina es costoso y tedioso.

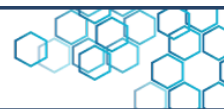
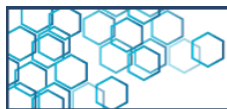
La alta especificidad de la IgY se evidencia por su capacidad de unirse a moléculas y estructuras particulares del patógeno, como proteínas de membrana, fimbrias, flagelos y pilis, inhibiendo la adherencia de este a la superficie celular y previniendo la propagación intercelular [16]. Además, se ha demostrado que la IgY se puede utilizar como anticuerpo en los inmunoensayos, amplificando las señales antígeno-anticuerpo



[17]. Igualmente se ha reportado la factibilidad de acoplar anticuerpos aviares a partículas de látex, abriéndose una perspectiva al empleo de este tipo de ensayo para el diagnóstico rápido de diversas enfermedades [18].

Las características descritas para la inmunoglobulina aviar y la necesidad de contar en el país con una técnica rápida y sensible que permita la identificación de enterobacterias causales de diarrea como la ECEP, impulsaron al laboratorio de Enfermedades Entéricas de la Infancia del SAIB el desarrollo de un trabajo de investigación con el objetivo de obtener una IgY anti-ECEP que permita identificar al patógeno *in vitro*. En el presente trabajo se muestran los resultados de las primeras etapas cumplidas para lograr el objetivo descrito: se caracterizaron las cepas de ECEP, se produjeron los antígenos que serán inoculados en las gallinas y se logró estandarizar la extracción de proteínas totales de la yema huevo.

Se demostró la capacidad de producción de biopelículas de 12 cepas de ECEP pertenecientes a distintos serotipos "O". Siendo el primer trabajo realizado en el país, que identifica este fenotipo en las cepas de ECEP. La producción de estas biopelículas es considerada un mecanismo de patogenicidad muy importante para ECEP ya que protege a los agregados bacterianos de la acción de los antibióticos y del sistema inmune del hospedero [19]. Además, se demostró en las 12 cepas productoras de biopelículas la expresión del pilis tipo IV, el cual es determinante para la adherencia inicial de la bacteria al enterocito. Estos resultados garantizan la especificidad de los antígenos que serán inoculados en las gallinas para la obtención de la IgY anti-ECEP.



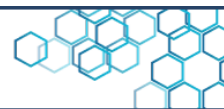
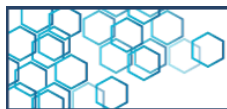
La estandarización de la metodología para la extracción de las proteínas totales de la yema de huevo utilizando la técnica de PEG 6000, generó resultados muy satisfactorios, ya que se consiguieron entre 117,9 a 168,6 mg de proteínas totales por yema, siendo el rendimiento publicado en la literatura entre 100 y 150 mg. El éxito obtenido en esta estandarización asegura, para las próximas etapas del trabajo de investigación, una vez inoculadas las gallinas con los antígenos caracterizados, la obtención de una importante concentración de IgY anti-ECEP específica.

De esta forma se dan los pasos iniciales para generar propuestas que den respuesta a la limitación que genera la dificultad del diagnóstico de enfermedades endémicas en nuestro país, tales como las diarreas bacterianas, y de esta manera contribuir al diagnóstico precoz, direccionar el tratamiento oportuno y el adecuado seguimiento del paciente infectado, contribuyendo así al estado de salud de los venezolanos.

5. Referencias

[1] Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736–88. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32203-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32203-7)

[2] Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, Khalil I, Brown A, Reiner RC Jr, et al. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the



Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis.* 2017;17(9):909–48. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30276-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30276-1)

[3] Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: A systematic review. *PLoS One.* 2013;8(9):e72788. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>

[4] Kovacs-Nolan J, Mine Y. Using egg IgY antibodies for health, diagnostic and other industrial applications. En: *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products.* Elsevier; 2011. p. 346–73.

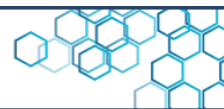
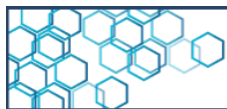
[5] Berdal J-E, Follin-Arbelet B, Bjørnholt JV. Experiences from multiplex PCR diagnostics of faeces in hospitalised patients: clinical significance of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and culture negative campylobacter. *BMC Infect. Dis.* 2019;19(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-4271-1>

[6] Pearson JS, Giogha C, Wong Fok Lung T, Hartland EL. The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annu. Rev. Genet.* 2016;50(1):493–513. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035138>

[7] Urrestarazu, M, Liprandi, I, Pérez, E, González, R, Pérez, I. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Panamericana de Salud Pública.* 1999; http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49891999000800001&lng=pt&nrm=iso

[8] González R, Díaz C, Mariño M, Cloralt R, Pequeneze M, Pérez-Schael I. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(5):1103–7. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.35.5.1103-1107.1997>

[9] Hannaoui, E, Villalobos, L, Martínez, R, Maldonado, A, Hagel, I, Bastardo, J. *Escherichia coli* diarreogénica asociada a casos de diarrea aguda en niños de Cumaná, Venezuela. *Investigación Clínica.* 2010;489–500.



- [10] Amro WA, Al-Qaisi W, Al-Razem F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2018;16(1):99–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>
- [11] Procop G, Church D, Hall G, Janda W, Koneman E., Schreckenberger P, Woods G. Koneman. Diagnóstico microbiológico. Wolters Kluwer; 2017.
- [12] Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 1977;41(3):667–710. <http://dx.doi.org/10.1128/br.41.3.667-710.1977>
- [13] Moreira CG, Palmer K, Whiteley M, Sircili MP, Trabulsi LR, Castro AFP, et al. Bundle-forming Pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2006;188(11):3952–61. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00177-06>
- [14] Ala-Jaakkola R, Laitila A, Ouwehand AC, Lehtoranta L. Role of D-mannose in urinary tract infections – a narrative review. *Nutr. J.* 2022;21(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s12937-022-00769-x>
- [15] Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *J. Vis. Exp.* 2011;(51). <http://dx.doi.org/10.3791/3084>
- [16] Abbas AT, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, Azhar EIA. IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2019;15(1):264–75. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
- [17] Zhang Q, He D, Xu L, Ge S, Wang J, Zhang X. Generation and evaluation of anti-mouse IgG IgY as secondary antibody. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2020;50(8):788–93. <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2020.1737940>
- [18] Dopico, J, Álvarez, M, Juvier, A, Trujillo, J, Reyes, G, Pico, M, Casa, I, Giralдино, I. Anticuerpos IgY en ensayos de látex-aglutinación. *Vaccimonitor.* 2012;10–5.



[19] Rodrigues RS, Lima NC da S, Taborda RLM, Esquerdo RP, Gama AR, Nogueira PA, et al. Antibiotic resistance and biofilm formation in children with Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Brazilian Amazon. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2019;13(08):698–705. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.10674>

