

ANTICORPI POLICLONALI PRODOTTI NELLA GALLINA: UN'ALTERNATIVA ALL'UTILIZZO DI MAMMIFERI

POLYCLONAL ANTIBODIES RAISED IN HEN: AN ALTERNATIVE TO MAMMALIAN EMPLOYMENT

ALESSANDRA GUIDI ⁽¹⁾, ANDREA ARMANI ⁽²⁾, GIORGIO IANNONE ⁽³⁾,
LORENZO CASTIGLIEGO ⁽³⁾, DANIELA GIANFALDONI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Il problema legato al benessere animale è una questione dai risvolti etici che negli ultimi anni ha notevolmente condizionato la ricerca scientifica coinvolgendo sempre di più alcuni settori della medicina veterinaria. Nei laboratori di ricerca, infatti, si fa spesso uso di animali per la sperimentazione, come nel caso della produzione di anticorpi. Le metodiche impiegate possono talvolta causare sofferenze agli animali e, per questo motivo, da anni sono allo studio metodi alternativi a quelli più frequentemente utilizzati.

L'immunizzazione di galline con antigeni di natura proteica consente di ottenere grandi quantità di anticorpi dai tuorli delle uova. Questo tipo di procedura comporta alcuni vantaggi sia dal punto di vista del benessere animale, in quanto scongiura i prelievi ematici per la valutazione del titolo anticorpale dell'animale in vita ed il salasso finale per la raccolta degli anticorpi, sia da quello economico dati i minori costi gestionali rispetto ai mammiferi da laboratorio di medie dimensioni e la maggiore resa finale di anticorpi. In questo lavoro sono stati prodotti anticorpi policlonali nelle galline contro una delle somatotropine bovine ricombinanti (rbST) esistenti in commercio, al fine di operare un confronto con anticorpi policlonali precedentemente prodotti nel coniglio contro la stessa molecola. Il raffronto delle curve ottenute tramite un test ELISA sandwich, messo a punto in precedenza per la quantificazione di bST nel siero e ripetuto utilizzando le due diverse specie anticorpali, ci ha permesso di valutare l'effettiva validità dell'immunizzazione di galliformi per la produzione di grandi quantità di immunoglobuline.

Parole chiave: anticorpi, IgG, IgY, rbST.

SUMMARY

Concerns about animal welfare are connected with ethical issues that affect scientific research, involving many veterinary fields. As a matter of facts, animals are often employed for experimental purposes, such as the production of antibodies. Applied methods could sometimes cause suffering to animals and for this reason several studies on alternative methods for antibody production are in progress.

⁽¹⁾ Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

⁽²⁾ Collaboratore Esterno.

⁽³⁾ Titolare di assegno di ricerca, Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

Immunisation of hens against proteic antigens allows to obtain a great amount of antibodies from the yolk of treated chicken eggs. This sort of practice brings many advantages for animal welfare, since blood collection is not necessary. In addition, some more advantages come either from the reduced breeding costs with respect to medium-size mammals or the higher antibodies yield.

In this work, we have produced polyclonal antibodies in hens against one of the commercialised recombinant bovine somatotropins (rbST), with the aim to make a comparison with rabbit polyclonal antibodies against the same molecule, already produced in an earlier work. With this purpose, we performed a sandwich ELISA previously developed for bST measurement in serum and then compared the curves obtained by using the two different kind of polyclonal antibodies. This allowed us to estimate the worth of poultry immunisation for the production of a great amount of specific antibodies.

Key words: antibodies, IgG, IgY, rbST

INTRODUZIONE

La somatotropina (ST), anche conosciuta come ormone della crescita, è un ormone peptidico prodotto dalla porzione anteriore della ghiandola pituitaria che influenza vari processi fisiologici fra i quali l'accrescimento corporeo ed il metabolismo tissutale. In particolare, la somatotropina bovina (bST) viene prodotta in grandi quantità grazie alle tecnologie del DNA ricombinante (rbST) ed utilizzata da alcuni allevatori allo scopo di incrementare la produzione nelle bovine da latte.

La Comunità Europea ha bandito l'uso dell'ormone ricombinante all'interno degli Stati Membri (Macrì, 1999). Ciò nonostante, è stata dimostrata l'esistenza di un commercio illecito della relativa preparazione farmacologica, realtà che rende necessaria la messa a punto di un metodo analitico, da poter utilizzare come strumento diagnostico per rilevare il trattamento dei bovini con rbST.

Nell'ambito di un precedente lavoro sono stati prodotti anticorpi policlonali, sviluppati nel coniglio, diretti contro la rbST commercializzata da una nota multinazionale farmaceutica e anticorpi monoclonali murini diretti contro un peptide corrispondente alla parte N-terminale della stessa molecola (Guidi e coll., 2004) ed è stato, infine, messo a punto un saggio immunoenzimatico (ELISA a sandwich) per la quantificazione di somatotropina nel siero bovino.

Allo scopo di avere a disposizione anticorpi prodotti in animali diversi da quelli già utilizzati, abbiamo immunizzato alcune galline contro la stessa rbST.

La scelta di ovipari è stata dettata dalla volontà di valutare l'utilizzo di metodi alternativi per la produzione di anticorpi, che comportassero la massima riduzione delle sofferenze indotte dalla sperimentazione agli animali utilizzati.

In seguito ad immunizzazione, gli uccelli più evoluti, ed in particolar modo i galliformi, hanno la capacità di produrre grandi quantità di anticorpi (IgY) (Warr, 1995) che si accumulano nel tuorlo delle uova in concentrazioni maggiori a quelle riscontrabili nel siero, costituendo, in tal modo, l'immunità passiva del feto (Yoshimura, 1994). Al momento della deposizione dell'uovo possono essere presenti oltre 200 mg

di IgY (Tini e coll., 2002).

Le IgY hanno un peso molecolare di circa 180 kDa, più alto rispetto a quello delle IgG ed IgE dei mammiferi (Bizhanov & Vyshniauskis, 2000) e si ritrovano nel siero di uccelli, rettili ed anfibi, rappresentando una versione “meno evoluta” delle precedenti (Morrison e coll., 2002).

Le IgY presentano diversi vantaggi che le rendono una valida alternativa agli anticorpi policlonali prodotti nei mammiferi. Le uova prodotte giornalmente dalle galline immunizzate costituiscono un continuo rifornimento di IgY; considerando la capacità dell'industria avicola di produrre migliaia di uova al giorno, ingenti quantità di anticorpi potrebbero essere potenzialmente ottenuti per scopi terapeutici o diagnostici (Morrison e coll., 2002; Mohammed e coll., 1998). Dal punto di vista etico, la raccolta delle uova è un metodo di prelievo che non comporta alcuna sofferenza per l'animale immunizzato, al contrario del prelievo di sangue, necessario nei mammiferi (Shade e coll., 1996). Inoltre, poiché la quantità di anticorpi prodotti giornalmente da una gallina in deposizione corrisponde a quella prodotta in un coniglio ogni due settimane, è possibile ridurre il numero di animali e, conseguentemente, i costi di gestione (Gee e coll., 2003). Infine, le galline possono essere stabulate poco prima che entrino in deposizione, riducendo ulteriormente i costi associati al mantenimento degli animali (Shade e coll., 1996).

Data la distanza filogenetica esistente fra mammiferi e uccelli, immunizzando galline contro antigeni proteici provenienti da mammiferi, è possibile ottenere elevate rese di anticorpi specifici, eventualità che non sempre si verifica impiegando i mammiferi stessi (Haak-Frendscho, 1994).

Nonostante i numerosi vantaggi, raramente questi animali vengono utilizzati per la produzione di anticorpi. Si ritiene che questo possa essere dovuto a diversi fattori fra cui l'assenza di esperienza relativa alle tecniche da utilizzare (Gee e coll., 2003) e procedure di purificazione più laboriose a causa dell'incapacità delle IgY di legare la proteina A dello *Staphylococcus aureus* e la proteina G degli streptococchi (Haak-Frendscho, 1994; Bizhanov & Vyshniauskis, 2000).

I metodi più comunemente utilizzati per la precipitazione delle proteine del tuorlo e l'allontanamento dei lipidi sono quelli che prevedono il frazionamento tramite precipitazione con PEG o solfato di ammonio, acidificazione o metodiche di diluizione in acqua (Devi e coll., 2002; Tu e coll., 2001; Polson, 1990).

Nel nostro caso, abbiamo utilizzato un protocollo di estrazione che prevede l'impiego di PEG 6000. Le IgY, una volta estratte dal tuorlo, sono state impiegate come anticorpo primario nel test ELISA per la somatotropina da noi precedentemente messo a punto, rivelando una buona funzionalità anche quando paragonate agli anticorpi policlonali di coniglio.

MATERIALI E METODI

1. Animali utilizzati

Per la produzione di anticorpi sono state utilizzate due femmine di ibrido

commerciale da uova normalmente reperibili in commercio.

Gli animali sono stati immunizzati prima del periodo di deposizione per evitare lo stress indotto dalle operazioni di immunizzazione. Infatti la natura dell'antigene, il tipo di adiuvante e l'iniezione stessa, possono avere un effetto negativo sulla produzione di uova (Shade e coll., 1996).

2. *Antigeni e reagenti*

Come immunogeno è stata utilizzata una soluzione di somatotropina ricombinante ottenuta da una preparazione iniettabile commerciale.

Tutti i reagenti e gli anticorpi commerciali sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US).

3. *Immunizzazione*

Poiché i protocolli di immunizzazione per conigli e galline sono sovrapponibili per quanto riguarda via di somministrazione e quantità di antigene utilizzato (Haak-Frendscho, 1994) e a causa della mancanza di riferimenti standardizzati in letteratura, è stato adottato un protocollo normalmente utilizzato per il coniglio: dopo una prima iniezione di 400 µg di rbST in 400 µl di tampone fosfato (PBS, pH = 7,4) e 400 µl di adiuvante completo di Freund, sono state eseguite altre due iniezioni con 200 µg di rbST, distanziate di circa 10 giorni l'una dall'altra, utilizzando adiuvante incompleto di Freund.

Ogni emulsione contenente l'antigene è stata iniettata in quattro differenti siti del muscolo pettorale. Le uova sono state raccolte giornalmente a partire dal 30° giorno dopo la prima iniezione, identificate con la data di raccolta e conservate a +4°C. I dati presentati in questo lavoro sono relativi all'uovo prelevato dopo sette giorni dall'inizio della raccolta, avendo raggiunto il massimo contenuto di anticorpi e non avendo constatato una variazione significativa nelle uova raccolte i giorni successivi.

4. *Estrazione delle IgY*

Il guscio delle uova è stato deterso con etanolo al 70% e, successivamente, lavato con acqua. Il tuorlo, dopo separazione dall'albume, è stato lavato con acqua per eliminare i residui esterni adesi alla superficie e successivamente è stato completamente asciugato tramite rotolamento su carta.

La purificazione delle proteine del tuorlo è stata eseguita tramite precipitazione con PEG 6000 (IgTech), apportando alcune modifiche alla metodica di Polson e coll. (Polson e coll. 1980): la soluzione di tuorlo è stata diluita 1:1 con PBS e lasciata in agitazione per alcuni minuti. Dopo centrifugazione a 3000 X g per 30 minuti, il surnatante è stato prelevato per le successive operazioni di doppia precipitazione con PEG. La prima precipitazione, finalizzata all'allontanamento della componente lipoproteica, è stata eseguita aggiungendo al surnatante raccolto una soluzione di PEG al 10,5% fino ad ottenere una concentrazione finale del 3,5%.

La miscela è stata fatta riposare a 4°C per 30 minuti e successivamente centrifugata a 14000 X g per 10 minuti a temperatura ambiente. La porzione liquida accumulatasi

al di sotto del tappo lipidico formatosi in seguito alla centrifugazione è stata quindi raccolta e precipitata nuovamente con una soluzione di PEG al 11,2% finale. La miscela è stata poi lasciata riposare a 4°C per 30 minuti e successivamente centrifugata a 14000 X g per 10 minuti. Il pellet ottenuto è stato disciolto in PBS e testato per il contenuto anticorpale.

5. *Western Blotting*

Per verificare l'efficacia della procedura di estrazione, gli estratti sono stati fatti correre su gel di poliacrilamide (Novex Precasted Bis-Tris Gel, Invitrogen 12%) secondo il protocollo indicato dal produttore.

I campioni sono stati diluiti 1:20 in un tampone di solubilizzazione (NuPage LDS Sample Buffer, Invitrogen), scaldati a 100° C per 10 minuti e 10 µl di tale soluzione sono stati caricati in doppio sul gel. Come controllo è stato fatto correre anche il siero di coniglio anti-rbST diluito 1:20 nel medesimo tampone.

Dopo la corsa elettroforetica, una metà del gel è stata colorata con una soluzione di Blu di Coomassie, l'altra metà, contenente i duplicati degli stessi campioni, è stata trasferita su membrana di nitrocellulosa. A trasferimento avvenuto la membrana è stata saturata con gelatina di pesce al 2 % e, dopo 3 lavaggi con PBS + Tween 0,05 % (T-PBS), incubata con una soluzione contenente 0,2 µg/ml di anticorpo secondario anti IgY marcato con fosfatasi alcalina. Dopo 4 lavaggi con abbondante tampone T-PBS si è proceduto alla colorazione con una soluzione di bromo-cloro-indolil-fosfato (B-CIP) e nitro-blue di tetrazolio (NBT) in tampone carbonato (pH = 9,8).

6. *Test ELISA diretto*

Una soluzione di rbST e di altri antigeni di controllo, diluiti in tampone carbonato a pH 9,8, alla concentrazione di 4 µg/ml, 100 µl/pozzetto, è stata fatta adsorbire sulle piastre per microtitolazione in polistirene (Costar, Coprning, NY, US) *over night* a 4°C. Dopo 3 lavaggi con PBS, la piastra è stata saturata a 4°C per due ore con una soluzione al 2% di gelatina di pesce in PBS.

Successivamente la piastra è stata lavata per 3 volte con T-PBS e sugli antigeni adsorbiti sono state incubate soluzioni a varia diluizione dell'estratto di IgY e di siero intero di coniglio anti-rbST per 90 minuti a temperatura ambiente. La piastra è stata poi lavata per 3 volte con T-PBS ed è stata aggiunta ai pozzetti una soluzione di anticorpo secondario (coniugato alla fosfatasi alcalina) (0,2 µg/ml) diretto rispettivamente contro le IgY di gallina e contro le IgG di coniglio, lasciando ad incubare per 90 minuti a temperatura ambiente. La piastra è stata infine lavata per 4 volte con T-PBS ed una volta con H₂O ultrapura. Il substrato per la reazione colorimetrica, costituito da una soluzione di para-nitro-fenol-fosfato (PNPP) (1mg/ml) in dietanolammina al 20% (pH = 9,8) è stato aggiunto e fatto reagire per 15 minuti. La reazione è stata bloccata con 50 µl di NaOH 1M e i valori di assorbanza sono stati letti a 405 nm tramite spettrofotometro (Biotrack II, Amersham).

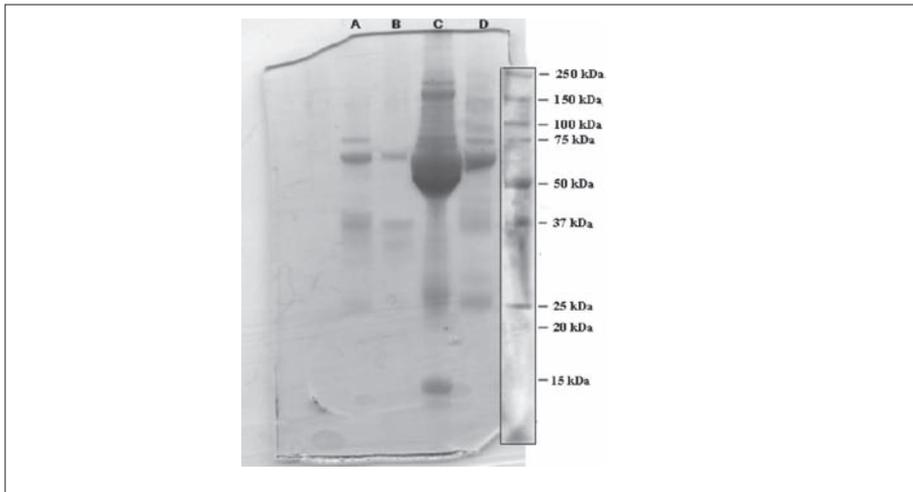


Fig. 1a. Colorazione con Blue di Coomassie di campioni estratti da tuorlo di uovo di gallina e di siero intero di coniglio. Corsia A: estratti di tuorlo provenienti da una delle due galline immunizzate con rbST. Corsia B: estratti di tuorlo provenienti da una gallina di controllo. Corsia C: siero intero di coniglio. Corsia D: estratti da tuorli provenienti da gallina immunizzata contro BSA (controllo positivo). *Coomassie Blue staining of samples extracted from yolk of hen egg and whole rabbit serum. Lane A: yolk extracts from one of the two rbST-immunised hens. Lane B: yolk extracts from the control hen. Lane C: whole rabbit serum. Lane D: yolk extracts from BSA-immunised hen (positive control).*

7. Test ELISA “sandwich”

Il sopraccitato anticorpo monoclonale (soluzione di 2 $\mu\text{g/ml}$) è stato fatto adsorbire alla piastra secondo le modalità descritte per il test diretto. Dopo due lavaggi con PBS la piastra è stata saturata con gelatina di pesce al 2%. Le soluzioni di anticorpo primario sono state fatte incubare 1 ora e mezza (diluizione 1/200 in T-PBS per l’estratto di tuorlo; 1/1000 per il siero di coniglio). L’incubazione di anticorpo secondario e la reazione colorimetrica sono state condotte come descritto nel saggio diretto.

RISULTATI

Gli estratti di IgY sono stati analizzati in Western blot. Dopo corsa elettroforetica su gel di poliaccrilammide, la parte del gel colorata con Blue di Coomassie ha evidenziato la presenza di due bande consistenti all’altezza dei pesi molecolari corrispondenti alla catena pesante e alla catena leggera delle IgY (68 kD e 27 kD).

La Fig. 1b mostra gli stessi campioni dopo trasferimento su membrana di

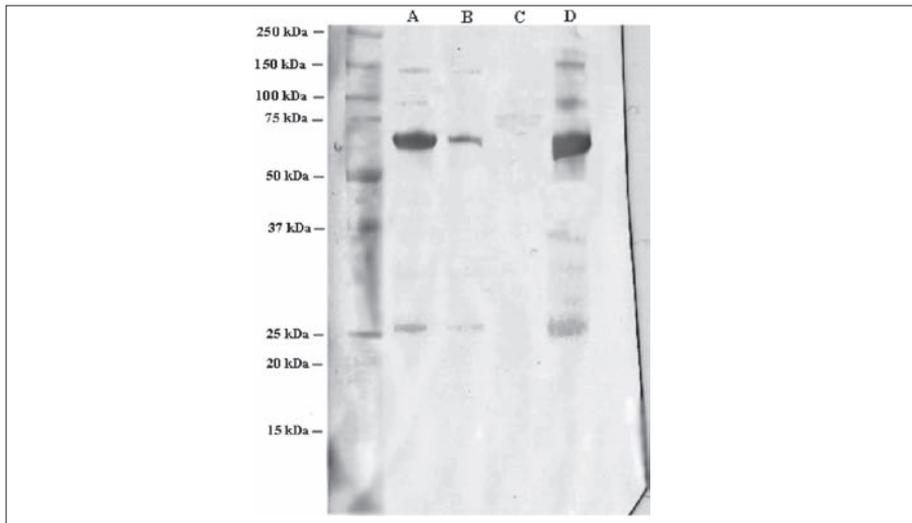


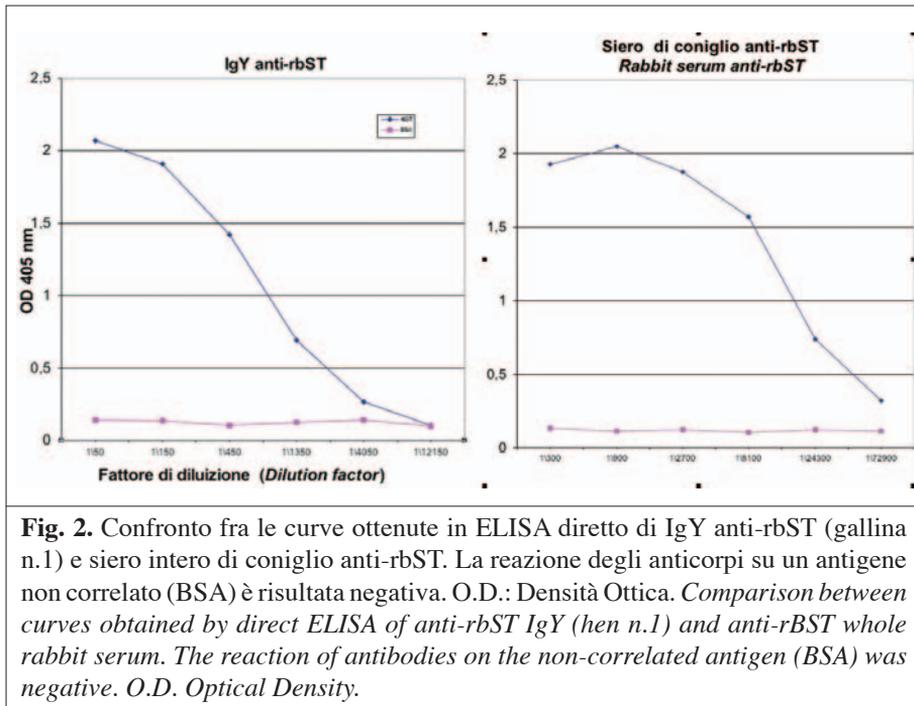
Fig. 1b. Western blot con anticorpi anti-IgY di campioni estratti da tuorli di gallina immunizzata con rbST (corsia A), di gallina di controllo (corsia B), di gallina immunizzata con BSA (controllo positivo) (corsia D) e di siero intero di coniglio (corsia C). *Western blot performed with anti-IgY antibodies. Lane A: yolk extracts samples from rbST-immunized hen. Lane B: control hen. Lane D: BSA-immunised hen (positive control). Lane C: whole rabbit serum.*

nitrocellulosa e marcatura con anticorpi anti IgY di pollo. La specificità della reazione evidenzia le bande formate dalle subunità delle IgY. Come confermato anche dalla colorazione con Blue di Coomassie, i tuorli provenienti dalla gallina immunizzata presentano una concentrazione anticorpale maggiore rispetto a quelli provenienti dalla gallina di controllo.

La capacità degli anticorpi di legare in maniera specifica l'antigene utilizzato per l'immunizzazione è stata testata in ELISA diretto. Dai test è emerso che le galline immunizzate hanno sviluppato una buona risposta contro l'antigene iniettato, risultata però minore per la gallina n. 2 (dati non presentati), la quale è stata esclusa dai test successivi.

Nella Fig. 2 è riportato il confronto in ELISA diretto fra l'andamento della curva ottenuta incubando varie diluizioni di IgY anti-rbST della gallina n. 1 e la curva del siero intero di coniglio anti-rbST. Dal momento che le igY non sono state purificate ulteriormente, non è stato possibile calcolarne l'effettiva concentrazione negli estratti. L'andamento delle due curve dimostra l'esistenza di una reattività specifica nei confronti della rbST.

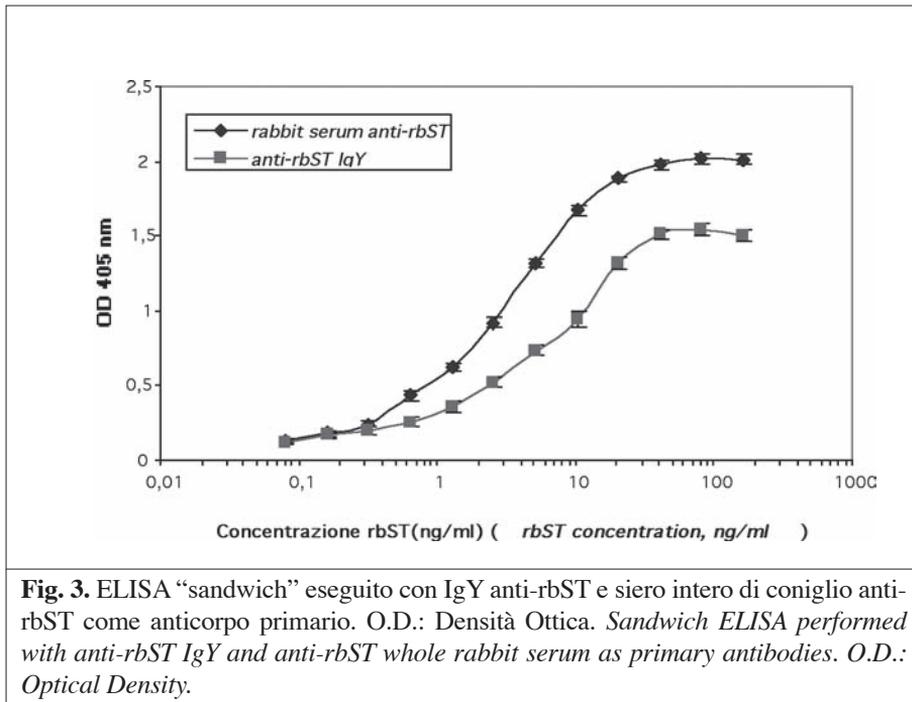
Il sandwich ELISA presenta vantaggi derivati dal fatto che l'anticorpo presentante agisce da "filtro" nei confronti della soluzione in cui è presente l'antigene da testare, legando solo quest'ultimo e permettendo l'allontanamento delle impurità col lavaggio.



Le curve ottenute in questo test hanno un andamento simile per i due tipi di anticorpi primari utilizzati, con un livello di sensibilità paragonabile ed un intervallo di linearità di estensione equiparabile, anche se leggermente spostato verso concentrazioni di antigene maggiori nel caso delle IgY (Fig. 3). L'apparente minore avidità manifestata dagli anticorpi presenti nell'estratto di tuorlo potrebbe essere dovuta ad una minore concentrazione complessiva degli stessi. In questo caso, però, il fattore di diluizione della soluzione anticorpale non può essere ulteriormente diminuito senza previa purificazione per non innalzare troppo i livelli di background.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo lavoro mostrano come gli anticorpi prodotti dall'immunizzazione delle galline contro la rbST abbiano una capacità di legame verso l'antigene tale da renderli idonei ad essere impiegati in saggi immunoenzimatici, dopo un'ulteriore processo di purificazione. Considerati il minor costo gestionale, la maggior quantità di anticorpi ottenibili e la minore sofferenza che le procedure sperimentali comportano agli animali impiegati, alla luce dei dati raccolti si può affermare che l'utilizzo di galline potrebbe rappresentare una valida alternativa a quello di mammiferi da laboratorio per la produzione di anticorpi.



BIBLIOGRAFIA

- BIZHANOV G., VYSHNIAUSKIS G. (2000). A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Vet. Res. Commun.*, 24: 103-113.
- DEVI C.M., BAI M.V., LAL A.V., UMASHANKAR P.R., KRISHNAN L.K. (2002). An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 51: 129-138.
- GEE S.C., BATE I.M., THOMAS T.M., RYLATT D.B. (2003). The purification of IgY from chicken egg yolk by preparative electrophoresis. *Protein Expr. Purif.*, 30: 151-155.
- GUIDI A., IANNONE G., CASTIGLIEGO L., GIANFALDONI D. (2004). Anticorpi monoclonali contro la forma ricombinante della somatotropina bovina. *Atti S.I.S.Vet.*, 53: 340-342.
- HAAK-FRENDSCHO M. (1994). Why IgY? Chicken polyclonal antibody, an appealing alternative. *Promega Notes Magazine*, 46: 11.
- MACRÌ A. (1999). La posizione dei comitati scientifici della U.E. sulla somatotropina bovina ricombinante. *Il Nuovo Prog. Vet.*, 54: 529-530.
- MOHAMMED S.M., MORRISON S., WIMS L., TRINH K.R., WILDEMAN A.G., BONSELAAR J., ETCHES R.J. (1998). Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology*, 4: 115-125.

- MORRISON S.L., MOHAMMED M.S., WIMS L.A., TRINH R., ETCHES R. (2002). Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol. Immunol.*, 38(8): 619-625.
- POLSON A., VON WECHMAR M.B., FAZAKERLEY G. (1980). Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunol. Commun.*, 9(5): 495-514.
- POLSON A., (1990). Isolation of IgY from the yolks of eggs by chloroform, polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.*, 19(3): 253-258.
- SHADER., STAAK C., HENDRIKSEN C., ERHARD M., HUGL H., KOCH G., LARSSON A., POLLMANN W., VAN REGENMORTELM., RIJKE E., SPIELMANN H., STEINBUSCH H., STRAUGHAN D. (1996). The production of avian (Egg Yolk) antibodies: IgY. *ECVAM Workshop 21: avian antibodies*, 24: 925-634.
- TINI M., JEWELL U.R., CAMENISCH G., CHILOV D., GASSMANN M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 131(3): 569-574.
- TU Y.Y., CHEN C.C, CHANG H.M. (2001). Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. *Food res. Int.*, 34: 783-789.
- WARR G.W., MAGOR K.E., HIGGINS D.A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today*, 16(8): 392-398.
- YOSHIMURA Y. (2004). Significance of local immunity in hen reproductive organs. *Anim. Science J.*, 75: 183-191.