

ARTÍCULO ORIGINAL

## IgY antialérgenos específicos del grupo 1 de ácaros del polvo doméstico inducidos por oligopéptidos sintéticos no glicosilados

Eduardo Egea<sup>1</sup>, Dary Mendoza<sup>2</sup>, Gloria Garavito<sup>1</sup>, Ángela Espejo<sup>3</sup>, Lina María Lizaraso<sup>3</sup>, Elkin Navarro<sup>1</sup>, Luis Alejandro Barrera<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Inmunología y Biología Molecular, División Ciencias de la Salud, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Bioquímica de Macromoléculas, Programa de Química, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia

<sup>3</sup> Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

**Introducción.** La obtención de anticuerpos específicos capaces de detectar alérgenos del grupo 1 de ácaros del polvo doméstico representa una estrategia potencial de salud pública para reducir la exposición y la sintomatología clínica asociada con el asma y la rinitis alérgica.

**Objetivo.** Producir y purificar anticuerpos aviares antialérgenos específicos del grupo 1 de los ácaros *Dermatophagoides sp.* y *Blomia tropicalis* utilizando la tecnología IgY.

**Materiales y métodos.** Se diseñaron y sintetizaron oligopéptidos que evidenciaran epítopes inmunogénicos de los alérgenos Der p1, Der f1 y Blo t1 empleados posteriormente para producir anticuerpos IgY policlonales en gallinas Hy Line Brown. Las IgY presentes en las yemas de los huevos se purificaron mediante cromatografía tiofílica. Su inmunorreactividad y especificidad se determinaron mediante un inmunoensayo ELISA indirecto y *Dot Blot*.

**Resultados.** Se obtuvo una reactividad elevada de las IgY contra epítopes de alérgenos presentes en extractos de cuerpo entero de *D. farinae*, *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis*. Los niveles más altos de IgY se produjeron entre los días 32 y 40 de inmunización. Los anticuerpos mostraron mayor inmunorreactividad y especificidad en el reconocimiento de proteínas de *D. farinae*, con un límite de detección mayor de 0,03 µg de proteína total del ácaro bajo las condiciones experimentales analizadas. Las IgY purificadas no mostraron reactividad significativa frente al extracto de *Periplaneta americana*.

**Conclusión.** La tecnología IgY permitió la producción de anticuerpos específicos contra alérgenos del grupo 1 de los ácaros del polvo al utilizar oligopéptidos sintéticos no glicosilados. Hasta donde se sabe, esta es la primera vez que se usan estos reactivos inmunológicos para la detección de ácaros de importancia médica.

**Palabras clave:** alérgenos; anticuerpos, ácaros, oligopéptidos, yema de huevo; *Pyroglyphidae*.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3689>

### Specific IgY anti-group 1 dust mite allergens induced by unglycosylated synthetic oligopeptides

**Introduction:** The use of specific antibodies capable of detecting allergens of the group 1 of house dust mites represents a potential strategy to reduce exposure and clinical symptomatology associated with asthma and allergic rhinitis.

**Objective:** To produce and purify chicken antibodies specific for the dust mites *Dermatophagoides sp.* and *B. tropicalis* using the IgY technology.

**Materials and methods:** We designed and synthesized oligopeptides showing immunogenic epitopes of Der p1, Der f1, and Blo t1. These were used to produce IgY antibodies in Hy Line Brown chickens. IgY were extracted from egg yolk using thiophilic chromatography. The immunogenicity and specificity were assayed by indirect ELISA and Dot Blot.

**Results:** We obtained high reactivity of IgY antibodies against epitopes of allergens present in whole body mites extracts of *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, and *B. tropicalis*. The highest IgY levels were registered between days 32 and 40 after immunization. The antibodies showed high immunoreactivity and specificity towards *D. farinae* proteins with detection limits above 0.03 µg of mite proteins under the experimental conditions used. Purified IgY did not show significant reactivity when binding to *Periplaneta americana* extract.

#### Contribución de los autores:

Dary Luz Mendoza, Ángela Espejo, Lina María Lizaraso y Elkin Navarro: adquisición de datos y redacción del manuscrito

Gloria Garavito: revisión crítica de contenido

Eduardo Egea y Luis Alejandro Barrera: redacción del manuscrito

Todos los autores participaron en el análisis e interpretación de los datos.

**Conclusion:** The IgY technology allowed the production of specific antibodies against house dust mites group 1 allergens using non-glycosylated synthetic peptides. To our knowledge, this is the first time that this immunochemicals are used in the detection of mites of medical relevance.

**Key words:** Allergens; antibodies; mites; oligopeptides; egg yolk; *Pyroglyphidae*.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3689>

Los anticuerpos son sensores moleculares importantes en la investigación biomédica. Se han usado ampliamente como herramientas diagnósticas y en la terapéutica de diversas enfermedades (1,2). En inmunología y alergología estas moléculas tienen aplicación como reactivos en la detección de proteínas involucradas en la fisiopatología de enfermedades alérgicas (3,4).

La producción de anticuerpos monoclonales y policlonales frecuentemente se hace empleando una gran variedad de mamíferos (5,6). Sin embargo, se ha visto que la inmunogenicidad obtenida en ratones, conejos y hámsters contra algunos antígenos es baja (7). Otros animales, como cabras, ovejas y caballos, a pesar de que permiten la obtención de mayores niveles de título y volumen de anticuerpos, son difíciles de manipular por su tamaño y su mantenimiento es costoso en condiciones de bioterio (8,9). Además, la producción de anticuerpos en mamíferos involucra una serie de procedimientos, como la toma de las muestras de sangre para el seguimiento de la titulación de los anticuerpos, que pueden ocasionar estrés, dolor y sufrimiento al animal, provocando cambios fisiológicos que añadirían otras variables a los resultados experimentales (7,10). Hoy existe un gran interés por la búsqueda e implementación de procedimientos alternativos experimentales (*in vivo*) para la producción de anticuerpos que impliquen un menor sufrimiento del animal. En este sentido, el uso de aves para la inmunización representa un refinamiento del proceso de producción de anticuerpos, ya que estas transfieren los anticuerpos del suero sanguíneo a la yema de huevo de donde se pueden extraer, metodología que se conoce como tecnología IgY (11-15).

En alergología experimental la tecnología IgY se ha utilizado en la producción de anticuerpos contra alérgenos de alimentos como el maní (*Arachis hypogaea* L.) (16). En el 2004 se describió el

Correspondencia:

Eduardo Egea, Grupo de Investigación en Inmunología y Biología Molecular, División Ciencias de la Salud, Universidad del Norte, Km 5 vía a Puerto Colombia, Barranquilla, Colombia  
Teléfono: (5) 3509486; fax: (5) 3577220  
[eegea@uninorte.edu.co](mailto:eegea@uninorte.edu.co)

Recibido: 05/12/16; aceptado: 21/09/17

desarrollo de un anticuerpo IgY policlonal contra proteínas de avellana tostada, el cual se empleó en la detección de alérgenos de este fruto mediante un ensayo de ELISA competitivo indirecto, con un límite de detección de 10 µg/ml y una IC<sub>50</sub> de 618 µg/l (17). En otro estudio se reportó el uso de la tecnología IgY para la detección simultánea de múltiples alérgenos de alimentos, tales como las proteínas de avellana, la nuez de Brasil y el maní, con límites de detección entre 0,1 y 1 µg/g, lo cual demostró la viabilidad de estos anticuerpos en el diseño de pruebas inmunoquímicas para la detección de alérgenos (18).

También se ha descrito la producción de bibliotecas de fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) mediante la tecnología de producción en fagos a partir de una sola ave inmunizada, con lo que se obtuvieron inmunoglobulinas aviares contra el alérgeno recombinante de la saliva y el epitelio del gato (Fel d1), el alérgeno nativo del polen de la ambrosía (Amb a1) (19) y varios alérgenos nuevos de dos especies de cucaracha, *Blattella germanica* y *Periplaneta americana* (20).

*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis* son ácaros domiciliarios predominantes en regiones tropicales. Sus proteínas principales son una fuente de alérgenos aéreos sensibilizadores y participan en los mecanismos fisiopatológicos de la cascada inflamatoria de enfermedades alérgicas como el asma bronquial atópica y la rinitis alérgica (21). Entre los alérgenos principales están los del grupo 1 de la familia de las cisteína proteasa, que son los más dominantes en la expresión de la hipersensibilidad mediada por IgE contra ácaros del polvo doméstico (22), de aquí la importancia de obtener anticuerpos específicos para su detección y diagnóstico. En el 2014, Lee, *et al.*, publicaron su estudio sobre la producción de anticuerpos IgY específicos contra proteínas de los ácaros *D. pteronyssinus* y *D. farinae*; sin embargo, en dicho estudio las IgYs obtenidas mostraron inmunorreactividad contra un amplio rango de proteínas en el *Western blot*, lo cual limitó su especificidad (23).

El propósito del presente estudio fue producir anticuerpos policlonales IgY específicos contra epitopes

de alérgenos de los ácaros del polvo doméstico utilizando como inmunógenos oligopéptidos sintéticos no glicosilados diseñados por simulación computacional a partir de las proteínas naturales de los alérgenos del grupo 1 de los ácaros *D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *B. tropicalis* (Der p 1, Der f 1 y Blo t 1, respectivamente).

## Materiales y métodos

### Diseño de epítopes y síntesis de péptidos

Los oligopéptidos se diseñaron a partir de las secuencias de aminoácidos de los alérgenos Der p 1, Der f 1 y Blo t 1 reportadas en las bases de datos de proteínas del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Con el objeto de hallar secuencias específicas y homólogas, se emplearon secuencias no conservadas y conservadas de los alérgenos de este grupo, analizando la homología con los programas Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Clustalw (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). La hidrofobia de estos péptidos se evaluó con el programa ProtScale de ExPasy Molecular Biology (<http://web.expasy.org/protscale/>). Para el mapeo de los oligopéptidos diseñados en la estructura en 3D de Der p 1 se utilizó el programa Epítape Viewer (<http://tools.immuneepitope.org/>). Para la selección de los seis oligopéptidos definitivos se tuvo en cuenta que no fueran glicosilados, con el propósito de obviar la posible reactividad inespecífica o cruzada con otros epítopes de alérgenos.

Los oligopéptidos se sintetizaron en el Instituto de Inmunología de la Universidad del Valle, Colombia, mediante el método en fase sólida F-moc en un equipo automatizado Advanced ChemTech APEX 396, se purificaron mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (*Fast protein liquid chromatography*, FPLC), y posteriormente se liofilizaron. La pureza de los péptidos se verificó por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (*Reversed phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC). La identidad de cada péptido se confirmó por espectrometría de masas.

### Inmunización

Para la producción de los anticuerpos se inmunizaron un total de 12 gallinas de la variedad Hy Line Brown de 16 a 20 semanas de edad obtenidas en un centro avícola local. Se hicieron cuatro inmunizaciones en los músculos pectorales de las gallinas (dos gallinas por cada péptido sintético); cada inmunización se realizó a intervalos de dos semanas durante dos meses. Cada antígeno (oligopéptidos

sintéticos) se inyectó en una concentración de 100 µg/ml, emulsionado en adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich®) para la primera inmunización y en adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich®) para los tres refuerzos siguientes. Los huevos se recogieron diariamente antes y después de la primera inyección, y se rotularon y almacenaron a 4 °C. Las gallinas del grupo de control se inyectaron con adyuvante completo e incompleto de Freund sin el antígeno, usando el mismo protocolo descrito para el grupo de estudio (12,24). El seguimiento del título de producción de los anticuerpos policlonales se hizo empleando una prueba de ELISA indirecta. Todos los protocolos experimentales se ajustaron a los parámetros de cuidado y uso del laboratorio de animales aprobados por los comités de ética de la Universidad Javeriana y la Universidad del Norte.

### Extracción de los anticuerpos IgY

Los anticuerpos presentes en la yema de cada huevo se separaron siguiendo un protocolo modificado descrito previamente (25). Brevemente, el contenido de la yema se emulsionó en igual volumen de tampón salino fosfato 0,1 M con pH de 7,4 (PBS) y los lípidos se extrajeron con dos volúmenes de cloroformo. El sobrenadante con los anticuerpos se recolectó y se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento y purificación.

### Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

La reactividad de los anticuerpos producidos por las gallinas se determinó mediante un inmunoensayo de ELISA indirecto. Los antígenos usados fueron extractos de proteínas totales de los ácaros *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis* obtenidos previamente (26).

Se sensibilizaron placas de microtitulación de poliestireno (Nunc Maxisorp®) con 50 µl de extracto de proteína de ácaro en una concentración constante de 20 µg/ml, correspondiente a 1 µg de proteína total por pozo, disueltos en solución reguladora de fosfatos (PBS 1X, pH 7,4). Las placas se incubaron en cámara húmeda a 37 °C durante 18 horas, luego se bloquearon durante 2 horas a 37 °C con 200 µl de solución de bloqueo (PBS 1X, Tween 20 al 0,05 % v/v, leche descremada al 5 % p/v), y se lavaron con solución PBST (PBS 1X /Tween 20 al 0,05% v/v).

Inicialmente se estableció la concentración de anticuerpos IgY para los inmunoensayos de ELISA, para lo cual se usaron extractos crudos

IgY antipéptido P01 obtenidos ocho días después de la tercera inmunización, cuya concentración de proteína total se ajustó previamente en 2,5 mg/ml. Los extractos IgY se diluyeron a 1/250 y 1/500, 1/1000 y 1/2000 en solución de anticuerpo (PBS 1X, Tween 20 al 0,05% v/v, leche descremada al 2,5% p/v). Se agregó un volumen de 100 µl/pozo de cada dilución de IgY, y se incubó en cámara húmeda durante una hora a 37 °C. Con el fin de retirar los anticuerpos no unidos, se realizaron lavados cuatro veces con PBST como se describió anteriormente. Un volumen de 100 µl de conjugado anti-Chicken IgY-peroxidasa de rábano (HRP) (Promega® G1351) diluido a 1/1000 se agregó a cada pozo, y se incubó durante una hora a 37 °C. Se hicieron tres lavados con solución de lavado. La prueba se reveló con sustrato TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) (SureBlue Reserve™ Microwell Substrate, KPL Inc.), la reacción se detuvo con ácido clorhídrico 1N y se leyó en un lector de placas Synergy™HT – BioTek, a una longitud de onda de 450 nm.

La mejor dilución de los extractos IgY se definió como aquella cuya absorbancia en el ELISA fuera mayor a la media ± tres desviaciones estándar (DE) de la absorbancia del extracto IgY pre-inmunización. La concentración de todos los extractos crudos de IgY se ajustó previamente en aproximadamente 2,5 mg/ml de proteína total.

#### **Purificación de los anticuerpos IgY**

Los extractos de las yemas de huevo que presentaron las concentraciones más altas de anticuerpos IgY se purificaron mediante cromatografía de columna tiofílica usando la técnica descrita por Hansen, *et al.* (27), con algunas modificaciones introducidas en trabajos previos (25). La purificación se hizo en un equipo BioLogic™ LP System - Bio-Rad, y la monitorización de la cromatografía utilizando el programa LP Data View (Bio-Rad). Brevemente, la fase estacionaria (Sephacrose® CL4B, Sigma-Aldrich) se activó con divinilsulfona (DVS) y beta-mercaptoetanol (β-MESH); un volumen de 2 ml del soporte activo se equilibró en 50 mM de solución reguladora de fosfato con pH de 7,4 a la cual se agregaron 0,5 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (solución reguladora de equilibrio). Posteriormente, una dilución de 1:2 de la muestra en solución reguladora de equilibrio se agregó al soporte de sefarosa activada. La elución de la IgY retenida se obtuvo mediante la adición de 50 mM de la solución reguladora de fosfato con pH de 7,4 y se monitorizó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm.

La cantidad de proteína total presente en los extractos de yema de huevo antes y después de la purificación, se determinó mediante el microensayo de Bradford usando el estuche comercial Quick-Start™ Bradford Protein Assay de Bio-Rad®. La concentración de proteínas total en cada muestra se determinó extrapolando la absorbancia obtenida en una curva de titulación construida utilizando un patrón de gammaglobulina (GGB) (28).

Los extractos de los anticuerpos purificados se corrieron en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) usando un equipo Mini Protean® III cell (Bio Rad). Se prepararon geles de poliacrilamida con concentraciones 12 %T y 4 %C. Se sembraron 20 µg de muestra por pozo; el corrido electroforético se hizo a 120 V durante dos horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 durante dos horas para luego ser visualizados con el equipo Universal Hood II, Serie n° 76S/7786 (Bio-Rad).

Para identificar las proteínas en los extractos de los ácaros reconocidas por las IgY purificadas se hizo un ensayo de *Western blot*. Brevemente, los extractos de proteínas de *B. tropicalis* y *D. farinae* (20 – 25 µg/carril) se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), como se describió antes. Las proteínas se transfirieron del gel a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (Trans-Blot® Transfer Medium de Bio-Rad), luego se lavaron con una solución reguladora salina con Tris (TBS 1X) pH 7,5 y se bloquearon durante dos horas en una solución de bloqueo (TBS 1X/ Tween-20 0,1 % v/v/leche descremada 2,5 % p/v). Cada membrana se incubó durante dos horas en una dilución de 1/250 de IgY antipéptido P02, antipéptido P04, antipéptido P06 y pre-inmunización. El exceso de anticuerpo se lavó con solución TBST (TBS 1X/ Tween-20 al 0,1% v/v). Las IgY unidas se detectaron con el conjugado anti-Chicken IgY- peroxidasa de rábano (HRP) (Promega® G1351) diluido a 1/1000 en solución de bloqueo. El revelado se hizo con una solución compuesta por imidazol al 0,1 % y diaminobenzidina al 0,001 % disuelta en PBS 1x Triton X-100 0,1 %, y 15 µl de peróxido de hidrógeno 30 % al 0,05 %. Después de visualizadas las señales, la reacción se detuvo con agua destilada.

#### **Ensayos de especificidad de las IgY purificadas**

*ELISA indirecto.* La especificidad de los anticuerpos purificados se evaluó mediante un inmunoensayo

de ELISA indirecto siguiendo el protocolo descrito antes. Para estos experimentos se escogieron los anticuerpos IgY antipéptico P02 e IgY antipéptido P04 por presentar la mayor reactividad para *B. tropicalis* y *Dermatophagoides* sp, respectivamente; también se escogió el IgY antipéptido P06 por tratarse de un anticuerpo diseñado para *B. tropicalis* y *Dermatophagoides* sp.

Los antígenos provenían de extractos de cuerpo entero de ácaros *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis*, así como un extracto de cuerpo entero de cucaracha (*P. americana*) donado por el Dr. Enrique Fernández-Caldas (Laboratorios Leti, Madrid, España), usado como control negativo y para evaluar la especificidad de los anticuerpos IgY.

Inicialmente se estableció la mejor dilución de los anticuerpos IgY purificados usando diluciones de 1/100, 1/250 y 1/500 ajustando previamente la concentración de proteína total en 1,5 mg/ml. Luego se determinó el límite de detección de cada anticuerpo sensibilizando las placas con 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,06 – 0,03 y 0 µg/pozo de proteína total de cada antígeno.

**Dot Blot.** Se prepararon diluciones dobles seriadas de cada extracto de ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *B. tropicalis*) a partir de 0,5 a 0,03 µg/µl de proteína total en solución TBS 1X con pH de 7,5. Se agregaron 50 µl de cada dilución sobre una membrana de nitrocelulosa Z-probe (Bio-Rad). La membrana se incubó con los extractos durante dos horas a temperatura ambiente, luego se lavó tres veces con solución TBST y se incubó durante 45 minutos con solución de bloqueo. Los pasos de detección y revelado de los puntos se hicieron como se describió en el *Western blot* con una dilución de 1/100 de cada IgY en solución de bloqueo. Los puntos se analizaron con el programa de acceso libre JustQuantify Free Version 0.3 (<http://www.sweday.com>), programa que permite expresar cuantitativamente la intensidad de los puntos generados en cada reacción.

### Análisis de datos

Para la producción de los anticuerpos se inmunizaron dos gallinas por cada péptido. Los ensayos de cuantificación de proteína total y las pruebas de ELISA se llevaron a cabo por duplicado. Todos los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico univariado utilizando medidas de frecuencia y pruebas de tendencia central y de dispersión con el paquete estadístico SPSS Statistics 19 para Windows de IBM (SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, H, IL, USA). Los gráficos

se hicieron con el paquete ggData2, versión 2.1.0., en el programa R versión 3.2.1 (2015) (<http://www.rstudio.com>).

### Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por los comités de ética de la Universidad del Norte y de la Pontificia Universidad Javeriana previo estudio del cumplimiento de las disposiciones determinadas en la Ley 84 de 1989 y los lineamientos consignados en la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia sobre la investigación biomédica con animales.

### Resultados

#### Diseño de epítopes y síntesis de oligopéptidos

Se diseñaron y sintetizaron seis oligopéptidos no glicosilados con tamaños entre 17 y 20 aminoácidos, los cuales se organizaron en tres grupos según el diseño de la secuencia, a saber: grupo A, conformado por los péptidos P01, P04 y P06, diseñados a partir de una secuencia homóloga de las cisteína proteasas de ácaros del género *Dermatophagoides* sp. y de la especie *B. tropicalis*; grupo B, conformado por los péptidos P02 y P05 diseñados a partir de la secuencia del alérgeno Blot 1, y grupo C, conformado por el péptido P03 diseñado a partir de una secuencia homóloga del Der p 1 y Der f 1 (cuadro 1).

El mapeo de los oligopéptidos P01, P03, P04 y P06 en la estructura en 3D de Der p 1 evidenció que las secuencias sintetizadas se encontraban expresadas en la proteína madura de la cisteína proteasa del ácaro *D. pteronyssinus* (figura 1). El mapeo para los oligopéptidos de *Blomia tropicalis* (P02 y P05) no se hizo debido a que aún no se tiene una estructura en 3D de esta proteína.

#### Producción de anticuerpos IgY antiácaros

Se recolectaron los huevos de las gallinas cada ocho días a partir del día previo a la inmunización

**Cuadro 1.** Secuencia de aminoácidos de los oligopéptidos de la cisteína proteasa de ácaros domiciliarios del género *Dermatophagoides* y la especie *B. tropicalis* (patente: US009416163B2)

Código	Secuencia	Aminoácidos
P01	DYWIVRNSWDTNWGDNGYGY	20
P02	AHFRNLRKGLRGAGYNDAQ	20
P03	FRHYDGRTHIQRDNGYQPNY	20
P04	TNACSINGNAPAEIDLQMR	20
P05	PANFDWRQKTHVNPINRQG	19
P06	PIRMQGGCGSCWAFSGV	17

(día cero o pre-inmunización). La titulación de los extractos IgY antipéptido P01 evidenció que la mayor reactividad de este anticuerpo frente al extracto alérgeno de *D. pteronyssinus* (1µg/pozo) ocurrió con la dilución de 1/250 v/v, siendo significativamente mayor a la obtenida con el IgY pre-inmunización (figura 2). Por ello, se escogió esta dilución para evaluar la reactividad de todos los extractos IgY antipéptidos contra los alérgenos de *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* durante un periodo de inmunización de ocho semanas.

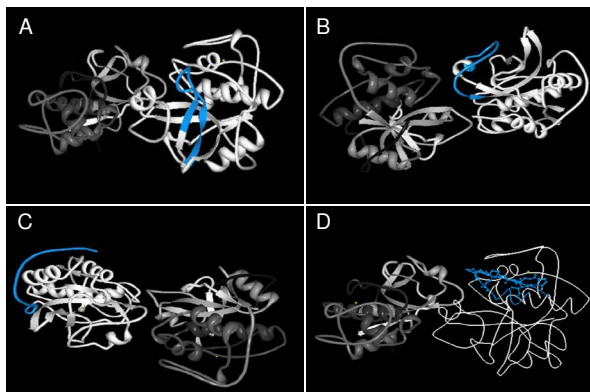
Las IgY en los huevos de los animales inmunizados con el péptido P02 del grupo B presentaron su mayor reactividad antiácaros en el día 40 después de la primera inmunización, sin embargo, la reactividad fue más alta contra los alérgenos de *B. tropicalis* (figura 3). Asimismo, aquellos inmunizados con P05 y P03 mostraron un mejor reconocimiento de *B. tropicalis*. Por otro lado, los animales inmunizados con los péptidos P01 y P04 (grupo A), presentaron mayor título de anticuerpos contra *D. pteronyssinus*. El péptido P06 (grupo A), por su parte, reconoció las proteínas de ambos ácaros con una reactividad similar, alcanzando una reactividad máxima en el día 32 después del inicio del esquema de inmunización y coincidiendo con la tercera inmunización, lo cual podría explicarse por un fenómeno estocástico sin ninguna relación con la inmunización y la respuesta específica del modelo experimental.

#### Extracción y purificación de los anticuerpos IgY

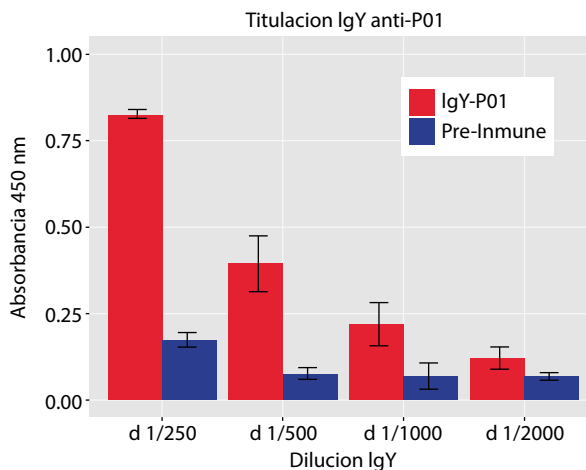
Las concentraciones de proteína total en los extractos 'deslipados' de la yema de huevo fue de  $3,49 \pm 0,16$  mg/ml; después de la purificación por columna tiorfílica se obtuvo una concentración de IgY de  $1,94 \pm 0,68$  mg/ml de extractos de yema de huevo, lo cual equivale a 18,9 - 39,3 mg de IgY por huevo.

El análisis de los extractos IgY mediante SDS-PAGE mostró dos bandas bien definidas, cuyos tamaños son cercanos a los reportados para las cadenas pesadas (67 kDa) y livianas (25 kDa) de la IgY (11). También se detectaron impurezas menores a nivel de los 110 kDa y una banda de alto peso molecular que podría ser la IgY completa (aproximadamente 160 kDa) (figura 4).

El *Western blot* con las IgY antipéptidos P02, P04, P06 y pre-inmunización, comparadas con los extractos de ácaros *D. farinae* y *B. tropicalis*, mostró que todas las IgY antipéptidos reconocían varias proteínas de los ácaros, destacándose dos bandas intensas entre los 21 y 31 kDa que podrían



**Figura 1.** Mapeo de los péptidos sintetizados. En los paneles A, B, C y D se observa la localización de las secuencias de aminoácidos de los péptidos P01, P03, P04 y P06 (color azul), respectivamente, en la estructura en 3D de la proteína nativa de la cisteína proteasa de *D. pteronyssinus* (PDB 3F5V).

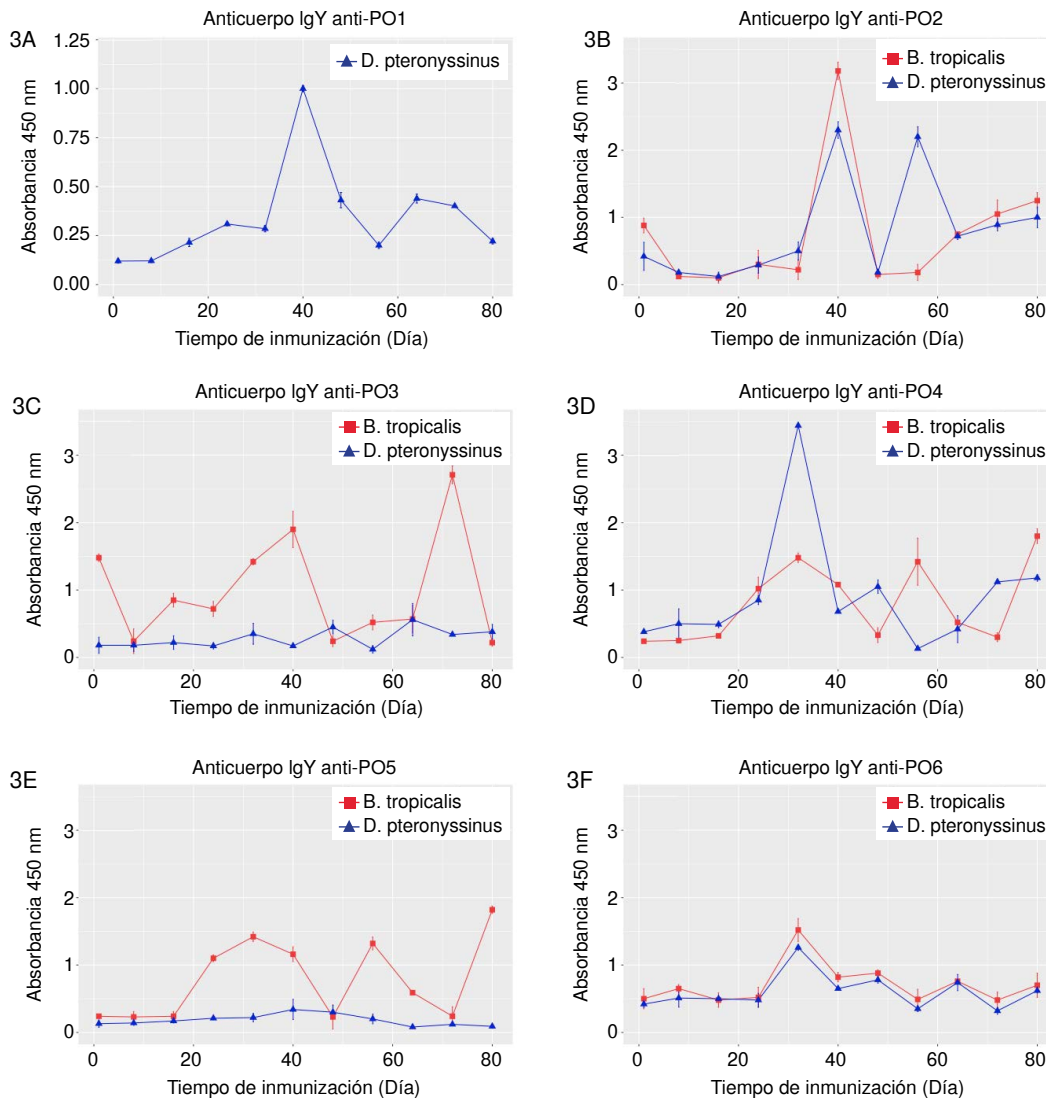


**Figura 2.** Titulación del anticuerpo IgY anti-péptido P01 en los extractos de yema de huevo. Las placas de titulación se sensibilizaron con extracto de *D. pteronyssinus* (1µg/pozo). Las diluciones de 1/250 y 1/500 del extracto IgY antipéptido P01 (2,5 mg/ml) mostraron 'reactividades' significativamente diferentes (> media  $\pm$  3 DE) a las de la IgY pre-inmunización (2,5 mg/ml).

corresponder a los alérgenos Blo t 1 y Der f 1 (figura 5). Cheong, *et al.*, estimaron un peso molecular de 26 kDa para la proteína nativa Blo t 1 detectada tanto en extractos crudos de *B. tropicalis* como en el medio de cultivo (29); por otra parte, el peso molecular estimado de la proteína madura del Der f 1 con una glicosilación es de 25,6 kDa (30). El reconocimiento inespecífico de otras proteínas se atribuye al carácter policlonal de los anticuerpos IgY.

#### Titulación de los extractos de IgY purificados

Un ensayo de ELISA con diferentes diluciones (1/100, 1/250 y 1/500) de los IgY purificados por columna tiorfílica permitió establecer que las diluciones de



**Figura 3.** A. Reactividad de anticuerpos IgY antipéptido P01; B. P02; C. P03; D. P04, E. P05 y F. P06, en los extractos de yema de huevo (dilución de 1/250). Las placas de titulación se sensibilizaron con extractos de *B. tropicalis* (Bt) y *D. pteronyssinus* (Dp) con 1 µg/pozo. Las gallinas se inmunizaron en los días 1, 16, 32 y 48.

1/100 y 1/250 v/v mostraron las reactividades más altas comparadas con las IgY pre-inmunización; sin embargo, la dilución de 1/100 produjo las mejores reactividades contra ambos extractos de ácaros, *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis* (figura 6 A y B).

#### **Inmunorreactividad y especificidad de las IgY purificadas**

Las IgY antipéptidos P02, P04 y P06 purificadas por columna tifoíllica fueron inmunorreactivas frente a los extractos alérgenos de ácaros *D. farinae* y *B. tropicalis*; sin embargo, las IgY antipéptido P02 fueron más reactivas al extracto de *B. tropicalis*, mientras que las IgY antipéptido P04 y P06 fueron más reactivas al ácaro *D. farinae* (figura 7A, B y C).

Por otra parte, los anticuerpos IgY antipéptido P02 y P04 mostraron un escaso reconocimiento inespecífico contra el extracto de la cucaracha *P. americana* (otra fuente común de alérgenos domiciliarios), en contraste con las absorbancias obtenidas contra *D. farinae* y *B. tropicalis*, lo cual confirma la especificidad de los anticuerpos contra alérgenos de los ácaros bajo las condiciones experimentales del estudio.

Los resultados del inmunoensayo *Dot Blot* concordaron con el ELISA indirecto, observándose una mayor actividad de unión de las IgY purificadas con las proteínas de extractos alérgenos de los ácaros *D. farinae* y *B. tropicalis*. Cuando se usó



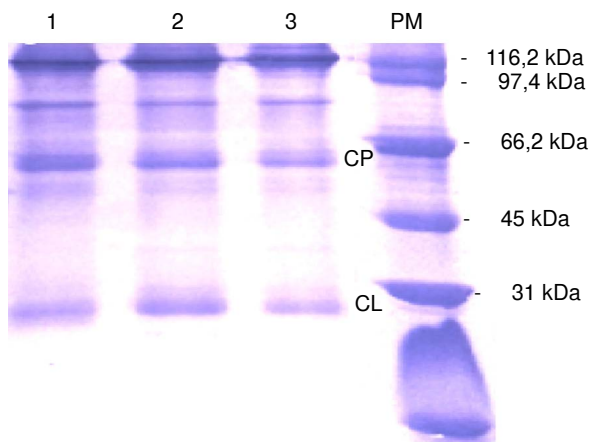
como antígeno el extracto de *D. pteronyssinus*, la actividad de unión fue más baja. Además, el extracto de yema de huevo pre-inmunización no reaccionó con los extractos alérgenos de los ácaros (figura 8).

**Discusión**

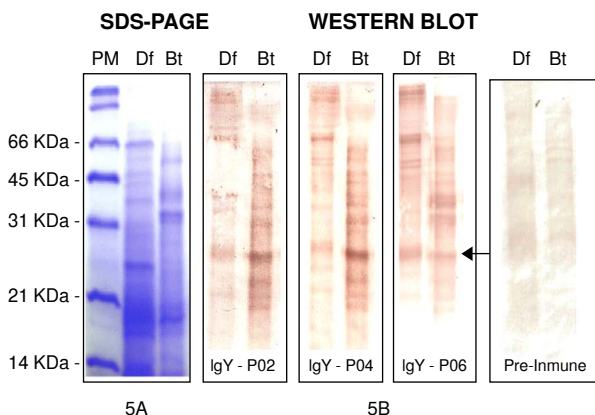
La síntesis de oligopéptidos y el mapeo mediante simulación computacional de epítopes de células B contenidos en estos oligopéptidos constituye una

herramienta valiosa para el diseño de inmunógenos de aplicación en alergología (31-33). No se encontraron artículos científicos que describieran la producción de oligopéptidos sintéticos lineales no glicosilados de alérgenos mayoritarios de los ácaros *D. farinae* y *B. tropicalis*, como tampoco sobre su aplicación en alergología experimental. En el presente estudio se sintetizaron seis oligopéptidos a partir de secuencias de los alérgenos Der p 1, Der f1 y Blo t 1, los cuales se utilizaron como inmunógenos en un modelo experimental aviar. Los seis péptidos diseñados indujeron la producción de títulos elevados de anticuerpos IgY policlonales frente a extractos alérgenos de ácaros domiciliarios. Durante las ocho semanas de inmunización, los títulos de anticuerpos fueron diferentes entre los grupos, siendo los animales inmunizados con el péptido P02 y P04 los que produjeron los títulos más elevados de anticuerpos. Existen factores asociados a las características de los péptidos que pueden influir en el proceso de inmunización y la obtención de un título de anticuerpos en cualquier organismo; algunos de ellos pueden ser: 1) la sensibilidad a la proteólisis; 2) la estabilidad durante la administración en el cuerpo del animal; 3) la disposición de epítopes más antigénicos, y 4) el plegamiento del péptido en conformaciones que no correspondan a la secuencia dentro de la proteína intacta (34). Por otra parte, Leenaars, *et al.*, han señalado algunos factores asociados al proceso de inmunización que pueden contribuir a que el título de anticuerpos varíe, por ejemplo, causar estrés o dolor al animal durante la inmunización, usar un antígeno mal homogenizado con el adyuvante, lo cual impide una correcta administración del antígeno en el sistema inmunitario del animal, y no inyectar de forma adecuada, causando que el antígeno se introduzca por una vía distinta a la intramuscular, como la intradérmica, la cual es menos eficiente en la distribución del antígeno en el animal (7).

Los anticuerpos IgY antipéptidos P02, P04 y P06 reconocieron proteínas en los extractos alérgenos de *D. farinae* y *B. tropicalis*. Las secuencias de Der f 1 y Blo t 1, publicadas en la base de datos de proteínas del NCBI, tienen un 32,8 % de identidad entre ellas, lo cual posibilita que los anticuerpos reconozcan epítopes compartidos. Asimismo, la similitud estructural entre las proteínas puede hacer que la disposición de los residuos expuestos en la superficie de la estructura terciaria influya en la unión de los anticuerpos a las cisteína proteasas usadas (35,36). Estas hipótesis está respaldada

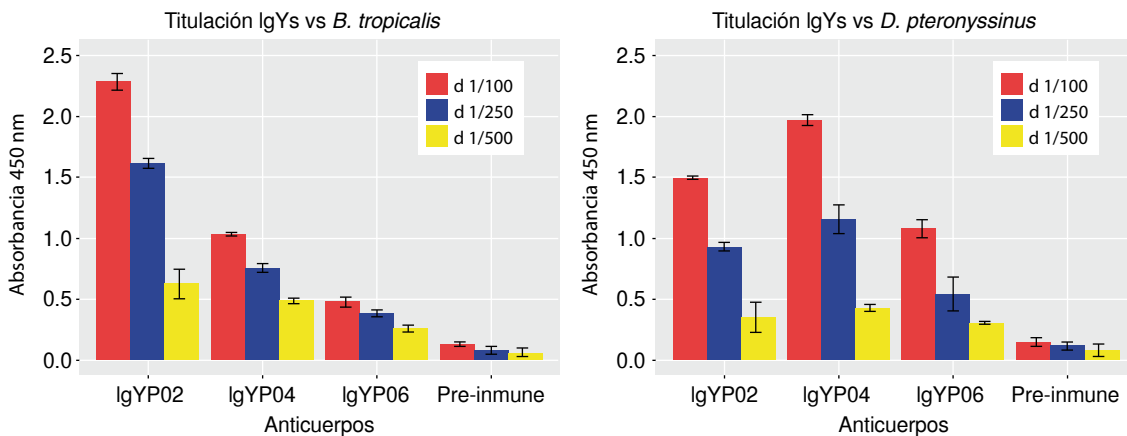


**Figura 4.** Perfil de la electroforesis SDS-PAGE de extractos de IgY en yemas de huevos. 1:- IgY antipéptido P02; 2:- IgY antipéptido P04; 3:- IgY antipéptido P06. CP: cadenas pesadas; CL: cadenas livianas; PM: marcadores de peso molecular (Molecular Weight Standards, Broad Range de Bio-Rad).

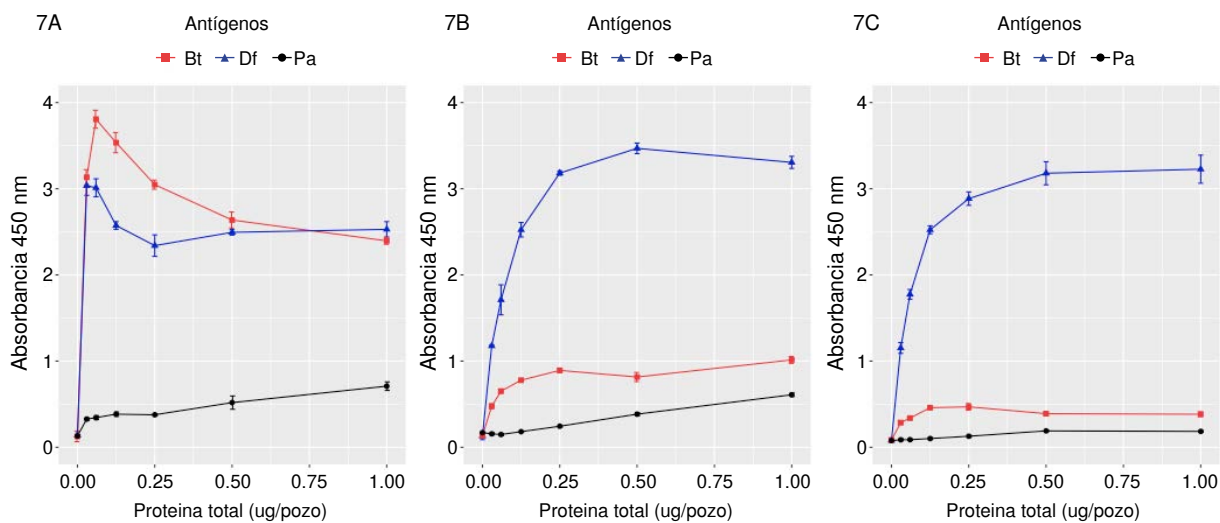


**Figura 5.** Western bot con las IgY antipéptidos P02, P04, P06 y pre-inmunización. Perfil electroforético de las proteínas SDS-PAGE de los extractos de ácaros *D. farinae* (Df) y *B. tropicalis* (Bt) (A). Inmunorreacción con los distintos anticuerpos y extractos de ácaros. Se muestra que todas las IgY antipéptidos reconocieron varias bandas electroforéticas en los extractos, destacándose una banda intensa en Bt y otra en Df a nivel de los 26 kDa, las cuales podrían corresponder a los alérgenos Blo t 1 y Der f 1. PM: marcadores de peso molecular (Molecular Weight Standards, Broad Range de Bio-Rad)





**Figura 6.** Titulación de los IgY purificados. Los anticuerpos IgY antiP02, antiP04 y antiP06, purificados por columna tiofílica, se titularon frente a los extractos de proteína total de los ácaros *B. tropicalis* (A) y *D. pteronyssinus* (B) en una concentración de 1 µg/pozo. La dilución de 1/100 v/v de los tres anticuerpos presentó las reactividades más altas con ambos ácaros, comparada con la del IgY pre-inmunización.

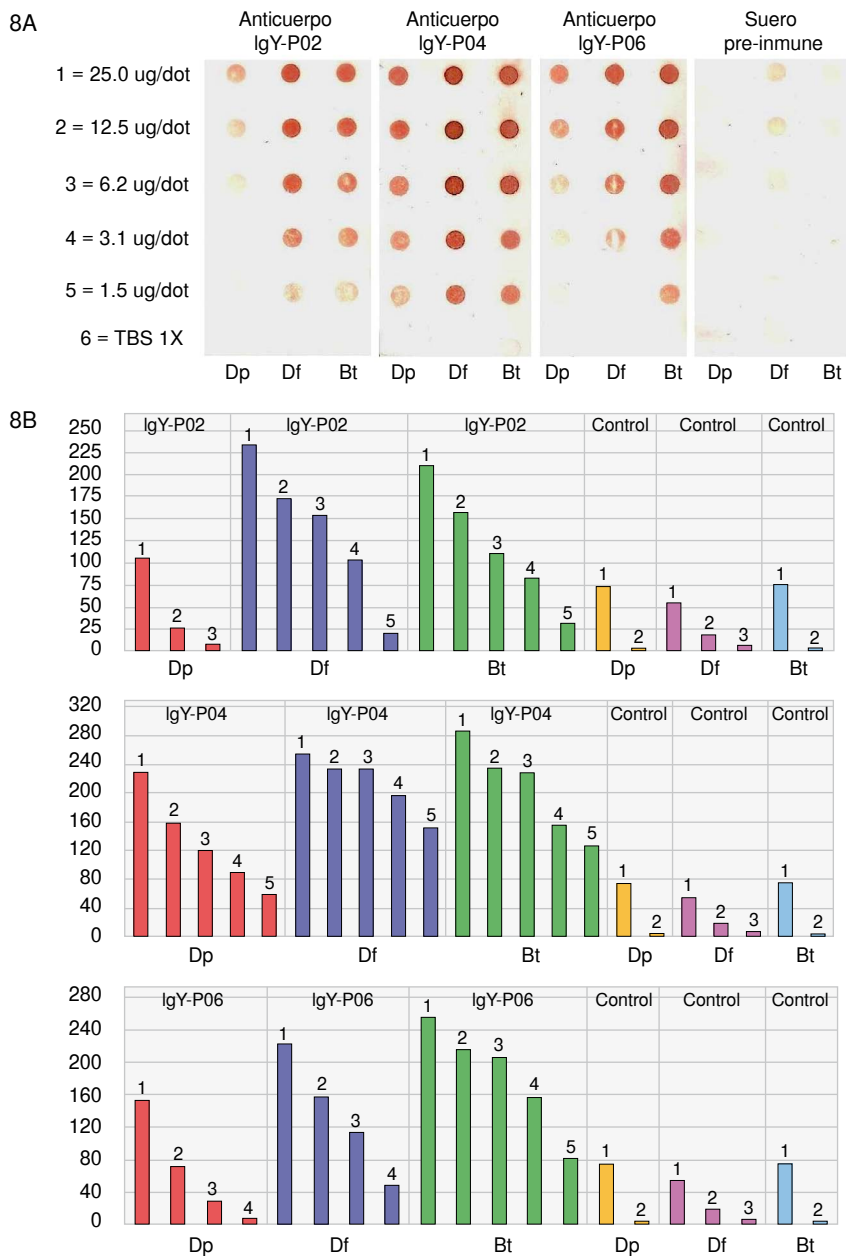


**Figura 7.** Especificidad de los IgY antipéptido purificados por columna tiofílica. La fuente de antígenos fueron los extractos alérgicos de los ácaros *B. tropicalis* (Bt), *D. farinae* (Df) y de la cucaracha *P. americana* (Pa) de 1 µg/pozo a 0 µg/pozo. Los anticuerpos IgY antipéptido P02 (A), antipéptido P04 (B) y antipéptido P06 (C) se usaron en diluciones de 1/100 (equivalentes a 15 µg/ml). Todos los IgY antipéptidos fueron inmunorreactivos contra los extractos de ácaros en la concentración mínima ensayada (0,03 µg/pozo de proteína total). Los IgY antipéptidos P02 y P04 mostraron un escaso reconocimiento inespecífico contra *P. americana*.

por las observaciones de Cheong, *et al.*, quienes publicaron la secuencias de aminoácidos de una proteína recombinante del Blo t1, la cual presentó 34 y 32 % de identidad con Der p1 y Der f1, respectivamente; el modelamiento molecular del Blo t1 y Der p1 sobre la estructura cristalina de otras dos cisteínas proteasas, la actinidina y la papaina, demostró que Blo t1 presenta una gran similitud estructural con Der p1 en tres regiones importantes: un dominio I de la hélice alfa conformado por residuos del extremo N-terminal; un dominio II de hoja beta plegada antiparalela y hélices cortas

conformado por residuos del extremo C-terminal, y en una hendidura ubicada entre los dominios I y II, la cual conforma el sitio catalítico (30).

En cuanto a la especificidad de los anticuerpos, las IgY antipéptidos P02, P04 y P06 tuvieron un muy bajo reconocimiento de las proteínas de *P. americana* (extracto de cucaracha), un insecto que se ha descrito como otra fuente importante de alérgenos domiciliarios (37,38). Esto demuestra la utilidad del uso de estos anticuerpos para la monitorización de la presencia o concentración de alérgenos de ácaros en espacios intramuros.



**Figura 8.** Dot Blot con las IgY antipeptidos P02, P04, P06 y suero pre-inmunización (control) frente a extractos alérgenos de *D. pteronnyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df) y *B. tropicalis* (Bt). **A.** Resultados de la inmunorreacción con los distintos anticuerpos y antígenos. **B.** Gráficos de volumen de los puntos calculado con el programa JustQuantify free, versión 0.3. Los resultados evidenciaron que la IgY antipeptido P04 presentó una mayor inmunorreactividad contra los tres antígenos (Dp, Df y Bt).

Hasta donde se sabe, este es el primer reporte de producción de anticuerpos IgY policlonales contra alérgenos del grupo 1 de los ácaros domiciliarios producidos por la inmunización de aves utilizando oligopeptidos sintéticos no glicosilados. Se ha descrito la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales contra alérgenos Der p 1, Der f1 y Blo t1 usando ratones para la inmunización (39). Estos anticuerpos se han utilizado para la cuantificación

de alérgenos de ácaros en muestras de polvo domiciliario y la purificación de alérgenos nativos a partir de extractos totales (40-42). A diferencia del modelo de inmunización en ratones, el uso de gallinas para la producción de anticuerpos permite una mayor producción de anticuerpos en las yemas de los huevos, lo cual disminuye los costos de producción. En este trabajo se obtuvo una concentración de IgY de  $1,94 \pm 0,68$  mg/ml de

extracto de yema de huevo, y una producción de 18,9 a 39,3 mg de IgY por huevo, cantidad superior a la producción de anticuerpos IgG reportada en mamíferos (43).

En su conjunto, los resultados presentados en este trabajo sugieren que los anticuerpos IgY policlonales antialérgenos del grupo 1 de los ácaros del polvo doméstico podrían usarse en futuros protocolos de diagnóstico y control de alérgenos de ácaros en ambientes intramuros.

### Conflicto de intereses

Los desarrollos tecnológicos producto de esta tecnología se encuentran patentados ante la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia (Resolución No.78965). La estructura de los oligopéptidos se encuentra protegida por la oficina de patentes en Estados Unidos, con el número US009416163B2.

### Financiación

Esta investigación fue financiada parcialmente por Colciencias (121534419081) y con fondos propios de la Pontificia Universidad Javeriana y la Universidad del Norte.

### Referencias

- Goldman RD.** Antibodies: Indispensable tools for biomedical research. *Trends Biochem Sci.* 2000;25:593-5. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01725-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01725-4)
- Bradbury A, Plückthun A.** Reproducibility: Standardized antibodies used in research. *Nature.* 2015;518:27-9. <https://doi.org/10.1038/518027a>
- Peng J, Song S, Xu L, Ma W, Liu L, Kuang H, et al.** Development of a Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA for Peanut Allergen Ara h 1 in Food. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10:2897-905. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072897>
- Sookrung N, Khetsuphan T, Chaisri U, Indrawattana N, Reamtong O, Chaicumpa W, et al.** Specific B-cell epitope of per a 1: A major allergen of American Cockroach (*Periplaneta americana*) and anatomical localization. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014;6:325-32. <https://doi.org/10.4168/aair.2014.6.4.325>
- Even MS, Sandusky CB, Barnard ND.** Serum-free hybridoma culture: Ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol.* 2006;24:105-8. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.001>
- Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT.** Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR J.* 1995;37:93-118. <https://doi.org/10.1093/ilar.37.3.93>
- Leenaars M, Hendriksen CF.** Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations. *ILAR J.* 2005;46:269-79. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269>
- Thompson MK, Fridy PC, Keegan S, Chait BT, Fenyö D, Rout MP.** Optimizing selection of large animals for antibody production by screening immune response to standard vaccines. *J Immunol Methods.* 2016;430:56-60. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.006>
- Jain E, Kumar A.** Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters. *Biotechnol Adv.* 2008;26:46-72. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.004>
- Joint Working Group on Refinement.** Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Lab Anim.* 1993;27:1-22. <https://doi.org/10.1258/002367793781082412>
- 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;85:179-89.
- Svendson Bollen L, Crowley A, Stodulski G, Hau J.** Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *J Immunol Methods.* 1996;191:113-20. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00010-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00010-5)
- Malmarugan S, Raman M, Jaisree S, Elanthali P.** Egg immunoglobulins - an alternative source of antibody for diagnosis of infectious bursal disease. *Veterinarski Arhiv.* 2005;75:49-56.
- Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C.** Eggs: Conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods.* 1981;46:63-8. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90333-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90333-1)
- Warr GW, Magor KE, Higgins DA.** IgY: Clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today.* 1995;16:392-8. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)
- Iqbal A, Ateeq N.** Effect of processing on the detectability of peanut protein by ELISA. *Food Chem.* 2013;141:1651-4. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.102>
- Drs E, Baumgartner S, Bremer M, Kemmers-Voncken A, Smits N, Haasnoot W, et al.** Detection of hidden hazelnut protein in food by IgY-based indirect competitive enzyme-immunoassay. *Anal Chim Acta.* 2004;520:223-8. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.04.054>
- Blais BW, Gaudreault M, Phillippe LM.** Multiplex enzyme immunoassay system for the simultaneous detection of multiple allergens in foods. *Food Control.* 2003;14:43-7. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00053-1](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00053-1)
- Finlay WJ, deVore NC, Dobrovolskaia EN, Gam A, Goodyear CS, Slater JE.** Exploiting the avian immunoglobulin system to simplify the generation of recombinant antibodies to allergenic proteins. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:1040-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02307.x>
- de Vore N, Finlay W, Dobrovolskia E, Gam A, Slater J.** Cloning and analysis of mono-specific scFv fragments from chicken to allergenic proteins of *Periplaneta americana* (American cockroach). *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:S297. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.01.550>
- Andiappan AK, Puan KJ, Lee B, Nardin A, Poidinger M, Connolly J, et al.** Allergic airway diseases in a tropical urban environment are driven by dominant mono-specific sensitization against house dust mites. *Allergy.* 2014;69:501-9. <https://doi.org/10.1111/all.12364>

22. Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TA. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*. 1981; 289:592-3.
23. Lee KE, Han BK, Han JY, Hong JY, Kim MN, Heo WI, *et al*. Production of egg yolk antibodies specific to house dust mite proteins. *Yonsei Med J*. 2014;55:999-1004. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.4.999>
24. Ruan GP, Ma L, Meng XJ, Meng MJ, Wang XN, Lin Y, *et al*. Quantification of antibody (IgY) titers in hen eggs following immunization and their use in detecting cell surface molecules on nitrocellulose membranes. *J Immunoassay Immunochem*. 2007;28:35-45. <https://doi.org/10.1080/15321810601026083>
25. Sosa AC, Espejo AJ, Rodríguez EA, Lizaraso LM, Rojas A, Guevara J, *et al*. Development of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantification of iduronate-2-sulfate sulfatase. *J Immunol Methods*. 2011; 368:64-70. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.03.004>
26. Mendoza DL, Ruiz T, Lagares A, Garavito G, Egea E. Caracterización de la actividad alérgica y enzimática de extractos somáticos producidos a partir de cultivos *in vitro* del ácaro *Dermatophagoides farinae*. *Salud Uninorte*. 2011;27:11-21.
27. Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods*. 1998;215:1-7. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00050-7)
28. Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Review. Biotechnol Appl Biochem*. 1999;29:99-108. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00538.x>
29. Gough L, Schulz O, Sewell HF, Shakib F. The cysteine protease activity of the major dust mite allergen der P 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J Exp Med*. 1999;190:1897-902.
30. Chruszcz M, Pomés A, Glesner J, Vailes LD, Osinski T, Porebski PJ, *et al*. Molecular determinants for antibody binding on group 1 house dust mite allergens. *J Biol Chem*. 2012;287:7388-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.311159>
31. Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H, Mills EN. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An *in silico* analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:163-70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.026>
32. Sharma V, Singh BP, Gaur SN, Pasha S, Arora N. Bioinformatics and immunologic investigation on B and T cell epitopes of Cur I 3, a major allergen of *Curvularia lunata*. *J Proteome Res*. 2009;8:2650-5. <https://doi.org/10.1021/pr800784q>
33. Brusci V, Petrovsky N, Gendel SM, Millot M, Gigonzac O, Stelman SJ. Computational tools for the study of allergens. *Allergy*. 2003;58:1083-92. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00224.x>
34. Moisa AA, Kolesanova EF. Synthetic Peptide Vaccines. In: Priti R, editor. *Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario*. InTech Publications; 2012. <https://doi.org/10.5772/33496>
35. Chruszcz M, Chapman MD, Vailes LD, Stura EA, Saint-Remy JM, Minor W, *et al*. Crystal structures of mite allergens Der f 1 and Der p 1 reveal differences in surface-exposed residues that may influence antibody binding. *J Mol Biol*. 2009;386:520-30. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.049>
36. Cheong N, Soon SC, Ramos JD, Kuo IC, Kolatkar PR, Lee BW, *et al*. Lack of human IgE cross-reactivity between mite allergens Blo t 1 and Der p 1. *Allergy*. 2003;58:912-20. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00215.x>
37. Arruda LK, Chapman MD. The role of cockroach allergens in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2001;7:14-9.
38. Sun BQ, Lai XX, Gjesing B, Spangfort MD, Zhong NS. Prevalence of sensitivity to cockroach allergens and IgE cross reactivity between cockroach and house dust mite allergens in Chinese patients with allergic rhinitis and asthma. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123:3540-4.
39. Chien TI, Chen YG, Chiang BL. Preparation of Der p 1 specific monoclonal antibodies and use in a two-site-ELISA to detect Der p 1 allergen. *J Microbiol Immunol Infect*. 2000;33:87-92.
40. Ramos JD, Cheong N, Teo AS, Kuo IC, Lee BW, Chua KY. Production of monoclonal antibodies for immunospecific purification and quantitation of Blo t 1 allergen in mite and dust extracts. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:604-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.1922.x>
41. Sookrung N, Kamlanghan T, Indrawattana N, Tungtrongchitr A, Tantilipikorn P, Bunnag C, *et al*. Quantification of Der f 1 in houses of patients allergic to house dust mite, *Dermatophagoides farinae*, using a locally produced detection reagents. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2011;29:78-85.
42. Sander I, Zahradnik E, Kraus G, Mayer S, Neumann HD, Fleischer C, *et al*. Domestic mite antigens in floor and airborne dust at workplaces in comparison to living areas: a new immunoassay to assess personal airborne allergen exposure. *PLoS One*. 2012;7:e52981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052981>
43. Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim*. 2005;33:129-54.