

Desarrollo de un Sistema ELISA para cuantificar IgG de ratón tomando como base la tecnología IgY

Esteban J. Gutiérrez Calzado, Tomás Samón Chávez, Gustavo Sierra González,* David Higginson Clarke, Gustavo Rodríguez Silva y Rüdiger Schade.*****

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

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

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

RESUMEN. Se conoce que desde 1893, se había descrito un experimento en el que se demostraba que en el proceso de inmunización de gallinas, el resultado consistía en la transferencia de anticuerpos específicos hacia la yema de sus huevos. Tomando como base este conocimiento, este trabajo se enfocó en demostrar que los anticuerpos de yema de huevo obtenidos a partir de gallinas inmunizadas con una preparación comercial de IgG de ratón pueden constituir una alternativa a sus similares en mamíferos al conjugarse con la enzima peroxidasa y utilizarse como reactivos en técnicas ELISA para la determinación de anticuerpos monoclonales murinos del tipo IgG. Para esto, se desarrollaron esquemas de inmunización en paralelo en gallinas y conejos a los que se les aplicaron diversas dosis del antígeno (IgG de ratón) demostrándose que las gallinas son capaces de brindar títulos de anticuerpos aunque menores que en el conejo, sí razonables en sus yemas de huevo contra este antígeno, útiles para procesos posteriores. Se demuestra que el método del m-peryodato de sodio es aplicable a los anticuerpos de yema de huevo (IgY) para conjugarlos a la enzima peroxidasa para su uso exitoso en inmunoensayos como el ELISA. El Sistema ELISA desarrollado sobre la base de los anticuerpos IgY mostró en su desempeño algunas ventajas a su similar desarrollado con conjugado de anticuerpos de mamíferos. Este trabajo demuestra que la obtención de anticuerpos IgY en este caso, es una fórmula que reduce los costos de producción de conjugados enzimáticos al menos tres veces, lo que conjuntamente con los elementos bioéticos la convierte en una vía atractiva para complementar los procesos tradicionales de producción de anticuerpos.

ABSTRACT. As early as 1893, an experiment was described in which the immunisation of a hen results in the transfer of specific antibodies (Abs) into the egg yolk was demonstrated. Taking in mind this knowledge, this work has been focused on the immunisation of hens with commercial mouse IgG to prepare IgY polyclonal antibodies and label them with horse radish peroxidase (HRP) to use as alternative similar mammal's antibodies in ELISA tests to determine murine monoclonal antibodies. Immunisation schedules were carried out in rabbits and hens simultaneously with different dosages of commercial preparation of mouse IgG. Rational titres of antibodies were obtained from egg yolk in comparison to rabbit's antibodies. Here, it is demonstrated that sodium m-periodate method is also useful to offer IgY enzymatic conjugates with characteristics similar to those obtained from mammal's source. The performance of ELISA assay by egg yolk's conjugate

showed several advantages in comparison to similar one with rabbit's conjugate in parameters like linearity and precision. Finally, it is demonstrated that IgY Technology is an alternative to produce enzymatic conjugates at lower cost and can be accepted as an attractive way for traditional mammalian polyclonal antibodies technology.

INTRODUCCIÓN

La producción de anticuerpos (Acs) con frecuencia constituye una etapa definitoria en muchos proyectos de investigación y puede constituir la clave del éxito o el fracaso de un estudio.¹⁻⁶ Por esta razón, la producción de Acs en animales de laboratorio se ha convertido en la parte esencial de muchas investigaciones.

La base de toda técnica inmunológica es la detección de antígenos o Acs apoyándose en la reacción específica que ocurre entre estas dos proteínas. El éxito para desarrollar estas técnicas de detección es la tenencia de Acs específicos hacia determinados antígenos.

Dado al hecho de que los Acs de yemas de huevo puestos por gallinas inmunizadas se han reconocido como una excelente fuente de Acs policlonales, se ha producido en las

Correspondencia:

Esteban Justo Gutiérrez Calzado

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

Correo electrónico: esteban@cim.sld.cu

últimas décadas una explosión en el desarrollo de proyectos de investigación para utilizar pollos como un biomodelo apropiado en la producción de Acs policlonales (IgY) hacia proteínas de mamíferos, para usarlos en el campo del diagnóstico.⁷⁻¹⁰ Hasta la fecha, no solo se han utilizado pollos para la producción de Acs policlonales aviares con fines diagnóstico, han sido utilizadas también codornices (*Coturnix quail*),¹¹ así como Acs purificados de las yemas de huevos de los patos pekineses blancos (*Anas platyrhynchos*)¹² para estos propósitos, de manera que se han podido demostrar las atractivas ventajas que ofrecen estas inmunoglobulinas aviares aisladas de la yema de sus huevos (denominadas IgY) sobre los Acs IgG convencionales obtenidos de fuentes de mamíferos.

Los receptores para el dominio Fc de las inmunoglobulinas suministran una importante unión entre la respuesta humoral específica y la parte celular del sistema inmune. La unión de la IgG a los receptores Fc puede producir diversas respuestas biológicas (fagocitosis, endocitosis, citotoxicidad celular dependiente de Acs, liberación de mediadores inflamatorios y el incremento de la presentación de antígeno).^{13,14} Los complejos inmunes que contienen Acs de mamíferos pueden interactuar con los receptores Fc o del complemento sobre las células o al mismo tiempo, unirse a otras inmunoglobulinas presentes en la muestra problema, pudiendo causar resultados erróneos en diversos ensayos para detectar sustancias de interés diagnóstico en el suero o plasma a investigar, así como en la cuantificación o enumeración de tipos celulares específicos. Esto ha sido probado en diversos inmunoensayos que contienen Acs de mamíferos, no así en otros similares desarrollados con Acs de yema de huevo de gallina (IgY).

Una herramienta poderosa para la determinación de sustancias en muestras biológicas diversas, lo constituye el ensayo inmunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked-Immuno-sorbent Assay* o Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima).

Por esta razón, el objetivo de este trabajo ha sido la producción de Acs en gallinas inmunizadas con IgG de ratón, para el reconocimiento específico de esta molécula y probar la factibilidad de marcaje con enzimas de los Acs IgY purificados, este marcaje se realiza en especial con la peroxidasa de rábano picante y la

demostración de la capacidad de desarrollar con este conjugado un sistema ELISA que al ensayarse en paralelo con uno realizado teniendo como base Acs de conejo permita la cuantificación específica de la IgG de ratón para su uso en sistemas de calidad que brinden la posibilidad de evaluación de Acs monoclonales murinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos animales

Gallinas ponedoras (*White Leghorn*, de 18 semanas de edad) y conejos hembras F1 (Nueva Zelanda x Semigigante blanco, de 16 semanas de edad) fueron seleccionados para el experimento.

Antígeno para la inmunización

Los inmunógenos se obtuvieron de una fuente comercial (IgG de ratón pura, grado técnico de Sigma, EE. UU.).

Esquema de inmunización (conejos, gallinas)

Gallinas

Las gallinas se dividieron en cuatro grupos de tres cada uno. Se les aplicaron dosis de 100, 250 y 500 µg del inmunógeno a cada grupo por separado. Se mantuvo un grupo control al que se le aplicó 1 mL de NaCl 0,15 mol/L (Böheringer, Alemania).

Las emulsiones inmunógeno-adyuvante se llevaron a cabo volumen a volumen, a razón de 0,5 mL de la preparación del inmunógeno con 0,5 mL del adyuvante completo o incompleto de Freund (Sigma, EE. UU.) y fueron mezclados hasta obtener una emulsión adecuada.

El esquema de inmunización consistió en tres inmunizaciones por vía intramuscular en la pechuga a intervalos de 21 d y dos inmunizaciones adicionales intravasculares en ausencia de adyuvantes.

Este esquema se determinó realizar teniendo en cuenta los antecedentes de los trabajos de Schwartzkopf y cols.,¹⁵ y Schade y cols.¹⁶ en los que se recomiendan como mejores dosis de antígenos solubles en gallinas, las que oscilan entre 100 y 1 000 µg.

Conejos

Los conejos fueron divididos en tres grupos de tres cada uno y se utilizó el mismo esquema de inmunización de las gallinas. El control consistió en las muestras de sangre que se obtuvieron antes del comienzo de la inmunización.

Preparación de la IgY de yema de huevo por el método de la fracción soluble en agua (WSF)

Los huevos se cosecharon diariamente. Previamente fueron marcados con la fecha y el grupo experimental y se almacenaron a 4 °C hasta que fueron procesados. Se separó la clara de la yema mediante un separador de yemas comercial (Promega Co., EE. UU.) y se lavaron las yemas con abundante agua corriente y destilada para limpiarlas de la albúmina que pudiera quedarles adherida. Se puncionaron sus membranas y sus contenidos fueron diluidos en 9 volúmenes de agua estéril acidificada con HCl 0,1 mol/L hasta que la emulsión alcanzó un pH entre 4,8 y 5,2.¹⁶ Este extracto de yema se mantuvo a 4 °C durante 24 h, posteriormente, se centrifugó a 2 000 g por 30 min en una centrifuga refrigerada (Medifriger, J.P. Selecta S.A., Abrera, España). El sobrenadante de yema de huevo (EYS) obtenido, rico en IgY, se filtró por papel de filtro Whatman No. 1 (Whatman International, Maidstone, UK) y ajustado a pH 7,0 con regulador Tris (hidroximetilamino metano) (1 mol/L + 0,15 mol/L NaCl; Böehring, Mannheim, Alemania).

Estos sobrenadantes se probaron mediante una prueba de ELISA para determinar títulos específicos de Acs IgY contra IgG de ratón (IgGr). Este antisuero se purificó mediante Cromatografía de Inmunoafinidad⁶ previa precipitación con sulfato de amonio a 45 % de saturación.

De acuerdo con las instrucciones del fabricante se preparó un gramo de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia, LKB, Uppsala, Suecia), esta rindió 3,5 mL de resina, aproximadamente 10 mg de IgG comercial (Sigma) previamente dializada contra regulador de acoplamiento (0,5 mol/L NaCl, 0,1 mol/L NaHCO₃, pH 8,3) se le adicionó a la sefarosa tratada, se mantuvo en rotación por 2 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 40 g por 5 min, el precipitado se incubó a 4 °C por 16 h con 10 mL de agente bloqueador (0,2 mol/L glicina, pH 8,0) para bloquear los grupos que pudieran permanecer activos en la resina, la cual fue introducida en una columna (PD-10) y las proteínas unidas de forma inespecífica se lavaron mediante un procedimiento de cinco lavados sucesivos alternantes consistentes en una etapa de lavado con 5 mL de regulador de acoplamiento, seguido de otro con 5 mL de regulador acetato (0,5 mol/L NaCl, 0,1 mol

/L acetato de amonio, pH 4,0). Después se lavó la columna con 50 mL de PBS y el contenido de la IgY de no más de tres huevos obtenido por precipitación con sulfato de amonio y previamente dializado contra PBS se llevó a 50 mL con este mismo regulador fosfato y se descargó en la columna a una velocidad de flujo de 240 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posteriormente, se lavó la columna con 50 mL de PBS y los Acs IgY anti IgG de ratón unidos se eluyeron con un regulador de elusión (0,15 mol/L NaCl; 0,2 mol/L glicina, pH 2,2). Para la neutralización inmediata, se colectaron las fracciones eluidas de aproximadamente 2 mL en tubos que contenían 0,8 mL de un regulador (0,1 mol/L Tris-HCl, pH 8,0). Al término de la operación, la columna se neutralizó con regulador Tris y se lavó con PBS, para su almacenamiento final se dejó en una preparación de PBS que contenía 0,05 % NaN_3 a 4 °C, para su reutilización, la columna se lavó con PBS.

Preparación de la IgG de conejo

Con sulfato de amonio, se precipitaron 20 mL del suero hiperinmune de conejo. Posteriormente, se purificó este antisuero mediante Cromatografía de Inmunofinidad con las mismas condiciones utilizadas para la purificación de la IgY.

ELISA para el seguimiento de los contenidos de Acs (gallina y conejo)

Los pocillos de cada una de las placas de 96 posiciones (Immulon F Dynatech) se recubrieron con 50 μL de IgG de ratón pura (Sigma, EE. UU.) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se aplicaron diluciones 1 : 00 y 1 : 1 000 de los sobrenadantes de yema y suero de conejo respectivamente obtenidos de diferentes momentos del esquema de inmunización y, conjugados anti-IgY de pollo peroxidasa de rábano picante (Pierce, EE. UU.) y, conjugado anti-IgG de conejo peroxidasa (Sigma, EE. UU.) se adicionaron a cada placa según especificidad. Se reveló la reacción con *o*-fenilenediamina (OPD) en ambos casos. Se determinaron las absorbancias a 492 nm utilizando un lector de ELISA (Reader 530, Organon Technika).

El método del peryodato para la peroxidasa de rábano picante (conjugado-POD)

Para la preparación de ambos conjugados se aplicó el método del

periyodato introducido por Nakane y Kawaoi,¹⁷ y modificado por Wilson y Nakane.¹⁸

Determinación de las razones de absorbancia anticuerpo-enzima

Primeramente, se ajustó la concentración de proteínas de las muestras del conjugado en PBS para que rindieran una medición espectrofotométrica a $\text{OD}_{280\text{ nm}}$ de 1,4 (equivalente aproximadamente a 1 mg/mL de IgY de pollo e IgG de conejo respectivamente). Se dispusieron diluciones de ambos conjugados a las que se midieron sus densidades ópticas tanto a 403 como a 280 nm y se determinó la razón de estas dos mediciones.

Determinación de la dilución óptima de trabajo de los conjugados enzimáticos por ELISA

Se realizó mediante un ensayo ELISA en el cual los pocillos de las placas fueron recubiertos con 50 μL de IgG de ratón pura (Sigma) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en regulador de recubrimiento, pH 9,6 (1,59 g Na_2CO_3 + 2,43 g NaHCO_3 + 0,2 g NaN_3 en 1 L agua destilada). Se aplicaron los conjugados a diferentes diluciones y se reveló la reacción enzimática con *o*-fenilenediamina (OPD) (Sigma).

Las absorbancias a 492 nm se determinaron mediante un lector de microELISA Reader 530 (Organon Technika).

Caracterización de los conjugados de peroxidasa

Recubrimiento de las placas

Cada pocillo de la placa de 96 posiciones (Immulon F, Dynatech) fue cubierto con 50 μL de una anti IgG de ratón obtenida en carnero (CIMAB S.A, Ciudad de La Habana) a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en regulador de recubrimiento pH 9,6 (1,59 g Na_2CO_3 + 2,43 g NaHCO_3 + 0,2 g NaN_3 en 1 L de agua destilada), se incubó por 1 h a 37 °C en una cámara húmeda. Se lavó tres veces la placa con una disolución de PBS - Tween 20 (8 g NaCl + 1,15 g NaH_2PO_4 + 0,2 g KH_2PO_4 + 0,2 g KCl + 0,2 g NaN_3 en 1 L de agua destilada y se adicionaron 0,5 mL de Tween 20) a razón de 200 μL por pocillo.

Posteriormente, los pasos del ELISA consistieron en bloquear con leche descremada al 5 % en PBS (0,5 % Tween 20 (Sigma, EE. UU.) y se incubó por 1 h a 37 °C en una atmósfera húmeda. La placa se lavó con la disolución de PBS Tween 20 con el mismo volumen y frecuencia que el paso anterior. En los diferentes pocillos de la placa de ELISA se aplicaron

doce réplicas en leche descremada al 2 %, 50 μL de una curva estándar de calibración de IgG de ratón pura (Sigma), la cual se preparó a partir de una dilución volumen a volumen de leche descremada al 2 % y una solución estándar de IgG de ratón a una concentración de 500 ng/mL a partir de la cual se realizaron diluciones doble sucesivas para obtener soluciones estándar de concentraciones de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,812 5; 3,906 25 ng/mL, en el resto de doce pocillos, se aplicó otra muestra correspondiente al blanco que consistió de albúmina humana 2 % en leche descremada 2 %. Esta muestra se consideró que correspondía a una concentración de 0,0 ng/mL de IgG de ratón. Se incubó en cámara húmeda a 37 °C por una hora. Se aplicaron lavados como los arriba descritos. Posteriormente, se adicionaron 50 μL por pocillo del conjugado tanto de conejo como de gallina a sus diluciones óptimas respectivas de trabajo en leche descremada 2 % en PBS-Tween 20. Se realizó incubación en cámara húmeda por 1 h a 37 °C. Se realizaron tres lavados como los arriba descritos. Para la reacción enzimática se utilizó como sustrato de la peroxidasa, la *o*-fenilenediamina (OPD) (Sigma). Se adicionaron 100 μL por pocillo de una mezcla de una disolución de (1 mg de OPD + 1 μL de 30 % H_2O_2) por mililitro de regulador citrato, pH 4,5. Las placas se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. El desarrollo de la reacción de color se paró añadiendo 50 μL de ácido sulfúrico 2 mol/L. Las absorbancias a 492 nm se determinaron mediante un lector de microELISA Reader 530 (Organon Technika).

Los ensayos se replicaron doce veces y los promedios de las densidades ópticas obtenidos para cada punto de calibración se utilizaron para realizar la caracterización de ambas pruebas (ELISA de Acs IgY de gallina e IgG de conejo).

Análisis de regresión lineal

Mediante un análisis de regresión lineal de la curva y los coeficientes de regresión obtenidos se comparó la linealidad entre los ensayos con Acs de gallina y conejo. Para ello se utilizaron los mejores intervalos de linealidad en los puntos de concentración de IgG de ratón para cada prueba. Para la determinación de diferencias estadísticas entre ambos ajustes se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (EXCEL, Corporación Microsoft)

Límite de detección

Se asumió como el valor más bajo de concentración de IgG de ratón en la curva estándar para los doce ensayos aquel al que correspondiera una densidad óptica (OD) que no se sobrelapara con el mayor valor de la reacción de fondo (muestra con ausencia de IgG de ratón) comparando el promedio y la desviación estándar de las DO de las muestras.

Prueba de precisión para la determinación de IgG de ratón

Valores de concentraciones, elevado, medio y bajo de IgG de ratón se midieron repetidamente (ocho réplicas intraensayos y tres réplicas interensayos) se determinaron mediante el ELISA *Sandwich* para determinar la precisión de ambas pruebas (conejo y gallina).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA), y prueba t para determinar diferencias de los títulos de Acs en diferentes esquemas, análisis de regresión lineal y la prueba de Mann-Whitney para comparar el parámetro de linealidad de cada reactivo en la prueba ELISA, la determinación de estadígrafos de tendencia central y dispersión para los parámetros de precisión y límite de detección. Se utilizó el Programa Profesional EXCEL, Microsoft.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de los niveles de Acs. Comparación entre gallina y conejo

La comparación del desarrollo de los niveles de Acs obtenidos en los esquemas de inmunización mediante el análisis de un ANOVA (Fig. 1), permitió concluir que las concentraciones de Acs en los conejos eran mayores que en las gallinas. La comparación de cada dosis realizada por la prueba t arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El desarrollo de estos experimentos y lo que permite un análisis crítico de estos resultados tiene sus antecedentes en los trabajos de Schwarzkopf,¹⁵ quien en un estudio multifactorial muy amplio utilizando 972 gallinas probó el efecto de dos tipos de adyuvantes en varias dosis y vías de inoculación con cuatro dosis distintas de cuatro antígenos diferentes (IgG humana de 158 kD de peso molecular (PM), lipoproteínas de baja densidad, de 1 000 kD, somatotropina bovina recombinante, de 22 k de PM y el antígeno fimbrial K88 de *E. coli* con un PM de

22 kD. De los resultados obtenidos por estos autores, dosis de 100 µg de IgG humana combinada con Adyuvante incompleto de Freund resultó la mejor combinación utilizada en cuanto al logro de los mayores concentraciones de Acs obtenidos. Behn y cols.¹⁹ no encontraron diferencias significativas al probar en gallinas dosis de 100 y 500 µg de IgG de ratón y lograron concentraciones de Acs IgY muy razonables. Otros experimentos de inmunización llevados a cabo en gallinas por Sasse y cols.²⁰⁻²² utilizando como inmunógenos, endotoxinas bacterianas describen como las mejores dosis, aquellas que oscilan entre 10 y 1 000 µg, así como otros llevados a cabo por Schade y cols.,²³ utilizando péptidos como antígenos, refieren como la mejor dosis a utilizar para la inmunización de gallinas, la de 100 µg.

Según la experiencia personal de los autores, concentraciones razonables de Acs, se lograron al inmunizar gallinas con dosis de 100 µg de IgG humana²⁴ a pesar de haberse realizado inmunizaciones de refuerzo a intervalos muy cercanos (7 d).

En un experimento donde se suministraron dosis de 500; 1 000; 2 500 y 5 000 µg de albúmina humana respectivamente a gallinas, se obtuvo una inmunosupresión con las dos ultimas dosis.²⁵

Las dosis antigénicas utilizadas en este trabajo con relación a la IgG de ratón se movió dentro de estos límites planteados como buenos en estos experimentos previos, no arrojando diferencias estadísticamente significativas entre ellas y mostrando concentraciones de Acs muy

aceptables si se tiene en cuenta que en el seguimiento de las concentraciones de Acs IgY llevado a cabo por la técnica ELISA que proporcione densidades ópticas (DO) por encima de 0,3 en las muestras de Acs diluidas 1 : 1 000, constituyen preparaciones útiles de Acs para cualquier propósito.¹⁵ En este trabajo, se lograron concentraciones de Acs en las diluciones 1 : 000 de las muestras que superaron valores de DO de 1,5 (cinco veces superior a lo que puede constituir una preparación útil de Acs IgY) (Fig. 1), lo que muestra que el esquema brindó un resultado de Acs satisfactorio. El análisis en conjunto de estos resultados obtenidos hasta hoy en la inmunización de gallinas llevan a concordar con otros autores^{15,19,23} en que dosis óptimas para este biomodelo, al menos de antígenos solubles, y sobre todo, si se trata de inmunoglobulinas de mamíferos, deben oscilar entre los 10 y 1 000 µg. Dosis por encima o por debajo, se ha demostrado que inducen modulaciones no deseables de la respuesta inmune como la tolerancia y la inmunosupresión.

En gallinas sometidas a esquemas de inmunización, se ha encontrado^{15,19,23,26,27} una cinética en las concentraciones de Acs que con más frecuencia suele ser un incremento transiente posterior a la primera inmunización y una segunda fase posterior a la inmunización de refuerzo que se caracteriza por un incremento inicial en el título de Acs dentro de los 10 primeros días aproximadamente, seguido de una meseta en los 10 d posteriores y acto seguido, un descenso de nuevo.

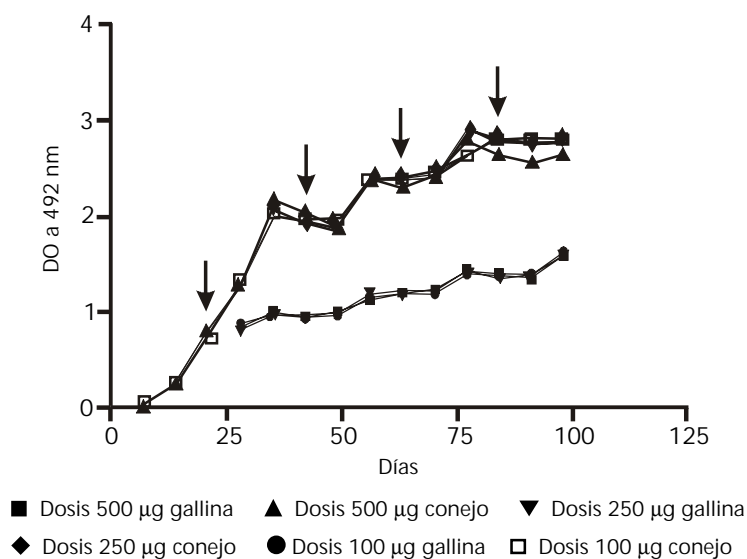


Fig. 1. Comparación de la dinámica en las concentraciones de anticuerpos específicos anti IgG de ratón entre gallina y conejo. Las saetas indican el momento en que se realizaron las inoculaciones en ambas especies.

En otros casos^{16,28} se ha referido que el tiempo de permanencia de las concentraciones de Acs después de una inmunización de refuerzo (segunda fase de la respuesta inmune) puede durar entre 6 y 10 semanas antes de que se comience a apreciar una declinación.

La recopilación de estos resultados ha llevado a proponer como la mejor inmunización de gallinas, aquella que consiste en dosis antigénicas que oscilan entre 100 y 1 000 µg, siendo suficiente 10 µg en algunas ocasiones con inmunizaciones de refuerzo que oscilen entre las 4 y 8 semanas.²³

Los resultados de este trabajo guardan una relación muy estrecha con esas recomendaciones por lo que concuerdan con su practicabilidad.

Este experimento demuestra que los conejos brindan mejores títulos de Acs utilizando las mismas dosis de inmunógeno que en gallina y sometidos al mismo esquema en este caso, pero el solo hecho de concentraciones mayores no es razón suficiente para considerar al conejo como el animal de preferencia para los fines que se propusieron en el trabajo, uno debe recordar también, en sentido general, que el principal objetivo para la producción de Acs, es la obtención de una gran cantidad de Acs de gran afinidad durante la respuesta secundaria, de tal manera que la obtención de títulos elevados después de la respuesta primaria no es necesariamente del todo convincente,¹ además que no se pueden dar conclusiones del mantenimiento de la estabilidad de los títulos en el tiempo, pues en este trabajo solo se analizaron los primeros 100 d en el estudio de la dinámica de producción de anticuerpos, que es otro factor importante en la selección de un

animal para estos fines, de otro lado, las grandes cantidades de Acs que se pueden obtener mediante la tecnología IgY y otras ventajas que estos Acs poseen específicamente para evitar interferencias en los ensayos inmunológicos,¹⁹⁻²¹ junto con toda la controversia reportada entre diversos autores, es una poderosa razón para considerar a la gallina como un animal de selección en la producción de Acs policlonales anti IgG de ratón.

Caracterización de los conjugados

Se pudieron apreciar (Tabla 1) las características de ambos conjugados de peroxidasa (conejo y gallina) obtenidos por el método del m- peryodato de sodio. Obviamente, analizando las razones de las absorbancias obtenidas, se pudo concluir que las eficiencias de conjugación resultaron muy similares para ambos tipos de Acs. El análisis de las densidades ópticas (OD) de ambos productos de conjugación permitió definirlos como buenos reactivos. Generalmente, razones de absorbancia (OD) a 403 y 280 nm (403 : 280) en un intervalo entre 0,3 a 0,5 se traducen en una elevada actividad de la enzima POD sin perjudicar la actividad del Ac.²⁹ Estas conclusiones se han reportado trabajando especialmente

con Acs de mamíferos por lo que este trabajo constituye un aporte en este punto para considerar que los Acs IgY de gallina tienen comportamientos similares a los IgG, hecho que permite recomendar el método del m- peryodato de sodio de utilidad para obtener conjugados enzimáticos con Acs de origen aviar.

Las tablas 2 y 3 muestran los resultados del ELISA para determinar las diluciones óptimas de trabajo de ambos conjugados de peroxidasa (IgY de gallina e IgG de conejo) anti-IgG de ratón respectivamente.

Para el análisis de pruebas de ELISA mediante lectores espectrofotométricos automáticos, como es este el caso, la dilución óptima de trabajo de un conjugado puede definirse empíricamente como aquella que garantiza una absorbancia (OD) igual a 1,0 bajo condiciones normalizadas. Esto está dado principalmente porque la eficiencia máxima de los fotómetros permanece óptima a este nivel de señal de manera que la medida de "ruido" en ella, es de la menor proporción en este punto que cuando se realiza a mediciones mayores de 1.0. En este trabajo, se obtuvo esta condición en la dilución 1 : 20 000 para el conjugado a base de Acs de conejo y 1 : 8 000 para el conjugado IgY. Las diluciones de

Tabla 1. Razones de absorbancia obtenidas para diferentes diluciones de los reactivos conjugados a partir de anticuerpos IgY de yema de huevo e IgG de suero de conejo con enzima peroxidasa (POD) mediante el método del m- peryodato de sodio.

	DO _{403 nm}		DO _{280 nm}		Razón 403 : 280	
	1/2	1/4	1/2	1/4	1/2	1/4
IgY (gallina) (POD)	0,275	0,131	0,694	0,367	0,39	0,35
IgG (conejo) (POD)	0,312	0,173	0,736	0,393	0,42	0,44

Tabla 2. Densidades ópticas obtenidas por la prueba ELISA utilizando el conjugado IgY de pollo - peroxidasa anti IgG de ratón para buscar su dilución óptima de trabajo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,017	1,634	1,587	1,598	1,631	1,685	1,600	1,701	1,599	1,626	1,655	0,023
B	0,015	1,399	1,465	1,385	1,405	1,408	1,417	1,438	1,359	1,478	1,427	0,018
C	0,019	1,222	1,211	1,209	1,240	1,254	1,293	1,299	1,276	1,298	1,234	0,021
D	0,017	1,008	1,012	1,014	0,999	1,001	0,989	0,982	1,016	1,004	0,976	0,013
E	0,014	0,670	0,702	0,685	0,656	0,735	0,667	0,668	0,693	0,740	0,682	0,016
F	0,018	0,500	0,467	0,466	0,476	0,457	0,490	0,492	0,485	0,452	0,473	0,017
G	0,013	0,262	0,265	0,270	0,277	0,285	0,264	0,271	0,267	0,269	0,281	0,012
H	0,016	0,140	0,164	0,149	0,160	0,157	0,170	0,160	0,158	0,153	0,166	0,013

Todos los pocillos de la placa se recubrieron con 1,0 µg de IgG de ratón pura (Sigma).

Columnas 1 a 12 corresponden a muestras blanco (albúmina humana 2 % en leche descremada 2 %).

Diluciones de conjugado: A 1 : 1 000; B 1 : 2 000; C 1 : 4 000; D 1 : 8 000; E 1 : 10 000; F 1 : 20 000; G 1 : 40 000; H 1 : 80 000.

Tabla 3. Densidades ópticas obtenidas mediante la prueba ELISA utilizando el conjugado IgG de conejo - peroxidasa para buscar su dilución óptima de trabajo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,029	2,897	2,991	2,896	2,987	2,936	2,978	2,992	2,989	2,990	2,996	0,031
B	0,027	2,703	2,699	2,724	2,731	2,693	2,708	2,711	2,689	2,691	2,701	0,021
C	0,031	2,528	2,472	2,501	2,500	2,487	2,499	2,496	2,512	2,513	2,490	0,030
D	0,026	2,152	2,099	2,108	2,132	2,106	2,078	2,113	2,101	2,111	2,143	0,027
E	0,023	1,663	1,585	1,588	1,701	1,631	1,600	1,596	1,602	1,596	1,613	0,030
F	0,016	1,112	1,013	1,104	0,998	1,100	1,087	1,101	1,047	1,102	1,009	0,019
G	0,013	0,603	0,555	0,600	0,594	0,653	0,624	0,598	0,612	0,624	0,601	0,015
H	0,015	0,288	0,297	0,312	0,299	0,301	0,256	0,300	0,279	0,258	0,312	0,017

Todos los pocillos de la placa se recubrieron con 1,0 µg de IgG de ratón pura (Sigma).

Columnas 1 a 12 corresponden a muestras blanco (albúmina humana 2 % en leche descremada 2 %).

Diluciones de conjugado: A 1 : 1 000; B 1 : 2 000; C 1 : 4 000; D 1 : 8 000; E 1 : 10 000; F 1 : 20 000; G 1 : 40 000; H 1 : 80 000.

conjugados para inmunoglobulinas monoméricas como es la IgG de los mamíferos que se reportan por encima de 1 : 6 000 son consideradas reactivos de calidad.²⁹ En ambos casos, los conjugados obtenidos presentan el valor óptimo por encima de esta dilución.

Se pudo concluir en este acápite que se obtienen buenas eficiencias de conjugación por el método del m-peryodato de sodio, quedando demostrado que no se perjudica la actividad enzimática. Se logran reacciones de fondo razonables, indicador de gran importancia para el desempeño de las pruebas de ELISA que constituyen técnicas de gran sensibilidad. En el caso del conjugado IgY, los blancos en la prueba ELISA resultaron un poco más bajos, esto se podría explicar por la mayor especificidad de esta prueba usando conjugados de IgY, esto es de particular importancia en este sistema para determinar IgG de ratón, puesto que no existen reportes previos con respecto a esto, de manera que le da una ventaja a la gallina como modelo a elegir para estos fines como sustituto de los conejos. Esto puede plantearse a pesar de que la dilución de trabajo del conjugado de pollo fue menor, unido a la anterior ventaja de especificidad, ya que estos títulos menores podrían verse compensados con la enorme cantidad de Acs que podría brindar la extracción de la IgY de las yemas de huevo de una sola gallina en el curso de un esquema de inmunización, además de garantizar una homogeneidad en el lote de Acs específicos, imposible de lograr en el conejo, en el que para obtener cantidades similares habría que inmunizar más de un animal, lo que traería consigo la pérdida de esta homoge-

neidad, puesto que siempre cada animal en un esquema aporta como respuesta un espectro amplio de inmunoglobulinas que nunca es exactamente repetible, cosa que siempre atendería con características deseables en un Ac policlonal, además de la repetibilidad que es un factor siempre importante.

Es necesario tener en cuenta muchos parámetros para la normalización de las pruebas ELISA para cuantificar cualquier sustancia. Algunos de los más importantes que muestran el nivel de calidad de las pruebas son, la linealidad, el límite de detección, precisión, confiabilidad, especificidad.³⁰⁻³⁴ Para comparar el desempeño de los ensayos en este trabajo se analizaron tres de los parámetros arriba mencionados (linealidad, límite de detección y precisión). Existen muchos criterios para determinar la mayoría de estos parámetros, por ejemplo, Rodbard propuso cómo determinar el límite de detección de un ensayo ELISA y lo conceptualizó como el punto de concentración más bajo con una señal significativamente distinta a la del blanco para 20 o más ensayos.³⁵ Otra forma es el criterio de las densidades ópticas (OD) para el control negativo (correspondiente al suero de un animal no inmunizado) y otros criterios más recientes³⁶ para determinar esos parámetros.

Las tablas 4 y 5 explican los parámetros de linealidad y límites de detección obtenidos en estos experimentos. Los valores medios de doce determinaciones para doce ensayos se obtuvieron para caracterizar cada ELISA. Los promedios de las DO para el ensayo con conjugado de conejo en todos los casos, incluyendo los puntos correspondien-

te a las muestras sin IgG de ratón (concentración de IgG de ratón nulo), fueron mayores que los obtenidos en el ensayo con conjugado de IgY (Tablas 4 y 5). Esta observación unida al análisis de linealidad (Tablas 4 y 5) en que el ensayo con IgY resulta más lineal que el de IgG de conejo permite concluir que este primero es más específico y confiable que el segundo. Se conoce que para ensayos de linealidad, un coeficiente de correlación superior a 0,98 en un análisis de regresión lineal es razonable y brinda una curva útil para mediciones confiables.³⁵ El análisis de regresión lineal realizado con todos los puntos en ambos ensayos arrojó resultados no confiables (Tablas 4 y 5), pues los coeficientes de correlación estuvieron muy por debajo de 0,98, pero cuando se analiza la regresión lineal para los puntos representados por las concentraciones de IgG de ratón entre 0 y 62,5 ng/mL (Tablas 4 y 5), ambos ensayos resultan muy lineales al arrojar coeficientes de correlación de 0,999 9 para el ensayo con Ac de gallina y 0,986 2 para el de conejo, con lo que se demuestra que el primero toma ventaja sobre el segundo. Del mismo modo, al analizar la curva de calibración en los intervalos 0 a 125 ng/mL y 3,90 a 125 ng/mL, el análisis de regresión vuelve a demostrar mejor linealidad en el ensayo de IgY, lo que lo hace más confiable. Estas observaciones amparan el criterio de que en el presente trabajo, el ELISA basado en Acs IgY puede ser un sustituto más confiable que el de IgG de conejo para cuantificar IgG de ratón. Asimismo, los coeficientes de correlación (r) en los intervalos 0 a 125 ng/mL y 3,9 a 125 ng/mL respectivamente, arrojaron valores de 0,975

Tabla 4. Ensayo ELISA con conjugado IgY.

Estándar de IgG de ratón (ng/mL)	Promedio DO _{492 nm}	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
0,0	0,016	0,002 4	15,0
3,906 25	0,080	0,003 4	4,25
7,812 5	0,161	0,006 8	4,22
15,625	0,308	0,021 5	6,9
31,25	0,612	0,012 5	2,04
62,5	1,208	0,015 6	1,29
125,0	1,629	0,032 7	2,0
250,0	2,087	0,019 1	0,9

Estos resultados corresponden al análisis de regresión lineal para determinar el parámetro de linealidad en cada tramo de los valores de la curva estándar fijada.

$r = 0,94$ para todos los puntos de la curva estándar.

$r = 0,975$ puntos entre 0,0 y 125 ng/mL .

$r = 0,999 9$ puntos entre 0,0 y 62,5 ng/mL .

$r = 0,93$ puntos entre 3,906 25 y 250 ng/mL .

$r = 0,975$ puntos entre 3,906 25 y 125 ng/mL .

$r = 0,999 9$ puntos entre 3,906 28 y 62,5 ng/mL .

Límite de detección: intervalo de las densidades ópticas entre el blanco y el punto de menor concentración en la curva estándar de IgG de ratón.

Muestra	Intervalo de densidad óptica a 492 nm	
	Mínimo	Máximo
Blanco	0,013 6	0,018 4
3,906 25	0,077 6	0,114

El coeficiente de variación es menor que 7 % en todos los puntos de concentración examinados en la curva estándar de IgG de ratón, exceptuando el punto correspondiente al blanco.

Tabla 5. Prueba ELISA con IgG de conejo.

Estándar de IgG de ratón (ng/mL)	Promedio DO _{492 nm}	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
0,0	0,032	0,004 0	12,5
3,906 25	0,160	0,006 4	4,0
7,812 5	0,301	0,012 6	4,1
15,625	0,721	0,023 2	3,2
31,25	1,412	0,026 0	1,84
62,5	2,089	0,053 5	2,56
125,0	2,393	0,045 6	1,9
250,0	2,794	0,051 7	1,8

Estos resultados corresponden al análisis de regresión lineal para determinar la linealidad del ensayo en los diferentes tramos de concentración de IgG de ratón en la curva estándar.

$r = 0,868$ para todos los puntos de la curva estándar.

$r = 0,924 4$ puntos entre 0,0 y 125 ng/mL .

$r = 0,986 2$ puntos entre 0,0 y 62,5 ng/mL .

$r = 0,867 1$ puntos entre 3,906 25 y 250 ng/mL .

$r = 0,923 8$ puntos entre 3,906 25 y 125 ng/mL .

$r = 0,986 0$ puntos entre 3,906 28 y 62,5 ng/mL .

Límite de detección: intervalo de las densidades ópticas entre el blanco y el punto de menor concentración en la curva estándar de IgG de ratón.

Muestra	Intervalo de densidad óptica a 492 nm	
	Mínimo	Máximo
Blanco	0,028	0,036
3,906 25	0,153 6	0,166 4

El coeficiente de variación es menor al 5 % en todos los puntos de concentración de la curva estándar, excepto el punto correspondiente al blanco.

para el ensayo con IgY, valor muy cercano a lo recomendable para un buen desempeño, por lo que en general estos resultados demuestran un mejor desempeño en general para el ensayo IgY.

La prueba de Mann-Whitney arrojó diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las curvas de calibración obtenidas para ambos conjugados demostrando un mejor ajuste lineal para el ensayo con IgY. Estas observaciones amparan el criterio que en este trabajo, el ELISA a base de Acs IgY pudiera ser un sustituto más confiable que el de IgG de conejo para cuantificar IgG de ratón.

Las tablas 4 y 5 también muestran el análisis del límite de detección para ambos ensayos. El menor valor de concentración de IgG de ratón en la curva patrón cuya OD no se sobrelapa con el valor más elevado de OD en la reacción de fondo (muestra ausente de IgG de ratón) se corresponde con 3,906 25. Con relación a este parámetro, ambos ensayos parecen ser similares, pero quizás, ensayando valores más bajos se podrían encontrar diferencias. No obstante, en este aspecto, ambos ensayos son útiles pues valores del límite de detección por debajo de 4,0 ng/mL como es este el caso, pueden ser considerados muy buenos para los objetivos del trabajo que se encarga de analizar muestras cuyas concentraciones de IgG de ratón siempre serían muy superiores (sueños de ratón, ascitis de ratón ricas en Acs monoclonales, hibridomas secretoras de Acs monoclonales) entre otras. En general, las pruebas de ELISA para cuantificar inmunoglobulinas pueden ser normalizadas con mucho menos sensibilidad que la reportada en este ensayo y resultaría muy útil, por ejemplo, un ELISA *sandwich* similar a este para detectar Acs monoclonales del tipo IgG murino para uso en los sistemas de calidad de la producción de Acs monoclonales en el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales.

Para el análisis de la precisión de las pruebas, se debe recordar que este parámetro consiste en determinar el coeficiente de variación (CV) de los valores encontrados para determinada concentración en varias determinaciones inter e intraensayos.^{29,30,32,36} Un bajo CV es predictivo de una buena precisión. Las tablas 6 y 7 muestran el análisis de este parámetro para ambos ensayos (IgY e IgG). Generalmente, el ELISA con

Acs de gallina parece ser más preciso que el de conejo, obviamente, si se analiza el punto de concentración más bajo (25 ng/mL). Este resultado se torna interesante, ya que al analizarlo con los discutidos anteriormente (resultados de regresión lineal) se correlacionan muy bien y hacen al ensayo de IgY más confiable que el de conjugado de IgG de conejo y por lo tanto, se demuestran las ventajas que representa para avalar el uso de los Acs IgY como sustitutos efectivos de los de mamíferos. Por lo visto, se puede concluir que el ensayo IgY es relativamente mejor y se convierte en una alternativa atractiva.

Relación costo/beneficio

La cantidad de Acs específicos que puede brindar una gallina en el curso de un año supera en hasta siete veces la que podría brindar un conejo (Tabla 8). Este es un análisis solo en teoría, pues para obtener estos rendimientos en los conejos sería necesarias 12 extracciones en el año, cosa imposible en la práctica, porque este mamífero tolera, a lo sumo, cuatro sangrías en un año, luego queda visto que serían necesarios, al menos, tres conejos para este objetivo con la consiguiente pérdida de homogeneidad en la respuesta de Ac que ocurre en cada individuo, esto dificulta un análisis exacto de cuánto más eficiente resulta el uso de los Acs de gallina para la producción de lotes de reactivos. En este caso, a pesar de los títulos inferiores de los Acs IgY, se lograría triplicar los rendimientos de conjugados con el uso de la gallina.

CONCLUSIONES

Si bien las concentraciones de Acs específicos anti IgG de ratón obtenidos a partir de las yemas de huevo de las gallinas inmunizadas resultaron en general menores que los obtenidos en los conejos, las otras ventajas de las primeras, es decir, el rendimiento por animal y por año; de manejo y características deseables de las IgY para minimizar reacciones cruzadas en pruebas diagnósticas, así como los aspectos éticos hacen de esta fuente de Acs una alternativa muy atractiva.

Los conjugados obtenidos a partir de IgY resultan equivalentes a los de conejo para su empleo en técnicas tipo ELISA y muestran incluso características superiores en algunos de los parámetros correspondientes, así como reacciones de fondo más bajas.

Tabla 6. Resultados correspondientes al análisis de la prueba de precisión para la determinación de IgG de ratón mediante el ELISA *sandwich* con conjugado IgY.

Interensayo	n	Promedio ± DE (ng/mL)	Coefficiente de variación (%)
Ensayo			
I	3	98,400 ± 1,67	1,69
II	3	53,192 ± 2,870	5,3
III	3	30,816 ± 0,855	2,7
Intraensayo			
I	8	97,995 ± 0,783	0,8
II	8	53,582 ± 3,22	6,01
III	8	30,573 ± 1,85	6,07

Tabla 7. Resultados correspondientes al ensayo de precisión para la determinación de IgG de ratón mediante la prueba ELISA *sandwich* con conjugado basado en IgG de conejo.

Interensayo	n	Promedio ± DE (ng/mL)	Coefficiente de variación (%)
Ensayo			
I	3	107,758 ± 0,641	0,59
II	3	49,724 ± 3,486	7,01
III	3	29,089 ± 3,209	11,03
Intraensayo			
I	8	107,575 ± 4,471	4,15
II	8	45,913 ± 0,465	1,01
III	8	25,692 ± 3,641	14,17

Tabla 8. Relación costo/beneficio en la producción de antivuerpos.

Cantidad	IgY de gallina	IgG de conejo
Anticuerpo por mes	2,0 a 2,8 g	200 mg
Anticuerpo específico por mes	100 a 140 mg (5 % de la IgY total)	20 mg (10 % de la IgG total)
Anticuerpo por año	1,200 a 1,680 mg	240 mg

La obtención de IgY a partir de gallina ofrece un método que permite la producción de Acs policlonales específicos en cantidades muy superiores a las que puede brindar un mamífero de similar tamaño sometido al mismo esquema de inmunización y comparable a mamíferos de mucho mayor talla por lo que económicamente constituye una ventaja, además el rendimiento del conjugado final resulta más de tres veces superior por esa vía.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carey H., Artwohl W., James E. and Taylor B. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in

Mammals and Poultry. **International Laboratory Animals Resource (ILAR) Journal**, 37, 3, 1995.

2. Jennings V. Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. **International Laboratory Animals Resource (ILAR) Journal**, 37, 119, 1995.

3. Burton G., Kapasi Z., Szakal A. and Tew J. The generation and maintenance of antibody and B cell memory. The role of retained antigen and follicular dendritic cells. Strategies in Vaccine Design. Ed. Austin, Tex; R.G. Landes Company, 35, 49, 1994.

4. Morton B., Abbot D., Barclay R. The British Veterinary Association (BVA); The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments

- (FRAME); The Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA); The Universities Federation for Animal Welfare Joint Working Group on Refinement. Removal of blood from laboratory mammals and birds. **Laboratory Animals**, **27**, 1, 1993.
5. Coligan J., Kruisbeek A., Margulies D., Shevach E. and Strober W. Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons, New York, 1995.
 6. Gutiérrez E., Rodríguez G., García R., Bello L., Pérez D., Higginson D., Rodríguez Ch., Riverón A. Terzolo H. and Schade R. Obtainment of anti chicken IgY reagent in rabbits and its use in IgY Technology. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **33**, 2, 2002.
 7. Carlander D., Stalberg J. and Larsson A. Chicken Antibodies. A Clinical Chemistry Perspective. **Upsala J. Med. Sci.**, **104**, 179, 1999.
 8. Gutiérrez E., Cruz E., Samón T., Luna E., Corona Z. and Schade R. Extraction of Monospecific Coombs-reagent from chicken egg. **ALTEX**, **20**, 1, 21, 2003.
 9. Gutiérrez E., García M. and Schade R. Human Haemoclassification by Use of Specific Yolk Antibodies Obtained After Immunisation of Chickens Against Human Blood Group Antigens. **ATLA**, **29**, 717, 2001.
 10. Wei-Wei Zhang. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, **8**, 364, 2003.
 11. Somowiyarjo S., Sako N. and Nonaka F. Production of avian antibodies to three potyvirus in coturnix quail. **Journal of Virological Methods**, **28**, 125, 1990.
 12. Yun-Chien Tsen, Guor-Yuan Kao, Chung-Li Chang, Fang-Yu Lai, Chien-Hsun Huang, San Ouyang; Mei-Huei Yu, Chi-Pin Wang and Y-Neng Chiou. Evaluation and Validation of a Duck IgY Antibody-based Immunoassay for High-Sensitivity C - reactive protein: Avian Antibody Application in Clinical Diagnostics. **Clinical Chemistry**, **49**, 5, 810, 2003.
 13. Larsson A., Balow R., Lindahl T. & Forsberg P. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution - A Review. **Poultry Science**, **72**, 1807, 1993.
 14. Karlsson M., Kollberg H. and Larsson A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, **60**, 341, 2004.
 15. Schwarzkopf C., Staak C., Behn I. & Erhard M. Immunisation. In: Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY-technology, Chapter 3, 1st Ed. Berlin Heidelberg New York, Springer Lab Manuals, 25-64, 2000.
 16. Akita E. & Nakai S. Immunoglobulins from egg yolks: Isolation and purification. **Journal of Food Science**, **57**, 629, 1992.
 17. Nakane P. and Kawaoi A. Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, **22**, 1084, 1974.
 18. Wilson M. and Nakane P. Recent developments in the peroxidase method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. En: Knapp W., Hollubak K., Wick G., eds. Immunofluorescence and related staining techniques. New York: Academic, 215, 1978.
 19. Behn I., Hommel U., Oertel M. & Hauschild S. Kinetics of IgY formation after immunisation of hens with different protein antigens. **ALTEX** **13** (Suppl.), 18, 1996.
 20. Sasse M. Experimente zur Induktion, Präparation und Charakterisierung aviärer vitelliner Antikörper gegen Endotoxine verschiedener gramnegativer Bakterien. Doktor Thesis, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, 1998A.
 21. Sasse M., Küger M., Schade R. & Hlinak A. Generation and characterization of egg yolk antibodies specific for LPS and lipid A 1. Report: Induction and preparation of endotoxin-specific egg yolk antibodies (in German). **Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, **111**, 121, 1998B.
 22. Sasse, M. & Hlinak A. Generation and characterization of egg yolk antibodies specific for LPS and lipid A2. Report: Investigations on specificities of egg yolk antibodies (IgY) against endotoxins (in German). **Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, **111**, 127, 1998C.
 23. Schade R., Henklein P., Hlinak A., de Vente J. & Steinbusch H. Specificity of chicken (IgY) versus rabbit (IgG) antibodies raised against cholecystokinin octapeptide (CCK-8). **ALTEX** **13** (Suppl.), 80, 1996B.
 24. Gutierrez E., Mariño E., Chavez T., Vazquez E., Ochoa Z. & Schade R. Extraction of a monospecific Coombs reagent from chicken eggs. **ALTEX** **20**, 21, 2003.
 25. Gutiérrez E., Samón T., García R., Schade R. *et al.* Producción de Acs policlonales antialbúmina humana en yemas de huevo de gallinas. Uso en el biodiagnóstico. CD-R Simposio Internacional de Biología "Charles Theodore Ramsden In Memoriam". Ediciones UO, Centro de Información Científico Técnico. Octubre, 11-14, 2004.
 26. Hatta H., Tsuda K., Akachi S., Kim M. & Yamamoto T. Productivity and some properties of egg yolk antibodies (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bio-science, Biotechnology and Biochemistry**, **57**, 450, 1993.
 27. Hommel U., Behn I., Erhard M., Hlinak A., Schade R., Schwarzkopf C. & Staak C. Use of polyclonal avian antibodies. In: Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application. IgY-Technology. Chapter 5. 1st Ed. Berlin Heidelberg New York, Springer Lab. Manuals, 108-210, 2000.
 28. Shimizu M., Fitzsimmons R. & Nakai S. Anti E. Coli immunoglobulin isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **Journal of Food Science**, **53**, 1360, 1988.
 29. Catty D., Raykundalia C. and Houba H. Preparation of Enzyme Conjugates of Antibodies for Human Immunoglobulins IgG, IgA, and IgM and their quality control. Performance of Indirect ELISA tests. General Considerations for a Standardized Protocol. Bench Manual of Techniques for the preparation of Immunological and Immunodiagnostic Reagents. World Health Organization. Collaborating Centre for the production of Immunological Reagents. University of Birmingham. Medical School, United Kingdom, 1983.
 30. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. In R. H. Burdon and P.H. v. Knippenberg (ed.), Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, 15, 385-421. Amsterdam: Elsevier Science Pub., 1987.
 31. Olechnowitz A., Miko A., Koepnik H., Starick E. and Frobe I. Die Validierung eines Enzymimmunoassays zum Nachweis von Antikörpern gegen das Rinderleukosevirus. **Arch. Exper. Vet. Med.**, **44**, 2, 279, 1990.
 32. Hlinak A., Krüger M., Bartels T., Sasse M., Claros M. & Schade R. Studies on diagnostic applications of egg yolk antibodies against *Bordetella bronchiseptica*. **ALTEX**, **13** (Suppl.) 70, 1996.
 33. Hlinak A., Schrödl W., Witt S., Schade R. & Krüger M. Production of egg yolk antibodies against human cell-associated antigens. **ALTEX**, **13** (Suppl.) 76, 1996.
 34. Hlinak A. & Schade R., Bartels T. & Ebner D. The laying hen as an antibody source: Experiences with husbandry systems and egg yield (in German). **Tierärztliche Umschau**, **51**, 402, 1996.
 35. Rodbard F. Methods for standardisation of ELISA assays. **Analytical Biochemistry**, **90**, 1, 1978.
 36. Ohkaru Y., Asayama K., Ishii H., Nishimura S., Sunahara N., Tanaka T., Kawamura K. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of human heart type fatty acid-binding protein in plasma and urine by using two different monoclonal antibodies specific for human heart fatty acid-binding protein. **Journal of Immunological Methods**, **178**, 99, 1995.