

Unión de Der p 2, alergeno mayor de *Dermatophagoides pteronyssinus* expresado en *E. coli*, a la IgE de pacientes cubanos

Marco Antonio Coca Pérez, Alexis Labrada Rosado, Rolando Romero Madero, Elisa Facenda Ramos, Ivis Alonso Martínez, Alejandro Silva y Rosa Elena Aranda Rivero.

Departamento de Alergenos, Centro Nacional de Biopreparados, Carretera Beltrán, km 1½, Bejucal, La Habana, Apartado Postal 6048, Ciudad de La Habana, Código Postal 10600, Cuba.

Recibido: 17 de enero del 2000. Aceptado: 3 de mayo del 2000.

Palabras clave: alérgenos, recombinantes, *E. coli*, Der p 2, IgE.
Key words: allergens, recombinant, *E. coli*, Der p 2, IgE.

RESUMEN. Las reacciones alérgicas a los ácaros del polvo del género *Dermatophagoides* desempeñan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. *D. pteronyssinus* ha sido identificado en Cuba, como una de las especies de mayor prevalencia de sensibilización entre los pacientes alérgicos. Está reconocido que los ácaros de este género presentan dos grupos fundamentales de alérgenos mayores: el grupo 1 (Der p 1, Der f 1, Der m 1, Der s 1, etc.) con peso molecular de 25 kD y el grupo 2 (Der p 2, Der f 2, Der s 2, etc.) con peso molecular de 15 kD. En el caso de *D. pteronyssinus*, Der p 1 y Der p 2 son reconocidos por alrededor del 85 y el 90 %, respectivamente de la población alérgica a esta especie. El empleo de alérgenos recombinantes para el diagnóstico *in vitro* (IgE específica) es una aplicación incipiente y promisorio. El objetivo de este trabajo consistió en demostrar el reconocimiento de la proteína recombinante fusionada rDer p 2 por la IgE específica de pacientes cubanos en diferentes ensayos *in vitro*. El 86 % de los sueros de pacientes alérgicos a *D. pteronyssinus* reconocieron a la proteína recombinante en Western-Blotting. La rDer p 2 inhibió la unión de la IgE a la proteína Der p 2 del extracto natural, indicando una identidad inmunológica entre ambas moléculas. La actividad alérgica fue también comprobada en ensayos ELISA empleando placas de poliestireno. En el ensayo ELISA directo se demostró que para el amortiguador PBS se obtienen las mayores señales de absorbancia, mientras que no se observan señales por encima del fondo en el control negativo, además, se comprobó en un ensayo ELISA de inhibición que el rDer p 2 conserva la mayor parte de la actividad alérgica de su análogo natural alcanzando hasta un 80 % de inhibición de la unión IgE-Der p 2 nativo.

ABSTRACT. Allergic reactions to house dust mite of the genus *Dermatophagoides* plays an important role in the pathogenesis of allergic diseases. *D. pteronyssinus* has been identified as one of the mite species with the highest prevalence of sensitization in Cuban allergic patients. It is demonstrated that the mites of this genus present two fundamental groups of major allergens: the group 1 (Der p 1, Der f 1, Der m 1, Der s 1, etc.) with molecular weight of 25 kD and the group 2 (Der p 2, Der f 2, Der s 2, etc.) with molecular weight of 15 kD. In the case of *D. pteronyssinus*, Der p 1 and Der p 2 are recognized for around 85 and 90 %, with regards to the population allergic to this species. The uses of recombinant allergens for the IgE based on *in vitro* diagnosis is promising and incipient application. The present work was carried out with the objective to demonstrate the IgE binding properties of the recombinant fusion protein rDer p 2 using sera from Cuban patients in different *in vitro* assays. Eighty six percent of the allergic patient's sera recognized the recombinant protein in Western-Blotting. IgE binding to natural Der p 2 was inhibited by recombinant fusion protein rDer p 2, showing the immunological identity of both molecules. The allergenic activity was also verified in ELISA assays, using polystyrene plates. In the direct ELISA it was demonstrated that the PBS buffer had the highest signals of D.O., however, the signals of negative control was equal to the background, and the recombinant allergen proved to retain most of the allergenic activity of the native molecule, reaching an 80 % inhibition value of the IgE-native Der p 2 binding in ELISA.

INTRODUCCION

Está reconocido que los ácaros del género *Dermatophagoides* (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *D. siboney*, *D. microceras*) presentan dos grupos fundamentales de alérgenos mayores: el grupo 1 (Der p 1, Der f 1, Der m 1, Der s 1, etc.) con peso molecular de 25 kD y el grupo 2 (Der p 2, Der f 2, Der s 2, etc.) con peso molecular de 15 kD.¹⁻³ Las proteínas del grupo 1 son muy similares a la papaína y presentan actividad de proteasas de cisteínas. Ellas fueron clonadas por primera vez por Thomas y col.⁴ (Der p 1) y Dillworth y col.⁵ (Der f 1) y presentan una homología de la secuencia aminoacídica del 77,5 %.^{5,6} Las proteínas del segundo grupo fueron clonadas por primera vez por Trudinger, Chua y Thomas (Der p 2) y Yuuki y col. (Der f 2) en 1990, presentando una mayor conservación de su secuencia de ADN y aminoacídica, con un 86 % de homología.^{7,9} De acuerdo con estudios recientes, se ha determinado que las moléculas del segundo grupo son proteínas de dominio único y plegado del tipo de las inmunoglobulinas, las cuales presentan alguna homología estructural con dos dominios de la transglutaminasa humana. Se ha comprobado además que tienen actividad de unión a la superficie de las bacterias, por lo que se le adjudica alguna función dentro del sistema de defensa de los ácaros.¹⁰

Existen además otros alérgenos de *Dermatophagoides* caracterizados (Grupo 3, 30 kD; Grupo 4, 60 kD,

Grupo 5, 14 kD),¹³ pero cuya importancia en cuanto a frecuencia e intensidad de reconocimiento por los pacientes es menor con respecto a los dos alérgenos descritos anteriormente.

En el caso de *D. pteronyssinus*, Der p 1 y Der p 2 son reconocidos por alrededor del 85 al 90 %, respectivamente de la población alérgica a esta especie de ácaro. Una mezcla de ambos alérgenos mayores resultaría en la detección de más del 95 % de los pacientes sensibles.

Desde el punto de vista de requerimientos técnicos, el diagnóstico *in vitro* empleando métodos inmunoenzimáticos, es quizás la aplicación más inmediata de los alérgenos recombinantes. Existe ya un producto de este tipo (*Aspergillus fumigatus*, rAsp f 1/a, Pharmacia).^{11,12} En este caso, se requiere que los alérgenos clonados sean reconocidos por la gran mayoría de los sueros de pacientes reactivos al extracto natural, el cual, como es conocido, comprende varios componentes.^{11,13}

El rDer p 2, clonado en *E. coli* como proteína de fusión con glutatión-S-transferasa de *Schistosoma japonicum* (GST), mostró un elevado grado de actividad alérgica *in vitro* y una gran correlación con el extracto alérgico natural de *D. pteronyssinus* en pruebas cutáneas en pacientes sensibles.^{14,15} Por otra parte, se ha comprobado que los epítopes B en esta molécula son muy conformacionales, ya que incluso fragmentos grandes no retienen partes significativas de la alergenidad de la molécula completa.^{16,17}

Es necesario caracterizar la actividad de la proteína recombinante en cuanto a unión de IgE de diferentes pacientes.¹³ Es conocido que la respuesta IgE es muy heterogénea en la población no sólo en cuanto a títulos, sino también, en cuanto al número de moléculas reconocidas de una fuente alérgica dada, así como en cuanto al reconocimiento de epítopes dentro de una misma molécula. Esta heterogeneidad puede estar alterada por factores genéticos y ambientales.²³

En Cuba, se ha comprobado una elevada prevalencia en la población de la sensibilización a ácaros del género *Dermatophagoides*, que en particular para *D. pteronyssinus* y *D. siboney* alcanza el 76 % de los asmáticos.¹⁸

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la posible retención de la actividad alérgica de la proteína recombinante fusionada

rDer p 2, obtenida en el Dpto. Alergenos de BIOCEN con respecto a su análogo nativo en varios métodos *in vitro*, usando sueros de pacientes alérgicos cubanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sueros

Fueron empleados sueros individuales extraídos de 14 pacientes alérgicos sensibles a la especie del ácaro doméstico *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), los cuales fueron seleccionados teniendo en cuenta su historia clínica y los resultados positivos en la Pueba por Punción Cutánea. El pool de sueros empleado fue obtenido a partir de la mezcla de otros cinco representativos.

Extracto alérgico

El extracto estandarizado utilizado en los ensayos fue obtenido a partir del cultivo completo del ácaro Dp. [Departamento de Alergenos del Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN), Cuba].

Preparación del lisado de bacterias

Se usaron colonias de *E. coli* transformadas (Dpto. Alergenos, BIOCEN) con el vector pGEX-1 (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Suecia),¹⁴ al cual se le insertó el gen de Der p 2 en su sitio de multiclonaje. Las colonias que expresaban la proteína fusionada fueron seleccionadas por el método de expresión en placas según Maniatis *et al.*¹⁹ El lisado de bacterias a partir de las colonias positivas fue obtenido según Chua *et al.*¹⁴

Cromatografía de afinidad

El lisado se aplicó a una columna de Glutatión Sepharose 4B (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Suecia), previamente equilibrada con PBS-Tritón X100 1 % (Sigma, St. Louis, Mo., USA). Se lavó la columna con PBS y la elución se realizó con 10 mmol/L de glutatión reducido en 50 mmol/L Tris-HCL pH 8,0 (Sigma, St. Louis, Mo., USA).

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Se realizó SDS-PAGE 12 % según la técnica de Laemmli.²⁰ La tinción se realizó con Azul de Coomassie 250 (Sigma, St. Louis, Mo., USA).

Determinación del contenido de proteínas totales

El contenido de proteínas totales se determinó por el método de Lowry.²¹

Western Blotting IgE

Se realizó un Western Blotting,²² se transfirió a la membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m la proteína recombinante rDer p 2. Se cortó en varias tiras dicha membrana y se incubaron las tiras con el pool y 14 sueros de pacientes alérgicos a de Dp y un suero de paciente no alérgico como control negativo. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti IgE monoclonal conjugado con peroxidasa (Dpto. Alergenos, BIOCEN, Cuba).

ELISA IgE directo

Se recubrió una placa de poliestireno (Marxisorp, NUNC, Paris, Francia) con la proteína recombinante rDer p 2 purificada diluida en varias disoluciones reguladoras. Se incubó con el pool de suero de pacientes alérgicos y se reveló con el mismo conjugado usado en el Western Blotting. La proteína se reconstituyó en los reguladores carbonato-hidrógenocarbonato, PBS, agua destilada y citrato. Se aplicó a las concentraciones de 5; 1; 0,5 y 0,25 μ g en 100 μ L. Para cada regulador se realizó el ensayo sin suero a las mismas concentraciones y con el mismo conjugado.

Western Blotting de Inhibición de IgE

El Western Blotting de inhibición se realizó según Ferrándiz *et al.*²³ Brevemente: la proteína purificada se aplicó en la electroforesis y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m. Se usó el extracto de Dp a diferentes concentraciones (45,4; 15,1; 5,04; 1,68; 0,56 y 0,18 μ g/mL) de proteínas totales para inhibir el pool de suero IgE. El revelado se realizó con el conjugado empleado en el Western Blotting.

ELISA de Inhibición de IgE

Una placa de poliestireno (Marxisorp, NUNC, Paris, Francia) fue recubierta con 0,2 μ g/pozo de anticuerpo monoclonal 1D8 anti Der p 2 (Indoor, UK). La placa recubierta se incubó con extracto de Dp a razón de 1 μ g de Der p 2/pozo. Posteriormente, se aplicó la mezcla de inhibición (1:1) del pool de suero (1:20) y diluciones seriadas de la proteína recombinante purificada (se partió de 6 650 ng de rDer p 2 y se hicieron diluciones base 3 hasta 0,038 ng).²⁴ Se aplicó además, la misma mezcla, pero sustituyendo el recombinante por el extracto natural (se partió de 400 ng de Der p 2 natural y se hicieron diluciones base 3 hasta 0,002 ng).

La detección de los anticuerpos IgE unidos a la molécula presentada fue realizada con el conjugado empleado en el Western Blotting.

RESULTADOS

Reacción de rDer p 2 con sueros de pacientes alérgicos

La proteína recombinante fusionada rDer p 2 purificada mostró una pureza del 95 % y un peso molecular de ~ 40 kD, del cual 26 kD lo aporta la GST y 14 kD la proteína Der p 2. La alergenicidad de la proteína de fusión rDer p 2, se evaluó en Western Blotting (Fig. 1), usando 14 sueros individuales de pacientes alérgicos y un pool de sueros, además se empleó un suero control negativo. La banda observada en las tiras de la 1 a la 15 (excepto 11 y 15) y a la altura de los 41 kD indica la capacidad de unir IgE sérica específica a la especie Dp de la mayor parte de los pacientes (86 %). En la tira 16 (Control Negativo), según lo esperado, no aparece ninguna señal.

El ensayo ELISA directo demostró que (Fig. 2) para el regulador PBS se obtienen las mayores señales de absorbancia, mientras que no se observan señales por encima del fondo en el control negativo.

Inhibición de la IgE

En la prueba Western Blotting de Inhibición de la unión IgE al recombinante con el extracto natural (Fig. 3), se pudo apreciar (tira 1), la ocurrencia de una inhibición casi total a elevadas concentraciones de proteínas del extracto (14 µg/mL). Esta inhibición fue decayendo a medida que disminuye la concentración del extracto, lo que era de esperar. En las tiras 5 y 6 prácticamente no hubo inhibición. En la tira 7 el control positivo (suero no inhibido) se observó muy bien definido, y en la tira 8 (control negativo) no se observó señal alguna según lo esperado.

Por otra parte, la inhibición de la unión Der p 2 natural-IgE con la proteína recombinante rDer p 2 se verificó en un ELISA de inhibición (Fig. 4). En este ensayo se fijó a la placa el Der p 2 natural a partir del extracto alergénico, empleando como inmuoabsorbente un anticuerpo monoclonal anti Der p 2. Según se apreció, ambos, el rDer p 2 y el Der p 2 nativo, lograron inhibir la unión Der p 2-IgE. El Der p 2 nativo logró una inhibición total (hasta 100 %), mientras que el rDer p 2 alcanzó un valor máximo del 80 %. Sin embargo, para lograr esta inhibición, se requirió

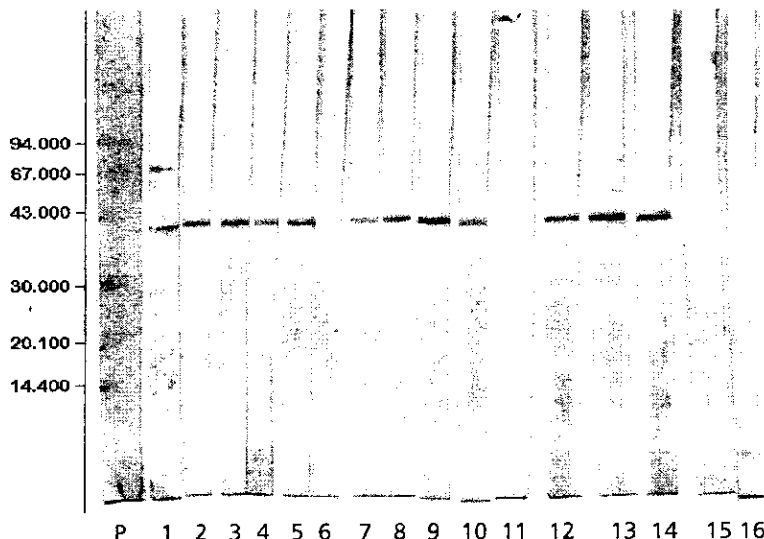


Fig. 1. Ensayo Western Blotting con sueros de pacientes alérgicos a la especie Dp. Tira P: patrón de pesos moleculares (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Suecia); Tira 1: pool de suero de pacientes alérgicos; Tira 2 a 15: sueros de pacientes alérgicos; Tira 16: Suero control negativo.

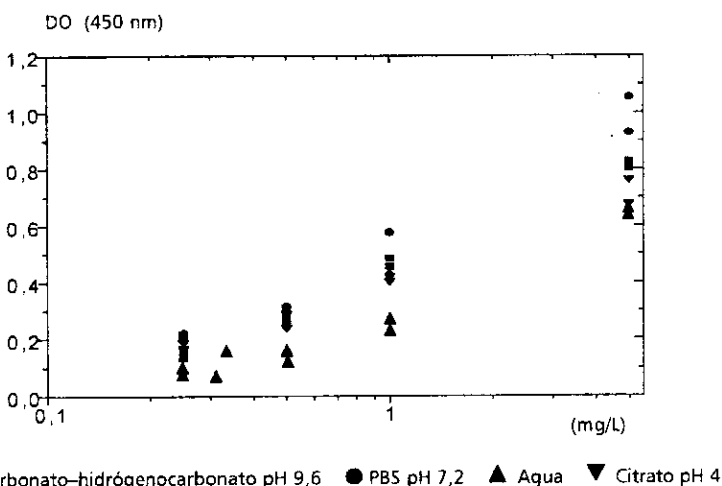


Fig. 2. Ensayo ELISA directo usando sueros de pacientes alérgicos a Dp y varias disoluciones reguladoras de recubrimiento.

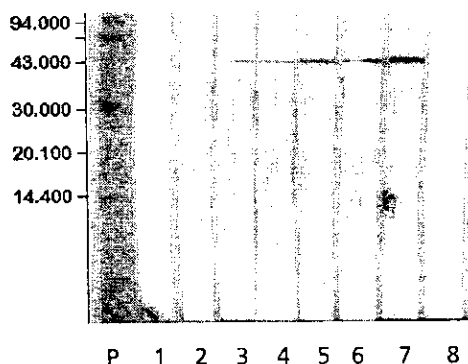


Fig. 3. Western Blotting de inhibición de IgE humana - Der p 2 natural por rDer p 2. Tira P: patrón de pesos moleculares (Pharmacia-Biotech, Uppsala, Suecia). Tira 1 a la 6: diluciones seriadas del extracto en orden ascendente. Tira 7: control positivo (pool de sueros de pacientes alérgicos). Tira 8: control negativo.

alrededor de 1 000 veces más proteína recombinante que la nativa. La forma de ambas curvas es compleja, de tipo escalonada. La distancia horizontal entre ellas (potencia relativa) no es constante: para la parte inferior es de alrededor de un orden mientras que para la superior alcanza tres órdenes.

DISCUSION

La expresión de Der p 2 fusionado con GST, usando el vector pGEX -1 ha sido reportada por K.Y. Chua et al.¹⁴ En este trabajo, al igual que en el anteriormente referido, la proteína fusionada mostró una elevada actividad alergénica (unión de anticuerpos IgE); no obstante, en dicho artículo se reporta que algunos sueros de pacientes infantiles rindieron resultados no concordantes (positivos a la proteína nativa, pero negativos a la recombinante). Otros autores,^{25,26} han detectado que el patrón de respuesta IgE hacia *Dermatophagoides* comienza a temprana edad con el desarrollo de anticuerpos hacia los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2 y que solamente a mayor edad, éste se amplía hacia otros alérgenos de este ácaro. Se ha especulado además que lo mismo sería también válido para el patrón de reconocimiento de epítopes dentro de una misma molécula; o sea que los pacientes con una sensibilización temprana reconocen también un espectro más estrecho de epítopes.^{27,28} De modo que la actividad alergénica de la molécula recombinante en este tipo de pacientes reviste un especial interés para el diseño de un sistema de diagnóstico eficaz, por IgE específica, basado en dicha molécula.

En Cuba, se conoce que la respuesta hacia los ácaros *Dermatophagoides* está dirigida fundamentalmente hacia el grupo 1 y 2, observándose un menor número de bandas, en comparación con los estudios realizados en climas templados, así como menores niveles de IgE específica a los ácaros.^{2,25} O sea, el patrón de respuesta cubano se acerca al de una sensibilización temprana. La causa de esa diferencia no está clara, pero pudiera radicar tanto en factores genéticos como en un menor nivel de exposición en el medio cubano. De esa forma, la cuestión de la conservación de la actividad alergénica de la proteína recombinante podría ser influida también por factores locales, puesto que podrían afectarse selectivamente diferentes epítopes, con diferentes prevalen-

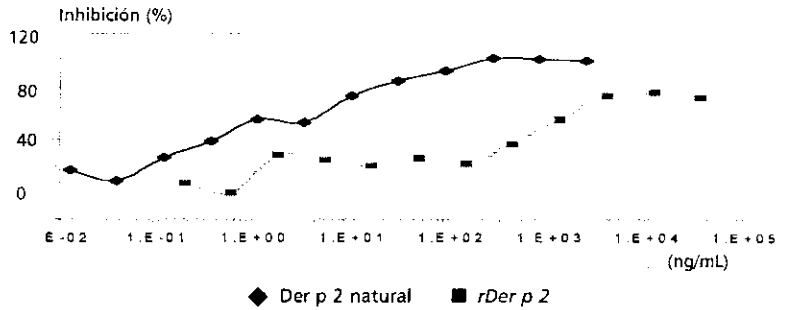


Fig. 4. Curvas de inhibición de IgE humana-Der p 2 natural. La inhibición (I, %) se calcula según la relación: $I = (CP - A)/(CP - CN)$, donde: CP: control positivo, A: absorbancia a 450 nm, CN: control negativo.²⁶ Los intervalos de confianza fueron calculados al 95 %, no obstante, no se observan por ser muy pequeños.

cias de anticuerpos IgE en distintas poblaciones.

Los resultados del ensayo de inhibición (valor máximo del 80 %) sugieren que la proteína recombinante retiene la mayor parte de los epítopes de la natural, lo cual concuerda con ensayos similares efectuados sobre otra fase sólida: nitrocelulosa.¹⁴ Sin embargo, un análisis cuantitativo de las curvas de dosis-respuesta obligaría a concluir que la actividad alergénica del recombinante es de 10-1 000 veces menor. La forma irregular de ambas curvas sugiere la presencia de anticuerpos con diferentes afinidades o dirigidos a epítopes diferentes, lo cual explicaría su forma escalonada. Esto concuerda con estudios recientes de la estructura de Der f 2 (homólogo de Der p 2 para *D. farinae*),¹⁰ en los que se han logrado identificar claramente al menos dos epítopes IgE diferentes. Concuerda además, con los resultados de Win van't Hof et al.²⁷ los cuales indican que existen al menos tres diferentes subpoblaciones de anticuerpos IgE que reconocen un mismo péptido derivado de Der p 2. De esa forma, las diferencias conformacionales entre la molécula nativa y la recombinante, influirían más marcadamente en una menor detección de los anticuerpos de menor afinidad o dirigidos hacia el epítope de menor importancia. Este aspecto podría dar lugar a alguna diferencia entre el empleo del alérgeno recombinante y el natural en un sistema de diagnóstico, cuya existencia real podría ser dilucidada estudiando un mayor número de pacientes.

Los epítopes de Der p 2 son muy conformacionales, por lo que sería de esperar una reducción considerable de la actividad si se altera la estructura de la proteína, lo cual puede suceder cuando ella se expresa en

forma fusionada. Sin embargo, a pesar de que existen evidencias de modificaciones (la molécula no es reconocida por el anticuerpo monoclonal 7A1-Indoor, UK- dirigido contra el alérgeno natural), aparentemente no reducen considerablemente su actividad alergénica en Western Blotting: el 86 % de los sueros reconoció a la molécula. Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente.¹⁴ Con este resultado se demuestra que existe identidad inmunológica de los determinantes alergénicos de la proteína recombinante con respecto a la natural, lo cual es relevante para su posible uso en el diagnóstico *in vitro*.

Las curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir del ELISA directo (Fig. 2) demuestran la actividad de unión de IgE de la proteína recombinante, esta vez empleando una fase sólida diferente (poliestireno) a la empleada en el Western Blotting (nitrocelulosa), teniendo en cuenta además que con el regulador PBS se obtuvieron las mayores señales de absorbancia se pudiera pensar en desarrollar un posible ensayo de diagnóstico *in vitro* usando la misma fase sólida y PBS como regulador de recubrimiento.

Como conclusión, se ha comprobado que el rDer p 2 expresado en *E. coli* fusionado con GST retiene la mayor parte de la actividad alergénica de su análogo natural en pacientes cubanos, el cual puede ser empleado en ensayos de diagnóstico *in vitro* específico de alergia al ácaro *D. pteronyssinus*, basados tanto en el uso de nitrocelulosa (Western Blot, Dot Blot) como poliestireno (ELISA), como fase sólida. No obstante, es necesario aún estudiar la posible afectación de algunos epítopes IgE de la molécula y su influencia sobre las propiedades de un sistema de diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

1. Voochors R., Spiekma F.T.M., Verakamp M.J., Leupen M.J., Lyklema A.W. The house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) and the allergen it produces. Identity with the house dust mite allergen. **J. Allergy**, **39**, 325, 1967.
2. Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S, Einarsson R, Bonachea I, Chapman M. Characterization of Allergenic components from house dust mite *Dermatophagoides siboney*. Purification of Der s 1 and Der s 2 allergens. **Clin. and Exp. Allergy**, **25**, 922, 1995.
3. Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S. Purification and IgE binding capacity of Der s 3, a major allergen from *Dermatophagoides siboney*. **Clin. and Exp. Allergy**, **27**, 700, 1995.
4. Thomas WR. Cloning and expression of DNA coding for the mayor House Dust Mite Allergen Der p 1 in *E. coli*. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **85**, 127, 1988.
5. Dillworth T. Sequence analysis of cDNA coding for a major hose dust mite Der f I. **Clin. Exp. Allergy**, **21**, 25, 1991.
6. Chua K.Y. Sequence Analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen. **J. Exp. Med.**, **167**, 175, 1988.
7. Chua K.Y. Isolation of cDNA coding for the Major Hose Dust Mite Allergen Der p II by IgE plaque Immunoassay. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **91**, 118, 1990.
8. Yuuki T. Cloning and sequencing of cDNAs corresponding to mite major allergen Der f II. **Japan J. Allergol.**, **39**, 557, 1990.
9. Trudinger M., Chua K.Y. cDNA encoding the major mite allergen Der f II. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **21**, 33, 1991.
10. Ichikawa S, Hatanaka H, Yuuki T, Iwamoto N, Kojima S, Nishiyama C et al. Solution structure of Der f 2, the major mite allergen for atopic diseases. **J. Biological Chemistry**, **273**, 356, 1998.
11. Moser M. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen 1/a (rAsp f 1/a) in the diagnosis of *Aspergillus* related diseases. **New Drugs in Allergy and Asthma**. Edited by Birkhauser Verlag Baud, Sweden, 1993.
12. Olsen E. Recombinant Allergens and diagnosis of grass pollen **Allergy. Annals of Allergy**, **72**, 104, 1994.
13. Bousquet J. Diagnosis of Allergy and specific Immunotherapy using Recombinant Allergens and Epitopes. **Progress in Allergy and Clinical Immunol.**, Vol 3. Edited by SG. Johansson. Hogrefe and Huber Publishers, Stockholm, 1994.
14. Chua K.Y. Expression of *D. pteronyssinus* Allergen Der p II in *E. coli* and the binding studies with human IgE. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **91**, 124, 1990.
15. Lynch N.R. *In vivo* biological activity of recombinant Der p II allergen of house dust mite. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **105**, 70, 1994.
16. Chua K.Y. IgE binding with large peptides expressed from Der p II cDNA constructs. **Clin. Exp. Allergy**, **21**, 161, 1991.
17. Vant Hof W. Epitope mapping of the *D. pteronyssinus* house dust mite allergen Der p II with overlapping peptides. **Mol. Immunol.**, **28**, 1225, 1991.
18. Martínez N, Aranda R.E., Casas R., Garriga S., Labrada A. Epidemiological study of sensitization to common inhalant allergens in Cuba. XVI International Congress Allergy Clin. Immunology, Cancún, México, 1997.
19. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680, 1970.
21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**, 265, 1951.
22. Towbin H., Staehelint J., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**, 43, 1979.
23. Ferrandiz R, Casas R, Dreborg S. Crossreactivity between *Dermatophagoides siboney* and other domestic mites. II. Analysis of individual crossreacting allergens after SDS-PAGE and western blotting inhibition. **Int. Arch. Allergy Immunol**, **116**, 206, 1998.
24. Center for Biologics Evaluation and Research. Method for Inhibition Assay of Allergenic Products. Food and Drug Administration., USA, April 25, 1992.
25. Thompson S.J., Whitley H.J., Naysmith J.D., Carswell F. IgE antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* in atopic patients. **Immunology**, **64**, 311, 1988.
26. Ferrandiz R., Casas R., Dreborg S. Sensitization to *Dermatophagoides siboney*, *Blomia tropicalis*, and other domestic mite in asmatic patients. **Allergy**, **51**, 501, 1996.
27. Van't Hof W, Van den Berg M., Driedijk PC., Aalberse R.C. Heterogeneity in the IgE Binding to a Peptide Derived from the House Dust Mite Allergen Der p II Indicates that the IgE Response is Highly Polyclonal. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **101**, 437, 1993.
28. Van't Hof W, Driedijk PC., Van den Berg M., Beck-Sickinger A.G, Jung G., Aalberse R.C. Epitope mapping of the *Dermatophagoides pteronyssinus* house dust mite major allergen Der p II using overlapping synthetic peptides. **Molecular Immunology**, **28**, 1225, 1991.