

# Producción de un anticuerpo IgY específico contra el antígeno CD41 humano

**Esteban J. Gutiérrez Calzado, Marlene Toledano Heredia, Hans Bäumlér\* y Rüdiger Schade.\*\***

Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Calle 23 y Carretera del Caney, Apartado Postal 4032, Código Postal 90400, Santiago de Cuba. Correo electrónico: esteban@cim.sld.cu \*Instituto de Medicina Transfusional. Universidad Libre de Berlín, Alemania. \*\*Instituto de Farmacología de la Universidad de Humboldt de Berlín, Alemania.

Recibido: 23 de abril de 2008. Aceptado: 9 de marzo de 2009.

Palabras clave: IgY, anticuerpos de yema de huevo, glicoproteína gpIIb/IIIa, antígeno CD41.  
Key words: IgY, egg yolk antibodies, gpIIb/IIIa glycoprotein, CD41 antigen.

**RESUMEN.** Desde hace dos décadas, la comunidad científica muestra un gran interés hacia la generación de anticuerpos en gallinas ponedoras por las ventajas que estas aportan al compararse con otros métodos tradicionales para este fin, sobre todo, en el hecho de lograrse en ellas, mejores respuestas de anticuerpos hacia antígenos de mamíferos muy conservados en la filogenia entre los que se encuentran glicoproteínas de membrana celular. El objetivo de este trabajo fue la generación de anticuerpos específicos contra la glicoproteína de membrana plaquetaria humana gpIIb/IIIa (antígeno CD41) en gallinas ponedoras. Para este propósito, se utilizaron gallinas de 22 semanas de edad, a las que se les aplicaron dosis de 20  $\mu\text{g}$  de una preparación inmunopurificada de este antígeno plaquetario, emulsionada con adyuvante completo e incompleto de Freund para una primera y segunda inmunización respectivamente, a intervalos de un mes. Se cosecharon los huevos diariamente de los animales inmunizados a partir de un día antes de esta aplicación hasta 30 d posteriores a la segunda inyección, se procesaron estos para la extracción de los anticuerpos específicos presentes en ellos y se obtuvo la dinámica de producción de anticuerpos por el método clásico de Ouchterlony que se enfrentó a una preparación pura del antígeno. Las respuestas de anticuerpos obtenidas resultaron en títulos adecuados susceptibles de investigar en usos posteriores en la Medicina Transfusional específicamente para el análisis de la calidad de plasmas.

**ABSTRACT.** Twenty years ago, scientific community has shown a great interest for the generation of polyclonal antibodies from egg yolk of immunized chickens for several advantageous that this method presents in comparison to conventional ones like the fact that chickens often produce antibodies against phylogenetical highly conserved mammalian proteins or peptides more efficiently than rabbits do. As a consequence, a conserved antigen can remain "masked" to the rabbit immune system, and thus cause only a weak or a "silent" response. Furthermore, if chickens and rabbits are immunized with the same mammalian antigen, very often the chickens respond with an antibody-specificity that can rarely be achieved in rabbits. Insofar, the chicken is an ideal host to produce antibodies against human CD41 antigen. This background knowledge has been the basis to produce specific antibodies in hens against human platelet gpIIb/IIIa. For this proposal, three laying hens of 22 weeks old were injected with 20  $\mu\text{g}$  of immunopurified complex antigen emulsified with Freund complete and incomplete adjuvant two times at one month interval. Before one day the first immunization up to 30 d after second one, eggs were collected and later processed for extraction of yolk antibodies and the specificity of these ones was tested by Ouchterlony technique against pure preparation of antigen. It was demonstrated that antibodies immune response was in reasonable titres and show the possibilities to research these ones in Transfusional Medicine proposal.

## INTRODUCCIÓN

La producción y uso de anticuerpos obtenidos a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas, lo que en términos generales se enmarca dentro de la denominada Tecnología IgY, es ya hoy una rama en expansión y de una gran connotación dentro de la Biotecnología. Se han publicado numerosos artículos que describen el uso exitoso de estos anticuerpos en una variedad de campos de investigación.<sup>1-6</sup>

Se han desarrollado diversos inmunoensayos vías ELISA o RIA para determinar la concentración de péptidos y proteínas basados en anticuerpos IgY, además de otros tipos de ensayos en la Química Clínica y en la investigación básica.<sup>1,2</sup> Los anticuerpos IgY se han utilizado de forma satisfactoria en Inmunohistoquímica para

la detección de antígenos virales y bacterianos, tanto de origen vegetal o animal, así como para el estudio de la incidencia de parásitos intestinales en animales domésticos,<sup>2,5</sup> la contaminación de alimentos con toxinas o drogas,<sup>2,6</sup> etc. Durante la pasada década, los anticuerpos IgY han visto incrementar su uso dentro de la terapia y profilaxis de enfermedades, tanto como dentro de un nuevo contexto que es dado en llamarse "alimentos funcionales".<sup>7-9</sup> Al compararse la inmunización entre pollos y mamíferos de laboratorio, estos primeros ofrecen ventajas.<sup>2,10-13</sup>

El objetivo primario en el cuidado de los animales es la reducción del dolor y daño que se les causa en las manipulaciones. La Tecnología IgY reduce al menos en un 50 % esta situación, dado que los anticuerpos IgY

se pueden obtener fácilmente mediante un método no invasivo basado en la simple acción de colectar los huevos puestos por las gallinas inmunizadas en vez del desangrado que se les hace a los mamíferos para obtener el suero.

La Tecnología IgY, por otro lado, también ofrece una serie de ventajas económicas dado que los costos para la adquisición y el mantenimiento de gallinas son inferiores a los que se necesitan para conejos, además que en cuanto a volúmenes de producción se refiere, las primeras brindan tanto anticuerpo como el que puede ofrecer un animal de mucho mayor talla como es el caso de los carneros y ovejos. Por consiguiente, de una gallina se puede obtener una enorme cantidad de anticuerpos. Se reporta un mínimo de 24 g de IgY total por año de cada animal, estos rendimientos pueden ser mayores si se tiene en cuenta que un huevo puede brindar entre 100 y 250 mg de este anticuerpo en su yema y las gallinas realizan al menos 240 puestas al año, de todo este volumen total, se puede esperar que sean anticuerpos específicos hasta el 10 %.<sup>1,2,5</sup> Estos resultados se han podido corroborar con mucha aproximación haciendo inferencias de la experiencia que se ha logrado en Cuba con estas metodologías.<sup>3,4</sup>

Esta enorme cantidad de anticuerpos permite considerar nuevas aplicaciones de la IgY dentro de la inmunoterapia y la inmunoprolifaxis aplicada a diversas infecciones bacterianas y virales en la Medicina tanto humana como veterinaria.<sup>2,5</sup>

Por otra parte, los anticuerpos IgY no muestran reacciones cruzadas con los factores reumatoideos<sup>2,12</sup> o anticuerpos humanos anti ratón,<sup>12</sup> los anticuerpos IgY son incapaces de activar el complemento de los mamíferos<sup>2,12</sup> y no presentan heteroaglutininas.<sup>11</sup>

Además, ha sido muy reportado que los pollos con frecuencia producen anticuerpos con más eficiencia que los mamíferos contra proteínas o péptidos de estos últimos que se encuentran muy conservados en la filogenia,<sup>2,12</sup> lo que trae como consecuencia que un antígeno pueda permanecer enmascarado al sistema inmune de un conejo y por consiguiente, provocar tan solo una respuesta débil o "silente". De igual manera, se ha visto que si se inmunizan pollos y conejos con el mismo antígeno de mamíferos, con una gran frecuencia, los pollos responden con una especificidad de anticuerpos que en raras ocasiones, se puede lograr en conejos, como es por ejemplo el PIIIP<sup>14</sup> y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea.<sup>15</sup>

Atendiendo a las consideraciones expuestas, se puede afirmar que los pollos son receptores ideales para producir anticuerpos contra glicoproteínas de membrana de células humanas como es el caso de la gpIIb/IIIa presente en la superficie de las plaquetas, la cual constituye el receptor para el fibrinógeno. De aquí, que el objetivo principal del presente estudio haya sido comprobar la factibilidad para producir anticuerpos IgY en las yemas de huevos de gallinas ponedoras específicos contra ese complejo glicoproteico mediante el diseño de un esquema de inmunización y el estudio de la dinámica de producción de anticuerpos mediante una técnica de inmunoprecipitación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Antígeno

Las muestras de antígeno se obtuvieron a partir de un donativo a través de una colaboración con el proveedor (Instituto de Medicina Transfusional de la Universidad Libre de Berlín).

## Producción de los anticuerpos de pollo

Se utilizaron tres gallinas ponedoras White Leghorn de 22 semanas de edad ubicadas en una jaula de 128 cm x 65 cm x 80 cm, sin identificación individual. Recibieron una dieta diaria consistente en 170 g de alimento especial estéril CM 005 Al y Co (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Ciudad de La Habana) y agua hervida *ad libitum*.

Se les aplicó un esquema de inmunización consistente de 20 µg de CD41 puro emulsionado con adyuvante completo de Freund para una primera inmunización (Sigma Co. Ltd., USA) y una segunda inmunización consistente de la misma dosis emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Co. Ltd., USA), todas a través del músculo pectoral de los animales a intervalos de un mes.

## Recolección de los huevos

Los huevos se cosecharon diariamente, a partir de un día antes de la primera inmunización hasta 30 d posteriores a la segunda inyección y se almacenaron en un refrigerador doméstico de 2 a 8 °C (Haier, China), hasta su procesamiento.

## Extracción de los anticuerpos de las yemas de los huevos

Se realizaron mezclas de las yemas de los huevos colectados durante cada semana y se procedió a la extracción de los lípidos de ellas por el método de la fracción soluble en agua,<sup>16,17</sup> consistente en la mezcla del contenido de la yema con nueve volúmenes de agua destilada estéril hasta lograr una emulsión que se ajustó a pH 5,0, lo que permitió precipitar posteriormente los lípidos en frío (2 a 8 °C). Los sobrenadantes acuosos obtenidos fueron sometidos a un sistema de fraccionamiento con sulfato de amonio (BDH, Inglaterra) al 45 %, <sup>18</sup> con el objetivo de concentrar el mayor porcentaje de las inmunoglobulinas presentes en las muestras, las que se sometieron con posterioridad a una diálisis en cloruro de sodio (BDH, Inglaterra) 0,85 % y azida sódica 0,05 % BDH, Inglaterra) y llevadas al volumen inicial de las yemas. El contenido final de cada procesamiento de estas mezclas semanales sirvió para el análisis de la dinámica de producción de anticuerpos. Las mezclas de los huevos cosechados previo al comienzo del esquema de inmunización fueron sometidas al mismo proceso y sirvieron para marcar el tiempo cero de la dinámica de producción de anticuerpos, la cual se realizó semanalmente en el curso de nueve semanas.

## La dinámica de producción de anticuerpos

La dinámica de producción de anticuerpos se realizó mediante la técnica de inmunodifusión doble bidimensional o técnica de Ouchterlony.<sup>19</sup> Se realizaron diluciones dobles sucesivas de los preparados de yemas obtenidos por la metodología de extracción previamente descrita y se enfrentaron a una preparación pura del antígeno (0,5 mg/mL) en cloruro de sodio 0,85 %.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inmunodifusión doble bidimensional (Técnica de Ouchterlony) descrita en la década de los años cuarentas del pasado siglo constituye hasta hoy una técnica simple y rutinaria en la mayoría de los laboratorios de Inmunología y permite hacer estudios de la calidad y cantidad de anticuerpos obtenidos en un esquema de inmunización a un animal objeto de estudio. Realizando diluciones sucesivas con una disolución reguladora apropiada del material a partir del cual se pretende

estudiar la presencia de anticuerpos, estas se enfrentan a una preparación pura del antígeno en cuestión. Una muestra de la respuesta de anticuerpos obtenida durante el periodo de estudio correspondiente a este trabajo (Fig. 1) es prueba elocuente de ella.

A partir de la Técnica de Ouchterlony (Fig. 1) se obtienen los datos de los títulos de anticuerpos (Tabla 1) que se corresponden con los valores recíprocos de las diluciones realizadas al material rico en anticuerpos, esto permite analizar el comportamiento de la respuesta inmune de un animal.

Teniendo los datos de los títulos de anticuerpos (Tabla 1), el comportamiento de la respuesta inmune de un animal se puede obtener mediante una simple graficación de estos datos contra el tiempo, lo que puede dar una idea muy aproximada de la relación que pueda tener la dinámica de producción de anticuerpos en un experimento dado con lo que ya se ha reportado clásicamente o lo realizado por otros autores con la especie animal objeto de investigación. En este trabajo, se muestra esta dinámica de producción de anticuerpos (Fig. 2).

Los resultados de estos experimentos (Tabla 1) y (Figuras 1 y 2) permiten realizar un análisis crítico partiendo de los antecedentes en los trabajos de Schwarzkopf y cols.<sup>20</sup> quienes en un estudio multifactorial muy amplio utilizando un total de 972 gallinas probaron 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), lipoproteína de baja densidad de 1 000 kD, somatotropina bovina recombinante de 22 kD y el antígeno fimbrial K88 de *E. coli* con un PM de 22 kD. De los resultados obtenidos por ellos, la dosis de 100  $\mu$ g de IgG humana combinada con adyuvante incompleto de Freund fue la mejor combinación utilizada en cuanto al logro de los mayores títulos de anticuerpos obtenidos. Asimismo, Behn y cols.,<sup>21</sup> probaron dosis de 100 y 500  $\mu$ g de IgG de ratón en gallinas y lograron concentraciones de anticuerpos IgY muy razonables, sin encontrar diferencias significativas. Estos resultados fueron reproducidos por Kritratanasak y cols.<sup>22</sup>

Según la experiencia obtenida en Cuba en la inmunización de este biomodelo, títulos razonables de anticuerpos se lograron al inmunizar gallinas con dosis de 100  $\mu$ g de IgG humana<sup>13</sup> a pesar de haberse realizado inmunizaciones de refuerzo a intervalos muy cercanos (7 d).

En un experimento en el que se suministraron dosis de 500, 1 000, 2 500 y 5 000  $\mu$ g de albúmina humana respectivamente a gallinas, se obtuvo una inmunosupresión con las dos últimas dosis y se vieron los mejores títulos con la dosis de 500  $\mu$ g.<sup>2</sup>

Las dosis inmunogénicas utilizadas en este trabajo en relación con el antígeno CD41 estuvo dentro de los límites planteados como buenos en esos experimentos previos (10 – 1 000  $\mu$ g),<sup>1,2,20</sup> y los resultados alcanzados con la aplicación de una dosis de 20  $\mu$ g en dos inoculaciones a un intervalo de un mes eran de esperar teniendo en cuenta que se trata de un antígeno de mamífero muy conservado en la filogenia. Se pudo observar el buen nivel de especificidad (Fig. 1) que se obtiene con estos anticuerpos frente al antígeno en cuestión, además de la dinámica de producción de anticuerpos en el tiempo (Tabla 1). En este trabajo, se lograron títulos de anticuerpos reactivos hasta diluciones de 1 : 32 de los sobrenadantes delipidados de yema, lo que puede constituir una preparación útil de anticuerpos IgY susceptible de uso en cualquier inmunoensayo para detectar la presencia del antígeno al que estos van dirigidos (Figuras 1 y 2, Tabla 1), lo que

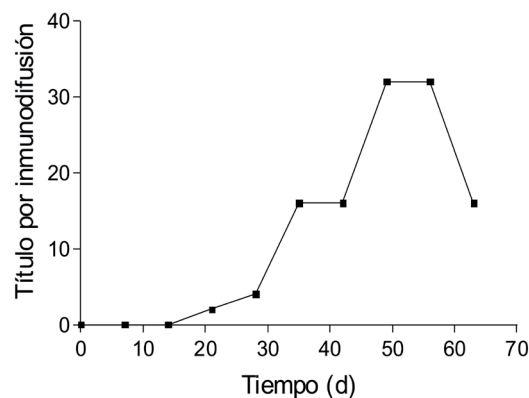


**Fig. 1.** Inmunodifusión de los sobrenadantes de yema de huevo anti CD41. (En el pocillo central se aplicó una muestra del antígeno complejo CD41/CD61 a una concentración de 0,5 mg/mL). Los seis pocillos que rodean a este representan diluciones sucesivas del preparado del anticuerpo, desde arriba y en dirección de las manecillas del reloj desde la dilución 1 : 2 hasta 1 : 32). Véase en todos los casos, la respuesta específica que se corresponde con una banda nítida de precipitación cerrando una forma hexagonal lo que da certeza del título alcanzado.

**Tabla 1.** Resultados de los títulos de anticuerpos IgY en el tiempo obtenidos por la técnica de inmunodifusión doble bidimensional.

Tiempo (d)	Título (recíproco de la dilución)
0	0
7	0
14	0
21	2
28	4
35	16
42	16
49	32
56	32
63	16

El título representa el recíproco de la dilución que se realizó a la mezcla de sobrenadante delipidado de las yemas de los huevos cosechados durante cada semana que habían sido concentrados previamente por sulfato de amonio y llevadas al volumen inicial de esta.



**Fig. 2.** Dinámica de producción de anticuerpos IgY específicos anti CD 41. (El título se presenta como el recíproco de la dilución del preparado de anticuerpo.).



muestra que el esquema brindó un resultado satisfactorio de anticuerpos. El análisis en conjunto de estos resultados obtenidos hasta hoy en la inmunización de gallinas llevan a concordar con Schwartzkopf,<sup>20</sup> Behn,<sup>21</sup> Schade,<sup>1,2</sup> y Kritatanasak<sup>22</sup> de que dosis óptimas para este biomodelo, al menos de antígenos solubles y sobre todo, si se trata de glicoproteínas de membranas de células del sistema hemolinfopoyético de mamíferos, deben oscilar entre los 10 y 1 000  $\mu\text{g}$ . Se ha demostrado que dosis por encima o por debajo inducen modulaciones no deseables de la respuesta inmune como la tolerancia y la inmunosupresión.

En otros casos,<sup>1,2,5,8,20-22</sup> en gallinas sometidas a esquemas de inmunización, se ha encontrado una cinética en los títulos de anticuerpos 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 anticuerpos dentro de los diez primeros días aproximadamente, seguido de una meseta en los diez días y posteriormente, un nuevo descenso.

En otras observaciones,<sup>1,2,5</sup> se reporta que el tiempo de permanencia de los títulos de anticuerpos después de una inmunización de refuerzo (segunda fase de la respuesta inmune) puede durar entre seis y diez semanas antes de que se comience a apreciar una declinación.

La recopilación de estos resultados ha llevado a proponer como la mejor recomendación para inmunizaciones de gallinas aquella que consiste en dosis antigénicas que oscilan entre 100 y 1 000  $\mu\text{g}$ , siendo suficientes 10  $\mu\text{g}$  en algunas ocasiones con inmunizaciones de refuerzo que oscilen entre las 4 y 8 semanas.<sup>1,2</sup>

Los resultados de este trabajo guardan una estrecha relación con esas recomendaciones y coinciden con la factibilidad de su aplicación.

Se observó en el estudio (Fig. 2), que aproximadamente a las cuatro semanas posteriores a la inmunización primaria, se comienzan a obtener títulos elevados de anticuerpos, los cuales se incrementan después de la aplicación de una segunda dosis, hasta que logran mantenerse estables por dos o tres semanas más, después de las cuales comienza una declinación. Estos resultados concuerdan con otros en los que se observaron los más elevados títulos entre las cuatro y ocho semanas después de la primera inmunización<sup>1,2,5</sup> y con otros estudios realizados en Cuba.<sup>3,4,11,13</sup>

La respuesta de anticuerpos después de la inmunización en las gallinas por vía intramuscular y con adyuvante, ha mostrado títulos de anticuerpos adecuados, los cuales mostraron una gran especificidad en el reconocimiento del complejo glicoproteico de membrana plaquetaria.

Con los resultados de la dinámica de producción de anticuerpos obtenida en este trabajo, se puede demostrar que dosis por debajo de 50  $\mu\text{g}$  de este antígeno soluble (gpIIb/IIIa), se pueden incluir dentro del concepto de ventana de inmunogenicidad para el modelo gallina y tipo de antígeno.<sup>23</sup> Todo esto puede afirmarse gracias a una respuesta inmune humoral activa por el antígeno dado. Es conocido que concentraciones muy elevadas o muy bajas pueden inducir condiciones de supresión o tolerancia.<sup>23</sup> Se conoce de gallinas inmunizadas con dosis mayores a 2,5 mg de albúmina humana, a las que se les ha inducido una supresión.<sup>2</sup>

Estos resultados reafirman al modelo gallina como un animal de selección posible para estos fines, pues además de la convincente demostración de los adecuados niveles de respuesta de anticuerpos ante un antígeno de difícil reconocimiento por el sistema inmune de mamíferos, permite la explotación basada en

una tecnología acorde con el principio de las 3R que propugna el bienestar animal en el desempeño de las investigaciones biomédicas.<sup>24</sup>

## CONCLUSIONES

Se demuestra que la gallina ponedora constituye un biomodelo animal apropiado para obtener anticuerpos específicos contra la glicoproteína de membrana plaquetaria gpIIb/IIIa o antígeno CD41, que por los elevados títulos de anticuerpos logrados en el esquema de inmunización utilizado y teniendo en cuenta los grandes volúmenes de reactivo que brinda este método no invasivo para la producción de anticuerpos, se puede recomendar la producción de grandes lotes de este anticuerpo específico que permita estudios posteriores que demuestren la factibilidad de su uso en la Medicina Transfusional, especialmente, como sustituto de diversas pruebas para la determinación de la calidad de los concentrados de plaquetas, sobre todo, por el conocimiento de que este anticuerpo es reconocedor específico del antígeno CD41, el cual constituye el receptor plaquetario para el fibrinógeno. Estudios preliminares de las características aglutinantes de este anticuerpo frente a concentrados de plaquetas humanas lo sugieren como un candidato para el biodiagnóstico certero de diversos procesos fisiopatológicos en los que la activación y agregación plaquetarias desempeñen un papel fundamental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schade R, Behn I, Erhard M, Hlinak A and Staak C. Chicken egg yolk antibodies, Production and Application. IgY – Technology. First Edition Heidelberg, Germany: Springer Verlag:2001.
- Schade R, Gutiérrez E, Sarmiento R, Chacana P, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo H. Chicken egg yolk antibodies (IgY Technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. ATLA. 2005;33:1.
- Gutiérrez Calzado EJ, Samón Chávez T, Sierra González G, Higginson Clarke D, Rodríguez Silva G, Schade R. Desarrollo de un Sistema ELISA para cuantificar IgG de ratón tomando como base la Tecnología IgY. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007;38(1):75.
- Gutiérrez Calzado EJ, Samón Chávez T, Sierra González G, Higginson Clarke D, Fernández Duarte J, Miranda Ariza A, Schade R. Obtención de un conjugado anti IgG de ratón-FITC mediante la Tecnología IgY para uso como anticuerpo secundario en la detección de antígenos de superficie celular. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007;38(1):85.
- Chacana PA, Terzolo HR, Gutiérrez Calzado E, Schade R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina: biología, propiedades y su aplicación en medicina humana y veterinaria. Revista Argentina de Medicina Veterinaria. 2004;85:5.
- Pichler H, Krska Szekacs A & Grasserbauer M. An enzyme immunoassay for the detection of the mycotoxin zearalenone by use of yolk antibodies. Fresenius Journal of Analytical Chemistry. 1999;362:176.
- Nau Françoise, Anton Marc, Nys Yves. pdf L'œuf de poule: une mine de molécules a activités biologiques. Consultado: 2 de febrero de 2009. Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 26 et 27 Mars, Disponible: 2003.[http://www.journees-de-la-recherche.org/JRA/Contenu/Archives/5\\_JRA/qualite/S-NAU.pdf](http://www.journees-de-la-recherche.org/JRA/Contenu/Archives/5_JRA/qualite/S-NAU.pdf).
- Rainer Huopalahti, Rosina López Fandiño, Marc Antón, Rüdiger Schade. Bioactive Egg Compounds. First Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2007.
- Horle K, Horle N, Abdou AN, Yang JO, Yun SS, Chun HN, Park CK, Kim M and Hata H. Suppressive Effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on Helicobacter pylori in humans. J. Dairy Sci. American Dairy Science Association. 2004;87:4073.

10. Karlsson M, Kollberg H and Larsson A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World's Poultry Science Journal*. 2004;60:341.
11. Gutiérrez Calzado EJ, Mariño EC, Chavez TS, Vazquez EL, Ochoa ZC & Schade R. Extraction of a monospecific Coombs reagent from chicken eggs. *ALTEX*. 2003;20:21.
12. Karlsson M, Kollberg H and Larsson A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World's Poultry Science Journal*. 2004;60:341.
13. Gutiérrez Calzado EJ; Mariño EC; Toledano HM; Chávez TS. Obtención de anti IgG humana en aves. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2001;32:2.
14. Gerl M, Steinert Quint CM, Schade R, & Günzler V. Immunisation of chickens with the amino terminal propeptide of bovine procollagen type III. *ALTEX*. 1996;(Suppl):51.
15. Rosol TJ, Steinmeyer CL, McCauley LK, Merryman JI, Werkmeister JR, Gröne A, Weckman MT, Swayne DE & Capen CC. Studies on chicken polyclonal anti-peptide antibodies specific for parathyroid hormone-related protein (1-36). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1993;35:321.
16. Akita EM & Nakai S. Immunoglobulins from egg yolks: Isolation and purification. *Journal of Food Science*. 1992;57:629.
17. Akita EM & Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods*. 1993;160:207.
18. Baines Michael G; Thorpe Robin. Purification of Immunoglobulin G (IgG). Chapter 8. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10: Immunochemicals Protocols. Ed. M. Manson, 1992.
19. Janeway CA, Tavers P, Walport M & Shlomchick M. *Immunologie (German version)*. 5th Edition, Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag: 2002.
20. Schwarzkopf C, Staak C, Behn I & Erhard M. Immunisation. In: *Chicken egg yolk antibodies, production and application. IgY-technology* (ed. R. Schade, I. Behn, M. Erhard, A. Hlinak & C. Staak), Berlin Heidelberg New York, Springer Lab Manuals: 2000: pp.25-64.
21. Behn I, Hommel U, Oertel M & Hauschild S. Kinetics of IgY formation after immunisation of hens with different protein antigens. *ALTEX*. 1996;13(Suppl.):18.
22. Kritratanasak S; Chiampanichayakul S; Kasinrerak W. Production of IgY antimouse IgG antibodies from chicken eggs. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2004;22(1):61.
23. Leenars M & Hendriksen, CFM. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *International Laboratory Animal Resource Journal (ILAR)*. 2005;46(3):269.
24. Jann Hau and Coenraad F M Hendriksen. Refinement of Polyclonal Antibody Production by Combining Oral Immunization of Chickens with Harvest of Antibodies from the Egg Yolk. *ILAR Journal*. 2005;46:294.