

CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS

## Respuesta IgE específica al ácaro *Blomia tropicalis* en pacientes cubanos

Dra. Rosa Elena Aranda Rivero,<sup>1</sup> MC. Alexis Labrada Rosado,<sup>2</sup> Dra. Maivis Cabrera Hernández<sup>3</sup> y Lic. Rosario Diéguez<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se realizó un estudio analítico prospectivo y transversal de 84 pacientes atendidos en la consulta de alergia del Hospital "Calixto García", en los cuales la prueba cutánea inmediata al extracto alergénico *Blomia tropicalis* fue positiva; los sueros de estos pacientes se utilizaron en los ensayos de determinación de anticuerpos IgE específicos y en la identificación de proteínas alergénicas en dicho extracto por medio de *western blotting*. Del total, 44 pacientes (55 %) mostraron niveles de IgE específica mayores que 0,1 U y 17 pacientes, niveles mayores que 0,3 U. El asma bronquial y la rinitis fueron las patologías con mayores niveles de IgE específica. Sin embargo, los valores de IgE específica en general, fueron inferiores a los reportados para otros ácaros, a pesar de que la reactividad cutánea se comportó de una forma similar. Se determinó que los anticuerpos IgE específicos están mayormente dirigidos hacia los alérgenos de peso molecular entre 13 y 15 kD.

**Descriptores DeCS:** ANTICUERPOS ANTIIDIDIOTIPOS/sangre; IGE/sangre; ACAROS/inmunología; ALERGENOS/inmunología; TESTS CUTANEOS.

En los últimos años se ha observado un notable incremento de la frecuencia de las enfermedades atópicas. En muchas partes del mundo, los ácaros de la familia *Piroglyphidae*, género *Dermatophagoides*, constituyen más de 90 % de los ácaros encontrados en las muestras de polvo doméstico y son la causa principal de alergia a los ácaros. Sin embargo, en climas tropicales y subtropicales húmedos, otras especies de ácaros aparecen en el polvo doméstico y son también parte importante de la acarofauna, ejemplo de ello es el ácaro *Blomia tropicalis* (Bt). Este ácaro pertenece a la familia *Glycyphagidae* y fue descrito por primera vez por Van Bronswijk y otros en 1973.<sup>1</sup>

En EE.UU., Bt ocupa el cuarto lugar entre las especies más conocidas de ácaros domésticos, es

el más común en los estados sureños subtropicales.<sup>2-4</sup> Otros estudios realizados en Colombia demuestran que Bt es el más común de los ácaros del género *Glycyphagidae* presente en el polvo doméstico y que la respuesta alérgica es comparable a la de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) y *D. farinae* (Df), por lo cual debe ser considerado como otro ácaro de importancia clínica.<sup>5</sup> En un estudio realizado por Ferrándiz y otros en Cuba, se obtuvo también una alta prevalencia de la sensibilización a este ácaro entre los pacientes asmáticos.<sup>6</sup> Se conoce que Bt es fuente primaria de al menos 21 proteínas con actividad alergénica y presenta una baja reactividad cruzada con Dp, Df y *D. siboney* (Ds);<sup>7,8</sup> esto indica la presencia predominante de determinantes alergénicos específicos.

<sup>1</sup> Especialista de II Grado en Inmunología. Investigadora Agregada.

<sup>2</sup> Máster en Ciencias. Investigador Agregado.

<sup>3</sup> Especialista de I Grado en Alergología.

<sup>4</sup> Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada.

En el presente estudio se reportó la reactividad cutánea al extracto Bt, se desarrollaron métodos *in vitro* para el estudio de anticuerpos IgE dirigidos contra este ácaro y se identificaron las proteínas alergénicas causantes de la sensibilización a Bt.

## MÉTODOS

### DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio analítico prospectivo y transversal de 84 pacientes de ambos sexos, atendidos en la consulta de alergia del Hospital "Calixto García" de Ciudad de La Habana, en el período comprendido desde julio a octubre del año 1997, cuyas edades oscilaron entre 14 y 64 años. Para su selección se tuvo en cuenta la presencia de un cuadro clínico sugestivo de patología alérgica, que el resultado de la prueba por punción cutánea con extracto de Bt fuera positivo, que no estuvieran recibiendo inmunoterapia ni tratamiento con drogas que interfirieron con la reacción cutánea (antihistamínicos) y que no presentaran piel demográfica o eczematosa, ni síntomas de descompensación de asma, rinitis, conjuntivitis, urticaria u otra patología alérgica.

### PRUEBA POR PUNCIÓN CUTÁNEA (*PRICK TEST*)

Se realizó depositando una gota del extracto alergénico estandarizado de Bt (10 000 UB/mL), en la cara interna del antebrazo, se puncionó la piel a través de la gota con una lanceta de punta de 1 mm y se midió el tamaño del habón pasados 15 min. Se utilizó como control negativo el diluyente y como control positivo el fosfato de histamina 16,68 mg/mL. La prueba se considera positiva cuando el diámetro del habón es  $\geq 3$  mm. El extracto alergénico empleado fue producido en el Centro Nacional de Biopreparados a partir del cultivo completo de dicho ácaro.

### DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA A *BLOMIA TROPICALIS*

Placas de poliestireno *maxisorp-nunc* se recubrieron con extracto de Bt lote 1/95, 3 mg/mL

en solución de carbonato-bicarbonato pH 9,6 (100 mL/pozo), se procedió al bloqueo con solución de fosfatos pH 7,2 que contenía 0,05 % *Tween* 20 y albúmina bovina sérica 1 % (PBS-T-BSA); los sueros de pacientes se adicionaron por duplicado a una dilución de 1:2 y 1:5 en PBS-T-BSA (100 mL/pozo). Se adicionaron 100 mL de anti IgE-peroxidasa ( $E_2$ -BIOCEN/CIGB) a una dilución de 1:1000 en PBS-T-BSA y por último 100 mL/pozo de la solución sustrato (250 mL de tetrametilbencidina y 10 mL de  $H_2O_2$  en 12 mL de *buffer* citratofosfato pH 5,4). La lectura se realizó a 450 nm en un lector Multiskan (*Labsystems*). La curva patrón se estableció recubriendo con el anticuerpo monoclonal anti-IgE ( $E_1$ -BIOCEN/CIGB) y diluciones de un patrón de IgE (10 a 0,016 UI/mL) estandarizado contra la referencia internacional para IgE humana (75/502). Se utilizó como anticuerpo revelador, anti-IgE-peroxidasa ( $E_2$ -BIOCEN/CIGB).

### ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA Y *WESTERN BLOTTING*

La electroforesis de proteínas se realizó por el método de Laemmli. Se utilizó un gel de poliacrilamida 12,5 % y se aplicaron 2,5 mg del extracto Bt. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa 0,2 mm, ésta se incubó con los sueros diluidos 1:5 en PBS- *Tween* 20 0,1 % durante toda la noche. Se aplicó la anti-IgE marcada con peroxidasa y el revelado se realizó mediante el método quimioluminiscente (ECL, Amersham) con impresión en un filme fotográfico.

### PROCESAMIENTO DE LOS RESULTADOS

La prueba de paralelismo entre la curva de dosis-respuesta de la IgE específica y el patrón de IgE (prueba t de Student), se realizó mediante el programa KYBER ELISA<sup>R</sup> (BIOCEN, 1996). El análisis de la distribución y correlación de la respuesta cutánea y la IgE específica se realizó con la ayuda del paquete de programas STATISTICA para Windows v4.2. *Stat Soft Inc.*, 1993. El resto de los gráficos y cálculos se realizaron en el programa Microsoft Excel v4.0. y *Microcal Origin* v3.5, *Microcal Software Inc.* 1994.

## RESULTADOS

### PRUEBAS CUTÁNEAS

La media geométrica del área del habón, de los pacientes con resultados positivos en la prueba cutánea fue de 19,6 mm<sup>2</sup> (intervalo de confianza [IC] de 95 %: 16,5-22,5 mm<sup>2</sup>). Los valores extremos fueron 104 y 7,1 mm<sup>2</sup>.

### ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IgE ESPECÍFICA A *BLOMIA TROPICALIS*

Con el objetivo de comprobar si la IgE específica podía ser expresada en las mismas unidades del patrón de IgE, se hicieron diluciones de 5 sueros de pacientes y las curvas obtenidas fueron comparadas con la curva estándar de IgE total. Los coeficientes de correlación de las curvas de respuesta, para los sueros individuales seleccionados fueron  $r \geq 0,95$ , y resultaron paralelas a la curva estándar (prueba t de Student,  $p < 0,05$ ) (fig. 1). En el ensayo desarrollado se obtuvo una señal máxima de 1,6-1,8 unidades de absorbancia para el valor máximo de la curva patrón de IgE (4 U/mL), el valor mínimo detectable fue de 0,1 U/mL. Por otra parte, los valores máximos de absorbancia alcanzados para los sueros analizados fueron de 1,1-1,2, mientras que la señal de fondo osciló alrededor de 0,02-0,03. La relación señal/ruido obtenida fue de alrededor de 40-50 veces, la cual puede calificarse de satisfactoria.

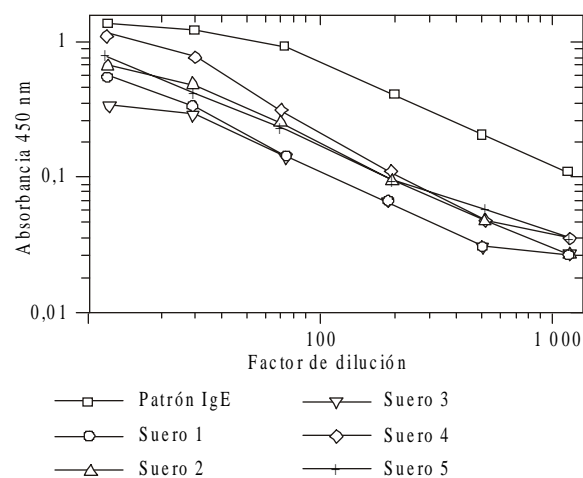


Fig.1. Curva dosis respuesta de 5 sueros y del patrón de IgE.

### IgE ESPECÍFICA

Fueron encontrados 46 pacientes (55 %) con niveles detectables de IgE específica ( $> 0,1$  U), de ellos 17 con valores superiores a 0,3 U. La media geométrica de los niveles de IgE específica fue de 0,33 U (IC 95 % 0,21-0,44). Resulta de interés estudiar la correlación de los niveles de IgE específica con el tamaño de la reacción cutánea. Se observan niveles significativos de correlación (Pearson) entre los valores de IgE específica y el área del habón ( $r = 0,32$ ,  $p = 0,032$ ); y la relación [área del alérgeno]/[área de la histamina] ( $r = 0,33$ ;  $p = 0,25$ ), aunque los coeficientes de correlación fueron bajos.

### IgE ESPECÍFICA Y REACTIVIDAD CUTÁNEA EN RELACIÓN CON DIFERENTES PATOLOGÍAS ALÉRGICAS

En la figura 2 se muestran los valores promedio de IgE específica en diferentes grupos de pacientes con asma, rinitis y urticaria. De acuerdo con estos resultados los pacientes asmáticos mostraron valores ligeramente superiores, aunque la diferencia en relación con el resto de las patologías no es significativa ( $p = 0,05$ ). Sin embargo, el porcentaje de pacientes con IgE específica detectable, en los pacientes asmáticos y riniticos fue similar. Por otra parte la reactividad cutánea de los asmáticos resultó similar a la de los pacientes con rinitis y conjuntivitis, fue ligeramente inferior en el caso de la urticaria (fig. 3). No obstante, la diferencia en este caso tampoco resultó significativa ( $p = 0,05$ ). En el grupo de pacientes estudiados fue mucho mayor el número de pacientes asmáticos en comparación con el resto de las patologías.

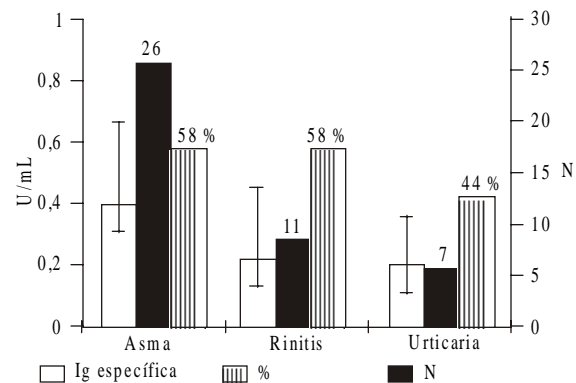
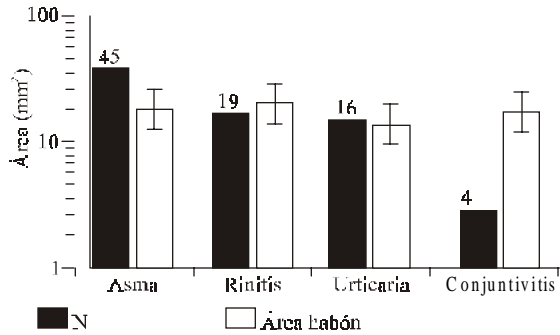


Fig.2. IgE específica hacia *Bt* en pacientes con diferentes patologías. El valor indicado es la media geométrica, las barras verticales muestran el intervalo de confianza de 95 % de dicho valor.

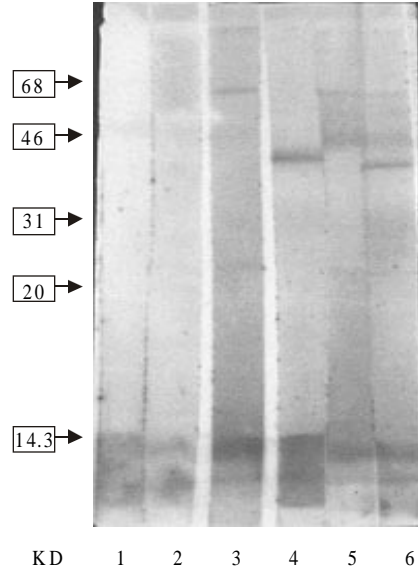


**Fig. 3.** Reactividad cutánea en pacientes con diferentes patologías. El valor indicado es la media geométrica, las barras verticales muestran el intervalo de confianza de 95 % de dicho valor.

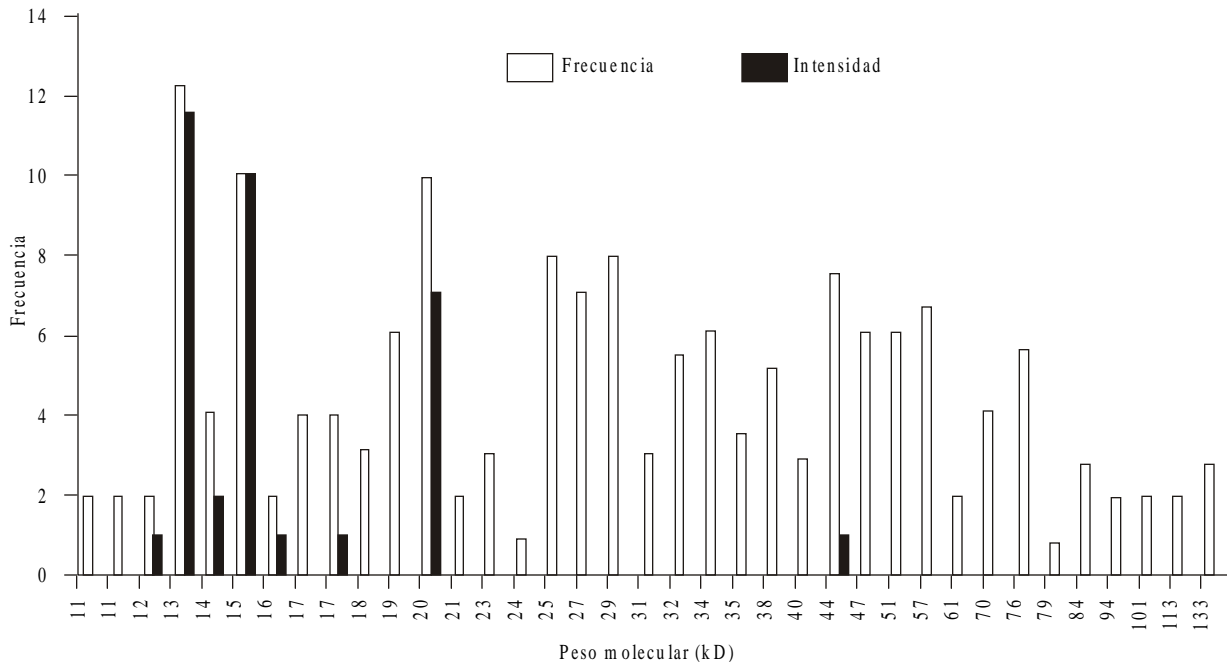
INVESTIGACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA IgE MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Se seleccionaron los 12 sueros con mayor contenido de IgE específica, según los resultados del ELISA, y se estudió la especificidad de los Ac IgE, con respecto a los diferentes componentes del extracto. La frecuencia e intensidad de las bandas reconocidas se muestran en la figura 4. Empleando el análisis densitométrico de los filmes, fue posible detectar hasta 38 bandas diferentes con pesos moleculares entre 10 y 130 kD. Las bandas

reconocidas con mayor frecuencia fueron las encontradas entre 13 y 15 kD. En esta región fue posible identificar hasta 3 bandas claramente definidas. En la figura 5 se muestra una reproducción fotográfica de los patrones de *immunoblotting* de algunos de los sueros analizados.



**Fig. 5.** Patrón de *immunoblotting* IgE de sueros de 6 diferentes pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis*. A la izquierda se representan los pesos moleculares en kD.



**Fig. 4.** Perfil alergénico de *Blomia tropicalis*. Intensidad y frecuencia del reconocimiento de los diferentes componentes del extracto, analizados mediante *immunoblotting*. El índice de intensidad muestra la frecuencia con que las bandas aparecen entre las 3 más intensas para cada suero.

## DISCUSIÓN

El tamaño promedio de la reacción, obtenido en las pruebas cutáneas, es similar a lo reportado previamente por otros autores en estudios realizados en Cuba: *Ferrándiz* y otros (20-26 mm<sup>2</sup>),<sup>6</sup> *Martínez* y otros (21-25 mm<sup>2</sup>);<sup>9</sup> aunque en este caso, el estudio se realizó no sólo con pacientes asmáticos, sino también con rinitis, conjuntivitis y urticaria. La reactividad cutánea hacia otros ácaros (Dp y Ds) en esos trabajos, resultó similar a la observada hacia Bt.

El paralelismo obtenido entre las curvas de IgE total y específica permite expresar los valores de IgE específica en las mismas unidades del patrón de IgE, o sea en unidades internacionales (UI). El no uso común en la práctica de las UI de IgE en la cuantificación de la IgE específica hace difícil la comparación entre los niveles detectados en estos pacientes y otros trabajos realizados con diferentes sistemas de diagnóstico. No obstante, en experiencias previas de los autores con un ensayo similar tipo ELISA, se han evidenciado niveles superiores de IgE específica a otras especies de ácaros Dp y Ds. Resulta paradójico que la intensidad de la reacción cutánea sea similar para estos 3 ácaros; sin embargo, son inferiores los niveles de IgE específica a Bt. Otros autores<sup>6</sup> han obtenido resultados similares, aun cuando han usado sistemas de detección supuestamente más sensibles. Sin duda se necesitan investigaciones más profundas para establecer las causas de este fenómeno. Una causa probable pudiera radicar en una unión inefectiva del alérgeno a las fases sólidas empleadas hasta ahora, aunque no se pueden descartar problemas relacionados con la afinidad de los anticuerpos IgE de los pacientes.

La sensibilidad cutánea mostró una correlación significativa, aunque limitada con respecto a los niveles séricos de IgE específica. En general, aún los métodos más sensibles de diagnóstico *in vitro* basados en la cuantificación de la IgE específica, no han mostrado resultados completamente concordantes con las pruebas cutáneas.<sup>10</sup> La causa probable fundamental de las diferencias, radica en la complejidad de la reacción alérgica *in vivo* donde intervienen, además de la IgE específica, otros factores independientes relacionados con la respuesta en el nivel celular (liberación de mediadores, afinidad de los receptores FcεRI, etc.).

En el caso de este estudio, el bajo nivel de correlación observado pudiera también estar relacionado con el umbral de detección del sistema, el cual permite detectar sólo los pacientes con niveles relativamente altos de IgE específica.

Los pacientes asmáticos mostraron valores ligeramente superiores de IgE específica lo que indica un mayor grado de sensibilización, aunque tanto los resultados de IgE específica como los de reactividad cutánea, no mostraron diferencias significativas en los grupos de pacientes estudiados.

Los resultados obtenidos en el estudio de la especificidad de la IgE mediante *western blotting* indican que Bt es fuente de al menos 38 proteínas con capacidad de unir IgE de los sueros de pacientes y de estas proteínas; las reconocidas con mayor frecuencia fueron las que se encuentran entre 13 y 15 kD. Estos resultados coinciden con lo reportado antes por otros autores.<sup>11,12</sup> Hasta el presente, se han aislado y caracterizado mediante la tecnología del ADN recombinante al menos 2 alérgenos de 14 kD, con una secuencia nucleotídica diferente;<sup>8</sup> aunque los intentos de identificar inmunológicamente estas moléculas recombinantes con sus análogos naturales han sido infructuosos.

Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes: se desarrolló un método *in vitro* para la cuantificación de la IgE específica a Bt, que consiste en un método inmunoenzimático sobre placas de poliestireno (ELISA); se evidenció la existencia de una alta reactividad cutánea al extracto alérgico de Bt en la población estudiada, sin embargo los niveles de IgE específica encontrados son menores que los obtenidos para otras especies de ácaros; la respuesta IgE específica a este ácaro está correlacionada con la respuesta cutánea; se observaron niveles algo mayores de IgE específica en los pacientes asmáticos; los anticuerpos IgE específicos están mayormente dirigidos hacia los alérgenos con pesos moleculares entre 13 y 15 kD, y éstos se identifican como los alérgenos mayores de la especie Bt.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del profesor *Sten Dreborg* (*Voksentoppen Centre of Asthma and Allergy*, Noruega) por su asesoría en



el establecimiento de los métodos inmunológicos empleados en el trabajo. Este trabajo ha sido llevado a cabo parcialmente con fondos otorgados por la Sociedad Suecia-Cuba y la Asociación Sueca para el Desarrollo Internacional (ASDI), en el contexto del Proyecto de Desarrollo de Productos Alergénicos en Cuba.

#### SUMMARY

We performed a prospective crosswise analytical study of 84 patients treated in the Allergy Service of "Calixto García" General Hospital whose skin tests to allergenic *Blomia tropicalis* extract were positive. These patients' sera were used in assays for determining specific IgE antibodies and in the identification of allergen proteins in this extract by means of *western blotting*. Forty-four patients (55 %) showed specific IgE levels higher than 0.1 U and 17 patients exhibited levels over 0.3 U. Bronchial asthma and rinitis were the pathologies with elevated specific IgE levels. However, generally speaking, the specific IgE values were lower than those reported in other mites in spite of the fact that skin reactivity behaved the same. It was determined that specific IgE antibodies are mainly directed to allergens with a molecular weight from 13 to 15 D.

**Subject headings:** ANTIBODIES, ANTI-IDIOTYPIC/blood; IgE/blood; MITES/immunology; ALLERGENS/immunology; SKIN TESTS.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bronswijk JE van, Cock MH de. The genus *Blomia* Oudemans (Acari: Glyciphagidae). I. Description of *Blomia tropicalis* sp. from house dust in tropical and subtropical regions. *Acarologia* 1973;15:477-89.

2. Arlian LG, Bernstein D, Bernstein I. Prevalence of dust mites in the homes of asthmatics living in eight different geographical areas of the United States. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:292-30.
3. Fernández-Caldas E, Fox R, Buchottz G. House dust mite Florida. Mite in survey in households of mite sensitive individuals in Tampa, Florida. *Allergy Proc* 1990;11:263-7.
4. Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD. Exposure and sensitisation to dust mite allergen among asthmatics Children in Sao Paulo, Brazil. *Clin Exp Allergy* 1991;21:433-9.
5. Fernández-Caldas E, Puerta L, Mercado D. Mite fauna. Der pl, Der fl and *Blomia tropicalis* allergens levels in a tropical environment. *Clin Exp Allergy* 1993;23(4):292-7.
6. Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S. Sensitisation to Ds, Bt and other domestic mites in asthmatic patients. *Allergy* 1996;51:501-5.
7. Llerena LP, Fernández-Caldas E, García LRC, Lockey RF. Sensitisation to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in Dermatophagoides S.P.P-Allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:943-50.
8. Ferrándiz R, Casas R, Dreborg S, Einarsson R, Fernández B. Crossreactivity between Dermatophagoides siboney and other house dust mite allergens in sensitised asthmatics patients. *Clin Exp Allergy* 1995;25:929-34.
9. Martínez N, Aranda RE, Casas R, Garriga S, Labrada A. Epidemiological study of sensitisation to common inhalant allergens in Cuba. *Allergy Clin Immunol Int* 1997;4:148.
10. Doekes G, Douwes J, Wouters I, Wind S de, Houba R, Hollander A. Enzyme immunoassay for total and allergen specific IgE in population studies. *Occup Environm Med* 1996;53:63-70.
11. Caraballo L, Puerta L, Martínez B, Moreno L. Identification of allergens from the mite. *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy* 1993;24:1050-60.
12. Morgan MS, Arlian LG, Fernández Caldas E. Cross allergenicity of the house dust mites *Euroglyphus maynei* and *Blomia tropicalis*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:386-92.

Recibido: 13 de diciembre de 1999. Aprobado: 27 de diciembre de 1999.

Dra. Rosa Elena Aranda Rivero. Calle 20 # 1711, Quivicán, La Habana. Correo electrónico:biocen@infomed.sld.cu