

# Alergenicidad cruzada entre los ácaros domésticos

Leonardo Puerta. Enrique Fernández-Caldas, Luis Caraballo

Se investigó la alergenidad cruzada mediante inhibición del RAST usando sueros de pacientes alérgicos entre los ácaros domésticos *Dermatophagoides farinae* (Df), *Blomia tiopicalis* (Bt) y *Lepidoglyphus destructor* (Ld) y entre *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *Chortoglyphus arcuatus* (Ca) y *Aleuroglyphus ovatus* (Ao). Se halló por un lado una alta reactividad cruzada entre Bt vs Ld, y entre Ao vs Ca. Por otro lado, se halló una mínima a moderada reactividad cruzada entre Df vs Bt, Df vs Ld, Dp vs Ao y entre Dp vs Ca. Estos resultados sugieren que entre los no-piroglífidos Bt, Ld, Ao y Ca se comparten varios determinantes alérgicos y que la población sensibilizada a una de estas especies presentará sensibilización a las otras. Entre los piroglífidos y no piroglífidos se presenta una mínima reactividad cruzada dada por unos pocos determinantes alérgicos compartidos, diferentes de los alérgenos mayores. Los no-piroglífidos poseen determinantes alérgicos propios y tienen un papel importante como inductores de enfermedades alérgicas respiratorias especialmente en regiones tropicales donde su crecimiento es exuberante, por lo tanto se deben considerar para el diagnóstico y tratamiento de los alérgicos a los ácaros en esas regiones.

## INTRODUCCION

Los ácaros de la familia *Pyroglyphidae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) y *Dermatophagoides farinae* (Df) son la principal fuente de alérgenos en el polvo de las casas y son un factor etiológico importante en el asma y la rinitis alérgicas (1-3). Otras especies de ácaros, llamados inicialmente ácaros de los depósitos debido a que se encuentran frecuentemente en los depósitos de los alimentos en el campo, se han asociado tradicionalmente con la alergia en poblaciones campesinas y en trabajadores expuestos en los almacenes de granos y harinas (4, 5). Entre estas especies las más comunes pertenecen a las familias: *Glycyphagidae* (géneros: *Blomia*, *Lepidoglyphus* y *Glycyphagus*), *Acaridae* (géneros: *Tyrophagus*, *Acarus*, *Suidasia* y *Aleuroglyphus*) y *Chortoglyphidae* (género *Chortoglyphus*) (4-9).

En los últimos años han aumentado los trabajos que describen la sensibilización a los ácaros no-piroglífidos en personas no expuestas ocupacionalmente, asimismo son varias las publicaciones que describen la presencia de estos ácaros en el polvo de habitación en muchas regiones (10-16); esto ha estimulado el estudio del papel alérgico de dichas especies en poblaciones urbanas y llevó a que se acuñara el nombre de ácaros domésticos para cobijar en una sola denominación a los ácaros del polvo de las casas y a los ácaros de los depósitos (17).

El asma y la rinitis alérgica son comunes en Cartagena (18), en este hecho intervienen, además de factores genéticos (19, 20), factores ambientales relacionados con la exposición a los alérgenos de los ácaros que se presenta en esta ciudad con condiciones climatológicas bastante

• Investigación financiada en parte por el Programa para el Desarrollo de la Capacidad Investigativa (ICFES-BID) y Colciencias.

Dr. Leonardo Puerta Llerena: QF. MSc. Laboratorio de Inmunología. Universidad de Cartagena. Dr. Enrique Fernández-Caldas: PhD. División of Allergy and Clinical Immunology University of South Florida. Tampa. USA: Dr. Luis Caraballo: MD. MSc. Laboratorio de Inmunología, Universidad de Cartagena.

Solicitud de separatas al Dr. Puerta.

favorables, para el crecimiento y proliferación de estos artrópodos (4, 21, 22).

Bt y Dp son las especies más prevalentes en el polvo de habitación en Cartagena (22) y la sensibilización a varios no-piroglífididos en la población alérgica en esta ciudad, es alta destacándose en orden de prevalencia Bt y Ld (23, 24). Como parte de un proyecto dirigido a establecer el papel que los ácaros domésticos tienen en la inducción de las alergias respiratorias se investigó la alergenicidad cruzada entre Df. Bt y Ld y entre Dp. Ao y Ca.

## MATERIAL Y METODOS

### Preparación de los alérgenos

Los ácaros Bt, Ca y Ao se cultivaron en el laboratorio en medio compuesto por tetramin y alimento para roedores, a temperatura y humedad relativa controladas. Mediante el uso de tamiz y un aparato de Tullgren modificado (25) los ácaros se separaron del medio de cultivo y se congelaron a 80°C. Los cuerpos de la especie Ld se obtuvieron de Biopol-Laboratory Inc., Spokane, Washington.

Los extractos alérgicos de las anteriores especies se prepararon a partir del cuerpo de los ácaros: previo desengrase de los ácaros con éter etílico en extractor de Soxhlet, se secaron a temperatura ambiente y se mezclaron en proporción 1:10 p/v, con bicarbonato de amonio 100 mM. La mezcla se agitó por 24 horas a 4°C y se centrifugó a 18.000 rpm, el sobrenadante se dializó contra agua destilada y se filtró por membrana 0.22 µm. El contenido de proteínas se determinó por el método del ácido bicinónico (BCA protein assay Pierce). Los extractos alérgicos de Dp y Df se obtuvieron de los laboratorios Greer.

### RAST

A un grupo de 24 pacientes con asma alérgica por ácaros se les determinaron los niveles de IgE específicos contra Bt, Ca, Ao, Ld. Dp y Df por el método de *radioallergosorbent test* (RAST): a 100 microlitros del extracto alérgico, diluido 1:100 en la buffer de carbonato de sodio 200 mM y pH 9.2, se agregó en cada pozo de las placas de microtitulación Immulon 4 (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA.) y se incubaron por 18 horas en

cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavaron los pozos con buffer de lavado (PBS pH 7.4, Tween 20 al 0.1%), se agregaron 100 µL de suero y se incubaron nuevamente durante 18 horas a temperatura ambiente. Después de varios lavados con buffer se agregaron 100 µL de anti IgE marcada con I-125 (Pharmacia) y se incubaron durante 18 horas a temperatura ambiente. Terminada la incubación se lavaron los pozos y se midió la radiactividad en un contador gamma. Los resultados se expresaron en porcentaje de las cuentas totales unidas (% CTU).

### Reactividad cruzada entre Bt, Df y Ld.

#### Preparación de la mezcla de sueros positivos.

Se prepararon varias diluciones (1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64) en buffer diluyente (BSA al 3% en PBS-Tween 20) de una mezcla de sueros con niveles altos de IgE específica para Bt, Ld y Df. Se realizó prueba de RAST con cada dilución como se describió anteriormente usando pozos cubiertos con alérgenos de Bt, Df y Ld. Se escogió la dilución 1:16 para los estudios de inhibición del RAST.

**Inhibición del RAST.** Se prepararon varias diluciones del extracto alérgico de Bt, Ld y Df (1:8000; 1:6000; 1:4000; 1:2000; 1:1000; 1:500; 1:200; 1:100 y 1:50), cincuenta microlitros de cada dilución se mezclaron con 50 µL de la mezcla de sueros positivos diluidos y se incubaron en los pozos de las placas de microtitulación cubiertos con el alérgeno, durante 18 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavaron los pozos y se incubaron con anti IgE marcada con I-125 (Pharmacia) durante 18 horas a temperatura ambiente, después de varios lavados se determinaron las cuentas por minuto (cpm) en cada pozo usando un contador gamma. Los resultados se expresaron en porcentaje (%) de inhibición calculado a partir de las cpm obtenidas con la mezcla de sueros positivo incubado con el extracto dividido por las cpm obtenidas al incubar la mezcla de sueros positivos con 50 µL de buffer diluyente, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \frac{\text{cpm. incubación con alérgeno}}{\text{cpm. incubación con diluyente}} \times 100$$

### Reactividad cruzada entre Dp, Ao y Ca

#### Preparación de la mezcla de sueros positivos.

Se prepararon varias diluciones de una mezcla de sueros positivos con títulos altos de IgE para Dp, Ao y Ca. Para escoger la dilución óptima a utilizar en la inhibición del RAST, se realizó prueba de RAST siguiendo el procedimiento señalado anteriormente.

La inhibición del RAST se realizó según el procedimiento descrito pero utilizando placas de microtitulación cubiertas con alérgenos de Dp, Ao o Ca, e incubando la mezcla de sueros positivos con diluciones de extracto alérgico de Dp, Ao o Ca.

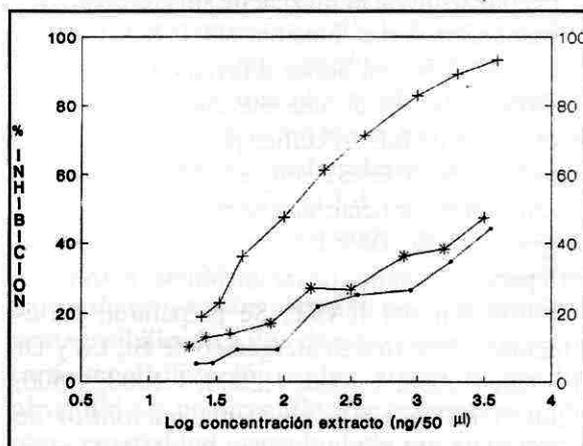


Figura 1. Ensayo de inhibición del RAST. Alérgenos de *B. tropicalis* en la fase sólida. — Dp, + Bt, \* Ld.

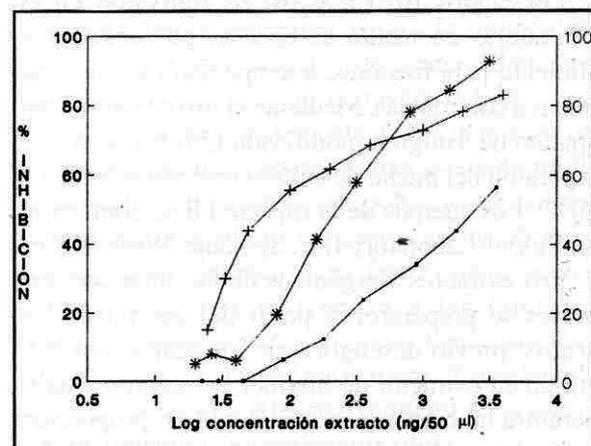


Figura 2. Ensayo de inhibición del RAST. Alérgenos de *L. destructor* en la fase sólida. — Df, + Bt, \* Ld.

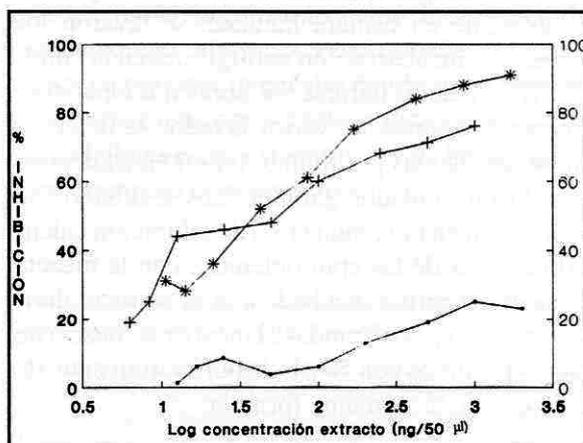


Figura 3. Ensayo de inhibición del RAST. Alérgenos de *C. arcuatus* en la fase sólida. — Dp, + Ao, \* Ca.

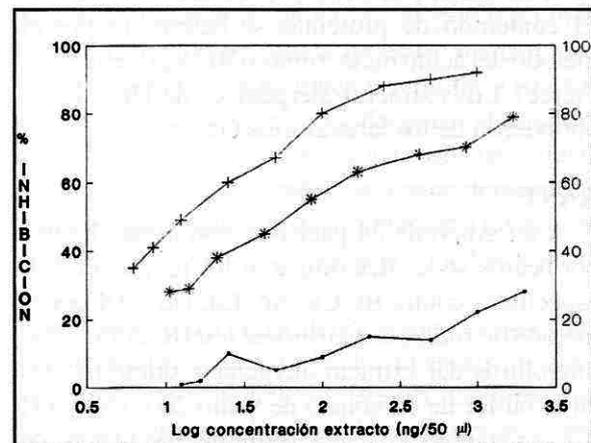


Figura 4. Ensayo de inhibición del RAST. Alérgenos de *A. ovatus* en la fase sólida. — Dp, + Ao, \* Ca.

### RESULTADOS

La máxima capacidad inhibitoria de Bt y Ld sobre el sistema de Df en fase sólida fue del 58.0% y 52.6% respectivamente. Cuando el ensayo de inhibición se realizó sobre el Bt en fase sólida, Df produjo una inhibición máxima del 44.3% y Ld del 47.5% (Figura 1). En el sistema de Ld sobre fase sólida Bt y Df alcanzaron inhibición máxima del 83% y 56% respectivamente (Figura 2). Estos resultados muestran una alta alérgenicidad cruzada entre Bt y Ld y una mínima a moderada alérgenicidad cruzada entre Df y Bt y entre Df y Ld.

A la concentración de alérgeno más alta (dilución 1:50), usando Ca en fase sólida, Ao produjo

91% de inhibición (Figura 3). Cuando se usó Ao en la fase sólida, Ca alcanzó 79% de inhibición (Figura 4). Dp no alcanzó ni un 30% de inhibición en estos dos sistemas. Estos resultados muestran por un lado un alto grado de reactividad cruzada entre Ao y Ca. Por otro lado, una mínima reactividad cruzada entre estas dos especies y Dp.

#### DISCUSION

La mínima a moderada reactividad cruzada entre Df, Bt y Ld, y entre Dp, Ao y Ca hallada en este estudio sugiere que entre los piroglífidos y los no-piroglífidos se comparten pocos determinantes alérgicos. También sugiere que en la sensibilización a los no-piroglífidos Bt, Ld, Ao y Ca intervienen antígenos específicos de estas especies. Por otro lado, la alta reactividad cruzada entre Bt y Ld y entre Ao y Ca sugiere que entre estas especies se comparten muchos determinantes alérgicos.

En la población alérgica de Cartagena existe una alta prevalencia de alergia a los ácaros domésticos siendo Dp, Df, Bt y Ld los principales sensibilizadores (24, 24). Por los hallazgos de este estudio se infiere que la reactividad contra los no-piroglífidos se origina por la exposición directa a sus alérgenos o por determinantes alérgicos compartidos con otras especies con las cuales presentan alto grado de reactividad cruzada. En efecto, en nuestra región ésta podría ser la causa de la sensibilización a Ld y Ao en los alérgicos debido a que estas dos especies no se hallaron en el polvo de habitación de las casas (22). En Cartagena la presencia de Df es muy escasa, por lo tanto la sensibilización a este ácaro probablemente es producida por los determinantes alérgicos de Dp comunes a Df; estas dos especies tienen un alto grado de reactividad cruzada (2) y sus alérgenos mayores presentan una alta homología química (26).

La mínima reactividad cruzada entre Ld y Df hallada en este estudio concuerda con la mínima reactividad cruzada entre Ld y Dp, el otro piroglífido más estrechamente relacionado con Df, demostrada por otros investigadores mediante el uso de inhibición de inmunoblot (27), anticuer-

pos monoclonales (28, 29) e inhibición del RAST (30). Este trabajo demuestra una alta reactividad cruzada entre los glicifagidos (Bt y Ld), Van Hage-Hamsten y cols demostraron una alta reactividad cruzada entre Ld y *Blomia kulagini* (31), con lo cual se sustenta el criterio de que la reactividad cruzada es mayor entre especies filogenéticamente más cercanas (29, 32). Estos hallazgos explican por qué pacientes sensibilizados a una especie de ácaro presentan sensibilización a otras especies relacionadas a las cuales no se han expuesto. En nuestra región esto tiene gran importancia ya que Ld no se ha encontrado en el polvo de habitación en Cartagena (22), pero los determinantes antigénicos compartidos con Bt podrían ser la causa de la sensibilización a Ld en los alérgicos de esta región. Además, un tratamiento de hiposensibilización con alérgenos de Bt pudiera brindar la protección adecuada ante una alergia provocada por otras especies con las cuales presenta un alto grado de reactividad cruzada.

Algunos pacientes alérgicos residentes en zonas urbanas presentan sensibilización a *Aleuroglyphos ovatus* y a *Chortoglyphus arcuatus* (24, 33).

Desde 1969 se sugirió que estas dos especies tienen antígenos propios y comunes pero la magnitud de la reactividad cruzada entre ellas no se había precisado (9); dado el alto grado de reactividad cruzada entre Ca y Ao hallado y la ausencia de Ao en nuestro medio, también se puede asumir, en este caso, que la sensibilización a este ácaro es producida por los determinantes alérgicos de Ca compartidos con Ao.

Los extractos alérgicos de Bt y Ao no contienen los alérgenos mayores Der p1 y Der f1, las principales proteínas alérgicas de los *Dermatophagoides* (33, 34), por lo tanto el bajo grado de reactividad cruzada entre Bt y Df y entre Dp y Ao hallada en este estudio compromete a otros determinantes posiblemente hallados en los alérgenos menores. En efecto Arruda y cols (34) hallaron que sólo 36% de los anticuerpos IgE contra Bt son de reactividad cruzada con Dp y que 64% son especie específicos. Estos hallazgos resaltan el papel jugado por Bt como inductor de enfer-

medades alérgicas especialmente en las regiones tropicales donde se encuentra abundantemente.

#### Esta investigación destaca

a. La mínima reactividad cruzada entre los piroglífidos y no piroglífidos sugiere que los ácaros domésticos diferentes a los *Dermatophagoides*, especialmente Bt, tienen un papel importante en las manifestaciones de las enfermedades alérgicas respiratorias.

b. Los ácaros no piroglífidos poseen determinantes alergénicos propios y en determinadas poblaciones el esquema de hiposensibilización hasta ahora solamente aplicado con los piroglífidos Dp y Df. puede ser ineficaz para brindar mejoría adecuada a la población con alergia producida por ácaros diferentes a los *Dermatophagoides*. Por lo tanto, un enfoque más racional debe contemplar la utilización de alérgenos derivados de los ácaros no piroglífidos para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas, en países donde la presencia de dichas especies se ha asociado con estas enfermedades.

#### SUMMARY

The allergenic cross-reactivity of the non-pyroglyphid mites: *Blomia tropicalis* (Bt), *Lepidoglyphus destructor* (Ld), *Aleuroglyphus ovatus* (Ao) and *Chortoglyphus arcuatus* (Ca), and the pyroglyphid: *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *Dermatophagoides farinae* (Df) was investigated by use of RAST-inhibition assay with serum pool from allergic patients. A high cross-reactivity was found between (Bt vs Ld), and between (Ao vs Ca). By contrast, a minimal to moderate cross-reactivity was found among (Df vs Bt), (Df vs Ld), (Dp vs Ao) and (Dp vs Ca). These findings suggest that Bt, Ld, Ao and Ca share several allergenic determinants and that patients with IgE to one of this species also will have IgE to the other. In the allergenic cross-reactivity between the pyroglyphid and non-pyroglyphid mites few allergenic determinants other than major allergens are involved. Non-pyroglyphid mites possess its own unique allergens and have an important role as

inducers of allergic respiratory diseases, specially in tropical regions where these species have an exuberant growth; consequently these mites should be considered in the diagnosis and treatment of allergic patients to mites in these regions.

#### REFERENCIAS

1. Voorhorst M, Spiekman F, Vrekamp H. House-dust atopy and the house-dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. Leiden: Stafilus Scientific Publishing Company, 1969.
2. Platts-Mills TAE, Chapman MD. Dust mites: Immunology, Allergy diseases and environmental control. *J Allergy Clin Immunol* 1987; **80**:755-765.
3. Arlian LG. Biology and ecology of house dust mite, *Dermatophagoides* spp. and *Euroglyphus* spp. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1989; **9**: 339-356.
4. Cuthbert OD. Storage mite allergy. *Clin Rev Allergy* 1990; **8**: 69-74.
5. Leskinen L, Kien T. Storage mites in the work environment of farmers. *Eur J Resp Dis* 1987; **71** (suppl 152): 101-106.
6. Iversen M, Korsgard J, Hallas T, Dahl R. Mite allergy and exposure to storage mites and house dust mites in farmers. *Clin Exp Allergy* 1990; **20**: 211-219.
7. Blainey AD, Topping MD, Olier S, Davies RJ. Respiratory symptoms in arable farmworkers: role of storage mites. *Thorax* 1988; **43**: 697-702.
8. Van Hage-Hamsten M, Johansson SGO, Hoglund S, Tull P, Wiren A, Zetterstrom O. Storage mite allergy is common in a farming population. *Clin Allergy* 1985; **15**: 555-564.
9. Miyamoto T, Oshima S, Mizuno K, Sasa M, Ishizaki T. Cross-antigenicity among six species of dust mites and house dust antigens. *J Allergy* 1969; **44**: 228-238.
10. Hurtado I, Parini M. House Dust Mites in Caracas, Venezuela. *Ann Allergy* 1987; **59**: 128-130.
11. Gabriel M, Cunningham AM, Allan WG, Pickering CA, Wraith DG. Mite allergy in Hong Kong. *Clin Allergy* 1982; **12**: 157-171.
12. Fernández-Caldas E, Fox R, Bucholtz G, Trudeau W, Ledford D, Lockey R. House dust mite allergy in Florida. Mite Survey in households of mite-sensitive individuals in Tampa, Fl. *Allergy Procc* 1990; **11** (6): 263-267.
13. Caraballo L, Puerta L, Cuadros G. Allergenic role of *Blomia tropicalis* in a Caribbean city of Colombia (Abstract). *J Allergy Clin Immunol* 1990; **85**: 248.
14. Spijkema, F. TH. Domestic mites: Their role in respiratory allergy. *Clin Exp Allergy* 1991; **21**: 655-660.
15. Iversen M, Dahl R. Allergy to storage mites in asthmatic patients and its relation to damp housing conditions. *Allergy* 1990; **45**: 81-85.
16. Luczynska CM, Griffin P, Davies RJ, Topping MD. Prevalence of specific IgE to storage mites (*A. siró*, *L. destructor*, and *T. longior*) in an urban population and cross-reactivity with the house dust mite (*D. pteronyssinus*). *Clin Exp Allergy* 1990; **20**: 403-406.
17. Dust Mite Allergens and Asthma: Report of a Second International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992; **8**: 1046-1060.
18. Caraballo, Cadavid A, Mendoza J. Prevalence of asthma in a tropical city of Colombia. *Ann Allergy* 1992; **68**: 525-529.
19. Caraballo L, Hernández M. HLA Haplotype segregation in families with allergic asthma. *Tissue Antigens* 1990; **35**: 182-186.
20. Caraballo L, Marrugo J, Jiménez S. Frequency of DPB1 \*0401 is significantly Decreased in Patients with Allergic Asthma in a Mullato Population. *Human Immunology* 1991; **32**: 157-161.
21. Calendario Meteorológico. Instituto Colombiano de Hidrología y Meteorología (Himat) PE-AM-016 Bogotá 1988.
22. Fernández-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey R, Caraballo LR. Mite fauna, Der p1, der f1 and *Blomia tropicalis* Allergens levels in a tropical environment. *Clin Exp Allergy* 1993; **23**:

23. **Puerta L, Fernandez-Caldas E, Caraballo L, Lockey R.** Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides spp* allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1991; **88**: 943-950.
24. **Puerta L, Fernandez-Caldas E, Lockey R, Caraballo L.** Mite Allergy in the tropics: sensitization to 6 domestic mite species in Cartagena, Colombia. *J Invest Allergology Clin Immunol* 1993; 3: en prensa.
25. **Krantz GW.** Collection, rearing and preparation for study. In: Krantz GW (Ed). *A manual of Acarology* 2nd ed. Oregon: Oregon States University Book Stores; 1978; 375-385.
26. **Dilworth RJ, Chua K, Thomas R.** Sequence Analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der f1. *Clin Exp Allergy* 1991; **21**: 25-32.
27. **Johansson E, Borga A, Johansson SGO, Van Hage-Hanstem M.** Immunoblot multi-allergen inhibition studies of allergenic cross-reactivity of dust mites *Lepidoglyphus destructor* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 1991; **21**: 511-518.
28. **Harfost B, Van Hage-Hanstem M, Ansotegui I, Johansson E, Jeddi-Tehrani M, Johansson S.G.O.** Monoclonal antibodies to *Lepidoglyphus destructor*: delineation of cross-reactivity between storage mites and house dust mites. *Clin Exp Allergy* 1992; **22**: 1032-1037.
30. **Tee RD, Gordon DJ, Van Hage-Hanstem M, Gordons S, Nunn AJ, Johansson SGO, Newman AJ.** Comparison of allergenic response to dust mites in U. K. bakery workers and Swedish farmers. *Clin Exp Allergy* 1992; **22**: 233-239.
31. **Van Hage-Hanstem M, Machado L, Barros M, Johansson S.** Immune Response to *Blomia kulagini* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in Sweden and Brazil. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; **91**: 186-191.
32. **Hill MR, Newton MR, Hart BS.** Comparative IgE response to extracts of five species of house dust mite using Western Blotting. *Clin Exp Allergy* 1993; **23**: 110-116.
33. **Silton RP, Fernández-Caldas Em, Trudeau WL, Swanson M, Lockey RF.** Prevalence of specific IgE to the storage mite, *Aleuroglyphus ovatus*. *J Allergy Clin Immunol* 1991; **88**: 595-603.
34. **Arruda KL, Rizzo MC, Chapman MD, Fernández-Caldas E, Baggio D, PlattsMills TAE, Naspitz C.** Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo Brazil. *Clin Exp Allergy* 1991; **21**: 433-438.