

Moderadora:
A. Cisteró-Bahima

J. Bartra Tomàs

Grupo de Trabajo de Estudio
de Alergia a Hongos de la
Societat Catalana d'Al·lèrgia i
Immunologia Clínica*

MESA REDONDA: ESTADO ACTUAL DE LA ALERGIA A HONGOS

Mapa fúngico y estudio multicéntrico de sensibilización a hongos en Cataluña

INTRODUCCIÓN

Los hongos, tanto las esporas fúngicas como las levaduras, constituyen una importante fuente de alérgenos en el desarrollo de patología alérgica. La rinoconjuntivitis y/o asma bronquial alérgico son dos de las enfermedades más frecuentes debido a la alergia a alérgenos fúngicos. Si tenemos en cuenta que en torno al 15-20% de la población está afectada de rinoconjuntivitis y/o asma alérgica, una proporción relevante de esta patología se debe a la exposición a hongos¹⁻³. La distribución de los hongos es ubicua y universal comportándose tanto como un alérgeno de exterior como de interior tal y como revelan los distintos estudios sobre la aerobiología de estos organismos. La concentración atmosférica de esporas fúngicas depende de distintas variables como son la estacionalidad, humedad, viento, pluviosidad y sustrato orgánico existente entre las más destacables. En la concentración de esporas fúngicas intradomiciliarias la humedad y temperatura interiores junto a otras características del hábitat parecen ser los factores determinantes más importantes⁴⁻¹⁰.

De los distintos géneros de hongos que se han relacionado con la el desarrollo de patología alérgica *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Epicoccum* son los que con mayor frecuencia se les ha implicado¹¹⁻¹⁴.

En las últimas décadas se han dedicado esfuerzos en el conocimiento de la aerobiología de los hongos para saber el grado de exposición al que estamos expuestos, así como en obtener extractos con una calidad, especificidad y especificidad óptimas para realizar un correcto diagnóstico y tratamiento de la alergia a hongos^{8, 15, 16}.

Dada la relevancia de los hongos en la alergia respiratoria, la Societat Catalana d'Al·lèrgia i Immunologia Clínica (S. C. A. I. C) promovió el desarrollo de un estudio encaminado a realizar un mapa fúngico en Cataluña así como conocer la prevalencia de sensibilización a los hongos en población con alergia respiratoria.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio aerobiológico de esporas fúngicas atmosféricas se realizó mediante 5 captadores esporo-polínicos tipo Burkard, utilizando el método Hirst, situados en distintos puntos de la geografía catalana (Barcelona, Bellaterra, Gi-

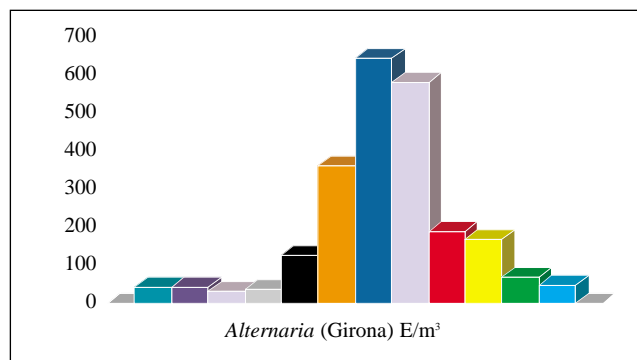
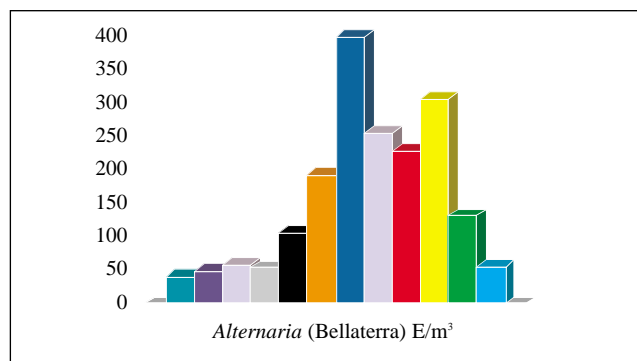
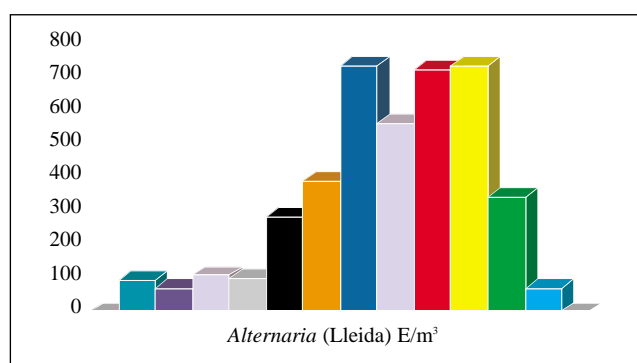
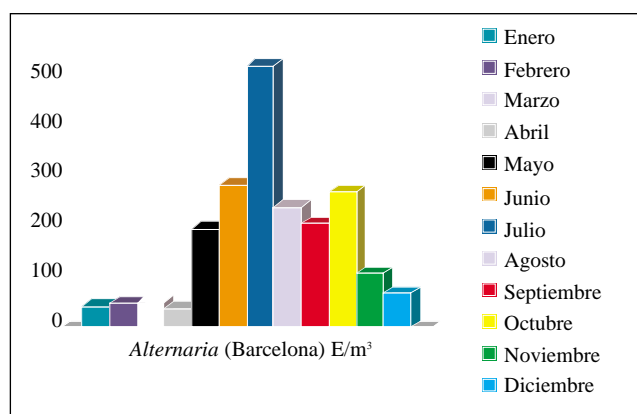
rona, Lleida y Tarragona) identificando las muestras recogidas en el año 2002 mediante examen con microscópio óptico por expertos de la Unidad de Botánica de la Universidad Autónoma de Barcelona.

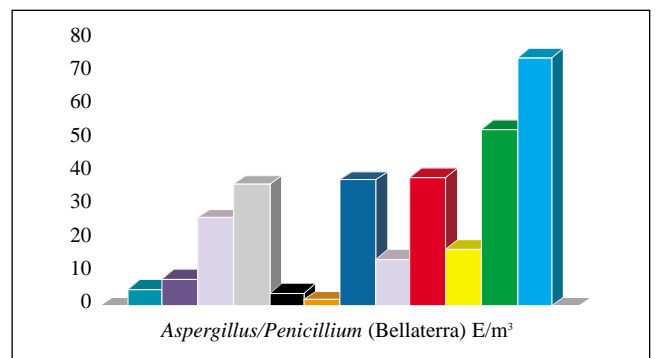
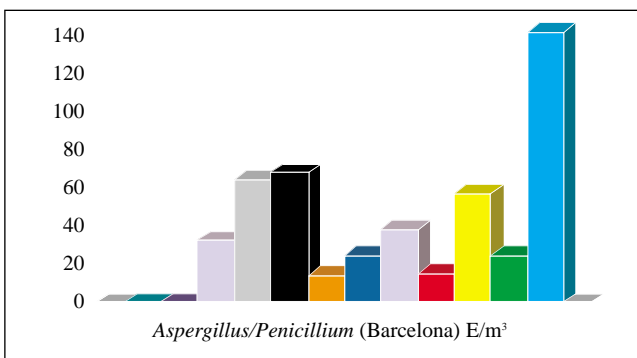
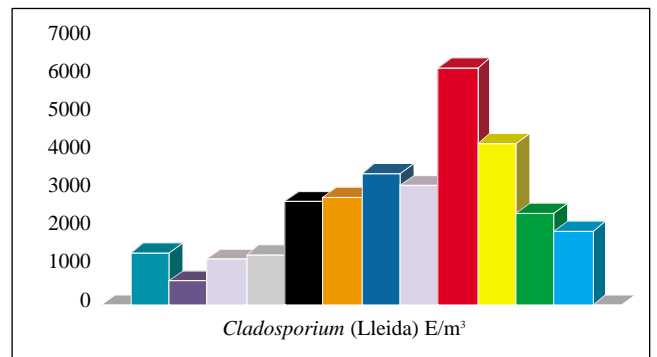
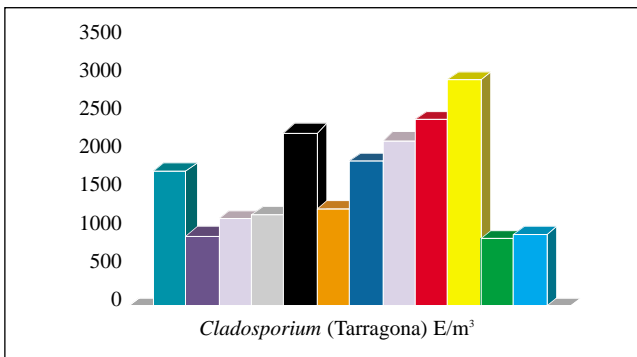
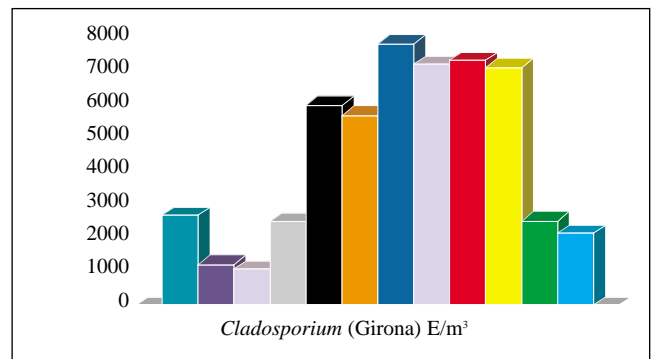
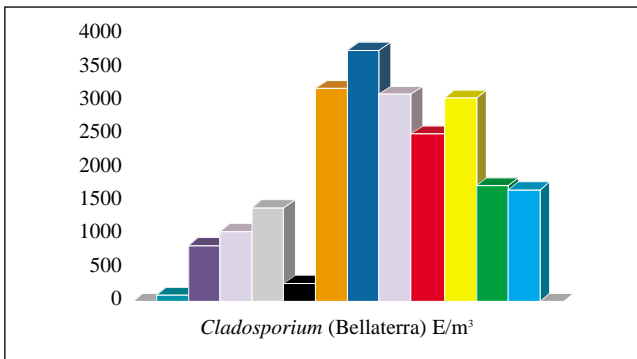
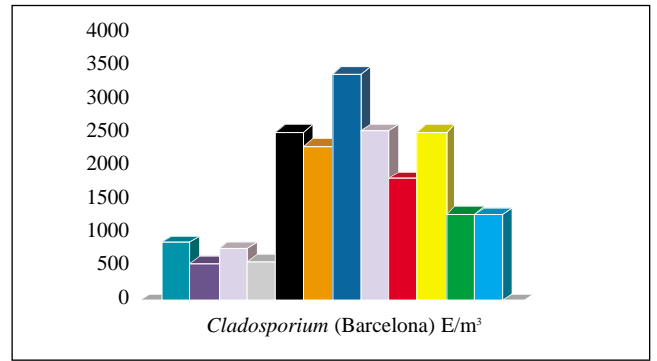
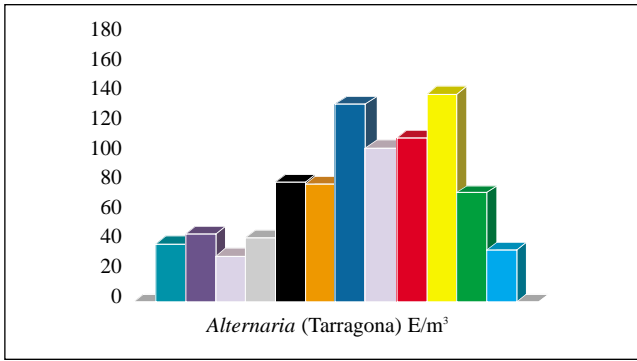
El estudio de prevalencia de sensibilización a hongos se realizó a partir de población entre 5 y 65 años con rinitis y/o asma que acudían en primera visita a una consulta de alergia y que según historia clínica se sospechaba etiología alérgica. A partir de dicha población se incluían aleatoriamente 7 pacientes por mes durante 12 meses, comprendidos entre enero del 2002 y diciembre del 2002 ambos inclusive, cada uno de los 15 centros participantes (ver en apartado de apéndice los componentes del grupo de estudio de alergia a hongos de la S. C. A. I. C.) repartidos por las 4 provincias catalanas. A cada uno de los pacientes se les realizó un test cutáneo (*prick test*) a batería de aeroalergenos comunes de área (ácaros, epitelio perro y gato y pólenes prevalentes) y batería de los hongos del estudio: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum* y *Ustilago sp.* Cada una de las especies de hongos del estudio se testaba por duplicado mediante extractos comercializados de distinta fuente (extracto A y B) que se obtuvieron liofilizados, y estandarizados biológicamente con alérgeno mayoritario en caso de *Alternaria*. Los test cutáneos se realizaron con personal experimentado y utilizando todos los centros participantes los mismos extractos y el mismo tipo de lanceta. El cálculo de área se realizó mediante papulometría considerándose positivas las pruebas cutáneas con un área superior a 7 mm². A una muestra significativa de pacientes se realizó determinación de IgE sérica específica (mediante CAP system Pharmacia®) a cada uno de las especies de hongos testadas independientemente si el test cutáneo a batería de hongos era positivo o negativo.

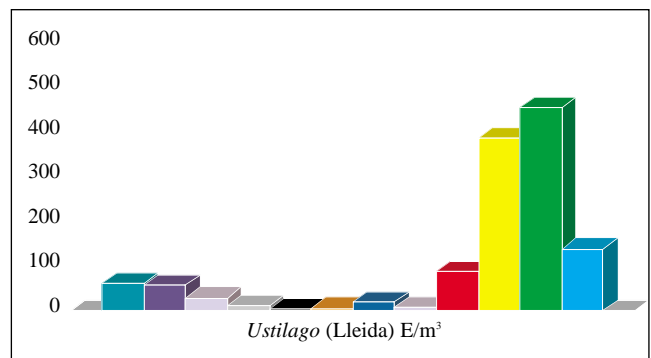
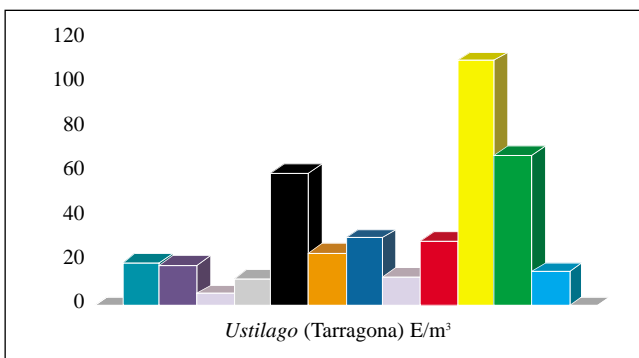
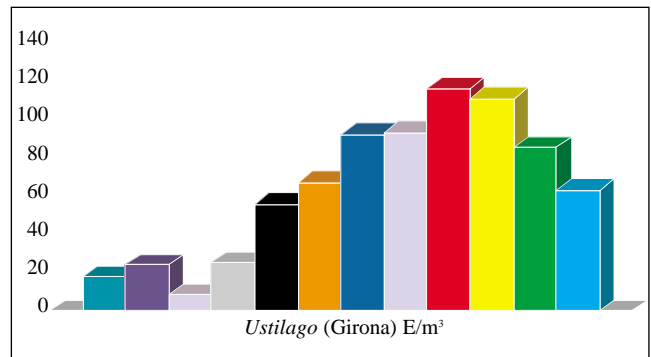
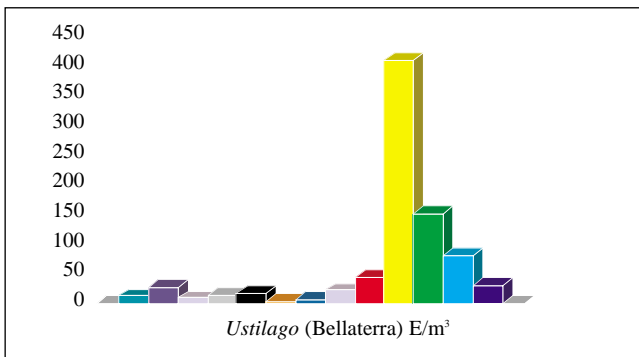
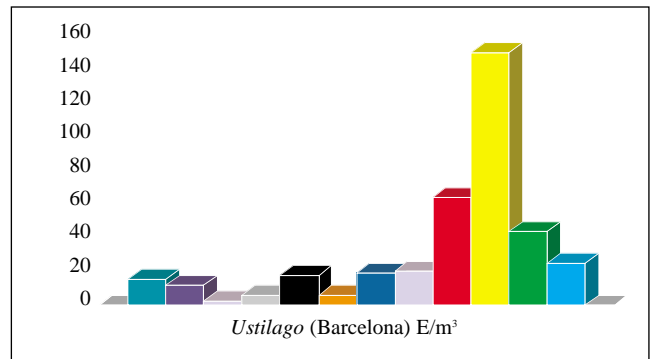
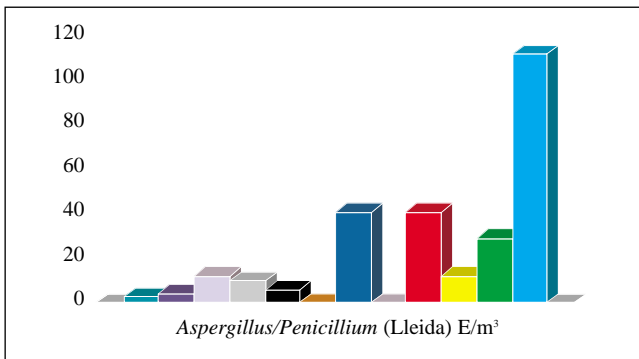
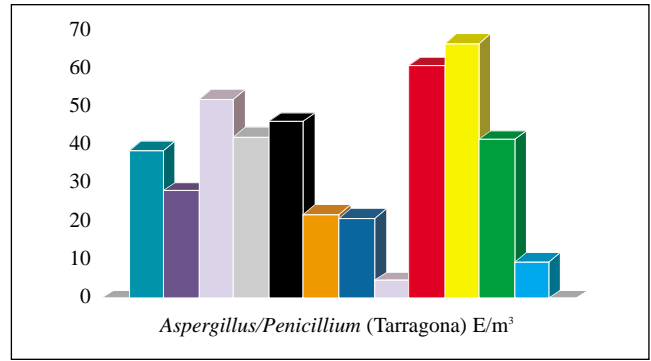
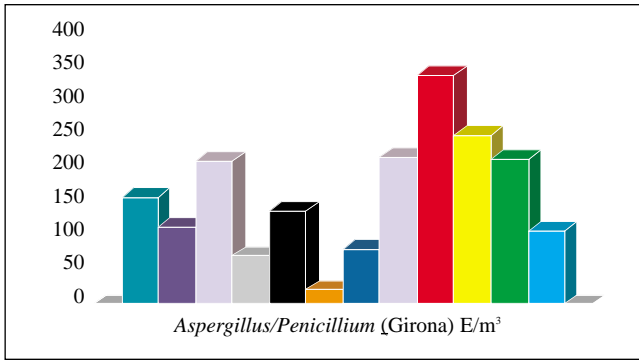
Así mismo, a todos los pacientes se les realizó un cuestionario en el que se detallaba edad, sexo, clínica respiratoria que presentaban, estacionalidad de los síntomas y características del hábitat (localidad, tipo de vivienda y existencia de manchas de humedad en alguna de las dependencias de vivienda o trabajo).

RESULTADOS

Los contagios de esporas fúngicas de los distintos hongos del estudio es el detallado en las gráficas (esporas/m³ por mes del año 2002 en cada uno de los 5 captadores). Cabe destacar que se han agrupado *Aspergillus* y *Pe-*







nicillium debido a la imposibilidad de diferenciar estos hongos mediante la identificación con microscópico óptico. Se observa una gran concentración de esporas de *Cladosporium* en todas los captadores, así como la presencia de todas las esporas de los hongos del estudio en la atmósfera prácticamente en cualquier época del año, siendo en verano y otoño las épocas del año con mayor concentración.

Los pacientes reclutados finales fueron 1.056 (633 mujeres y 423 hombres). 208 pacientes con una edad entre 5 y 14 años y 848 entre 14 y 65 años. De los 1.056 pacientes que se sospechaba por historia clínica etiología alérgica 824 presentaron como mínimo un test cutáneo positivo a alguno de los aeroalergenos testados (batería aeroalergenos comunes y batería de hongos del estudio) por lo que se confirmaba que se trataba de población sensibilizada a un aeroalergeno y que presentaban patología respiratoria.

De los 824 pacientes 151 pacientes estaban sensibilizados a *Alternaria*, 90 pacientes a *Aspergillus*, 50 pacientes a *Cladosporium*, 47 pacientes a *Penicillium* y 24 pacientes a *Ustilago*. 217 pacientes presentaban una sensibilización a como mínimo uno de los hongos testados del estudio. De los 151 pacientes sensibilizados a *Alternaria* 68 no presentaban sensibilización a ninguno de los otros hongos. De los 90 pacientes sensibilizados a *Aspergillus* 21 no presentaban sensibilización a los otros hongos. De los 50 pacientes sensibilizados a *Cladosporium* 8 no presentaban sensibilización a los otros hongos. De los 47 pacientes sensibilizados a *Penicillium* 11 no presentaban sensibilización a los otros hongos. De los 24 pacientes sensibilizados a *Ustilago* 7 no presentaban sensibilización a los otros hongos.

La determinación de Ig E específica a cada uno de los hongos testados fue menos sensible de forma estadísticamente significativa vs el *prick test* en la muestra realizada (482 pacientes). Sin embargo en los pacientes que presentaban una sensibilización a *Alternaria* según *prick test* sin presentar una sensibilización a ninguno de los otros hongos del estudio (68 pacientes) y que se les realizó una determinación de Ig E sérica específica (42 pacientes) presentaron una Ig E específica >0,70 kU/L a *Aspergillus*, *Penicillium* y/o *Cladosporium* en 14 de ellos.

Si analizamos la sensibilización a los hongos del estudio en la población entre 5 y 14 el porcentaje de sensibilización es mayor respecto al de la población adulta con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,005$). De igual modo si realizamos tablas de contingencia mediante

análisis estadístico la población afecta de asma bronquial con o sin rinitis presenta mayor porcentaje de sensibilización a hongos frente a la población afecta de rinitis pero sin asma. La presencia de manchas de humedad en alguna de las dependencias de la vivienda o del trabajo de los pacientes también se asocia con una mayor sensibilización a los hongos del estudio.

DISCUSIÓN

En el estudio aerobiológico realizado destaca la presencia de esporas fúngicas a lo largo de prácticamente todos los meses del año oscilando su concentración sin seguir un patrón estricto determinado excepto para *Alternaria* en la cual se observa un incremento en todos los captadores en verano y entrada de otoño. Este hecho también es el resaltado en otros estudios aerobiológicos sobre concentración de esporas atmosféricas^{8, 17-19}. La baja concentración de esporas de *Aspergillus* y *Penicillium* según los contages realizados podría justificarse por dos hechos: la dificultosa identificación de estas dos especies por lo que habría una infraestimación de su concentración y por los resultados de los estudios sobre aerobiología de hongos en los que se observa una amplificación de dichas especies en los ambientes de interior respecto a las atmosféricas^{20, 21}. Los hongos de interior tienen un papel protagonista en el desarrollo de alergia puesto que un hábitat con unas características determinadas puede favorecer la presencia de esporas fúngicas en una elevada concentración (superior a la atmosférica) que inducen una sensibilización. Estos datos están en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio en el que se observa una asociación entre presencia de manchas de humedad en la vivienda o sitio de trabajo del paciente y sensibilización a hongos.

Según los diversos estudios realizados la prevalencia de sensibilización a hongos presenta un rango de oscilación importante que depende en gran parte de la metodología empleada (sobre todo en el perfil de la población incluida) y otros factores determinantes como son el área geográfica donde se ha centrado el estudio y el tipo de los extractos utilizados²²⁻²⁷. Si analizamos los resultados obtenidos en nuestro trabajo respecto a otros con unas características de diseño y método parecidas se observa una prevalencia de sensibilización parecida tanto por los resultados de las pruebas cutáneas como por determinación de IgE sérica específica^{22,23,25}.

La asociación de sensibilización a hongos y asma bronquial es un hecho constatado en diversos trabajos publicados²⁸⁻³⁰ al igual que ocurre en el estudio que se presenta en el que se observa que los pacientes sensibilizados a hongos tienen un riesgo mayor de desarrollar asma. Este es un hecho importante a tener en cuenta para encauzar medidas ambientales de evitación y otros tratamientos, sobre todo en la población pediátrica que es la que presenta una mayor prevalencia de sensibilización respecto a la población adulta según los resultados obtenidos.

*APÉNDICE

Componentes del Grupo de Trabajo de Estudio de Alergia a Hongos de la Societat Catalana d'Al·lèrgia i Immunologia Clínica:

Joan Bartra (Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta), Teresa Alfaya (Hospital Santa Maria de Lleida), Pau Amat (Alergocentre. Barcelona), Miquel Baltasar (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona), Jordina Belmonte (Unitat de Botànica. Universitat Autònoma de Barcelona), Montse Bosque (Corporació Sanitaria Parc Taulí. Sabadell), Victoria Cardona (Hospital Universitari Vall D'Hebron. Barcelona), M^a José Castillo (Consorci Hospitalari de Terrassa), M^a Teresa Cerdà (Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta), Anna Cisteró-Bahima (Institut Universitari Dexeus. Barcelona), Mercè Corominas (Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat), Pilar García-Ortega (Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat), Pere Gaig (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII), Mar Guilarte (Hospital Universitari Vall D'Hebron. Barcelona), Marcel Ibero (Consorci Hospitalari de Terrassa), Raquel López (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII), Rafael Llätser (Hospital Sant Pau i Santa Tecla. Tarragona), Ramón Leonart (Fundació Althaia. Manresa), Lluís Marquès (Hospital Santa Maria de Lleida), Santiago Nevot (Fundació Althaia. Manresa), Carme Planell (Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta), Zeida Pulido (Clínica Teknon. Barcelona), Esperança Raga (Clínica Plató. Barcelona), Albert Roger (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona.), Nuria Rubira (Clínica Plató. Barcelona), M^a Mar San Miguel-Moncín (Institut Universitari Dexeus. Barcelona), Josep M^a Torres-Rodríguez (Clínica Teknon. Barcelona).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salvaggio J, Aukrust L. Mold Induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 327-346.
2. Breitenbach M, Crameri R, Lehrer SB (eds): *Fungal Allergy and Pathogenicity*. Chem Immunol. Basel, Karger, 2002, vol 81: 1-4.
3. Bush RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107s: 430-440.
4. Solomon WR. Aerobiology and inhalant allergens: pollens and fungi. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, et al. editors. *Allergy, principles and practice*. St Louis, MO: Mosby, 1993: 469-415.
5. D'Amato G, Spiekma FThM. Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. Position paper of Subcommittee on Aerobiology and Environmental Aspects of Inhalant Allergens of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* 1995; 50: 870-877.
6. Torres-Rodríguez JM. Mould allergy in Spain: Atlas of moulds causing respiratory allergy. Wilken-Jensen K and Gravesen S (ed) Copenhagen, Forlaget ASK 1984; 106-107.
7. Chapman J. Update on airborne mold and mold allergy. *Allergy Asthma Proc* 1999; 20: 289-292.
8. Solomon W, Platts-Mills T. Aerobiology and inhalant allergens. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy principles and practice*. 5th ed. St. Louis: Mosby; 1998: 367-403.
9. Levetin E. Identification and concentration of airborne basidiospores. *Grana* 1991; 30: 123-128.
10. Troutt C, Levetin E. Correlation of spring spore concentrations and meteorological conditions in Tulsa. In *J Biometereol* 2001; 45: 64-74.
11. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. *Clin Microbiol rev* 1995; 8: 161-179.
12. Horner WE, Helbling A, Lehrer SB. Basidiomycete allergens. *Allergy* 1998; 53: 1114-1121.
13. Slavin RG, Winzenburger P. Epidemiologic aspects of allergic aspergillosis. *Ann Allergy* 1977; 38: 215-218.
14. Achatz G, Oberkofler H, Lechenauer E, Simon B, Unger A, Kandler D, et al. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Mol Immunol* 1995; 32: 213-227.
15. Burge HA, Simmonsw EG, Muilenberg M, Hoyer M, Gallup J, Solomon WR. *Intrinsic variability in airborne fungi: implications for allergen standardization*. Basel: Birkhauser 1987; 143-146.
16. Lavings BJ, Dolen WK, Nelson HS, Weber RW. Use of standardized and conventional allergen extracts in prick skin testing. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 658-666.
17. Subiza Martín E, Jerez M. Concentración de esporas de hongos en la atmosfera de Madrid (método volumétrico). In: *Actas del IV simposio de palinología*. Solé de Porta N, Suárez Cervera M (Eds.) 1983: 227-293
18. Calvo MA, Guarro J, Suárez G. Los hongos como agentes etiológicos de alergias y enfermedades pulmonares: su incidencia en Barcelona. *Anales de Medicina y Cirugía* 1976; 246: 329-340.
19. Ebner MR, Haselwandter K, Frank A: Seasonal fluctuations of airborne fungal allergens. *Mycol Res* 1989; 92: 170-176.
20. Garrett M, Rayment P, Hooper M, Abramson M, Hooper B. Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 459-467.
21. Solomon WR. Assessing fungal prevalence in domestic interiors. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56: 235.
22. D'Amato G, Chatzigeorgiou G, Corsico R, Gioulekas D, Jäger L,

Jäger S, et al. Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. *Allergy* 1997; 52: 711-716.

23. D'Amato G, Spiekma FThM. Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. Position paper of Subcommittee on Aerobiology and Environmental Aspects of Inhalant Allergens of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1995; 50: 870-877.

24. Gergen P, Turkeltaub P, Kovar M. The prevalence of skin test reactivity to eight common aeroallergens in the U. S. population: results from the Second National Health and Nutrition Examination Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 669-679.

25. Chapman J. Update on airborne mold and mold allergy. *Allergy Asthma Proc* 1999; 20: 289-292.

26. Aas K, Leegaard J, Aukrust L. Immediate type hypersensitivity to

common molds. A comparison of different diagnostic materials. *Allergy* 1980; 35: 443-451.

27. Lavings BJ, Dolen WK, Nelson HS, Weber RW. Use of standardized and conventional allergen extracts in prick skin testing. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 658-666.

28. Horner WE, Hughes JM, Lopez M, Lehrer SB. Basidiomycete skin test reactivity is a risk factor for asthma. *Pediatr Asthma, Allergy Immunol* 2000; 14: 69-74.

29. Neukirch C, Henry C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Is sensitization to *Alternaria* a risk factor for severe asthma? A population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 709-711.

30. Dales RE, Cakmak S, Burnett RT, Judek S, Coates F, Brook JR. Influence of ambient fungal spores on emergency visits for asthma to a regional children's hospital. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 162: 2087-2090.

J. F. Gent

Yale University, USA

Correlation of levels of household mold with respiratory symptoms in infants

Since 1998, we have been following a birth cohort of 1,002 infants at risk for developing asthma. Each child enrolled in the study was born to a family that had at least one older child with physician diagnosed asthma. Within 4 months of the infant's birth, a home interview was conducted with the mother to collect demographic information, medical histories and household characteristics. Information on infant respiratory symptoms of wheeze and persistent cough were collected at the home interview and at quarterly telephone interviews when the infant was 6, 9, and 12 months of age. A mold sample was also taken at the time of the home interview. This report is based on prospective symptom information from 880 infants.

The health outcomes examined were number of days of infant respiratory symptoms of wheeze and persistent cough. For some analyses, yearly rates were calculated and categorized into three levels: 0 days; less than 30 days per year; and 30 or more days per year.

Airborne mold was sampled using a Burkard portable air sampler used in combination with dichloran-18% glycerol agar. The sampling period was 1 minute with an airflow rate of 20 L/min. Fungi were identified to the genus level and were recorded as colony forming units per cubic meter (CFU/m³). Mold counts were also categorized into four levels as follows: 0 CFU/m³ (Undetectable); 1 - 499 CFU/m³ (Low); 500 - 999 CFU/m³ (Medium); and 1000 or more CFU/m³ (High).

Both New Haven, Connecticut (the home of Yale University), and Barcelona fall close to 41° latitude. The climate in our area is temperate with temperature and humidity ranging from 4°C and 30% relative humidity in the winter to 27°C and 50% relative humidity in the summer.

Genera of mold identified in the main living rooms of our study subjects' homes included *Cladosporium* (found in 62% of the homes) and *Penicillium* (in 40%). Although *Aspergillus* (in 26%) and *Alternaria* (in 12%) were also quite common, neither was found in sufficient numbers to be analyzed separately. An additional 21 genera were identified including *Wallemia* (8%), *Epicoccum* (6%),

Botrytis (3%), and others found in less than 3% of the homes. No mold could be detected in 16% of the homes. The number of different genera per sample in the remaining samples ranged from 1 to 7. *Cladosporium* was the only mold identified in 12% of the samples while *Penicillium* was the only mold in 8%. Both were present in 27% of the samples. Unspecified yeast was found in 44%, and it was not possible to identify at least one of the molds present on 24% of the samples. This report will focus on the two most common household molds in our region: *Penicillium* and *Cladosporium*.

Levels of *Cladosporium* measured indoors, but not *Penicillium* were significantly associated with the season the mold sample was taken with highest levels measured in homes sampled in the summer and fall. This is not surprising since an examination of mold samples collected both inside and outside a sub-sample of 491 homes showed significant seasonal variation in levels of *Cladosporium*, and a significant source of indoor *Cladosporium* is the out of doors. For other molds, including *Penicillium*, there are significant indoor sources.

Many studies use reported observation of mold rather than measured mold as the exposure variable. In a comparison of measured mold to observed mold, we found that indoor levels of *Cladosporium*, but not *Penicillium*, were significantly associated with mother's report of mold observed in the home and mother's report of problems with water leaks.

This group of infants at high risk for developing asthma had a high rate of respiratory symptoms: nearly half of the infants experienced wheeze (41%) or persistent cough (46%) during the first year of life. Close to one-third of the infants who experienced symptoms had the equivalent of 30 or more days of wheeze (27.5%) or persistent cough (34.9%). Rate of respiratory symptoms was significantly associated with the infant's gender: boys had significantly more symptoms than girls; and with the mother's history of asthma: infants of asthmatic mother's had significantly more symptoms than infants of non-asthmatic mothers. Infant symptoms were not associated with the mother's allergy status. Persistent cough was significantly associated with the mother's report of mold in the home.

In bivariate analyses examining the association of respiratory symptoms and measured mold, high levels of *Penicillium* and medium levels of *Cladosporium* were associated with persistent cough. Wheeze was associated only with high levels of *Penicillium*.

We examined the effect of measured household mold on infant respiratory symptoms using Poisson regression analyses that included potential confounding factors. Separate models were run for predicting number of days of wheeze and number of days of persistent cough in the first year of life. *Penicillium*, *Cladosporium*, all "other" mold (total mold count minus counts for *Penicillium* and *Cladosporium*) were entered into the model as quasi-continuous variables, i.e., as their mold category from 0 (undetectable) to 3 (High). Potential confounding factors included season of mold sample, infant gender, mother's history of asthma and allergy; socioeconomic variables including mother's education level and family housing type; and other housing characteristics including, water leaks observed in the home, humidifier and dehumidifier use, smoking in the home, and home heating system.

Controlling for confounding variables, an infant's number of days of persistent cough during the first year of life would be 20% higher for each increase in the level of *Penicillium* (i.e., from no mold to a low level, or from low to medium, or from medium to high). Similarly, the model for rate of wheeze suggests that an infant's number of days of wheeze in the first year of life would be 23% higher for each increase in level of *Penicillium*. Controlling for confounding factors and level of *Penicillium*, neither *Cladosporium* nor "other" mold affect respiratory symptoms experienced by an infant during the first year of life.

The differences in the association between *Penicillium*, *Cladosporium* and respiratory symptoms is also seen when each mold is entered into the models as a categorical variable with each level compared to "undetectable." Infants living in homes with the highest levels of *Penicillium* are at risk for rates of wheeze or persistent cough twice as high as those of infants in homes with undetectable amounts of this mold. Level of *Cladosporium* appears to have no significant effect on rates of respiratory symptoms. However, seasonal variations suggest that exposure to *Cladosporium* is intermittent and may contribute only intermittently to respiratory symptoms and not as much as *Penicillium*, which appears to be present at more consistent levels year round.

Study strengths include our collection of extensive respiratory symptom data, maternal asthma and allergy histories, and housing characteristic information on a large population at high risk for developing asthma. The major limitation to our study is that a single airborne sample of mold was used to represent exposure during the first year of life.

We assessed the risk of increased incidence of res-

piratory symptoms as a result of exposure to particular fungi in a susceptible population, namely, infants at high risk for developing asthma. Our assessment also takes into account factors that might have confounding effects such as maternal allergy and asthma, socioeconomic variables, and housing characteristics. We conclude that infants in this high risk group who are exposed to high levels of *Penicillium* are at significant risk for developing wheeze and persistent cough in the first year of life.

REFERENCES

1. Belanger K, Beckett W, Triche E, Bracken MB, Holford T, Ren P, et al. Symptoms of wheeze and persistent cough in the first year of

life: associations with indoor allergens, air contaminants, and maternal history of asthma. *Am J Epidemiol* 2003; in press.

2. Commission of the European Communities (CEC) (1994) Report no. 12. Biological particles in indoor environments. Luxembourg.

3. Gent JF, Ren P, Belanger K, Triche E, Bracken MB, Holford TR, et al. Levels of household mold associated with respiratory symptoms in the first year of life in a cohort at risk for asthma. *Environ Health Perspect* 2002; 110: A781-A786.

4. Ortega AN, Belanger KD, Bracken MB, Leaderer BP. A childhood asthma severity scale: symptoms, medications, and health care visits. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 86: 405-413.

5. Ren P, Jankun TM, Leaderer BP. Comparisons of seasonal fungal prevalence in indoor and outdoor air and in house dusts of dwellings in one Northeast American county. *J of Expo Anal Environ Epidemiol* 1999; 9: 560-568.

6. Ren P, Jankun TM, Belanger K, Bracken MB, Leaderer BP. The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy* 2001; 56: 419-424.

J. M. Torres Rodríguez

Unitat d'Al·lèrgia Teknon.
Grup de Investigació en
Micologia Experimental y
Clínica (GREMEC). Institut
Municipal d'Investigació
Mèdica / IMAS. Barcelona.

Estandarización de alérgenos fúngicos

Existe un consenso total en que todos los extractos alérgicos disponibles deben de estar adecuadamente estandarizados para asegurar la buena calidad de los mismos en su utilización en el diagnóstico las enfermedades alérgicas y especialmente en aquellos casos en que se justifique una inmunoterapia específica¹.

Los alérgenos fúngicos no escapan a este concepto básico y es principalmente en ellos en los que se produce, por sus características intrínsecas una variabilidad extrema, la cual es dependiente de la materia primera utilizada, de la forma de extracción y preparación de los extractos y de la manera de valorarlos y estandarizarlos para sus diferentes aplicaciones².

Los hongos están integrados por células eucariotas con una pared externa constituida por quitina, glucano u otros componentes insolubles, y se desarrollan en forma de micelio pluricelular o levaduras unicelulares, cuyo crecimiento es variable en el tiempo y con las condiciones de laboratorio. Los hongos constituyen un ejemplo de la biodiversidad de este planeta debido al gran número de especies conocidas. Un número reducido de ellas han demostrado ser patógenas para el hombre ocasionándole intoxicaciones e infecciones de diferente gravedad. Un considerable número de especies son capaces de ocasionar estados de hipersensibilidad respiratoria cuando son inhaladas. De estas apenas unas pocas han estado estudiadas disponiéndose de conocimientos más o menos profundos de sus características bioquímicas y antigénicas. Lamentablemente hasta la fecha solamente tres o cuatro especies han sido estandarizadas y apenas una o dos de ellas, principalmente *Alternaria alternata* y *Aspergillus fumigatus* han llegado a la estandarización biológica³.

Estos datos demuestran lo mucho que queda por hacer en el campo de producción y estandarización de los extractos fúngicos, aunque afortunadamente se ha despertado un interés considerable por avanzar en este tema, un ejemplo de

ello lo tenemos en las ponencias siguientes que exponen la aplicación de la ingeniería genética en la elaboración de alérgenos y la utilización de extractos recombinantes en la práctica clínica. Aunque este parece ser el futuro todavía se sigue elaborando casi el 100% de los extractos diagnósticos y terapéuticos con métodos tradicionales y convencionales a partir de cultivos y procesamiento de laboratorio.

En la estandarización de los alérgenos fúngicos existen varias etapas bien diferenciadas y encadenadas cuya importancia es esencial para llegar a obtener un producto final de garantía alérgológica. El primer paso es disponer de una materia primera de excelente calidad.

MATERIA PRIMERA

Comprende la cepa o cepas utilizadas para la producción, el medio de cultivo y las condiciones de cultivo en cuanto a pH, temperatura, tiempo y humedad. Estos parámetros han de ser estandarizados y adaptados a las condiciones de cada especie. Así, por ejemplo, *Cladosporium* *sp* se desarrolla mejor a temperaturas de 22-25°C, mientras que *Aspergillus fumigatus* lo hace a 32-37°C. Los antígenos de *Candida albicans* se preparan con cultivos de 5-7 días, mientras que los de *Alternaria sp* suelen requerir 3-4 semanas y los de dermatofitos 5-6 semanas. Si pretendemos obtener antígenos de hongos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*, tendremos que incubarlo de 3 a 4 meses.

Por tanto el primer paso es la estandarización de los elementos constitutivos de la materia primera.

PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

Se considera que los extractos preparados a partir del medio de cultivo, que suele ser líquido (extractos metabólicos) son muy útiles y de buen rendimiento, no obstante, algunos alérgenos como los de levaduras se preparan a partir del propio hongo una vez lograda su rotura y liberación de las proteínas celulares (extractos somáticos)⁴.

La normalización de los reactivos y procedimientos de extracción también resulta imprescindible para disponer de alérgenos estandarizados⁵.

PROCESAMIENTO DE LOS EXTRACTOS

Disponer de extractos libres de productos nocivos

como las micotoxinas o de materiales no antigénicos es fundamental, para ello se someten a precipitación, diálisis, concentración y filtraciones aclarantes y esterilizantes. Obviamente todos estos procedimientos han de estar normalizados y explícitos en las guías de producción utilizadas⁶.

CONSERVACIÓN

La liofilización es probablemente el mejor sistema de conservación de los extractos alérgicos, aunque no el único, puesto que también lo es la ultracongelación, aunque este método plantea otros problemas relacionados con el volumen a conservar y coste económico.

OBTENCIÓN FINAL DEL ALÉRGENO

Según los diferentes autores, se considera que el antígeno metabólico de la mayoría de los hongos miceliares es adecuado. Sin embargo en levaduras se prefiere utilizar extractos somáticos que por lo general, ofrecen un mayor contenido proteico. En muchos alérgenos se emplea una mezcla en diferentes proporciones de extracto metabólico y extracto somático que se denomina: antígeno total. La utilización de uno, ambos productos o bien otros tipos de extractos (de pared, de esporas, etc) depende de diversos factores.

La normalización de esta composición también es necesaria para disponer de extractos de características alérgicas y de una potencia similares.

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ALÉRGICO FINAL

Una vez se dispone del extracto alérgico completamente procesado es imprescindible proceder a su evaluación química e inmunológica. Este procedimiento suele basarse en la determinación del contenido en proteínas y carbohidratos, en la electroforesis y otros métodos como el punto isoeléctrico, sin embargo la reactividad inmunológica *in vitro* utilizando sueros de referencia con anticuerpos IgE e IgG es esencial para conocer si existe una adecuada presencia de los antígenos mayores y menores –siempre que sean conocidos–. Para ello se utilizan diferentes métodos inmunológicos, presentando una especial importancia la inmunoelectro-transferencia⁷.

No podemos olvidar que el paso final, para su apli-

cación en diagnóstico y sobre todo en tratamiento, debe venir dada por la estandarización llamada biológica tomando como referencia un extracto de potencia determinada. Esta última fase debe ser realizada por el propio especialista en pacientes conocidos utilizando una técnica muy precisa y diluciones diferentes del extracto y controles de positividad (histamina) y negatividad (solución salina). La correlación de las pruebas *in vivo* e *in vitro* son el mejor método para asegurar al alergólogo que dispone de un extracto alergénico fúngico de total garantía para utilizar en la práctica clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Klysner S, Lowenstein H. Allergens and Standardization. In Kay AB. Allergy and Allergic Diseases. Oxford Blackwell Sci. London 1997.
2. Robert K, Yunginger BJ, Standardization of fungal allergens. Clin Rev Allergy 1987; 5: 3-21.
3. Aden E, Weber B, Bossert J, Teppke M, Franck E, Wahl R, Fiebig H, Cromwell O. Standardization of *Alternaria alternata*: Extraction and quantification of Alt a 1 using and mAb-based 2-site binding assay. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 128-135.
4. López Jodra O, Torres-Rodríguez JM, Martínez Garate A, Gutiérrez Martínez G, Martínez Quesada J. Antigens of *Fusarium solani*: types and criteria for immunochemical characterization. Allergol Immunopathol 2000; 28: 261-266.
5. Paris S, Fitting C, Ramirez E, Latgè JP, David BMD. Comparison of different extraction methods of *Alternaria* Allergens. 1990; 85: 941-948.
6. Martínez J, Martínez A, Gutiérrez G, Llares A, Palacios R, Saenz de Santamaría M. Influencia del proceso de obtención en la actividad alergénica y rendimiento de extractos de *Alternaria alternata*. Rev Iberamer Micol 1994; 11: 10-13.
7. Madrenys-Brunet N, Torres-Rodríguez JM. *Aspergillus fumigatus* comatic antigens: comparison between two methods of preparation and immunochemical characterization. Allergol et Immunopathol 1995; 23: 164-170.

F. Ferreira

Institute of Genetics,
University of Salzburg,
Hellbrunnerstr.

Genetic engineering of fungal allergens

A variety of fungi are capable of inducing IgE-mediated hypersensitivity reactions. The prevalence of fungal allergy among atopic subjects is estimated to range between 3 and 40%, depending on the allergic population investigated, the used test systems, extracts, and evaluated mould species.

Most commercial mould allergen extracts used for *in vivo* and *in vitro* diagnosis and specific immunotherapy (SIT) are not standardized and well characterized. For the best performance of SIT for mould allergy, the first crucial step is the exact identification of the molecules causing the allergic reaction. This can be accomplished with a molecule-based diagnosis. Knowledge of the pattern of IgE reactivity at a molecular level allows the formulation of vaccines containing only the allergens to which the patient is allergic to, consisting for example of cocktails of pure and standardized recombinant mould allergens instead of whole mould extracts. Moreover, the selected recombinant allergens can be modified to reduce the risk of IgE-mediated side effects. In this way, higher doses of allergen can be administered to allergic patients increasing the efficacy of the treatment without compromising safety.

Modification of mould allergens to improve conventional SIT should aim at the production of molecules with reduced IgE binding epitopes (hypoallergens), while preserving structural motifs necessary for T cell recognition (T cell epitopes) and for induction of IgG antibodies reactive with the natural allergen (blocking antibodies). In this respect, genetic engineering offers exciting possibilities for the generation of new candidate molecules for mould allergy vaccination. Genetic engineering comprises the targeted modification of a protein in order to alter its function or properties in a predictable manner and usually requires the complete understanding of the relationship between structure and function/properties for precise and effective manipulation. Alteration of the gene

can involve changing specific base-pairs (mutated gene), introduction of a new piece of DNA into the existing DNA molecule (chimeric or hybrid gene), and deletions (truncated gene or fragments). With the exception of the DNA shuffling approach, which bypass the need to identify amino acid residues or motifs that are important to structure and function, alteration of allergen genes requires knowledge of B and T cell epitopes and in some cases also of the three-dimensional structure of the allergen.

More than 80 genera of the major fungal groups have been reported to cause respiratory allergy. To date, cDNA sequences of 77 allergens from 20 fungal species have been deposited in the allergen databank (www.allergen.org). However, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium*

herbarum, and *Penicillium* are recognized as major causes of fungal allergies. Several allergens from these species have been characterized in some detail at the molecular level. Identification of B cell epitopes has been achieved for a number of fungal allergens including *C. herbarum* enolase (Cla h 6), *A. fumigatus* Asp f 1 and Asp f 2, and *P. notatum* Pen n 18. In contrast, data concerning cell-mediated immune response and T-cell epitope mapping is only available for *A. fumigatus* Asp f 1. Similarly, with the exception of Asp f 6, very little is known about the three-dimensional structure of mould allergens. Thus, despite the relatively large number of available cDNA sequences, engineering of fungal allergens for SIT is still in its infancy. It can be expected that in the next few years, much progress will be achieved in this area.

M. M. San Miguel
Moncín, A. Cisteró
Bahima

Servicio de Alergia. Instituto
Universitario Dexeus de
Barcelona.

Utilidad de los alérgenos recombinantes de hongos en la práctica diaria

INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos, se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies. Presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas¹.

La implicación de los hongos en las reacciones alérgicas se conoce ya desde hace mucho tiempo. En 1726 Floyer observó la aparición de asma en pacientes que acababan de visitar una bodega². En 1873 Blackely sugiere la asociación de crisis asmáticas con la inhalación de esporas de *Chaetomium* y *Penicillium*³. En 1924, Van Leeuwen en Holanda relacionó la aparición de síntomas de asma con la presencia de esporas fúngicas en el ambiente y con el clima⁴. Posteriormente y hasta la actualidad diversos trabajos han demostrado la implicación de los hongos en distintas patologías alérgicas.

Los hongos son organismos ubicuos en la naturaleza, y la exposición a los alérgenos fúngicos se produce tanto en espacios abiertos como interiores. El número de esporas y su tipo varía en el momento del día, la estación del año, la localización geográfica y la presencia de fuentes de esporulación entre otros factores. Así, el número total de esporas fúngicas en el aire puede variar de menos de 200 a más de un millón por metro cúbico¹. Por lo tanto la exposición a estos alérgenos, y la posibilidad de que una persona inhale esporas fúngicas es muy elevada.

Sin embargo, la prevalencia de sensibilización a hongos en pacientes alér-

gicos en general es baja si la comparamos con la sensibilización a otros neuroalergenos, y varía según el área donde se estudia. Así en el estudio multicéntrico realizado por D'Amato et al en Europa, la prevalencia de alergia respiratoria y sensibilización a hongos (*Alternaria* y *Cladosporium*) varía desde un 3% en Portugal a un 20% en España⁵.

Algunos géneros de esporas fúngicas aerovagantes se encuentran distribuidas por todo el mundo, sin embargo la alergia a hongos, ha sido una de las menos estudiadas. Además, aunque se ha demostrado sensibilización alérgica a más de 80 especies de hongos^{6,7}, sólo algunas de estas han sido estudiadas en detalle.

Uno de los mayores problemas que existen en el estudio de la alergia a hongos es la estandarización de los extractos antigénicos.

Los extractos fúngicos son muy variables en potencia y contenido alérgico, esta variabilidad puede proceder tanto de la cepa utilizada como de los diferentes procedimientos de cultivo. Los hongos presentan algunas diferencias respecto a otras fuentes alérgicas, que dificultan su estudio y la elaboración de extractos alérgicos. Por un lado presentan polimorfismo entre la forma micelial y sus conidios. Hay variaciones antigénicas importantes relacionadas con las condiciones externas de crecimiento, como el tiempo y la temperatura de incubación, el pH o las concentraciones de nitrógeno y carbohidratos en los medios de cultivo empleados. Se añade a esta problemática el que los extractos alérgicos empleados en el diagnóstico clínico se caracterizan por su variabilidad y suele ser poco predecible su actividad biológica. Los alérgenos fúngicos pueden ser obtenidos del micelio, de las esporas del hongo o del medio donde se produce el cultivo¹.

Además, algunos hongos son productores de micotoxinas, debiéndose evitar su presencia en los extractos elaborados tanto con fines diagnósticos como terapéuticos, por su potencial efecto tóxico o irritativo.

Por último, estudios realizados en algunos extractos alérgicos como extractos de *Aspergillus fumigatus*⁸ y *Fusarium culmorum*⁹, han demostrado que estos extractos alérgicos son inestables, lo que también puede afectar a la sensibilidad de estos extractos utilizados con fines diagnósticos.

En ausencia de información específica sobre la composición cualitativa y la concentración de antígeno en la atmósfera, y sin el empleo de extractos uniformes de antígenos fúngicos, es difícil establecer una relación causa efecto entre exposición a hongos y alergia respiratoria.

ALERGENOS RECOMBINANTES

En las últimas décadas, muchos alérgenos de distintas fuentes, se han purificado e identificado en algunos casos, mediante los métodos químicos clásicos. A finales de los años 80 se comienzan a aplicar técnicas de biología molecular en el estudio de alérgenos¹⁰, y las técnicas de ingeniería genética ha permitido la producción de alérgenos recombinantes. Desde entonces, se han clonado, secuenciado y expresado algunos de los principales alérgenos de ácaros, pólenes, animales, insectos, alimentos y hongos¹¹.

Las proteínas alérgicas recombinantes son producidas a nivel de distintos sistemas de expresión, pudiendo tratarse de sistemas procariotas tales como *Escherichia coli*, o sistemas eucariotas tales como las levaduras *Sacharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*¹².

En los distintos estudios publicados, los alérgenos recombinantes muestran una capacidad para fijarse a la IgE similar a la que presentan los alérgenos naturales, y muestran una excelente reactividad en los estudios diagnósticos realizados tanto *in vivo* como *in vitro*¹³⁻¹⁵.

Los alérgenos recombinantes nos han permitido comprender los mecanismos por los que interaccionan los alérgenos y los anticuerpos a nivel molecular. La aplicación de las técnicas de DNA recombinante en el estudio de la estructura de los alérgenos, ha aumentado nuestro conocimiento de la estructura primaria de estos, y además en muchos casos se ha determinado la estructura tridimensional de algunos alérgenos y se han mapeado epítopos conformacionales de células T y B¹³.

La producción de alérgenos recombinantes ha permitido caracterizar muchos alérgenos a nivel molecular y bioquímico. Estos estudios muestran que los alérgenos tienen diversas funciones biológicas (pueden ser enzimas, inhibidores enzimáticos, lipocalinas o proteínas estructurales), aunque en general, la función biológica del alérgeno, no está relacionada con su capacidad de producir respuestas de hipersensibilidad IgE mediadas¹³.

Numerosos trabajos realizados con alérgenos recombinantes demuestran que son importantes herramientas utilizadas con fines diagnósticos, tanto en estudios *in vivo* e *in vitro*. Permiten aclarar el perfil alérgico que presentan algunos pacientes polisensibilizados, reconocer la sensibilización a alérgenos potencialmente peligrosos como en el caso de algunos alérgenos alimentarios e identificar la presencia de estos en diversas fuentes¹⁶⁻¹⁸. Además sirven para estudiar la potencial reactividad cruzada entre alérgenos

de la misma especie o de distintas especies no relacionadas, como es el caso de los panalergen​os^{19, 20}.

Un reciente trabajo de Hauswirth y cols, adem​as de identificar hipersensibilidad IgE, utiliza los alergen​os recombinantes para estudiar marcadores celulares de activaci​on IgE mediada en estudios *in vitro* con citometr​ia de flujo²¹.

Por otra parte, adem​as del uso de los alergen​os recombinantes con fines diagn​osticos, se sugiere su potencial utilizaci​on con fines terap​euticos. Los alergen​os recombinantes podr​ian aportar innovadoras nuevas estrategias en el desarrollo de inmunoterapia con alergen​os²².

AVANCES EN ALERGENOS RECOMBINANTES A HONGOS

Muchos de los componentes alerg​enicos son glicoprote​inas y se est​a desarrollando una importante labor investigadora para conocer y purificar los principales alergen​os f​ungicos y comprender la importancia de los componentes gluc​idicos y proteicos en la alergia.

En la actualidad, excepto para algunos alergen​os, la mayor​ia de los extractos alerg​enicos de hongos comercializados no est​an estandarizados, por lo que el contenido alerg​enico de los diferentes extractos no puede ser comparado directamente.

La mayor​ia de extractos f​ungicos utilizados tanto en el diagn​ostico como el tratamiento contienen otros componentes y otras prote​inas no alerg​enicas.

La gran variabilidad existente entre los diferentes extractos es un problema especialmente presente en los extractos de hongos, ya que pueden existir grandes diferencias de una cepa a otra, por el medio de cultivo, la fuente de d​onde se obtiene, as​i como el procedimiento por el que se obtiene el extracto²³.

Las t​ecnicas de biolog​ia molecular permiten clonar, caracterizar y producir alergen​os unic​os, altamente purificados, en grandes cantidades. As​i, en los ultimos a​nos se ha producido un considerable esfuerzo en la obtenci​on de alergen​os f​ungicos relevantes purificados. Se han aislado varios alergen​os f​ungicos y se han clonado los genes que codifican estos alergen​os. En la actualidad, alrededor de 70 alergen​os f​ungicos han sido aprobados por El Comit​e Internacional de Nomenclatura Alerg​enica²⁴.

La obtenci​on de algunos de los principales alergen​os f​ungicos recombinantes ha sido utilizada con distintos fines. Por un lado se han utilizado y permiten valorar la

presencia de determinados alergen​os en los extractos naturales, as​i, como se han utilizado para comparar la variabilidad en el contenido de alergen​os mayores en distintos extractos alerg​enicos comerciales o en distintos lotes de una misma compa​n​ia²³, como en el estudio realizado por Vailes L et al en distintos extractos comerciales de *Alternaria* y *Aspergillus*.

La obtenci​on de alergen​os recombinantes tiene diversas aplicaciones cl​inicas. As​i, adem​as de permitir la identificaci​on del perfil de sensibilizaci​on alerg​enica que presentan los pacientes al​ergicos a hongos mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. Tambi​en podr​ian ayudar a la identificaci​on de determinadas patolog​ias y a su diagn​ostico diferencial. En la actualidad se han obtenido 22 alergen​os recombinantes de *Aspergillus fumigatus*, y algunos estudios destacan un distinto patr​on de sensibilizaci​on alerg​enica en los paciente afectados de Aspergilosis broncopulmonar al​ergica, respecto a pacientes afectados de otros tipos de patolog​ias alerg​icas por *Aspergillus*²⁵⁻²⁷.

La obtenci​on de alergen​os purificados ha permitido, por otra parte identificar las distintas prote​inas alerg​enicas y definir sus caracter​isticas y propiedades biolog​icas. Por lo que se definen distintos grupos de prote​inas (enolasas, alcalin-serin-proteasas, manganeso-super​oxido-dismutasas, factores de transporte nuclear, etc.)²⁸⁻³¹. Esto a su vez ha permitido realizar estudios de reactividad cruzada, que se ha demostrado tanto entre distintas especies de hongos como entre hongos y otros alergen​os como el l​atex (enolasas y manganeso super​oxido dismutasas)^{29, 32, 33}.

HIPERSENSIBILIDAD A *FUSARIUM*

Las especies de *Fusarium* se distribuyen en numerosas plantas y est​an presentes en diferentes tipos de suelo. Pueden ser importantes fitopat​ogenos del arroz, ca​na de azucar, sorgo y ma​iz. Tambi​en pueden afectar a pl​atanos, tomates y melones. Su esporulaci​on es m​as intensa en periodos c​alidos y h​umedos. Durante los meses fr​ios o en estaciones secas, las especies de *Fusarium* sobreviven en los restos de plantas y el suelo. Diferentes especies de *Fusarium* son productoras de micotoxinas. Se han asociado con diferentes patolog​ias al​ergicas como rinitis perenne, asma, enfermedad broncopulmonar al​ergica y de car​acter profesional en recolectores de fresas y otros agricultores¹.

En algunos estudios epidemiol​ogicos se describe la presencia de sensibilizaci​on a *Fusarium* en pacientes al​ergicos, aunque en menor frecuencia que la encontrada con

otros hongos como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* o *Aspergillus*. Sin embargo, el diagnóstico de alergia a este hongo no es habitual en la práctica clínica diaria, y, por otra parte son muy escasos los trabajos publicados sobre la patología alérgica asociada a este hongo en concreto³⁴.

Esto podría deberse en parte tanto a la falta de extractos comerciales estandarizados de *Fusarium*, como a una baja sensibilidad de la determinación de IgE sérica específica. Por otra parte, es esencial que los extractos alérgicos, además de una elevada calidad, tengan una adecuada estabilidad. Recientemente se ha publicado un trabajo que demuestra que los extractos alérgicos de *Fusarium* tienen una estabilidad muy baja. Por todos estos factores podríamos encontrarnos ante un alérgico infradiagnosticado.

Recientemente nuestro grupo ha tenido la oportunidad de realizar un estudio en colaboración con otros investigadores y con Michael Hoff del Instituto Paul Ehrlich de Alemania. Se llevó a cabo un estudio para identificar, aislar y caracterizar potenciales alérgenos de *Fusarium culmorum*, con el fin de obtener material alérgico de referencia estable. Se estudian 52 pacientes alérgicos a hongos procedentes de Alemania, Suiza y Barcelona. Mediante estudios de *immunoblotting* y EAST (enzimoadsorbente test), se determina la capacidad fijadora de IgE específica de un extracto comercial y de un extracto propio de *Fusarium culmorum*. Mediante técnicas de biología molecular se obtienen alérgenos recombinantes, siendo valorada posteriormente su capacidad fijadora de IgE. 26 pacientes presentan sensibilización a *Fusarium*. Se aislaron 3 clones de alérgenos Fus c 1; Fus c 2 y Fus c 3. Un 50% de los 26 pacientes sensibilizados a *Fusarium* presentaban IgE específica frente a rFus c 2. Mediante la combinación de rFus c 1 y rFus c 2 se podían diagnosticar un 81% de los pacientes sensibilizados a este hongo³⁵.

CONCLUSIONES

Muchos de los problemas derivados del uso de productos alérgicos naturales para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas podrían resolverse con la utilización de alérgenos recombinantes obtenidos por ingeniería genética. La utilización de extractos de alérgenos recombinantes podría sustituir en un futuro a los alérgenos naturales, ya que además de tener una composición más uniforme, aportaría un diagnóstico alérgico más preciso.

Fusarium culmorum, como otras especies de hongos pueden ser neumalérgenos infradiagnosticados. En con-

traste con los extractos naturales, que presentan una gran variabilidad y una baja estabilidad, los nuevos alérgenos recombinantes pueden servir como un estable material de referencia. Aunque, aún hacen falta más estudios para determinar los diferentes alérgenos, la obtención de alérgenos recombinantes podría suponer una mejoría sustancial en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J, Quindós G. Hongos y actinomicetos alérgicos. Revista Iberoamericana de Micología. 2002.
2. Floyer J. Violent asthma after visiting a wine cellar. En: A treatise on asthma. London, Innys & Parker, 1745.
3. Blackley C. Experimental research on the cause and nature of *Cattarrhus aestivus* (hay fever or hay asthma). London, Bailliere, Tindall & Cox 1873. (Revised edition, London, Dawson, Pall Mall 1959).
4. Van Leeuwen WS. Bronchial asthma in relation to climate. Proc R Soc Med 1924; 17: 19-26.
5. D'Amato G, Chatzigeorgion G, Corsico R, Gioulekas D, Jager L, Konton-Fili K, et al. Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. Allergy 1997; 52: 711-716.
6. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 161-79.
7. Bush RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: S430-40.
8. Hansen MY, Wold JK, Smestad Paulsen B, Cohen EH, Karlsson-Borga A. Allergens in *Aspergillus fumigatus*. I. Characterization of two different allergen extracts and evaluation of their stability and the importance of carbohydrate for IgE binding. Allergy 1994; 49: 235-241.
9. Hoff M, Krail M, Kästner M, Hausteine D, Vieths S. *Fusarium culmorum* causes strong degradation of pollen allergens in extract mixtures. J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 96-101.
10. Deviller P. Natural allergens and recombinant allergens. Allerg Immunol (Paris) 1995; 27: 316-319.
11. Chapman MD, Smith AM, Vailles LD, Arruda LK, Dhaharaj V, Pomes A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2000; 106: 409-18.
12. Schmidt M, Hoffman DR. Expression systems for production of recombinant allergens. Int Arch Allergy Immunol 2002; 128: 264-270.
13. Chapman M, et al. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic diseases. J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 96-101.
14. Díaz-Perales A, et al. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy.
15. Rihs H.-P, Dumont B, Rozynek P, Lundberg M, Creimer R, Bruning T, et al. Molecular cloning, purification, and IgE-binding of a recombinant class I chitinase from *Hevea brasiliensis* leaves (rHev b 11.0102). Allergy 2003; 58: 246-251.
16. Scheurer S, Postorello EA, Wanbgorsch A, Kastner M, Mausteine D, Vietns S. Recombinant allergens Pru av1 and Pru av 4 and newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 724-731.

17. Ballmer-Weber B, et al. Component resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 167-173.
18. Vieths S, Scheurer S, Reindl J, Luttkopf D, Wangorsch A, Kastner M, et al. Optimized allergen extracts and recombinant allergens in diagnostic applications. *Allergy* 2001; 56 (Suppl.67): 78-82.
19. Simpson A, Green R, Custovic A, Woodcock A, Arruda LK, Chapman MD. Skin test reactivity to natural and recombinant *Blomia* and *Dermatophagoideis spp.* Allergens among mite allergic patients in the UK. *Allergy* 2003; 58: 53-56.
20. Pauli G. Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens: the role of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 183-195.
21. Hauswirth AW, Natter S, Ghannadan M, Majlesi Y, Scherthaner GM, Sperr WR, et al. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitised individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 102-109.
22. Chapman MD, Smith AM, Vailles LD, Pomes A. Recombinant allergens for immunotherapy. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23: 5-8.
23. Vailles L, Sridhara S, Cromwell O, Weber B, Breitenbach M, Chapman M. Quantitation of the major fungal allergens, Alt a 1 and Asp f 1, in commercial allergenic products. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 641-646.
24. Kurup VP, Shen HD, Vijay H. Immunobiology of fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 181-188.
25. Kurup VP, Banerjee B, Hemman S, Greenberger PA, Blaser K, Cramer R. Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 988-993.
26. Banerjee B, Kurup VP, Greenberger PA, Johnson BD, Fink JN. Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 761-770.
27. McCann WA, Cromie M, Chandler F, Ford J, Dolen WK. Sensitization to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen in allergic fungal sinusitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 203-208.
28. Simon-Nobbe B, Probst G, Kajava AV, Oberkojler H, Susani M, Grameri R, et al. IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 887-895.
29. Wagner S, Sowka S, Mayer C, Cramer R, Focke M, Kurup VP, et al. Identification of a *Hevea brasiliensis* latex manganese superoxide dismutase (Hev b 10) as a cross-reactive allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 120-127.
30. Chou H, Lai HY, Tam MF, Chon MY, Wang SR, Han SH, et al. cDNA cloning, biological and immunological characterization of the alkaline serine protease major allergen from *Penicillium chrysogenum*. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127: 15-26.
31. Weichel M, Schmid-Grendelmeier P, Fluckger S, Breitenbach M, Blaser K, Cramer R. Nuclear transport factor 2 represents a novel cross-reactive fungal allergen. *Allergy* 2003; 58: 198-206.
32. Wagner S, Breiteneder H, Simon-Nobbe B, Susani M, Krebitz M, Niggemann B, et al. Hev b 9, an enolase and a new cross-reactive allergen from hevea latex and molds. Purification, characterization, cloning and expression. *Eur J Biochem* 2000; 267: 7006-7014.
33. Hemmann S, Blaser K, Cramer R. Allergens of *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii* share IgE-binding epitopes. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1956-1962.
34. López-Jodra O, Torres-Rodríguez JM, Martínez Gárate A, Gutiérrez Martínez G, Martínez Quesada J. Antigens of *Fusarium solani*: types and criteria for immunochemical characterization. *Allergol et Immunopathol* 2000; 28: 261-266.
35. Hoff M, Ballmer-Weber BK, Niggemann B, Cistero-Bahima A, San Miguel-Moncin M, Conti A, et al. Molecular cloning and immunological characterisation of potential allergens from the mould *Fusarium culmorum*. *Mol Immunol* 2003; 39: 965-975.