

RESPUESTA IgE ESPECÍFICA ANTI- *BLOMIA TROPICALIS* EN NIÑOS ASMÁTICOS RESIDENTES EN SANTA MARTA, UNA CIUDAD DEL CARIBE COLOMBIANO

Dary Luz Mendoza Meza* y Sonja Lozano Socarras**

RESUMEN

Blomia tropicalis es un ácaro intradomiciliario predominante en Colombia. Sin embargo, existe poca información disponible sobre la sensibilización a este y otros ácaros intradomiciliarios en pacientes asmáticos de Santa Marta. El propósito de este estudio fue establecer la respuesta IgE específica contra el ácaro *B. tropicalis* en pacientes pediátricos asmáticos de Santa Marta. La respuesta IgE específica se determinó por ELISA indirecto en 77 niños con diagnóstico de asma bronquial alérgica. Las fracciones alergénicas mayoritarias de *B. tropicalis* se identificaron por Western Blotting usando un extracto de proteínas de *B. tropicalis*. Setenta y seis (98.7%) niños presentaron niveles elevados de IgE total, 48 (88%) tenían IgE anti- *B. tropicalis* positiva. El Western Blot identificó 16 fracciones alergénicas con rango entre 80- 21 kDa. Estos resultados indican que los alérgenos del ácaro *B. tropicalis* deben incluirse en el diagnóstico exacto de la sensibilización a los ácaros del polvo doméstico en Santa Marta, Colombia.. (DUAZARY 2011, 9 - 16)

Palabras clave: *Blomia tropicalis*, ácaros intradomiciliarios, sensibilización alérgica.

ABSTRACT

Blomia tropicalis is the predominant indoor mite in Colombia, nevertheless there is not enough information about sensitization to this and other indoor mites, in the asthmatic patients living in Santa Marta. The purpose of this study was to establish the specific IgE responses against to *B. tropicalis* in pediatric asthmatic patients in Santa Marta. Specific IgE responses were determined by indirect ELISA in 77 children with bronchial asthma. The *B. tropicalis* major allergenic fractions were identified by Western Blotting using a *B. tropicalis* protein extract. Seventy six (98.7%) children showed high levels of total IgE, 48 (88%) had IgE anti-*B. tropicalis* positive. Sixteen allergenic fractions, between 80 - 21 kDa, were identified by Western Blotting. These results indicate that the *B. tropicalis* allergens must be included in the precise diagnosis of sensitization to house dust mite in Santa Marta, Colombia.

Key words: *Blomia tropicalis*, indoor mites, allergic sensitization.

*Química Farmacéutica. MSc Bioquímica. Grupo de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Magdalena. dary_mendoza@yahoo.com.

**Bacterióloga. Esp. Docencia Universitaria. MSc Ciencias Básicas Biomédicas. Grupo de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Magdalena. sonjalilo@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los trastornos respiratorios son uno de los problemas de salud más frecuentes en el mundo, y entre ellos el asma aparece como una patología muy común en niños y adultos^{1,2}. En Colombia la prevalencia de asma bronquial en la población general es 8-12%³ y en niños de edad escolar está alrededor del 20,6%⁴.

Asma es un desorden inflamatorio crónico en el cual las vías aéreas sufren cambios cuando son estimuladas por alérgenos u otros agentes ambientales produciendo tos, sibilancias y disnea⁵. Los factores que influyen en el riesgo de desarrollar asma pueden ser divididos en: sensibilizantes (provocan el desarrollo de asma) y desencadenantes (precipitan los síntomas de asma), algunos participan en ambas situaciones. Los primeros son relacionados con el huésped (primariamente el factor genético) y los segundos son, usualmente, factores ambientales⁶.

Durante mucho tiempo se ha atribuido al polvo acumulado en ambientes intramuros de casas y edificios un carácter alérgico importante, responsable de un gran número de enfermedades como asma. El valor epidemiológico de estos hallazgos, propició el estudio minucioso de los componentes del polvo de habitación que pudiesen desencadenar la sintomatología de asma⁷. En la actualidad se sabe que los ácaros del polvo son los factores desencadenantes principales de asma y otras alergias en el mundo^{8, 9, 10, 11}. En Colombia, los ácaros de mayor relevancia clínica pertenecen a las familias *Glycyphagidae*, *Pyroglyphidae*, *Cheyletidae*, *Acaridae*, *Oribatidae* y *Chortoglyphidae*¹¹. En el Caribe colombiano las especies *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*, son las principales causantes de enfermedades alérgico-respiratorias^{12, 13, 14} (Figura 1).

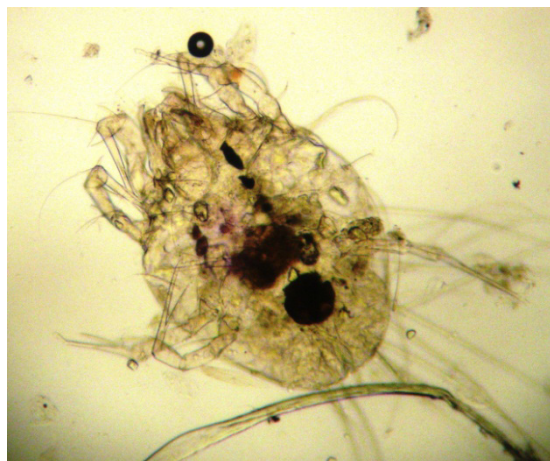


Figura 1. Imagen microscópica del ácaro *Blomia tropicalis*, espécimen colectado de la acaro-fauna de Santa Marta.

Los alérgenos de los ácaros son generalmente péptidos, proteínas o glicoproteínas capaces de inducir una respuesta inmunológica mediada por la inmunoglobulina E (IgE). Hay tres fuentes de alérgenos en los ácaros: los huevos, las secreciones oleosas de las glándulas laterales productoras de feromonas y las heces fecales, siendo estas últimas las que contienen la mayoría de los alérgenos¹⁵. Las heces fecales son partículas de forma esférica (de 10 a 40 μm) que se suspenden fácilmente en el aire y que ocasionan una reacción alérgica por inhalación (Figura 2).

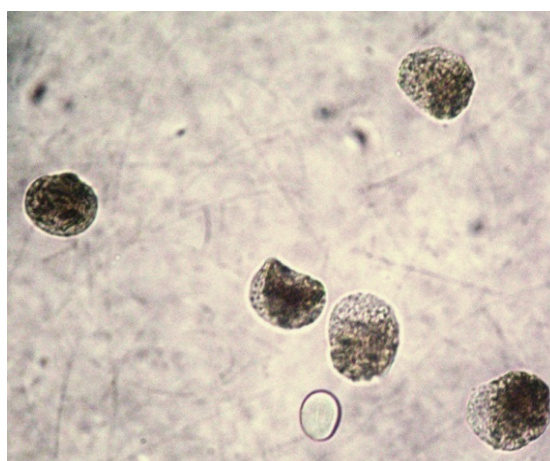


Figura 2. Imagen microscópica de partículas fecales de *Blomia tropicalis*.

En Colombia, *B. tropicalis* se ha reportado como una de las especies responsables de la alergenidad en los ambientes intramuros debido a la predominancia de este ácaro en el polvo, demostrado por los resultados de pruebas de sensibilización cutánea y títulos de anticuerpos IgE específicos hallados en el suero sanguíneo de los asmáticos^{12,16}. El propósito del presente estudio fue determinar la respuesta IgE contra el ácaro *B. tropicalis* en una población de niños con diagnóstico de asma bronquial alérgica, residentes en la zona urbana de la ciudad de Santa Marta.

MATERIALES Y MÉTODO

TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo y experimental.

ZONA DE ESTUDIO

La ciudad de Santa Marta localizada al norte de Colombia, con coordenadas geográficas de 11° 14' 50" de latitud norte y 74° 12' 06" latitud oeste. Santa Marta limita por el norte y el oeste con el mar Caribe, por el oeste con el departamento de La Guajira y por el sur con los municipios de Aracataca y Ciénaga. La altura promedio de la ciudad es de 2 msnm, la temperatura promedio anual de 28 °C, y humedad relativa entre 70 - 90%, con predominio de un ambiente seco debido a las brisas provenientes de la Sierra Nevada de Santa Marta.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para las pruebas de sensibilidad alérgica al ácaro *B. tropicalis* se incluyeron en este estudio 77 niños con edades comprendida entre 6 y 16 años, remitidos por médicos especialistas en neumología o pediatría de instituciones prestadoras de salud (IPS) del distrito de Santa Marta, entre octubre de 2005 y noviembre de 2007, con síntomas de sibilancia y/o rinitis durante los 12 meses previos al estudio, quienes manifestaron sensibilización alérgica (estornudo y/o dificultad respiratoria) al polvo de habitación, con obstrucción del flujo aéreo confirmado por espirometría, consistente en FVC disminuida, relación FEV1/FVC menor al 80% e irreversibilidad de la relación FEV1/FVC post broncodilatadora superior al 12%.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Solo se incluyeron en el estudio los pacientes pediátricos con diagnóstico de asma bronquial alérgica cuyos padres autorizaron su participación mediante consentimiento informado, previa explicación de los objetivos de la investigación, sus ventajas y exposición con riesgo mínimo, según lo establecido en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de la Protección Social de Colombia. Todos los participantes del estudio recibieron los resultados de las pruebas realizadas y orientación sobre el control ambiental de los ácaros intradomiciliarios.

RECOLECCIÓN Y FUENTES DE INFORMACIÓN

Suero sanguíneo. Los niveles de IgE total y de IgE específica anti-*B. tropicalis* se determinaron en muestras de suero sanguíneo. A cada niño se le extrajo una muestra de 5 mL de sangre periférica, la cual se dejó coagular y se centrifugó a 4°C y 2.500 rpm durante 20 minutos. El suero sanguíneo se separó y almacenó en viales plásticos a -20° C.

Determinación de IgE total. Se cuantificaron los niveles de IgE total mediante una prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), tipo *sándwich*, usando el Kit comercial de Vedalab®. La fase sólida fueron placas de microtitulación de polivinilo sensibilizadas con un anticuerpo específico para la IgE humana, y todas las muestras se analizaron por triplicado. La discriminación diagnóstica se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante: Niveles de IgE total > 100 UI/mL fueron considerados elevados.

IgE específica anti- *B. tropicalis*. Se determinó mediante un ensayo de ELISA indirecto casero, usando como antígeno extracto de cuerpo entero de *B. tropicalis* donado por el Grupo de Alergología Experimental del Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena. El extracto liofilizado de *B. tropicalis* se disolvió en tampón carbonato/bicarbonato de sodio 0,2 M y pH 9,2, hasta una concentración final de proteínas de 0,05 µg/µL. En una placa de microtitulación de 96 pozos se adsorbieron 5 µg de proteína por pozo, correspondiente a 100 µL del extracto diluido. La adsorción se llevó a cabo durante 16 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. La proteína no adsorbida a la placa se retiró mediante lavados con tampón salino fosfato PBST (PBS 0,1M - Tween 20 al

0,1% v/v). Las zonas de los pozos donde no se fijaron proteínas del extracto se bloquearon durante 3 horas con 200 μ L de la solución del anticuerpo (PBS 0,1M - BSA 3% p/v - Azida sódica 0,02% p/v). Posterior al bloqueo se realizaron 3 lavados de la placa con PBST. Los pozos se incubaron por 16 horas con 100 μ L de una dilución 1/5 de los sueros sanguíneos en solución de anticuerpo. Las uniones inespecíficas y el exceso de suero se retiró mediante lavados con PBST. Seguido, se adicionó a cada pozo 100 μ L de un segundo anticuerpo, IgG de cabra anti-IgE conjugada a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma®), diluido 1/1000 en la solución del anticuerpo, la placa se incubó en cámara húmeda por 2 horas. El segundo anticuerpo no unido se removió mediante lavados con PBST. Se adicionó a cada pozo 100 μ L del sustrato para la enzima fosfatasa alcalina, el p-nitrofenil fosfato disuelto en solución de Dietanolamina al 10% v/v, MgCl₂ 0,5 mM (1 mg/mL). La reacción generó un producto de color amarillo cuya densidad óptica se leyó a la longitud de 405 nm, usando el Software Gen5™ Data Analysis (BioTek® Instruments, Inc). Para la discriminación diagnóstica de esta prueba se estableció un punto de corte (definido como el valor de densidad óptica DO que permitirá diferenciar una muestra positiva de una negativa), el cual se calculó sumando el doble de la desviación estándar al promedio de los valores de absorbancia de las muestras negativas, para este estudio el punto de corte calculado fue una DO igual a 0,11.

Identificación de componentes alergénicos en extractos totales de *B. tropicalis*. Para el reconocimiento de componentes de *B. tropicalis* que son reconocidos por los anticuerpos IgE presentes en el suero sanguíneo de la población estudiada, se requirió del cultivo y obtención de extractos totales del ácaro. El establecimiento de un cultivo puro de *B. tropicalis* y la preparación de los extractos se hizo siguiendo la metodología descrita por Yi FC y colaboradores¹⁷. Los ácaros fueron cultivados en el laboratorio de Bioquímica de la Universidad del Magdalena, a partir de especímenes seleccionados de la ácaro-fauna de Santa Marta en noviembre de 2007, y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (27 a 28,5°C) y humedad relativa (80- 85%) durante 12 meses (Figura 3).

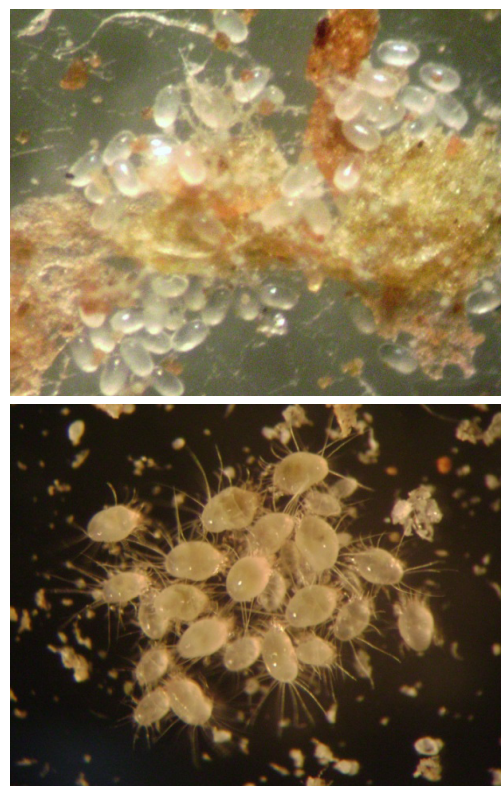


Figura 3. Cultivo de ácaros *Blomia tropicalis*. La imagen de la izquierda muestra los ácaros en estadio de huevos y la imagen de la derecha los ácaros adultos.

Los extractos se obtuvieron por lisis osmótica de los ácaros, previamente desgrasados con éter etílico. Las proteínas solubles se separaron de los restos celulares por centrifugación a 4°C y 3.500 rpm durante 30 minutos, seguido por diálisis en membranas con tamaño de exclusión de 3.500 Dalton (Spectrum Laboratories Inc.), frente a agua MQ de conductividad > 14.5 M Ω . La concentración de proteínas en el extracto se estableció mediante el microensayo de Bradford (Bio-Rad protein Assay, Hercules, CA) y la integridad de la proteínas se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) del 12%T y 4%C, en un equipo Mini Protean®III Cell (Bio-Rad). La actividad alergénica de los extractos se comprobó mediante prueba inmunoquímica de “Dot blot” usando como fuente de anticuerpos IgE

sueros de diez niños sujetos de estudio. Las fracciones proteicas mayoritarias del extracto total de *B. tropicalis* se identificaron por “Western Blot”, usando sueros de tres niños sujetos de estudio, seleccionados de las muestras que dieron resultado positivo en el ELISA y el Dot blot.

Dot-Blot: Se preparó una solución de extracto total de *B. tropicalis* de concentración final 250 µg/mL, en tampón TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). El extracto (50 µL) se adicionó con ayuda de una micropipeta a una membrana de nitrocelulosa, situada previamente dentro de un equipo de microfiltración Bio- Dot® SF (Bio Rad). La membrana se incubó con el extracto durante 2 horas, luego se bloqueó en solución TBST-BSA (TBS 50 mM, Tween 20 al 0,1% v/v y BSA 3% p/v) durante 1 h. Para la inmunodetección de los alérgenos adsorbidos a la membrana, estas se incubaron por 16 horas a 4°C, con los sueros sanguíneos de diez niños asmáticos (dilución 1/5 del suero en tampón TBST-BSA). El exceso de suero sobre la membrana se lavó con tampón TBST. La membrana se incubó con una dilución 1/1000 del conjugado IgG anti-IgE humana unida a la fosfatasa alcalina, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. El conjugado no unido se lavó con tampón TBST. La membrana se reveló con 5mL del sustrato Nitro azul tetrazolium /5- Bromo-4-Cloro-indol fosfato (NBT/BCIP) disuelto en tampón de la fosfatasa alcalina pH 9,0 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM). El color de las bandas sobre la membrana se detectó a los 5 minutos, después de los cuales la reacción se detuvo con solución de TBS- EDTA 2 mM.

Western Blot: Las proteínas separadas en la electroforesis SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en un equipo Trans Blot Cell (Bio-Rad), usando tampón Tris-Glicina pH 8,3 (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20 %v/v). La transferencia se realizó durante 2 h a 200 mA. La membrana se cortó en tiras, las cuales fueron bloqueadas con tampón salino TBS-BSA. La inmunodetección de las fracciones electroforéticas que se unen a la IgE se realizó siguiendo la metodología descrita para el Dot-Blot.

PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos a partir de las pruebas inmunoquímicas fueron organizados y sistematizados en el programa Epi Info versión 6.04d para su tratamiento estadístico. Para el análisis se utilizaron medidas de frecuencia, pruebas de tendencia central y dispersión.

RESULTADOS

La población de estudio (N= 77) estuvo conformada por 42 niños y 35 niñas, con un promedio de edad de 9 años (DE= 3,12). Setenta y seis, correspondiente al 98,7% de la población, presentaron niveles séricos de IgE total elevados (rango de 120,8 - 2.191 UI/mL).

Sesenta y ocho de los 76 sueros con IgE total elevada presentaron anticuerpos IgE específicos para el ácaro *B. tropicalis* (rango de DO = 0,111-1.868) (Figura 4).

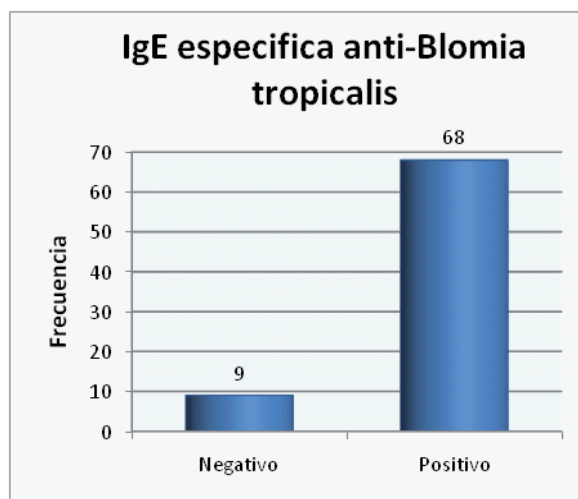


Figura 4. Resultados del ELISA indirecto para detectar la presencia de anticuerpos IgE anti- *B. tropicalis* en el suero sanguíneo de 77 pacientes asmáticos.

El inmuno-ensayo de Dot Blot con extractos crudos de cuerpo entero de *B. tropicalis*, confirmó la presencia de anticuerpos IgE alérgenos específicos en el suero de 8 niños asmáticos. Estos sueros también reconocieron las proteínas presentes en el extracto de cuerpo entero de otro ácaro, el *Dermatophagoides farinae*, el cual fue identificado en la acaro-fauna de Santa Marta en un estudio previo (Figura 5).

Un ensayo de Western Blot mostró la presencia de un perfil complejo de proteínas de *B. tropicalis* que son reconocidas por los anticuerpos IgE de tres niños asmáticos, las fracciones electroforéticas mayoritarias correspondieron a tamaños entre 80 y 21 kDa (Figura 6).

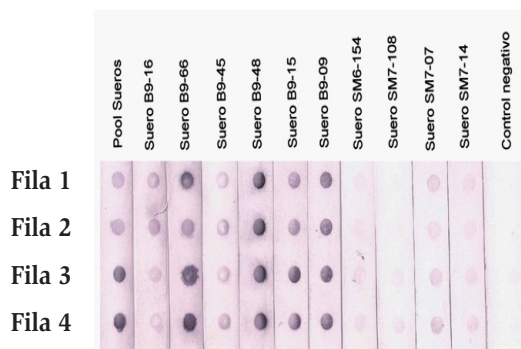


Figura 5. Resultado del Dot-blot con extractos totales de *Dermatophagoides farinae* (filas A y B) y *B. tropicalis* (filas C y D), incubados con un pool de sueros de 10 niños asmáticos, sueros individuales de 10 asmáticos y un control negativo correspondiente a un suero de un individuo no asmático, no alérgico.

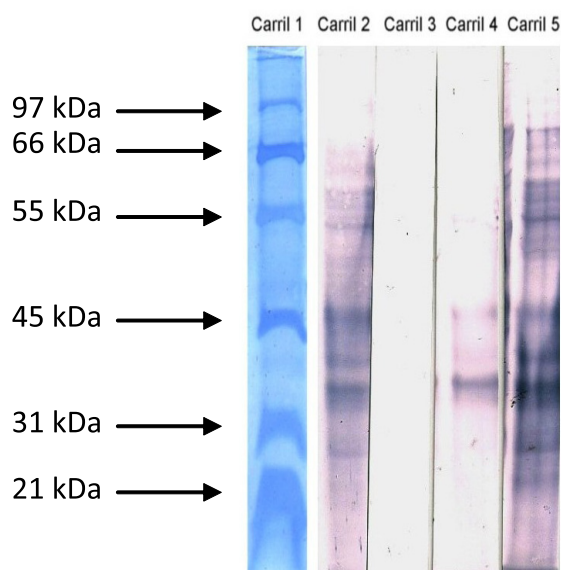


Figura 6. Resultados del ensayo de Western Blot con extractos totales de *B. tropicalis*. Carril 1 Marcador de peso molecular (Sigma Market); Carril 2. Suero B9-48; Carril 3. Suero B9-16; Carril 4. Suero B9-15; Carril 5. Suero B9-09.

DISCUSIÓN

14

El ácaro *B. tropicalis* ha sido identificado como un factor de riesgo importante para la sensibilización alérgica en zonas de clima tropical y subtropical^{18, 19, 20}. Un estudio realizado en la ciudad de Taipei, Taiwan, con 142 escolares alérgicos, mostró una respuesta IgE positiva del 84,63% a *B. tropicalis*, determinada por ELISA²¹; en Tailandia, una investigación con 84 voluntarios

pediátricos mostró que 24 de ellos presentaban sensibilización a *B. tropicalis*²². Otros estudios realizados en Caracas (Venezuela) y La Habana (Cuba), demuestran que *B. tropicalis* es factor sensibilizante importante en pacientes diagnosticados con asma y/o rinitis alérgica^{23, 24}. En Colombia, estudios realizados con sujetos atópicos residentes en Cartagena, señalan que más del 80% presentan IgE específica positiva frente al ácaro *Blomia tropicalis*, determinada por “radio alergosorbent test” (RAST)²⁵. Los resultados de nuestro estudio muestran que la respuestas IgE anti- *B. tropicalis* en pacientes pediátricos asmáticos residentes en Santa Marta es alta (88%) y que la prevalencia de sensibilización es comparable con la observada en Cartagena. Los experimentos de Dot-Blot confirmaron la sensibilización a *B. tropicalis*, usando un extracto total de *B. tropicalis* preparado con ácaros aislados de la ácaro-fauna de Santa Marta. Estos extractos se constituyen en reactantes valiosos para la caracterización de las fracciones alérgicas mayoritarias de *B. tropicalis* en poblaciones sensibilizadas a los ácaros.

El Western Blot reveló un perfil complejo de fracciones alérgicas, destacándose 16 bandas con tamaños entre 21-80 kDa, rango en el que se encuentran algunos alérgenos importantes de *B. tropicalis* identificados en Colombia y otros países de clima tropical. En un estudio realizado con pacientes asmáticos de Cartagena se identificaron 25 fracciones alérgicas en un extracto de cuerpo entero de *B. tropicalis* con tamaños entre 11 a 85 kDa²⁶. La caracterización de estas fracciones mostró que una proteína de 14 kDa nombrada Blo t5, es el alérgeno mayoritario de este ácaro. Blo t 5 fue clonado y obtenido como proteína recombinante, siendo utilizado como reactivo para el diagnóstico *In vitro* de sensibilización a *Blomia* y para investigación básica^{27, 28, 29}. Otros alérgenos de *B. tropicalis*, de importancia médica son el Blo t1, Blo t4, Blo t11 y Blo t 13, cuyos pesos moleculares corresponden a 39, 59, 110 y 14,8 kDa, respectivamente^{30, 31, 32, 33, 34}.

Concluyendo, *B. tropicalis* es un factor sensibilizante relevante en la población pediátrica asmática de Santa Marta, razón por la cual debe incluirse en el diagnóstico de sensibilización alérgica. Adicionalmente, se hace necesario caracterizar las fracciones alérgicas mayoritarias de *B. tropicalis* y determinar su prevalencia en la población asmática residente en Santa Marta, con el propósito de establecer un grupo de alérgenos mayoritarios que permita implementar un diagnóstico más exacto de la sensibilización a los ácaros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pawankar R, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Canonica GW, Cruz AA, Kaliner MA, et al. State of World Allergy Report 2008: Allergy and Chronic Respiratory Diseases. WAO Journal 2008; Supplement: S4-S17.
2. Mallol J, Solé D, Asher I, Clayton T, Stein R, Soto-Quiroz M. Prevalence of asthma symptoms in Latin America: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Pulmonol*. 2000; 30(6):439-44.
3. Dennis R, Caraballo L, García E, Caballero A, Aristizabal G, Córdoba H, et al. Prevalencia de asma y otras enfermedades alérgicas en Colombia. Resultados preliminares en Santa Fe de Bogotá. *Rev Colomb Neumol*. 1999; 11: 13-23.
4. Vilorio L, Villegas A, Badiel M, Herrera S. Asma y Rinitis Alérgica en Preescolares en Cali. *Colombia Médica*. 2003; 34(1): 1-5.
5. Roche N, Chinet TC, Huchon GJ. Allergic and nonallergic interactions between house dust mite allergens and airway mucosa. *Eur Respir J*. 1997; 10: 719-26.
6. Global strategy for asthma management and prevention (updated 2006): Global Initiative for Asthma (GINA). URL: <http://www.ginasthma.org>.
7. Hong CS, Park HS, Heon Oh S. *Dermatophagoides farinae*, an important allergenic substance in Buckwheat- Husk Pillows. *Yonsei Medical Journal*. 1987; 28 (4): 274-81.
8. Fernández - Caldas, E. Annual Meeting of the Aragonese Society of Allergology: First Main Subject: Biodiversity of Dust Mites in Allergologic Pathology: Mites and their Allergens. *Allergology and Immunology Clinical*. 1999; 14 (6):410-46.
9. Henszel L, Kuzna-Grygiel W. House dust mites in the etiology of allergic Diseases *Ann Acad Med Stetin*. 2006; 52(2):123-7.
10. Milián E, Díaz AM. Allergy to house dust mites and asthma. *P R Health Sci J*. 2004; 23(1):47-57.
11. Mulla S., Sánchez-Medina M. Ácaros en Colombia: Bionomía, Ecología y Distribución. Su importancia en las Enfermedades Alérgicas, 1 ed., Guadalupe Ltda., (1980), p. 17 - 158.
12. Fernández-Caldas, E.; Puerta, L.; Mercado, D.; Lockey, R. F.; Caraballo, L. Mite fauna, Der pI, Der fl y *Blomia tropicalis* Allergens levels in tropical environment: Clinical and Experimental Allergy. 1993; 23: 292-7.
13. Rodríguez S, Rivera I, Castellar A, Navarro J, Mendoza D, Blanco P. Asma alérgica, niveles de IgE y exposición a los ácaros del polvo casero en el municipio de Santiago de Tolú, Colombia. *Duazary*. 2006; 1(2):11-17.
14. Meza J, Mendoza D, Mercado D. Identificación de Ácaros del polvo casero en colchones y almohadas de niños alérgicos de Santa Marta, Colombia. *Duazary* 2008; 5(1): 23-30.
15. Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TA. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*. 1981; 289(5798): 592-3.
16. Jiménez S, Puerta L, Mendoza D, Chua KY, Mercado D, Caraballo L. Antibody Responses to Recombinant Allergens of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in a Tropical Environment. *Allergy Clin Immunol Int J World Allergy Org*. 2007; 19:233-38.
17. Yi FC, Chew FT, Jiménez S, Chua KY, Lee BW. Culture of *Blomia tropicalis* and IgE immunoblot characterization of its allergenicity. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1999; 17(3):189-94.
18. Caraballo L, Puerta L, Fernández-Caldas E, Lockey RF, Martínez B. Sensitization to mite allergens and acute asthma in a tropical environment. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1998; 8(5): 281-4.
19. Puccio FA, Lynch NR, Noga O, Noda A et al. Importance of including *Blomia tropicalis* in the routine diagnosis of Venezuela patients with persistent allergic symptoms. *Allergy*. 2004; 59: 753-57.
20. Meng-Kung Yu, Ching-Yuang Lin, Woan-Ling Chen, Ching-Tung Chen. Prevalence of *Blomia tropicalis* in wheezing children in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008; 41:68-73.
21. Wan KS, Yang W, Wu WF. A survey of serum specific-IgE to common allergens in primary school children of Taipei City. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2010; 28(1):1-6.
22. Daengsuwan T, Lee BW, Visitsuntorn N, Charoenratanakul S, Ruangrak S, Jirapongsananuruk O, et al. Allergen sensitization to aeroallergens including *Blomia tropicalis* among adult and childhood asthmatics in Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2003; 21(4):199-204.
23. Sánchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F, Fernández-Caldas E. Mite and cockroach sensitization in allergic patients from Caracas, Venezuela. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003; 90(6):664-8.
24. Almarales RL, Castelló MA, Díaz MR, Canosa JS, Gómez IG, León MG, et al. Sensitization to three species of mites in allergic patients from the coastal area of Havana city. *Rev Alerg Mex*. 2009; 56(2):31-5.
25. Puerta L, Fernández-Caldas E, Jockey R, Caraballo L. Mite allergy in the tropics: sensitization to six domestic mites species in Cartagena, Colombia. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 1993; 3: 198-204.
26. Caraballo L. Caracterización inmunoquímica y molecular de los alérgenos de *Blomia tropicalis*, un

- ácara causante de asma en el trópico. Rev Acad Colomb Cienc. 1999; 23 (88): 433-43.
27. Caraballo L, Mercado D, Jiménez S, Moreno L, Puerta L, Chua KY. Analysis of the cross-reactivity between BtM and Derp 5, two group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus*. Int Arch Allergy Immunol. 1998; 117:38-45.
 28. Yi FC, Shek LP, Cheong N, Chua KY, Lee BW. Molecular cloning of *Blomia tropicalis* allergens--a major source of dust mite allergens in the tropics and subtropics. Inflamm Allergy Drug Targets. 2006; 5(4):261-6.
 29. Tsai JJ, Yi FC, Chua KY, Liu YH, Lee BW, Cheong N. Identification of the major allergenic components in *Blomia tropicalis* and the relevance of the specific IgE in asthmatic patients. Ann Allergy Asthma Immunol. 2003; 91(5):485-9.
 30. Fonseca L, Díaz AM. IgE reactivity from serum of *Blomia tropicalis* allergic patients to the recombinant protein Blo t 1. P R Health Sci J. 2003; 22(4):353-7.
 31. Chua KY, Cheong N, Kuo IC, Lee BW, Yi FC, Huang CH, Liew LN. The *Blomia tropicalis* allergens. Protein Pept Lett. 2007; 14(4):325-33.
 32. Cheong N, Ramos JD, Tang CY, Chng HH, Yao R, Liang Z, Lee BW, Chua KY. Mite amylase from *Blomia tropicalis* (Blo t 4): differential allergenicity linked to geographical regions. Int Arch Allergy Immunol. 2009; 149(1):25-32.
 33. Ramos JD, Teo AS, Ou KL, Tsai LC, Lee BW, Cheong N, Chua KY. Comparative allergenicity studies of native and recombinant *Blomia tropicalis* paramyosin (Blo t 11). Allergy. 2003; 58(5):412-9.
 34. Caraballo L, Puerta L, Jiménez S, Martínez B, Mercado D, Avjiouglu A, Marsh D. Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. Int Arch Allergy Immunol. 1997; 112(4):341-7.