

Producción de extractos alérgicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* utilizando medios de cultivo de origen vegetal para su utilización en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad alérgica

Ana María García Redondo¹, Alejandro Martín Palacios², David Rodríguez Gil²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Departamento I+D, Laboratorios de Diagnóstico y Aplicaciones Terapéuticas, S.A., Avda. Gregorio Peces Barba, 2, Leganés, Madrid, España.

Resumen

La alergia es un problema a nivel mundial, que afecta cada vez a un número mayor de personas, una de las más comunes es la alergia al polvo doméstico, donde los ácaros tienen un papel fundamental. *Dermatophagoides pteronyssinus* es el principal causante de estas alergias ya que está presente en la mayoría de hogares europeos. Las vacunas existentes hasta ahora se han desarrollado a partir de ácaros que crecen en medios de cultivo que pueden contener alérgenos o derivados animales, causa por la cual se pueden originar reacciones de hipersensibilidad a los alérgenos presentes en estos medios. El objetivo de este trabajo es desarrollar un medio de cultivo nuevo, de origen vegetal, que no contenga alérgenos distintos a los propios del ácaro

Palabras clave: alergia, ácaros del polvo doméstico, *Dermatophagoides pteronyssinus*, medio de cultivo vegetal.

Cita: Ana María García Redondo, Alejandro Martín Palacios, David Rodríguez Gil (2014) Producción de extractos alérgicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* utilizando medios de cultivo de origen vegetal para su utilización en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad alérgica. *Dianas* 3(1): e20140913. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140913 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 27 de junio de 2014

Copyright: © 2014 Ana María García Redondo et al.

Este es un artículo open-access distribuido bajo licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: agredondo@yahoo.es



Introducción

La alergia afecta a un 15-20% de la población mundial [1], pudiendo llegar a ocasionar muchas complicaciones y molestias en la población según la OMS [2]. Su incidencia en la población adulta española es de un 21.6%, más frecuente en mujeres y en los núcleos urbanos [3]. Una de las alergias más comunes es la producida por el polvo doméstico, donde los ácaros tienen un papel fundamental. En 1698, Floyer indicó que la inhalación del polvo era uno de los principales factores desencadenantes de esta patología. Son habituales en la mayoría de las viviendas ya que se encuentran en camas, alfombras y polvo del suelo [1].

Reacciones de hipersensibilidad y alérgenos

La hipersensibilidad es una respuesta desmesurada o incorrecta de la inmunidad adquirida o específica contra sustancias inocuas. Las sustancias que desencadenan la reacción alérgica se llaman alérgenos [7]. En la alergia, la predisposición genética es un condicionamiento muy importante, pero si no existen una serie de contactos con alérgenos de una duración mínima, la enfermedad no se desarrollará. No todos los alérgenos son reconocidos con la misma frecuencia o intensidad por todos los individuos sensibilizados, los alérgenos mayores son aquellos que son reconocidos por más del 50% de una población de pacientes sensibles al extracto al cual pertenece el alérgeno [2]. Que sea alérgeno mayor no implica que sea el mayoritario. [8]

Los ácaros son animales presentes en la atmósfera, que penetran en el organismo por vía respiratoria y provocan asma, dermatitis y rinitis. [1, 2, 3, 9]. Sus alérgenos tienen una estructura similar y debido a ello pueden darse casos de reacciones cruzadas, por lo que, alérgenos de diferentes especies pueden desencadenar una misma respuesta inmune. [9,11]

El tratamiento de elección de la alergia se basa en la evitación del alérgeno mediante la educación del paciente y el tratamiento farmacológico. Si ninguna de estas opciones fuera suficiente, se recomendaría la

inmunoterapia con alérgenos. [12]. La inmunoterapia consiste en la administración de vacunas de extractos alérgicos, intentando modificar o regular la respuesta inmune de la alergia.

Dermatophagoides pteronyssinus

Dermatophagoides pteronyssinus, es el causante de la mayoría de las alergias al polvo doméstico, afectando a un 15-20% de la población. Se alimenta sobre todo de escamas humanas u organismos presentes en colchones, sofás y alfombras [4]. Las condiciones óptimas para el crecimiento del *D. pteronyssinus* varían entre 25-30°C de temperatura y 75-80% de humedad relativa. La humedad es el factor climático que más limita el crecimiento y ciclo de vida de los ácaros, por ello se ven limitados a hábitats húmedos [6,16]. Se han caracterizado aproximadamente 17 alérgenos, aunque los principales y en los que nos vamos a centrar son Der p 1 y Der p 2 con un peso molecular de 24 kDa y 15 kDa respectivamente [25]. Un detallado análisis proteómico revelará que los extractos generados bajo unas condiciones determinadas no contienen alérgenos del medio de cultivo y que los alérgenos mayores de los ácaros del polvo doméstico se encuentran entre las proteínas del extracto *D. pteronyssinus*. [15]

Materiales y métodos

Cultivo de ácaros

Los ácaros fueron cultivados en un medio de cultivo compuesto por levadura de cerveza (*S.cerevisae*) y Hesperidina a partes iguales de la siguiente manera:

Preparación del medio de cultivo

Se usaron matraces Erlenmeyer de 50 ml a los cuales se les colocó un tapón de celulosa que permite el intercambio gaseoso con el exterior. Los matraces se esterilizaron en autoclave Telstar a 121°C, 20 minutos. Se pesó a partes iguales la levadura de cerveza y la hesperidina en una balanza AND GH-300 y se trituró en un molinillo ultracentrífugo Retsch ZM200 a 8000 rpm utilizando una criba de acero de 80µm de luz de malla. El medio de cultivo, una vez triturado fue sometido a un ciclo de calor seco de 2 horas a 80°C en el horno Telstar HED 0.25D.

Inoculación de los cultivos

Previamente a la inoculación de las cepas de referencia, los medios de cultivo fueron acondicionados en condiciones de temperatura y humedad relativa fijadas según el cultivo y desarrollo de los ácaros [5, 6]. El inóculo de referencia para iniciar el nuevo cultivo fue *D. pteronyssinus*. En campana se añadieron 5 g del inóculo de referencia a 25 g de medio de cultivo en frasco Roux de 500 ml, se homogeneizó cuidadosamente y repartió el contenido a lo largo del frasco. Las condiciones de cultivo fueron de 25±2°C y 75±5% de humedad relativa. [6]. Semanalmente, se aireó el cultivo y se observó bajo la lupa estereoscópica Euromex XE1671 para comprobar el estado de los mismos y la evolución del cultivo.

Cuantificación de los cultivos

Tanto el recuento de ácaros vivos como de ácaros muertos se realizó bajo la lupa estereoscópica, pesando entre 40-100 mg del cultivo. El recuento de ácaros vivos, tanto adultos como ninfas y larvas, se realizó retirándose del medio con una aguja enmangada y depositándolos en un eppendorf con alcohol 70° para su montaje posterior. Los ácaros muertos se cuantificaron añadiendo Azul de lactofenol. El resultado de ambos contajes se expresó en nº ácaros /g.

Purificación de materia prima de ácaros

La purificación de los ácaros del medio de cultivo, previamente congelado a -32°C, se realizó mediante tamización. Para realizar la purificación, usamos la tamizadora CISA BA200N con un ciclo de 40 minutos con aire comprimido usando tamices Filtra (Diámetro 200) de 400, 200, 125 y 75 µm, 7 segundos agitando y 3 en reposo y una amplitud de 2 cm. Tras este ciclo se recogió la fracción de 400 µm y se le aplicó 1 ciclo de 5 minutos con dos tamices de 400 y 200 µm, sin aire, 7 segundos agitando y 3 en reposo, una amplitud de 1 cm y 3 ciclos en las mismas condiciones anteriores, recogiendo siempre la fracción de 400 µm. La materia prima purificada se pesó al final de cada ciclo de purificación y se congeló a -32°C hasta su posterior procesado.

Montaje de las preparaciones de ácaros e identificación

Previamente al montaje se mantuvieron los ácaros en un eppendorf con etanol 70°, al menos 1 semana, para eliminar partículas adheridas y aumentar la transparencia del ácaro. Bajo la lupa estereoscópica y con ayuda de una aguja enmangada, se seleccionaron los ácaros, y se colocaron en un portaobjetos que

contenía una gota de líquido de Hoyer [18] en su superficie y se colocó el cubreobjetos. Se dejó secar antes de proceder a su visualización.

Control de calidad

Determinación de la Humedad relativa

Se determinó la humedad relativa de los medios de cultivo horneados según el método de Karl-Fischer, basado en la reacción que el dióxido de azufre y el yodo realizan con el agua. La medida se realizó en un coulómetro Mettler Toledo C20, se añadiéndose 10 mg de muestra al vaso de valoración. El resultado se expresó en % de humedad relativa contenido en la muestra.

Determinación del contenido proteico de la muestra

Se realizó mediante la técnica de Bradford [19] midiéndose a una $\lambda = 595\text{nm}$ en el espectrofotómetro Biotek Powerwave XS2. Se elaboró una curva patrón por triplicado con BSA a 1mg/ml de concentración en agua pura. El rango de concentraciones usado fue de 2-10 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras a analizar fueron diluidas previamente a una concentración de 40 mg/ml en agua pura. Se usó como blanco reactivo de Bradford. Se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de las muestras. Cada muestra se analizó por triplicado. Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en la curva patrón de BSA para obtener las concentraciones de proteína de las muestras problema expresadas en mg proteína/g.

Identificación de alérgenos

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page)

Se empleó el método Laemmli (1970) con ligeras modificaciones introducidas por los fabricantes de los equipos de electroforesis utilizados (Mini-Protean II, Bio-Rad). Las muestras se analizaron a una concentración de 0.5 μg de proteína por calle. Se mezclaron 80 μl de muestra+20 μl de tampón de muestra, se calentó 5 minutos a 100° C y, tras su enfriamiento, se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos y a 4° C en la centrifuga Centrifuge 5415R (Eppendorf).

Se cargaron 2 μl de patrón de pesos moleculares y 10 μl de muestra por pocillo en un gel de agarosa 12,5%. La electroforesis se desarrolló a 200 V durante 45 minutos en una cubeta de electroforesis conteniendo tampón de electroforesis.

Tinción de plata

Los geles se colocaron en una placa Petri con fijador de plata durante 30 minutos en agitación suave, se lavaron 2 veces durante 10 minutos con agua pura y se añadió la tinción de plata. Tras 8-10 minutos manteniendo el gel en oscuridad y en agitación suave, se paró la reacción con ácido acético 7% durante 5 minutos. Se lavó finalmente con agua pura, manteniendo el gel en estas condiciones hasta su revelado en el transiluminador BioRad ChemiDoc XRS+.

Western-blot

Las proteínas separadas previamente por SDS-Page, se transfieren a una membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF de Trans-Blot Turbo, BioRad). La transferencia se realizó a 2.5 V (para dos geles) durante 7 minutos en el BioRad Trans-blot Turbo. Se bloqueó la membrana durante 1 hora en tampón PBS-T 0.5%, después se incubó toda la noche con el suero humano de pacientes sensibilizados a D. pteronyssinus diluido 1:1000 en PBS-T 0.5% a 4° C. La membrana se lavó con PBS-T 0.05% 4 veces durante 5 minutos. Finalmente se incubó con anticuerpo de ratón anti- IgE humano conjugado con peroxidasa (Mouse antiHuman IgE (Fc)-HRP; Clone B3102E8, Southern Biotech) a dilución 1:1000 durante 2 horas. Tras el lavado y añadir los reactivos de revelado Western Lightning Plus-ECL (Luminol Reagent y Oxidizing Reagent, 1:1), se procedió al revelado en el transiluminador BioRad ChemiDoc XRS+. Todo el proceso se realizó en agitación constante y temperatura ambiente salvo especificación concreta.

Se cargaron 2 μg prot/calle de los diferentes sueros de pacientes sensibilizados a D. pteronyssinus (dilución 1:1000), Phleum pratense (1:10), cítricos (1:10), naranja (1:25) y vino (1:10). Además se cargó un control positivo frente a D. pteronyssinus.

La obtención y tratamiento de las imágenes obtenidas mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western-blot se realizó con el programa informático Quantity One de Bio-Rad.

Detección de actividades enzimáticas

Se usó el sistema de detección Api-Zym®, según las recomendaciones del fabricante. Es un método semi-cuantitativo de detección de actividades enzimáticas. Se analizó el medio HL T80 como valor enzimático basal y las muestras que hemos ido recogiendo semanalmente.

Ensayo de ELISA

La materia prima estuvo en agitación entre 48 y 72 horas en cámara fría, después se realizó la dilución correspondiente para conseguir una concentración de 1 mg/ml.

Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente, tras cada paso del proceso se lavó la placa con PBS-T 0.05%, las diluciones se realizaron en BSA 1% en PBS-T 0.05%. El volumen de reacción en el ELISA de cuantificación son de 100 µl /pocillo y en la inhibición de 50 µl /pocillo.

ELISA cuantificación

Se utilizó para determinar qué cantidad de alérgenos mayores de *D. pteronyssinus* (Der p 1 y Der p 2) están presentes en la muestra de materia prima. (Se realizó el ensayo para cada alérgeno por separado).

Se prepararon las muestras a varias diluciones entre 1/4 y 1/64. La recta patrón se realizó usando el standard del grupo I a 250 ng/ml) y del grupo II a 100ng/ml para la primera concentración de cada recta patrón. Cada placa se activó con anticuerpo monoclonal anti Der p 1 y anticuerpo monoclonal anti Der p 2, respectivamente, diluido en tampón carbonato/bicarbonato sódico pH 9.6 a una dilución 1:1000 incubando la placa a 4°C toda la noche. Tras el lavado, se bloqueó la placa con BSA al 1% en PBS-T al 0.05% durante 30 minutos.

Tras lavar la placa, se añadieron las muestras y las rectas patrón, incubándose 1 hora. Tras el posterior lavado, se incubó la placa con el anticuerpo biotinilado (Anti Der p 1 mAb Bo 1 y Anti Der p 2 mAb Bo 2, dilución 1:1000) durante 1 hora.

Los valores de absorbancia de la muestra, se interpolaron en la curva patrón, obteniendo así la concentración de alérgenos mayores de grupo I y II presentes en la muestra.

ELISA inhibición

Se utilizó para medir la actividad alérgica de la materia prima de *D. pteronyssinus*. La muestra se diluyó a 500 µg/ml y se hicieron diluciones seriadas 1/2 hasta 7,81 µg/ml.

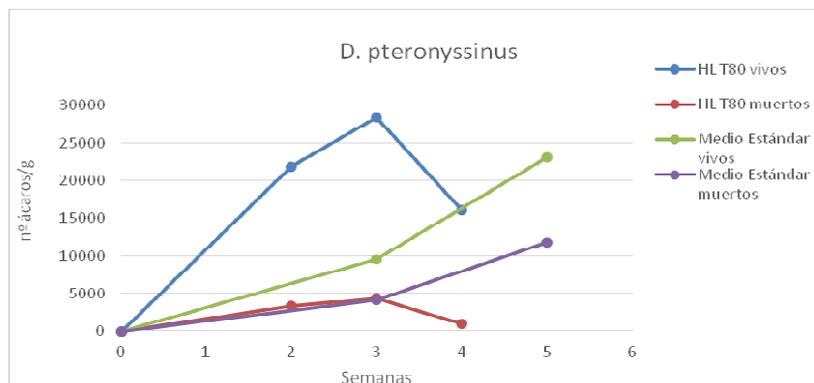
La placa se activó con extracto de referencia de *D. pteronyssinus* a 250 µg/µl en tampón carbonato/bicarbonato sódico pH 9.6 y se incubó a 4°C toda la noche. Tras el lavado, se bloquea la placa con 200 µl/pocillo con BSA 1% en PBS-T 0.05% durante 1 hora.

Las muestras se prepararon incubando 100 µl de la dilución correspondiente con 100 µl del suero humano (diluido previamente a razón de 1:8) durante 1 hora en rotación. El control positivo que se usó fue el suero + BSA y el control negativo fue únicamente BSA.

Tras lavar la placa, se añadieron las diluciones por triplicado y se incubó 2 horas. Después de volver a lavar, se añadió el Anti-IgE (Operón 1:1000) y se incubó 30 minutos. Al volver a lavar la placa, se incubó 30 minutos con el anticuerpo α-IgG (Anti-ratón de Sigma, dilución 1:500). Al volver a lavar la placa, se incubó 30 minutos con Streptavidina-peroxidasa a 1 mg/ml (1:250). Finalmente, tras lavar la placa, se añadió H₂O₂ en ABTS (1:1000). La reacción se visualizó a 405 nm en el LabSystems Multiscan Ascent La actividad alérgica fue calculada en base a su Ag50.

Resultados

Crecimiento de *D. pteronyssinus* en medio compuesto por Hesperidina y Levadura de cerveza



Gráfica 1. N° de ácaros/g vivos según cultivo

En la gráfica 1 podemos ver como se desarrolló el crecimiento del cultivo en medio HL T80 comparado con un cultivo en medio estándar durante varias semanas. El valor máximo obtenido para el cultivo en medio HL T80 fue de 28428 vivos y 4340 ácaros muertos a las 4 semanas. Mientras que el cultivo en medio estándar a las 5 semanas presentaba 23088 vivos y 11765 muertos. Podemos observar cómo el

número de ácaros del medio HL T80, tanto vivos como muertos, desciende tras la cuarta semana. El cultivo crecido en medio HL T80 alcanza un número mayor de vivos que el crecido en medio estándar, mientras que los muertos tienen un número similar.

Purificación de materia prima de ácaros

La purificación se realizó en varios días y se obtuvo una pureza del 81,25%, frente al 90% de pureza de la materia prima estándar. El rendimiento medio fue de 9-10% y cantidad total 70 g, siendo en medio estándar algo inferior en ambos casos. (Imagen 1a)

Montaje de las preparaciones de ácaros e identificación

Todos los ácaros utilizados fueron identificados como pertenecientes a la especie *D. pteronyssinus* (Imagen 1b)

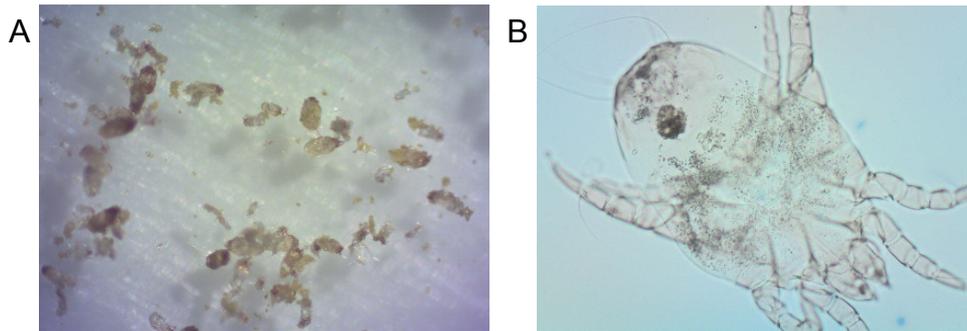


Imagen 1 A.- Materia prima de *D. pteronyssinus* tras su tamización, vista bajo lupa estereoscópica. B.- *D. pteronyssinus*, microscopio 10X

Control de calidad

Determinación de la Humedad relativa

Nuestro medio de cultivo presentó una humedad del 4.52%, siendo la humedad relativa máxima permitida para el medio estándar de un 10%, pudiendo comprobar así que nuestro medio de cultivo está dentro de especificaciones.

Determinación del contenido proteico de la muestra

Se obtuvo una concentración de proteína de 4.593 mg prot/g para el medio de cultivo HL T80. Este valor es inferior al obtenido en los medios usados anteriormente (7,902 mg prot/g medio de cultivo).

En el caso de la materia prima de *D. pteronyssinus* se obtuvo un valor de 5.032 mg prot/g materia prima. El contenido en proteínas es inferior a lotes anteriores del mismo ácaro purificado crecido en medio estándar (13,531mg/g materia prima).

Identificación de alérgenos

SDS-Page

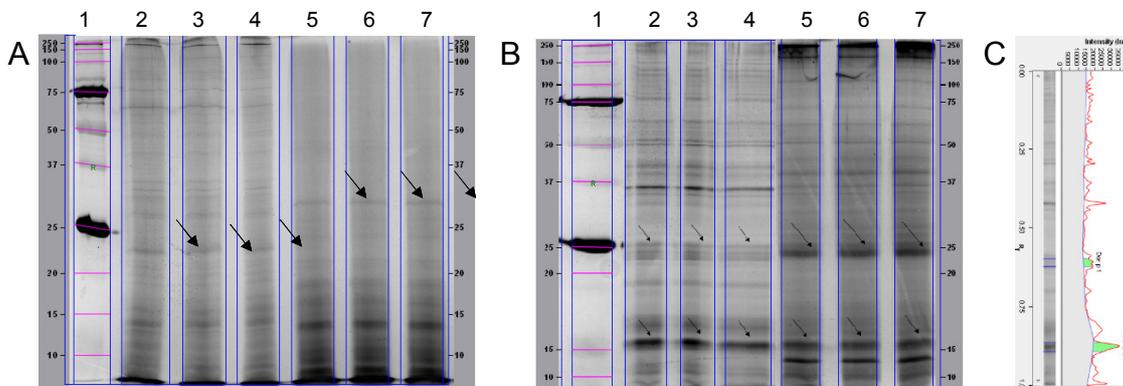


Fig. 1. A.- SDS-PAGE teñido con plata, standard (1), medio estándar 2 µg prot/calle (2-4), medio HL T80 2 µg prot/calle (5-7). B.- SDS-PAGE teñido con plata, standard (1), *D. pteronyssinus* materia prima 0.5 µg prot/calle (2-4), *D. pteronyssinus* 002-12 SAP 0.5 µg prot/calle (5-7) C.- Perfil *D. pteronyssinus* HLT80 MMP 0.5 µg prot/calle

Tinción de plata (HL T80 y *D. pteronyssinus* HL T80)

Las muestras del medio de cultivo HL T80 y estándar fueron cargadas en un SDS-PAGE y teñidas con tinción plata, apareciendo una banda a 30 kDa en el medio nuevo y estando ausente la de 20 kDa con respecto al medio de cultivo estándar. (Figura 1a)

Las muestras de la materia prima crecida en medio de cultivo HL T80 y crecida en PL T80 fueron cargadas en un SDS-PAGE y teñidas con tinción plata, apareciendo las bandas características correspondientes a Der p 1 y Der p 2 en las muestras de los diferentes medios de cultivo. (Figura 1b y 1c)

Western-blot

Se enfrentó el medio de cultivo HL T80 a sueros de pacientes sensibilizados a diferentes alérgenos (Fig. 2). No se obtuvieron bandas significativas ni pertenecientes a alérgenos.

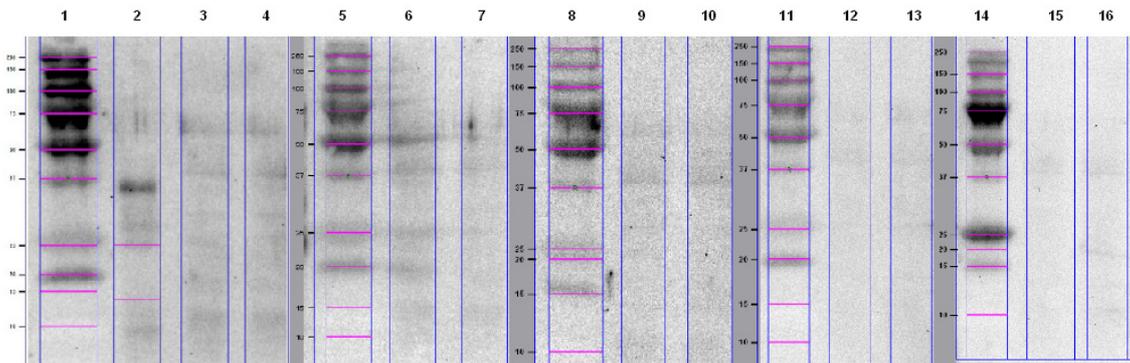


Fig. 2. Western-blot HL T80 vs *D. pteronyssinus*, standard (1, 5, 8, 11 y 14), *D. pteronyssinus* 002-12 SAP 2 µg prot/calle (2), HL T80 (3-4). Western-blot HL T80 vs *Phleum pratense*, HL T80 2 µg prot/calle (6-7). Western-blot HL T80 vs Citricos, HL T80 2 µg prot/calle (9-10), Western-blot HL T80 vs Naranja, HL T80 2 µg prot/calle (12-13), Western-blot HL T80 vs vino, HL T80 2 µg prot/calle (15-16).

Se realizó un Western-blot a la materia prima obtenida de medio de cultivo HL T80 comparándola con la obtenida en medio de cultivo estándar. Se comprobó que aparecían los alérgenos mayores en ambos cultivos. Se pueden apreciar las bandas características de los alérgenos mayores Der p 1 y Der p 2 con un peso molecular de 24 kDa y 15 kDa, respectivamente (Fig. 3).

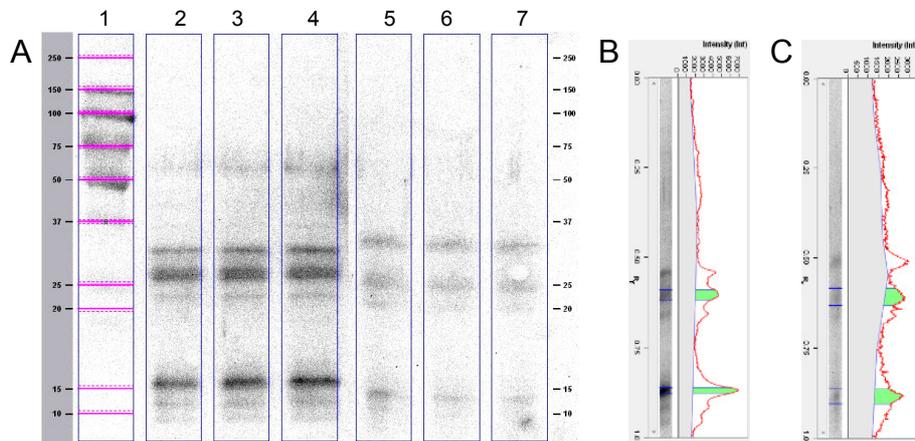


Fig. 3. A.- Western-blot *D. pteronyssinus* materia prima 2 mg prot/calle (2-4), *D. pteronyssinus* 002-12 SAP 2 mg prot/calle. (5-7) B.- Perfil cromatográfico de *D. pteronyssinus* materia prima 2 mg prot/calle. C.- Perfil cromatográfico de *D. pteronyssinus* 002-12 SAP 2 mg prot/calle.

Detección de actividades enzimáticas

El medio de cultivo posee una actividad enzimática basal. El medio de cultivo en la semana 1 presenta una actividad esterasa, leucina arilamidasas, fosfatasa ácida y la β -galactosidasa. En la semana aparece la actividad de la N-acetil- β -glucosaminidasa, α -mannosidasa y α -fucosidasa.

Al realizar el mismo ensayo al *Lepidoglyphus destructor*, otra especie de ácaro diferente, vemos diferencias en dicho perfil enzimático. En este caso se diferencia en que posee actividad enzimática fosfatasa alcalina al inicio del cultivo y leucina arilamidasas, tripsina y β -galactosidasa cuando el cultivo está maduro.

Ensayo de ELISA

ELISA cuantificación

La cantidad de alérgenos mayores de la materia prima crecida en medio HL T80 fue comparada con la obtenida del medio estándar. (Límite Der p 1: 0,157- 0,628 µg/ml, límite Der p 2: 0,502 - 2,008 µg/ml). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

| | ng/ml | µg/ml | | ng/ml | µg/ml |
|-----------------------|--------|-------|-----------------------|--------|-------|
| Der p 1 patrón | 249,5 | 0,25 | Der p 2 patrón | 794,18 | 0,794 |
| Der p 1 MPP | 279,15 | 0,279 | Der p 2 MPP | 664,85 | 0,665 |

Tabla 1: Cantidad de alérgenos de Der p 1 y Der p 2 de *D. pteronyssinus* y una muestra patrón.

ELISA inhibición

La potencia alergénica de la materia prima crecida en medio HL T80, expresada como Ag50, fue de 76,712 µg de materia prima/ml.

Discusión

Para la producción de extractos alergénicos destinados al diagnóstico y tratamiento específico de la alergia es imprescindible el cultivo de los ácaros en condiciones óptimas [5], por lo que cualquier contaminación con agentes infecciosos, material humano o animal, hace que no se pueda utilizar con el fin de producir extractos para su uso in vivo en humanos [15]. Según la EMA, el extracto alergénico es de origen biológico natural, contiene una mezcla de moléculas alergénicas y no alergénicas y es administrado para el diagnóstico y tratamiento de la alergia y las enfermedades alergénicas [13], además, los medios de cultivo en los que se hacen crecer los ácaros para producir extractos alergénicos, deben ser preferiblemente sintéticos y estar libres de cualquier material derivado de animales y de posibles alérgenos. [14]

Hemos observado que el crecimiento de ácaros en el medio de cultivo nuevo es bueno, siendo superior el recuento de ácaros en la misma semana que el realizado en el medio estándar. Se apreció como en la cuarta semana de crecimiento el número de ácaros vivos y muertos disminuía, este dato no concuerda con el análisis visual realizado ni con el número de ácaros obtenidos tras la purificación. La posible causa de este dato inusual puede estar en que la muestra obtenida para realizar el conteo en la cuarta semana no fue representativa del estado del cultivo. Como hemos visto en este trabajo, la forma habitual de monitorizar los cultivos de ácaros es mediante el recuento de los ácaros tanto vivos como muertos, sin embargo, este método a veces ofrece datos erróneos, por ello se ha desarrollado un método complementario de monitorización de los cultivos basado en la determinación de la actividad enzimática del mismo. Mediante la presencia de actividad enzimática podemos determinar cuándo hay ácaros en el medio de cultivo y el cultivo está listo para ser purificado. La variación de la actividad enzimática que presenta nuestra materia prima a medida que el cultivo va madurando es característica de *D. pteronyssinus*, ya que al compararlo con *Lepidoglyphus destructor* podemos ver diferencias en el perfil.

En este trabajo hemos podido observar que el medio de cultivo nuevo es diferente al estándar, al presentar un perfil electroforético diferente, en nuestro medio nuevo aparece una banda a 30 kDa en lugar de la banda de 20 kDa que aparece en el medio de cultivo estándar. Con estos elementos diferenciadores podemos identificar ambos medios.

Hemos podido comprobar que el nuevo medio de cultivo está libre de alérgenos, ya que no reconoce las IgEs específicas de los pacientes sensibilizados a las principales fuentes alergénicas, como son los ácaros y el polen. Además, por la procedencia del medio de cultivo, se enfrentó al suero de pacientes sensibilizados a los cítricos y al vino, sin mostrar ninguna reactividad específica, ya que como hemos comprobado no aparecen bandas de fijación de IgE específica. De esta manera podemos decir que el medio de cultivo es seguro y no producirá reacciones cruzadas.

La materia prima obtenida presenta una cantidad de proteína menor que la obtenida en cultivos estándar, esto puede ser debido a que el cultivo se tamizó en una fase muy temprana y la cantidad de proteína en esa fase de desarrollo del ácaro no pueda ser comparada a los niveles de un cultivo maduro. Esto hace pensar que habría que dejar madurar más el cultivo para poder comparar niveles de proteína. La determinación del ácaro mediante microscopía nos hace estar seguros de que el cultivo no presenta contaminaciones de otras especies de ácaros ni hongos, tal y como recomienda la directriz EMA. Se optimizó el método de purificación con el nuevo medio hasta obtener una pureza de más del 80%, siendo las impurezas de origen vegetal por lo que no afectan a la calidad de la materia prima. Esta pureza es muy alta y comparable a la de cultivos con medios estándar. Con este método de purificación se han mejorado

también los rendimientos tras la tamización. Se ha confirmado que nuestra materia prima contiene los alérgenos mayores que producen mayor sensibilización en las personas alérgicas, ofreciendo valores de Der p 1 y Der p 2 prácticamente iguales a los de una materia prima validada, y siendo el perfil proteico general comparable a la de ésta. Por último se estableció un parámetro de potencia alérgica que servirá como referencia para los siguientes cultivos de *D. pteronyssinus* en este tipo de medios de cultivo.

En base a los resultados obtenidos podemos determinar que el medio de cultivo HL T80 mejora la calidad de la materia prima obtenida, en comparación con los medios de cultivos estándar, al no presentar componentes de origen animal y carecer de elementos potencialmente alérgicos, presentando así un nivel de seguridad superior al de los medios de cultivo estándar utilizados hasta ahora. Además podemos afirmar que la calidad del cultivo ha mejorado con respecto a los cultivos en medios estándar, en relación a los parámetros de pureza y rendimiento. Podemos además diferenciar una especie de ácaro de otra debido a su perfil enzimático complementado con el recuento de ácaros que se ha realizado de forma rutinaria. En este trabajo se han puesto apunto las técnicas básicas de control de calidad para asegurar la seguridad y calidad de la materia prima obtenida a partir del nuevo medio de cultivo para poder ser utilizada en la fabricación de tratamientos y diagnósticos de alergia.

Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a todos los componentes del departamento de I+D de los laboratorios Diater por toda la ayuda prestada en este proyecto y por todo el tiempo que me han entregado de forma gratuita, gracias a su confianza este proyecto se ha podido llevar a cabo.

Referencias

1. “Ácaros productores de alergia. Características generales y claves para su identificación”. 2007. Universidad del País Vasco. Facultad de Farmacia. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología.
2. Boquete, M. 2008. “Importancia clínica del ácaro del polvo *Chortoglyphus arcuatus* en Galicia” Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz, España. 116p
3. Gaig, P., M. Ferrer, D. Muñoz-Lejarazu, R. Lleonart, J.L. Garcia-Abujeta, T. Caballero, A. Rodriguez, S. Echechipia, C. Martinez-Cocera, F.J. Dominguez, M.A. Gonzalo y M. Olona. 2004. “Prevalencia de alergia en la población adulta española” *Allergol Immunol Clin*. 19:68-74
4. Herbosa, R.O. y M.M. García. 2008. “Alergias: Los ácaros del polvo doméstico” *Offarm*. 27[4]: 56-66.
5. Eraso, E., J. Martínez, A. Martínez, R. Palacios y J.A. Guisantes. 1997. “Quality parameters for the production of mites extracts” *Allergol Immunopathol (Madr)*. 25[3]: 113-7.
6. Pike, A. J., M.J. Cunningham y P.J. Lester. 2005. “Development of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) at constant and simultaneously fluctuating temperature and humidity conditions” *J Med Entomol*. 42(3):266-269
7. Abraham, M.R., D.B. Cambas y A. Simes. “Reacciones inmunitarias que involucran a la IgE” Cátedra nº 1 de fisiología Humana- Facultad de Medicina- Universidad Nacional del Nordeste.
8. Aalberse, R.C. 2000. “Structural biology of allergens” *J Allergy Clin Immunol*. 106 [2]:228-238.
9. Thomas, W.R. 2012. “House dust allergy and immunotherapy” *Hum Vaccin Immunother*.8:10, 1469-1478
10. Johnson, C.A. 1982. “House dust allergy” *Can. Fam. Physician*. 28:739-742.
11. Martínez, J., E. Eraso, R. Palacios y J.A. Guisantes. 2000. “Cross-Reactions between *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae) related to the different growth phases of cultures” *J Med Entomol*. 37[1]:35-39.
12. “Inmunoterapia con alérgenos: Vacunas terapéuticas para las enfermedades alérgicas”. 1997. Bousquet, J., Lockey, R. y Mailing, H.J., editores. Ginebra. Artículo de opinión de la OMS. 1-46
13. “Guideline on the clinical development of products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases”, Committee for medicinal products for human use. 2008. Londres, EMA.
14. “Guideline of allergen products: production and quality issues” Committee for medicinal products for human use. 2008. Londres. EMA.
15. Bataud, T., A. Hrabina, X.Z. Bi, H. Chabre, P. Lemoine, M.N. Couret, D. Faccenda, B. Villet, P. Harzic, F. André, S.Y. Gog, C. André, F.T. Chew y P. Moingeon. 2006. “Production and proteomic characterization of pharmaceutical-grade *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* extracts for allergy vaccines” *Int Arch Allergy Immunol*, 140:295-305.
16. Yella, L., M.S. Morgan y L.G. Arlian. 2011. “Population growth and allergen accumulation of *Dermatophagoides pteronyssinus* cultured at 20 and 25°C” *Exp Appl Acarol*. 53(2):103-19
17. Baker, E.W. y G.M. Wharton. 1952. “An introduction to acarology” *MacMillan Co.*, New York. 465p
18. Bradford, M. 1976. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Ann Biochem*, 72:248-254.
19. Hughes, A.M. 1976. “The mites of stored food and houses” *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Her Majesty's Stationary Office*. London.

20. Ottoboni, F. y G. Piu. 1990 “Gli acari allergenici. Guida al loro riconoscimento” *Utet*. Milán.
21. Fain, A., B. Guérin y B.J. Hart. 1990. “Mites and allergic disease” *Allerbio*, Varennes.
22. Rodríguez, D. 2013. “Desarrollo y evolución de medios de cultivo de ácaros domésticos exentos de carga alérgica y derivados animales” Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco, España. 128p
23. Eraso, E., J.A. Guisantes, J. Martínez, M. Saenz-de-Santamaria, A. Martínez, R. Palacios y R. Cisterna. 1997 “Kinetics of allergen expression in cultures of house dust mites, *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae* (Acari: Pyroglyphidae)” *J Med Entomol.* 34[6]:684-9.
24. Sánchez, J. 2002. “Control de ácaros contaminantes del jamón ibérico”. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria.
25. Allergen Nomenclature. IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee [base de datos en línea] World Health Organization and International Union of Immunological Societies.