

ESTUDIO MOLECULAR DE LA HIPERSENSIBILIDAD A ESPORAS EN CASTILLA Y LEÓN



**GRADO EN MEDICINA
TRABAJO FIN DE GRADO
2018**

**AUTORES: DANIEL MONTEJO DE GARCINI SOLÍS /
ÁNGEL MORAL DE LA AZUELA
TUTORA: DRA. ALICIA ARMENTIA MEDINA**

ESTUDIO MOLECULAR DE LA HIPERSENSIBILIDAD A ESPORAS EN CASTILLA Y LEÓN.

Alicia Armentia Medina, Ángel Moral, Daniel Montejo, Rubén Conde, Blanca Martín, Sara Fernández, Alfredo Corell*, Delia Fernández**

Sección de Alergia. Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. Universidad de Valladolid

*Departamento de Inmunología. Universidad de Valladolid

**Biodiversity and Environmental Management, University of León. León. Spain

⁷Institute of Atmospheric Sciences and Climate. National Research Council. Bologna. Italy

RESUMEN

Antecedentes

Los aerosoles biológicos juegan un papel vital en las interacciones entre la atmósfera, biosfera, clima y salud pública. Uno de sus componentes con gran importancia alergológica son las esporas de hongos.

Objetivo

Se centró en la generación de una base robusta de datos a nivel autonómico (Castilla y León) y un estudio a nivel molecular (microarrays) que completara el estudio de calidad de aire que desde 2006 se realiza por nuestra red aerobiológica (RECYL) con el fin de ayudar a precisar el diagnóstico clínico y posterior tratamiento.

Material y Métodos.

Revisamos una base de datos de 19774 pacientes con patología respiratoria alérgica atendidos en los últimos 12 años. Realizamos además diagnóstico molecular por microarrays de las moléculas implicadas en la patología en una población seleccionada aleatoriamente de 150 pacientes.

Resultados

La glicoproteína acídica Alt a 1 de *alternaria* es el alérgeno más prevalente en los pacientes alérgicos a hongos de nuestro área (94,4%), seguido de la enolasa (*alternaria*), la mitogilina (*aspergillus*) y manitol deshidrogenasa de *cladosporium*.

Conclusiones

Nuestros resultados han ayudado a determinar qué moléculas de esporas están más asociadas a patologías alérgicas. El análisis molecular será útil para decidir una inmunoterapia más precisa y útil en la curación de los pacientes afectados.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias transportadas por el aire, esporas de hongos, polen y otras biopartículas son esenciales para la reproducción y propagación de organismos a través de diversos ecosistemas, y pueden causar o amplificar enfermedades en humanos, animales y vegetales. Su interacción está implicada en patologías graves como asma, ictus, cardiopatía isquémica y cáncer (1). Los hongos pueden ser causantes de patología alérgica respiratoria, tanto de vías aéreas superiores como inferiores, en personas sensibles y de otra clínica alergológica como urticaria, dermatitis, neumonitis y alveolitis. Nuestro objetivo se centró en la generación de una base de datos a nivel autonómico, que ayudará a precisar el diagnóstico clínico y posterior tratamiento. Completamos el estudio de la calidad del aire, que en la parte de polen ya se lleva realizando desde el año 2006 (RECYL), y pretendimos evaluar datos fiables y asumibles por cualquier empresa interesada en el control biológico ambiental.

Con esta propuesta de trabajo, pretendimos lograr medios de prevención y tratamiento tras conocer la concentración de esporas de hongos y sus interacciones clínicas.

Los principales géneros que se habían definido como causantes de alergia en nuestra Comunidad (Castilla y León) eran *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*, siendo *Cladosporium* más frecuente en el norte y *Alternaria* en el área central, con cultivos de cereales y sobre todo en niños, los más frecuentemente implicados (4). La aparición de aerosoles de esporas de *Alternaria*, muy abundante en la atmósfera de Castilla y León, está asociada a las siegas y recolección de cereales, viticultura y a las recidivas de asma grave (3-8).

En trabajos recientes se ha comprobado que la prevalencia de alergia a hongos es mayor de lo que hasta ahora se pensaba y que los hongos, como causantes de asma bronquial y otras enfermedades del sistema respiratorio, podrían haber sido subestimados (9). Las esporas fúngicas se encuentran en el aire a concentraciones muy superiores a las de los pólenes y en muchos casos son más pequeñas que los granos de polen, pudiendo alcanzar así más fácilmente el tracto respiratorio inferior y producir asma (10). Aunque no se conoce exactamente la prevalencia de patología alérgica respiratoria por hongos, que varía mucho según los diferentes autores y sobre todo, en relación con la población analizada, según un estudio multicéntrico europeo promovido por el Subcomité de Aerobiología de la Academia Europea de Alergología en 1997, un 9,5% de los pacientes con sospecha de alergia respiratoria estaba sensibilizado a *Alternaria* y/o *Cladosporium*, siendo España el país donde la prevalencia fue mayor (20%) (2). Actualmente se considera que los hongos son la tercera causa más frecuente de patología alérgica respiratoria, tras los ácaros y los pólenes (2,3).

A pesar de su importancia dentro de los aeroalérgenos, los hongos son los que han creado más dificultades para su estudio, lo que ha traído como resultado la falta relativa de investigación y de trabajos publicados en este campo. El diagnóstico de alergia a hongos puede ser difícil de realizar, probablemente porque los extractos comerciales disponibles hasta el momento para procedimientos diagnósticos no eran muy eficaces, tendiendo a tener una baja actividad alérgica y gran variabilidad en su composición de lote a lote. La mayor parte de fracciones fúngicas inhaladas por los pacientes son esporas, aunque también se inhalan fragmentos de micelios, que habitualmente se prueban en prick. Con los hongos, a diferencia de con la mayoría de los restantes agentes etiológicos, no está claro cuál es la fuente original sensibilizante, si los micelios, las esporas o sus metabolitos, por lo que no está claro cómo se deben producir los extractos con actividad antigénica ni cómo son los métodos más adecuados para su estandarización. Además, existe una gran variabilidad antigénica en las cepas fúngicas (5,6,7). Por todo esto, la hipersensibilidad inmediata a hongos tiene importantes dificultades en el diagnóstico y aún más en el tratamiento específico mediante inmunoterapia (11). El análisis molecular con alérgenos recombinantes y nativos puede ser de gran ayuda para precisar el diagnóstico de hipersensibilidad y decidir una inmunoterapia más adecuada (12,13).

MATERIAL Y MÉTODOS

Población diana: Base de datos: 19774 pacientes atendidos desde 1987 en la Sección de Alergia del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid.

El protocolo fue evaluado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HURH.

El diseño del estudio fue exploratorio observacional de carácter transversal. Los pacientes diagnosticados de rinitis y/o asma por hongos procedieron de una base de datos de pacientes con esta etiología recogida durante 12 años (2006-2017) en el Servicio de Alergia del Hospital Universitario Río Hortega, al que se añadieron los nuevos casos que fueron apareciendo durante el tiempo que se realizó este proyecto. También se incluyeron pacientes con clínica alérgica tras el consumo de hongos y setas comestibles.

Se definió como asmático a todas las personas que sufren disnea por obstrucción variable del flujo aéreo sin otra causa demostrable o episodios de tos durante 3 noches consecutivas y trastornos del sueño desde los 6 meses de edad (Criterios ISAAC). La rinitis seguirá criterios ARIA. La sensibilización a hongos se definirá como la presencia de: a) una o más pruebas cutáneas positivas a algún hongo ambiental (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida* y *Mucor*, b) un CAP (IgE) positivo > 0,35 IU/mL a estos alérgenos o c) provocación específica positiva. El asma por hongos será definida por prick, IgE específica y criterios espirométricos. Se eligió como parámetro ambiental mensurable en los resultados de las anteriores pruebas a *Alternaria*, por ser ésta la espóra de más importancia alergológica en nuestra región. Se admite que todos los pacientes incluidos han sido expuestos a similares concentraciones de pólenes y polución y otros factores ambientales, gracias a los análisis de niveles de calidad ambiental que son enviados cada semana desde la Dirección de Salud Pública de la Consejería de Sanidad.

De la misma base de datos y con un fin comparativo se seleccionaron aleatoriamente 50 pacientes sensibilizados a polen de gramíneas por mecanismo mediado por IgE. Se les realizó encuesta clínico-epidemiológica que incluyó las características y origen de su hipersensibilidad, la posible aparición de asma grave (en niños se preguntará a sus padres), potencial implicación de órganos y sistemas y tratamiento requerido. El grupo control (concurrente) fue evaluado en el mismo periodo que el grupo de pacientes problema y, estuvo constituido por 50 personas sanas, no fumadores ni expuestos a tabaco, seleccionados de forma aleatoria por la Unidad de Hemodonación del SACYL.

Además, en el grupo control ninguno de ellos había tenido que acudir a consulta de Alergia.

Posteriormente realizamos análisis alérgico convencional y análisis molecular (component resolved diagnosis o CRDs) por técnica de microarrays ISAC® a diferentes moléculas ambientales, incluyendo moléculas alérgicas de hongos, en pacientes que firmaron su consentimiento informado, distribuidos en 3 grupos de pacientes y controles:

1. Pacientes con asma y/o rinitis alérgica por hongos (50 pacientes).
2. Alérgicos a pólenes de gramíneas (50 pacientes).
3. Controles población sana de Hemodonación (50 pacientes).

Cálculo del tamaño muestral: Aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral, se precisan 48 sujetos en cada grupo para detectar una diferencia mínima de 8 entre los dos grupos, asumiendo que existen 4 grupos y una desviación estándar de 10. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 20%.

Pruebas "in vivo":

Pruebas cutáneas: Se realizaron con técnica convencional de prick para el caso de alérgenos comercializados y con proteínas purificadas de esporas de hongos nativas y recombinantes DIATER. Para la realización de las pruebas de prick se procedió de acuerdo con las normas de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI), considerando positiva aquella prueba que produjo un habón cuyo diámetro mayor sea igual o superior a 3 mm. Cada alérgeno se probó por duplicado y los resultados se registraron en una hoja de recogida de datos para su posterior digitalización.

Extractos alérgicos: Batería estándar de aeroalérgenos y alimentos que incluyó pólenes (gramíneas, árboles, malezas y flores), ácaros (*Dermatophagoides* y de almacenamiento), hongos (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Candida*), antígenos animales y alimentos comunes: trigo, cebada, centeno, huevo, leche, legumbres, frutos secos, pescados, mariscos, *anisakis*, profilinas (ALK -Abelló, Madrid, España).

Pruebas "in vitro":

Técnicas de análisis molecular por microarrays o CRD ("component resolved diagnosis"):

Dentro de las moléculas alergénicas de hongos se cuantificaron las siguientes:

rAlt a 1: Glicoproteína acídica de *Alternaria*

rAlt a 6: Enolasa (relacionada con la hipersensibilidad a setas comestibles)

rAsp f 1: Mitogilina de *Aspergillus*

rAsp f 2: Proteína peroxisomal

rCla h 8: Manitol deshidrogenasa de *Cladosporium*

Además, se evaluó la respuesta a otras 112 proteínas de diferentes orígenes y se valoró la respuesta debida a reactividad cruzada con otros alérgenos vegetales (profilinas, CCDs, polcalcinas, etc..).

Análisis estadístico: Se compararon los grupos simultáneamente. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 15.0. Para analizar la asociación entre las variables del estudio se utilizó el test Chi-cuadrado de Pearson. En el caso de que el número de celdas con valores esperados menores de 5 fue mayor de un 20% se calculó mediante el test exacto de Fisher o Prueba de razón de verosimilitudes. Se realizó la prueba t de Student para muestras independientes en la comparación de los valores medios y cuando el número de grupos a comparar fue mayor se utilizó el ANOVA. Las alternativas no paramétricas utilizadas, en el caso de no ser conveniente la utilización de las anteriores, fueron la prueba U de Mann-Whitney (para dos grupos) o la prueba H de Kruskal Wallis (para más de dos grupos). En el análisis multivariante se ajustó un modelo de regresión logística multinomial.

Limitaciones del estudio: Nuestro estudio pretendió describir en un grupo de pacientes con asma y rinitis causado por inhalación de esporas la respuesta a distintos alérgenos moleculares, así como investigar la utilidad de las técnicas de diagnóstico empleados y, en su vertiente analítica, pretendió comparar los resultados entre los diferentes grupos. La validez y viabilidad de nuestro estudio podría haberse comprometido por el hecho de que sólo detectara posibles alérgenos causales en pacientes con trasfondo atópico, no siendo aplicable a patología respiratoria por otras causas. Tampoco podríamos determinar si la respuesta obtenida a un epítipo micótico tendría o no valor clínico, porque en pacientes alérgicos está descrita la sensibilización (subclínica), es decir, sin claro correlato de enfermedad, a diferentes alérgenos. Para ello habría que hacer un estudio de la evolución clínica de los pacientes una vez

detectado el posible hongo implicado y realizada una inmunoterapia específica precisa durante al menos 3 años, pero sería otro estudio posterior en los próximos años, una vez valorada la rentabilidad diagnóstica de las técnicas que vamos a emplear.

RESULTADOS:

Datos clínicos-aerobiológicos obtenidos de la base de datos de 19774 pacientes: La mayoría de pacientes alérgicos a hongos de nuestra base de datos presentan síntomas de modo perenne, aunque en la mayor parte de la Comunidad, la máxima concentración de esporas de *Alternaria* en el ambiente se produce durante los meses de verano, coincidiendo con el pico de sintomatología de estos pacientes. En nuestra zona, Valladolid y provincia, la máxima sintomatología correspondió a los meses de Julio, Agosto y Septiembre, solapado con la sensibilización a pólenes de gramíneas. Del total de pacientes estudiados en los últimos 12 años y recogidos en nuestra base de datos (19774), fueron diagnosticados de asma alérgico 6.025. De ellos, 1979 (32.84%) estaban sensibilizados a pólenes, 561 (9,31%) a ácaros y 701 (11.63%) a hongos. De las especies estudiadas, la que causó más sensibilizaciones clínicas fue *Alternaria* (387, 61.04%), seguido por *Aspergillus* (115, 18.13%) y *Penicillium* (46, 7.25%). Menos sensibilizantes fueron *Cándida* (29 pacientes) y *Mucor*, sólo 1 paciente monosensibilizado, que vivía en un pinar. Este hongo perfora y se nutre habitualmente del polen de pino.

La patología más frecuente fue la rinitis y asma conjunta (269), rinoconjuntivitis (203) y asma aislado (143). Otras patologías alérgicas menos frecuentes fueron por orden de frecuencia la urticaria (50), conjuntivitis (22) dermatitis atópica (13), y un caso de anafilaxia por ingesta de alimentos contaminados por *Penicillium*, un niño por ingesta de *pleurotus* y una mujer por champiñón y shitakee.

Resultados del estudio molecular: Se realizó finalmente un estudio molecular a 145 pacientes (50 sanos, 50 polínicos y 45 alérgicos a hongos). En cuanto a los pacientes alérgicos a hongos hemos diagnosticado 45 pacientes en un total de 212 pacientes nuevos con alergia ambiental: 25,47 % de positivos a hongos.

De los 45 pacientes 21 eran hombres y 24 mujeres, con una edad media de 21.8 ± 14 años, sin diferencias significativas entre ambos sexos. La clínica predominante fue

asma (59,3%) seguido de rinoconjuntivitis de predominio estival. Las características clínicas y epidemiológicas se recogen en la Tabla 1.

Variable	Descripción
Edad (años)	21,8 ± 14
Sexo (varón)	21 (46,7%)
Trabajo de riesgo	5 (11,1%)
Humedad en casa y/o trabajo	10 (22,2%)
Presentación estacional	
• Primavera	3 (7,9%)
• Verano	22 (57,9%)
• Otoño	10 (26,3%)
• Invierno	3 (7,9%)
Clínica predominante	
• Asma	23 (51,1%)
• Rinitis / Conjuntivitis	11 (24,4%)
• Dermatitis / Urticaria	5 (11,1%)
• Esofagitis	1 (2,2%)
• Celiaca	1 (2,2%)
Alergia a setas (champiñón)	3 (6,7%)

Tabla 1. Características clínicas y epidemiológicas

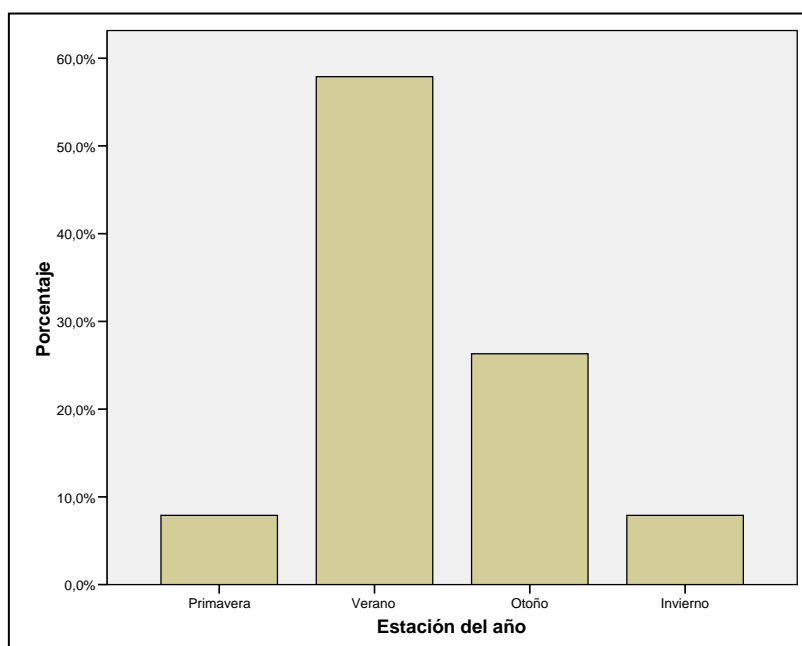


Figura 1. Distribución estacional

El número de resultados positivos de las pruebas moleculares para hongos se recoge en la Tabla 2. No hubo diferencias significativas entre resultados positivos y negativos en relación con la edad o con el sexo, excepto en el caso de la manitol-deshidrogenasa en lo que se refiere a la edad (negativos, $23,8 \pm 15,9$ años; positivos, $16,8 \pm 5,6$ años; $p=0,036$). La ocupación laboral de riesgo (industria del vino, agricultura, ganadería) se asoció con la positividad de proteína peroxisomal (positivos, 3 casos, 42,9%; negativos, 2 casos, 5,3%; $p=0,021$). Así mismo, el resultado de las pruebas moleculares no presentó asociación con la presencia de humedad ambiente, la estación o la clínica predominante, salvo en el caso de la manitol-deshidrogenasa que se asoció débilmente con asma (positivos, 10 casos, 76,9%; negativos, 13 casos, 43,3%; $p=0,043$). El resultado de las pruebas alérgicas clásicas para hongos se recoge en la Tabla 3.

	N	%
Enolasa	21	46,7
Glicoproteína acídica	42	93,3
Manitol deshidrogenasa	13	28,9
Mitogilina	19	42,2
Proteína peroxisomal	7	15,6

Tabla 2. Resultado de las pruebas moleculares

	Prick		IgE	
	N	%	N	%
Alternaria	37	82,2	38	84,4
Cladosporium	17	37,8	16	35,6
Aspergillus	17	37,8	16	35,6
Penicillium	10	22,2	9	20
Candida	10	22,2	10	22,2

Tabla 3. Pruebas alérgicas clásicas

Los estudios de pruebas diagnósticas, incluyendo Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN), Tasa de Falsos Positivos (TFP) y Tasa de Falsos Negativos (TFN), de las moléculas estudiadas frente a los resultados de pruebas cutáneas e IgE para los hongos correspondientes se recogen en

las Tablas 4 (*Alternaria* versus Glicoproteína acídica), 5 (*Cladosporium* versus Manitol deshidrogenasa), 6 (*Aspergillus* versus Mitogilina) y 7 (*Aspergillus* versus Proteína peroxisomal). Finalmente, en la Tabla 8 se recoge el estudio de pruebas diagnósticas de la Enolasa.

	Prick		IgE	
	%	IC 95%	%	IC 95%
Sensibilidad	88,1	77,1-99,1	90,5	80,4-100
Especificidad	100	83,3-100	100	83,3-100
VPP	100	98,6-100	100	98,7-100
VPN	37,5	0,0-77,3	42,9	0,0-86,7
TFN	5/8 (62,5)		4/7 (57,1)	
TFP	0/37 (0,0)		0/38 (0,0)	

Tabla 4. *Alternaria* versus Glicoproteína acídica

	Prick		IgE	
	%	IC 95%	%	IC 95%
Sensibilidad	76,9	50,2-100	76,9	50,2-100
Especificidad	78,1	62,2-94	81,2	66,2-96,3
VPP	58,8	32,5-85,2	62,5	35,6-89,3
VPN	89,3	76-100	89,7	76,8-100
TFN	3/28 (10,7)		3/29 (10,3)	
TFP	7/17 (41,2)		6/16 (37,5)	

Tabla 5. *Cladosporium* versus Manitol deshidrogenasa

	Prick		IgE	
	%	IC 95%	%	IC 95%
Sensibilidad	68,4	44,9-91,9	68,4	44,9-91,9
Especificidad	84,6	68,8-100	88,5	74,3-100
VPP	76,5	53,4-99,6	81,3	59-100
VPN	78,6	61,6-95,6	79,3	62,8-95,8
TFN	6/28 (21,4)		6/29 (20,7)	
TFP	4/17 (23,5)		3/16 (18,7)	

Tabla 6. *Aspergillus* versus Mitogilina

	Prick		IgE	
	%	IC 95%	%	IC 95%
Sensibilidad	100	92,9-100	100	92,9-100
Especificidad	73,7	58,4-89	76,3	61,5-91,1
VPP	41,2	14,8-67,5	43,7	16,3-71,2
VPN	100	98,2-100	100	98,3-100
TFN	0/28 (0,0)		0/29 (0,0)	
TFP	10/17 (58,8)		9/16 (56,2)	

Tabla 7. Aspergillus versus Proteína peroxisomal

	Clínica Setas	
	%	IC 95%
Sensibilidad	9,5	0,0-24,5
Especificidad	95,8	85,8-100
VPP	66,7	0,0-100
VPN	54,8	38,5-71
TFN	19/42 (45,2)	
TFP	1/3 (33,3)	

Tabla 8. Setas (champiñón) versus Enolasa

Se relacionó la presencia de asma con la estación en el grupo de alergia a hongos, siendo la frecuencia de asma estadísticamente más alta en Verano-Otoño (21 casos, 65,6%) que en Invierno-Primavera (1 caso, 16,7%), $p=0,03$.

Se han estudiado, además, un grupo de pacientes con asma a polen (N=50) y otro de sujetos sanos (N=50). Las diferencias clínicas entre los tres grupos se recogen en la Tabla 9.

	Hongos	Sanos	Polínicos	Sig.
N	45	50	50	
Edad (años)	21,8 ± 14	32 ± 11,1	25,8 ± 10,3	<0,001
Sexo varón	21 (46,7%)	35 (70%)	27 (54%)	0,058
Asma	23 (53,5%)	0 (0%)	50 (100%)	<0,001
Rinitis/Rinoconjuntivitis	12 (27,9%)	0 (0%)	50 (100%)	<0,001
Anafilaxia	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	0,322

Tabla 9. Diferencias clínico-epidemiológicas entre los grupos

La sensibilización a hongos en los tres grupos se recoge en la Tabla 10.

	Hongos	Sanos	Polínicos
N	54	50	50
Prick Alternaria	37 (82,2%)	0 (0%)	2 (4%)
IgE Alternaria	38 (84,4%)	0 (0%)	2 (4%)
Prick Cladosporium	17 (37,8%)	0 (0%)	0 (0%)
IgE Cladosporium	16 (35,6%)	0 (0%)	0 (0%)
Prick Aspergillus	17 (37,8%)	0 (0%)	0 (0%)
IgE Aspergillus	16 (35,6%)	0 (0%)	0 (0%)
Prick Penicillium	10 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)
IgE Penicillium	9 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Prick Candida	10 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)
IgE Candida	10 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabla 10. Sensibilización a hongos

Finalmente, los resultados de otros marcadores moleculares en los tres grupos se recogen en la Tabla 11.

	Hongos	Sanos	Polínicos
N	45	50	50
Pol 1	-	1 (2%)	36 (72%)
Pol 2	-	0 (0%)	34 (68%)
Pol 4	-	0 (0%)	21 (42%)
Pol 5	-	0 (0%)	6 (12%)
Pol 6	-	0 (0%)	14 (28%)
Alt a 1	-	0 (0%)	2 (4%)

Tabla 11. Otros marcadores moleculares

Resultado de las pruebas moleculares:

La glicoproteína acídica (*Alternaria*) es el alérgeno mas prevalente en los pacientes alérgicos a hongos de nuestro área (94,4%), seguido de la enolasa (*Alternaria*), la mitogilina (*Aspergillus*) y manitol deshidrogenasa de *Cladosporium*.

En resumen, las pruebas de mayor rentabilidad diagnóstica serían tanto el prick como la IgE para alternaria, la IgE para cladosporium y aspergillus y la enolasa para alergia alimentaria a setas.

DISCUSIÓN

La alergia a esporas ambientales es una causa de rinitis y asma grave, pero que responde bien a inmunoterapia específica (1). Las herramientas utilizadas tradicionalmente en el diagnóstico etiológico de alergia son generalmente extractos alergénicos obtenidos partir de homogeneizados de las supuestas fuentes alergénicas naturales. Dichos extractos son un mosaico de composición variopinta, que incluye moléculas de diversa naturaleza (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) que tan sólo permiten detectar la fuente biológica de la sensibilización, pero no su causa molecular, en este caso los alérgenos causales del fenómeno o fenómenos alérgicos. Frecuentemente se puede observar ausencia de reactividades cutáneas a los extractos fúngicos habituales en pacientes con una clínica evidente de alergia a mohos, o pacientes claramente reactivos a extractos fúngicos que no responden satisfactoriamente a la inmunoterapia. La falta de rigor de los resultados que se obtienen

depende de factores como el grupo de población estudiada, los extractos empleados y las especies utilizadas, etc. Mishra y cols. (1992), indicaron dos factores fundamentales que podrían explicar estos hechos. 1) Los patrones de exposición a las especies de hongos son, hasta la fecha, virtualmente desconocidos. 2) Los alérgenos fúngicos utilizados para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas han sido producidos en base a conocimientos parciales, tanto en relación con la exposición a especies alérgicas como a la naturaleza de los componentes causantes de la enfermedad.

En un intento de aumentar la precisión de la patología por hongos en nuestra área, realizamos un estudio molecular de sus componentes (CRDs) en un grupo numeroso de pacientes y controles. La *Alternaria* seguida del *Aspergillus* fueron las esporas que más se relacionaron con la clínica, predominantemente asmática y, desde el punto de vista molecular, los alérgenos más rentables para el diagnóstico fueron la glicoproteína ácida de la *Alternaria* (Alt a 1), seguido de la superóxido dismutasa del *Aspergillus* (rAsp f 6), aunque la mitogilina (rAsp f 1) reveló mayor especificidad. En el caso de la alergia a setas comestibles, la enolasa (Alt a 6) fue la más detectada.

La clínica predominantemente estival hace que los síntomas por esporas se superpongan a los provocados por polen de gramíneas. Este polen es la mayor causa de alergia en Europa, pero las esporas contribuyen por la gravedad de la clínica que provocan a ser un riesgo mayor para la salud pública (2). Se han aplicado diferentes índices para cuantificar la alergenidad atmosférica, sobre todo en áreas urbanas, ya que el contenido de partículas en la atmósfera tiene importantes implicaciones en la calidad de vida, la dinámica de nuestros ecosistemas y ambiente, de ahí la necesidad de poder medir de forma eficaz las partículas aerovagantes (4). Una forma sería concretar la medición de las moléculas que más se han relacionado con la clínica más grave en los pacientes.

La *Alternaria* ha sido la spora más importante en la clínica en nuestra serie. No se ha conseguido correlacionar positivamente sus niveles con la humedad domiciliaria, cercanía de ríos o lagos, la temperatura, horas de sol, velocidad del viento, lluvias y/o humedad. En el caso de las dos últimas variables enunciadas la correlación es inversa (5), es decir, parece que la esporulación depende de un ambiente seco. Nuestra zona es principalmente cerealista, con baja pluviosidad y esto conlleva el aumento de

esporulación de este hongo y su predominancia en la atmósfera que nuestros pacientes respiran. En concreto, la glicoproteína ácida es un componente alergénico que indica sensibilización primaria y es un factor de riesgo para el desarrollo de asma en niños y adultos.

El Asp f 1 es responsable de muchas enfermedades alérgicas, siendo la más importante por su gravedad la aspergilosis broncopulmonar alérgica. Otra molécula detectada, el Cla h 8 (manitol deshidrogenasa), es un componente que indica sensibilización primaria y puede causar síntomas alérgicos en casi todas las zonas climáticas por su ubicuidad.

Los aerosoles de origen biológico juegan un papel vital en el sistema terrestre, particularmente en las interacciones entre la atmósfera, biosfera, clima y salud pública. Las bacterias transportadas por el aire, esporas de hongos, polen y otras biopartículas son esenciales para la reproducción y propagación de organismos a través de diversos ecosistemas, y pueden causar enfermedades en humanos, animales y vegetales. Además, pueden servir como núcleos de condensación en la formación de nubes, cristales de hielo y precipitación, influyendo así en el ciclo hidrológico y en el clima. Las fuentes, abundancia, composición y efectos de los aerosoles biológicos, así como la interacción físico-química entre todos ellos, no están todavía bien caracterizados y constituyen una gran brecha en la comprensión científica de la coevolución de la vida y el clima en el sistema terrestre. (Fröhlich-Nowoisky et al. 2016) (14).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar la cantidad y variación de alérgenos en la atmósfera, ya que el conocimiento de los “niveles de exposición” a los mismos es útil para estimar el riesgo de sensibilización o la inducción de síntomas alérgicos en diversos ambientes. Por ello, después de la publicación de un artículo de posicionamiento (Raulf et al. 2014) (15) en relación a la conexión entre Alergia, Aerobiología y Contaminación del Aire por parte de un panel de expertos de la EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology), se está solicitando a nivel europeo una mayor información sobre algunas esporas de hongos que se encuentran en el aire y que están “provocando o amplificando” las respuestas alérgicas en determinados periodos del año. La interacción entre diversos componentes bióticos y abióticos está implicada en otras patologías graves como asma, ictus, cardiopatía isquémica y cáncer (Reinmuth-Selzle et al. 2017) (16).

Todavía no se conoce suficientemente la composición biológica del aire a nivel de esporas de hongos, ni la verdadera interacción que éstas y otros agentes ambientales pueden causar en nuestra salud.

Estudios realizados en algunos extractos de *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium culmorum* han demostrado que estos extractos alergénicos son inestables, lo que también puede afectar a la sensibilidad diagnóstica (12). Para evitar todos estos problemas, en las últimas décadas, se han purificado e identificado muchos alérgenos utilizando técnicas de biología molecular y, las técnicas de ingeniería genética han permitido la producción de alérgenos recombinantes.

En la actualidad, se han obtenido 22 alérgenos recombinantes de *Aspergillus fumigatus* y algunos estudios destacan un distinto patrón de sensibilización alérgica en los pacientes afectados de aspergilosis broncopulmonar alérgica, respecto a pacientes afectados de otros tipos de patologías alérgicas por *Aspergillus*.

Si las pruebas cutáneas y la respuesta IgE a alguna de las moléculas de esporas más prevalentes que hemos encontrado son positivas, no estaría indicada la prueba de provocación bronquial, considerada “gold standard” para el diagnóstico.

Nuestros resultados han confirmado el poder alergénico del género *Alternaria*, hongo saprófito de numerosas plantas, especialmente de gramíneas. En España afecta a un 20% de la población aproximadamente (D'Amato et al. 1997 (2), De Linares et al. 2010 (3). Por otra parte, la intensidad de la reacción alérgica a la presencia de *Alternaria* depende de la concentración de sus esporas en la atmósfera. Según Rapiejko et al. (2004), una concentración de 80 esporas/m³ de aire, es suficiente para que se desencadenen los síntomas, aunque también se ha establecido este valor con 20 esporas/m³. En pacientes muy sensibles de Europa central, los síntomas verdaderamente severos se producen con concentraciones de unas 300 esporas/m³ (Gravesen 1979; Black et al. 2000; Downs et al. 2001; Rapiejko et al. 2004) (20).

Se han encontrado notables diferencias en las concentraciones diarias de esporas de *Alternaria*, según la localización geográfica, distancias de las estaciones de muestreo, humedad, condiciones geobotánicas, etc. Herrero et al. 1996 (6), Peternel et al. 2004 (7); Maya-Manzano et al. 2012; (7), Sabariego et al. 2012 (8).

Además, variaciones de contaminantes atmosféricos, entre ellos CO₂, pueden modificar la esporulación de este hongo y la cantidad de proteínas alergénicas que producen (Wolf et al. 2010) (22).

Con este trabajo aportamos una información precisa sobre la concentración de esporas de hongos en el aire mediante la creación de una base de datos y la realización de pruebas moleculares en pacientes (Chapman et al, 2000) (12) con alérgenos de dicha especie de hongos; estableciéndose una relación real causa-efecto en su patología ambiental.

Las esporas de *Alternaria* provocan patología respiratoria grave y una vez diagnosticada, la inmunoterapia de precisión con alérgenos recombinantes logra una respuesta clínica muy favorable (Horst et al. 1990, Bousquet et al.1998, Tabar et al. 2000, (24), Hors et al (35), Prieto A et al (26).

En cuanto a la factibilidad de la propuesta en términos de viabilidad técnica y económica, el análisis del bioaerosol se está empleando en la asistencia clínica cotidiana y la técnica de microarrays sólo en pacientes seleccionados por su gravedad (anafilaxia, asma, esofagitis, conjuntivitis graves) (13). En cuanto a la replicabilidad de nuestra propuesta en otras CCAA, se podría realizar a través de colaboraciones nacionales e internacionales, siguiendo las directrices propuestas por la comisión de expertos de la EAACI y de la EAN (European Aerobiology Network).

Nuestra propuesta está conforme con los objetivos RIS3 del proponente y/o con la Estrategia Estatal de Ciencia, Tecnología y de Innovación. Seguimos esta estrategia realizando diferentes estudios, tanto epidemiológicos como de aplicación en clínica de análisis molecular. Por otra parte, estos resultados complementan la gran información que sobre las concentraciones de polen se están realizando desde el año 2006 a través del RACyL de la Consejería de Sanidad de Castilla y León. Dichos datos se envían semanalmente a redes nacionales (SEAIC, REA) y europeos (EAN).

REFERENCIAS

1. A Cárdaba Arranz M, Muñoz Moreno MF, Armentia Medina A, Alonso Capitán M, Carreras Vaquer F, Almaraz Gómez A. Health impact assessment of air pollution in Valladolid, Spain. *BMJ Open* 2014; 4 (10): e005999
2. D'Amato G, Chatzigeorgiou G, Corsico R, Gioulekas D, Jäger L, et al. (1997) Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. EEACI Position Paper. *Allergy*; 1997; 52: 711-716.
3. De Linares C, Belmonte J, Canela M, de la Guardia CD, Alba-Sanchez F, Sabariego S Dispersal patterns of *Alternaria* conidia in Spain. *Agric Forest Meteorol* 2010; 150:1491–1500
4. Downs SH, Mitakakis TZ, Marks GB, Car NG, Belousova EG et al. Clinical importance of *Alternaria* exposure in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 455–459
5. Fernández González M.D, Suárez Cervera M, Díaz González T.E & Valencia Barrera, RM. Airborne pollen and spores in León (Spain). *International Journal of Biometeorology* 1993; 37: 89-95
6. Herrero B, Fombella-Blanco MA, Fernández González D & Valencia Barrera, RM. The role of meteorological factors in determining the annual variation of *Alternaria* and *Cladosporium* spores in the atmosphere of Palencia, 1990-1992. *International Journal of Biometeorology* 1996; 39: 139-142
7. Maya-Manzano JM, Fernandez-Rodriguez S, Hernandez-Trejo F, Diaz-Perez G, Gonzalo-Garijo A et al. Seasonal Mediterranean patterns for airborne spores of *Alternaria*. *Aerobiologia* 2012; 28: 515–526
- 8.. Sabariego S, Bouoso V, Pérez-Badia R. Comparative study of airborne *Alternaria* conidia levels in two cities in Castilla-La Mancha (central Spain), and concentrations with weather-related variables. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19: 227–232
9. Black PN, Udy AA, Brodie SM Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma. *Allergy* 2000; 55:501–504

10. D'Amato G, Spieksma FTM. Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. EAACI Position Paper. *Allergy* 1995; 50: 870-877.
11. Bousquet J, Lockey RF, Malling HG. WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53: 1-42.
12. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhaharaj V, Pomes A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 409-18.
13. Armentia A, Martín S, Barrio J, et al. Value of microarray allergen assay in the management of eosinophilic esophagitis. *Allergol Immunopathol* 2015; 43: 73-80
14. Fröhlich-Nowoisky J, Kampf C.J, Weber B, Huffman J.A, Pöhlker C. et al. (2016). Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. *Atmospheric Research* 2016; 182: 346–376.
15. Raulf M, Buters J, Chapman M, Cecchi L, de Blay F. et al. (2014). Monitoring of occupational and environmental aeroallergens – EAACI Position Paper. *Allergy* 69: 1280–1299.
16. Reinmuth-Selzle H, Kampf C.J, Lucas K, Lang-Yona N, Fröhlich-Nowoisky J et al. (2017). Air Pollution and Climate Change Effects on Allergies in the Anthropocene: Abundance, Interaction, and Modification of Allergens and Adjuvants. 2017; *Environ. Sci. Technol.* 51: 4119–4141
17. Knutsen AP, Bush RK, Demain JG, Denning DW, Dixit A, et al. Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 129: 280–290
18. Salvaggio J, Aukrust L. Mold-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1981;68: 327-346.
19. Sanchez H, Bush RK. A review of *Alternaria alternata* sensitivity. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18:56–59
20. Rapiejko P, Lipiec A, Wojdas A, Jurkiewicz D (2004) Threshold pollen concentration necessary to evoke allergic symptoms. *Int Rev Allergol Clin Immunol* 2014; 0(3): 91–94

21. Peternel R, Culig J, Hrga I (2004) Atmospheric concentrations of *Cladosporium* spp. and *Alternaria* spp. spores in Zagreb (Croatia) and effects of some meteorological factors. *Ann Agric Environ Med* 2004; 11: 303–307.
22. Wolf J, O'Neill RN, Rogers CA, Muilenberg ML and Ziska LH. Elevated atmospheric carbon dioxide concentrations amplify *Alternaria alternata* sporulation and total antigen production. *Environmental Health Perspectives* 2010; 118 (9): 1223-1228
23. Sanjuan C, Alonso J, Sanchis J, Casan P, Broquetas JM, et al. The quality of life questionnaire with asthma patients; the Spanish version of the Asthma Quality of Life Questionnaire. *Archiv Bronconeumol*; 1995;31: 219-226.
24. Tabar AI, Lizaso MT, García BE, Echechipía S, Olaguibel JM, Rodríguez A. Tolerance of immunotherapy with a standardized extract of *Alternaria tenuis* in patients with rhinitis and bronchial asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 2000; 10: 327-333.
25. Horst M, Hejjaoui A, Horst V, Michel B, Bousquet J. Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized *Alternaria* extract. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 460-72.
26. Prieto L, Palacios R, Aldana A, Ferrer A, Perez-Francés C, López V et al. Effect of allergen-specific IT with purified Alt a 1 on AMP responsiveness, exhaled nitric oxide and exhaled breath condensate pH. A randomized double-blind study. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 16:27