

Quantificação de alérgenos *major* de *Dermatophagoides pteronyssinus* em extratos para imunoterapia com alérgenos por via sublingual

Dermatophagoides pteronyssinus major allergens quantification in sublingual immunotherapy extracts

Data de receção / Received in: 06/11/2017

Data de aceitação / Accepted for publication in: 14/12/2017

Rev Port Imunoalergologia 2018; 26 (4): 255-261

Maria Conceição Pereira Santos¹, Maria Amélia Spínola Santos², Idoia Postigo³, Jorge Martinez³

¹ Laboratório de Imunologia Clínica. Instituto de Medicina Molecular. Faculdade de Medicina – Universidade de Lisboa.

² Serviço de Imunoalergologia – Centro Hospitalar Lisboa Norte.

³ Laboratory of Parasitology and Allergy. Lascaray Research Center and Dept of Immunology, Microbiology and Parasitology. University of the Basque Country. Faculty of Pharmacy. Vitoria. España.

1.º Prémio SPAIC-ROXALL-2017

RESUMO

Fundamentos: Embora a quantidade de alérgenos *major* seja um aspeto considerado crítico na imunoterapia com alérgenos por via sublingual (ITASL), a comparação entre ITASL de diferentes fabricantes é praticamente impossível. **Objetivos:** Comparar as concentrações de alérgenos *major* de ácaros em soluções para ITASL. **Métodos:** Avaliação por ELISA-*sandwich* das concentrações de Der p1 e de alérgenos do grupo 2 (Der p2/Der f2) em 7 soluções para ITASL com ácaros (100% *Dermatophagoides pteronyssinus*) de diferentes fabricantes disponíveis no mercado português, utilizando uma solução para ITASL 100% *Phleum pratense* como controlo negativo. **Resultados:** Todas as amostras mostraram conteúdo similar em Der p1, sem quaisquer diferenças estatisticamente significativas ($p=0,115$).

Também em relação ao alergénio Der p2 se verificaram conteúdos similares em quase todas as amostras, exceto na solução de ITASL de um fabricante, que apresentou uma concentração significativamente mais baixa. **Conclusões:** Apesar de pequenas variações, a maior parte das soluções para ITASL com ácaros comercializadas em Portugal tem concentrações semelhantes de Der p1 e Der p2/Der f2, existindo apenas uma que apresentou valores mais baixos destes alergénios. As concentrações alergénicas dos alergénios *major* do grupo 1 foram sempre maiores do que as do grupo 2. Estes resultados são diferentes dos publicados na literatura onde se identificam maiores diferenças entre soluções para ITASL de diferentes laboratórios, o que vem uma vez mais sublinhar a necessidade de uniformizar os métodos de avaliação e de requerer que os laboratórios produtores indiquem a composição em alergénios *major* de cada um dos seus produtos para imunoterapia.

Palavras-chave: Ácaros, alergénios, Der p1, Der p2, ELISA, imunoterapia sublingual, quantificação.

ABSTRACT

Background: Although the amount of major allergens present in sublingual immunotherapy (SLIT) extracts is considered a crucial factor, the comparison between SLIT extracts from different manufacturers is practically impossible. **Objective:** To compare the concentration of mite major allergens in SLIT extracts (100% *Dermatophagoides pteronyssinus*) from different manufacturers. **Methods:** We measured by ELISA-sandwich the concentrations of Der p1 and group 2 mite allergens (Der p2/Der f2) in seven SLIT mite extracts, available in Portugal. We used a 100% *Phleum pratense* SLIT extract as a negative control. **Results:** All samples showed similar concentrations of Der p1, without significant differences ($p=0.115$). Also for group 2 allergens we observed similar concentration in samples from 6 out of the 7 SLIT extracts. Only one manufacturer had a SLIT extract with a significantly lower concentration of mite group 2 allergens. **Conclusions:** Despite small variations, most mite SLIT extracts commercialized in Portugal, present similar Der p1 and Der p2/Der f2 concentrations, with just one manufacturer showing lower concentrations in these major allergens. Concentrations of group 1 mite allergens were always higher than those of group 2 allergens. These results are different from the few studies that have been published comparing SLIT mite extracts from different manufacturers, where greater differences between producers have been identified. These differences underline once again the need to harmonize the methods used for allergen quantification and demand that the different SLIT producers reveal unequivocally the composition in major allergens of their SLIT extracts.

Key-words: Allergens, Der p1, Der p2, ELISA, mites, quantification, sublingual immunotherapy.

INTRODUÇÃO

A eficácia clínica da imunoterapia sublingual com extratos de ácaros tem sido amplamente demonstrada na rinite e na asma alérgicas a ácaros^{1,2}. Na imunoterapia sublingual (ITASL) utilizam-se

habitualmente concentrações alergénicas superiores às usadas na imunoterapia subcutânea para se obter uma melhor eficácia, uma vez que o grau de segurança desta é muito superior ao da imunoterapia subcutânea.

Vários autores demonstraram que a composição e o conteúdo alergénico são um aspeto crítico na eficácia da

imunoterapia com alergénios, incluindo as formas de administração sublingual³⁻⁶. No entanto, e apesar das recomendações dos organismos reguladores no sentido de os diversos fabricantes uniformizarem os produtos alergénicos que comercializam, a verdade é que a composição alergénica, as concentrações alergénicas e a potência biológica dos diferentes extratos alergénicos não são comparáveis. Adicionalmente, as diferentes unidades utilizadas pelos diferentes fabricantes tornam muito mais difícil a comparação entre extratos e a otimização do seu uso na prática clínica. Acresce ainda que, pelo menos em alguns países, os fabricantes não fornecem dados exatos sobre as concentrações alergénicas dos seus extratos, estando os valores dentro de um intervalo de concentrações bastante alargado, o que é permitido pelos reguladores.

Em Portugal e Espanha, a alergia aos ácaros é predominante e os extratos com ácaros são os mais prescritos para imunoterapia⁷. O nosso objetivo foi quantificar o conteúdo em alergénios major Der p1 e Der p2 de diferentes extratos comerciais para imunoterapia sublingual com ácaros, através da metodologia ELISA.

MATERIAL E MÉTODOS

Imunoterapia sublingual com ácaros

As soluções comerciais de ITASL com ácaros (100% *Dermatophagoides pteronyssinus*) foram adquiridas através dos circuitos normais de distribuição a sete laboratórios com licença para venda destes produtos em Portugal. Um extrato de ITASL sem ácaros, igualmente adquirido através de circuito normal de distribuição, foi utilizado como controlo negativo. Ao longo de todo o estudo os resultados são mostrados com um código numérico sem o nome do laboratório e por uma ordem aleatória.

As soluções de imunoterapia sublingual foram conservadas de acordo com as instruções dos respetivos fabricantes. Foram retiradas três amostras (cada uma

com um mililitro) do frasco de concentração máxima, que foram colocadas em tubos *Eppendorf* e codificadas de acordo com uma sequência gerada aleatoriamente e que não era do conhecimento de nenhum dos investigadores. Utilizou-se uma solução comercial de ITASL sem ácaros (100% *Phleum*) como controlo negativo e procedeu-se de maneira semelhante à das soluções com ácaros.

Quantificação dos alergénios major de *Dermatophagoides*

Foram determinadas, em triplicado e na mesma data, as concentrações de alergénios de *Dermatophagoides* (Der p1 e Der p2) nas soluções de imunoterapia sublingual com ácaros, através de ensaios imunoenzimáticos, de tipo *ELISA-sandwich*, utilizando kits ELISA para estes alergénios, de acordo com as instruções do fabricante (Indoor Biotechnologies, UK). Resumidamente foram utilizadas placas ELISA recobertas com anticorpos monoclonais murinos IgG2A para Der p1 e placas ELISA recobertas com anticorpos monoclonais murinos IgG2A para Der p2, o qual possui uma reatividade semelhante também para Der f2. Estas placas foram incubadas com os extratos alergénicos da ITASL dos diferentes fabricantes.

Após um passo de lavagem, os alergénios ligados foram identificados pela adição de um segundo anticorpo monoclonal murino biotilado, com a mesma especificidade, durante uma hora. A seguir a nova lavagem, foi adicionado o substrato streptavidina-peroxidase, com incubação durante 30 minutos. Após lavagem, adicionou-se ABTS / H₂O₂ e efectuou-se a leitura da absorvância a 405 nm.

Os resultados foram expressos em µg/ml de alergénio na amostra.

Análise estatística

Cada valor de Der p1 e de Der p2 dos diferentes laboratórios representa a média e o desvio-padrão de 9 determinações (determinações em triplicada de 3 amostras de cada solução de ITASL). Para a comparação dos valores utilizou-se o teste ANOVA, considerando significativo um $p < 0,05$.

RESULTADOS

O Quadro 1 mostra os resultados da quantificação dos alergénios *major* Der p1 e Der p2 nas diferentes soluções para imunoterapia sublingual com ácaros, quantificados por ELISA. Todas as amostras mostraram conteúdo similar em Der p1, com concentrações variando entre 1,005 e 1,451 µg/ml, sem quaisquer diferenças estatisticamente significativas ($p=0,115$). Também em relação ao alergénio Der p2 se verificaram conteúdos similares em quase todas as amostras, variando entre 0,754 e 0,791 µg/ml ($p=0,686$ na comparação entre 6 dos 7 laboratórios), exceto na solução de ITASL do laboratório 6, que apresentou uma concentração significativamente mais baixa 0,081 µg/ml ($p<0,0001$ relativamente aos outros laboratórios).

DISCUSSÃO

No presente estudo, todos os extratos de ITASL com ácaros revelaram quantidades muito similares de Der p1 e, em média, superiores às de Der p2, as quais também foram muito semelhantes nos extratos de ITASL com ácaros dos vários laboratórios, à exceção do laboratório 6, que mostrou uma quantidade de Der p2 significativamente mais baixa (cerca de 10 vezes menor), sendo também um dos que apresentava menor quantidade de Der p1.

A imunoterapia com alergénios sublingual (ITASL) é uma via alternativa à subcutânea, com um melhor perfil

de segurança e menor risco de efeitos adversos IgE-mediados⁸. No entanto persistem dúvidas quanto à sua maior ou menor eficácia relativamente à imunoterapia subcutânea^{8,9}. Pela sua segurança e também devido à robustez da evidência relativamente à sua eficácia clínica^{2,10-11}, a ITASL tem vindo a ser cada vez mais usada no nosso país ao longo dos últimos anos. Um dos fatores críticos para a eficácia da imunoterapia com alergénios é não só administrarmos os alergénios a que o doente está sensibilizado (e preferencialmente não administrarmos aqueles a que o doente não esteja sensibilizado) como também administrarmos uma dose alergénica suficiente para ser eficaz¹², o que varia não só em função da concentração alergénica da solução de ITASL, mas também em função do tipo de administração sublingual (gotas, *sprays*, frascos doseadores) e do regime posológico indicado por cada fabricante.

A capacidade de se definir o painel de alergénios moleculares a que um doente individual está sensibilizado, acoplada ao conhecimento exato da quantidade e qualidade dos alergénios moleculares presentes nas soluções para imunoterapia com alergénios, poderia, em princípio, contribuir para aumentar a eficácia deste tipo de tratamento. Sem dúvida, estes conceitos formam a base de futuras regulamentações que se aplicarão aos produtos com alergénios usados no diagnóstico e tratamento das doenças alérgicas. No entanto, hoje em dia, ainda um dos problemas que se coloca à comparação da imunoterapia com alergénios proveniente de diferentes laboratórios é a dificuldade em comparar elementos-chave, como por

Quadro 1. Concentrações alergénicas (Der p1 e Der p2) em soluções para ITASL com ácaros (µg/ml)

	Lab. 1	Lab. 2	Lab. 3	Lab. 4	Lab. 5	Lab. 6	Lab. 7	Controlo negativo
Der p 1	1,357±0,103	1,269±0,089	1,332±0,094	1,350±0,120	1,206±0,453	1,005±0,276	1,451±0,048	<0,5
Der p 2	0,791±0,007	0,754±0,069	0,791±0,084	0,783±0,026	0,851±0,120	0,081±0,016	0,776±0,075	<0,5
Ratio Der p1/ Der p 2	1,71	1,68	1,68	1,72	1,41	12,40	1,87	NA

ITASL – imunoterapia com alergénio por via sublingual; Lab – laboratório; NA – não aplicável

exemplo as unidades de referência internas, que não são facilmente ou diretamente comparáveis, mesmo em relação apenas aos alergénios *major*, sendo portanto difícil ou impossível comparar concentrações alergénicas de alergénios *major* entre diferentes fabricantes.

Iniciativas como o projeto CREATE podem permitir o desenvolvimento de referências alergénicas internacionais comuns que possam ser usadas para estandardizar os produtos alergénicos para diagnóstico e tratamento¹³⁻¹⁴, mas muitas vezes ainda são os métodos ELISA os mais utilizados para a quantificação alergénica¹⁵⁻¹⁶. É claro que a metodologia ELISA tem algumas limitações bem reconhecidas e, nos dias de hoje, a metodologia que melhor combina a avaliação do espectro total da composição alergénica e a quantificação alergénica nos produtos alergénicos é a espectrometria de massa¹⁷⁻¹⁹. Contudo, o seu alto custo, o tempo necessário para a análise e a complexidade da tecnologia envolvida são fatores que limitam a sua aplicação rotineira e, também por isso, não foi utilizada neste trabalho.

Neste estudo usámos a metodologia *ELISA-sandwich* para quantificar os alergénios *major* Der p1 e Der p2 em soluções comerciais para ITASL com ácaros, embora esta mesma metodologia possa dar diferentes resultados com a utilização de diferentes “kits” ELISA, um problema que também já foi reconhecido no projeto CREATE.

Não existem muitos trabalhos publicados que tenham avaliado as concentrações alergénicas de alergénios *major* dos ácaros (grupo 1 ou grupo 2) em soluções para ITASL^{15,20-21} e todos eles têm utilizado metodologias ligeiramente diferentes entre si, o que pode justificar algumas diferenças nos resultados, como já referido. Aliás, nos dois trabalhos que identificam, por laboratório, as concentrações de Der p1, Der f1 e antigénios do grupo 2 (Der p2+Der f2), por metodologia ELISA, das soluções para ITASL de diferentes laboratórios, detetam-se algumas discrepâncias na comparação dos resultados entre esses dois trabalhos, nomeadamente nos *ratios* Der p1/Der f1 e mesmo nas concentrações em µg/ml de Der p1 em soluções dos mesmos laboratórios, sendo num dos estudos

referidas concentrações semelhantes de Der p1 das duas soluções para ITASL destes dois laboratórios, enquanto no outro estudo houve diferenças da ordem das 50 vezes^{15,20}. Esta discrepância é de uma tal magnitude que não pode ser explicada só por eventuais diferenças entre lotes e, provavelmente, devem-se a diferenças metodológicas que podem ter grande impacto nos resultados, como se prova pela comparação entre estes dois estudos^{15,20}. Nesse aspeto o nosso trabalho acrescenta mais dados à literatura existente e reforça a necessidade de se harmonizar melhor as metodologias de quantificação alergénica usadas por diferentes grupos de investigadores para se tentar alcançar resultados reprodutíveis.

Nos três trabalhos referidos^{15,20-21} foram encontradas significativas diferenças entre distintos laboratórios produtores de soluções alergénicas para ITASL, identificados em dois^{15,20} e anonimizados em um²¹, tal como optámos por fazer no nosso trabalho, à semelhança do que outros autores também fizeram na comparação entre soluções alergénicas para imunoterapia e para testes cutâneos *in vivo*²¹⁻²². Ao contrário destes três trabalhos^{15,20-21}, que encontraram diferenças significativas entre laboratórios produtores de ITASL (muito embora nem sempre com resultados comparáveis e consistentes entre si), no presente trabalho as concentrações que encontramos de Der p1 foram bastante semelhantes entre as diferentes soluções para ITASL, embora com diferenças que rondaram os 30%, se considerarmos a diferença entre o extrato com maior concentração alergénica e o de menor. O mesmo se verificou para os alergénios do grupo 2 em 6 das 7 soluções de ITASL, excetuando-se o resultado da solução do laboratório 6, conforme referido nos resultados.

As concentrações de alergénios do grupo 1 foram em média superiores às do grupo 2, com um quociente variando entre 1,4 e 1,8, na maior parte dos laboratórios, exceto no laboratório 6, em que esse *ratio* foi superior a 10 devido às baixas concentrações medidas dos alergénios do grupo 2. Park et al¹⁵, Moreno Benitez et al²⁰ e Larenas-Linneman et al²¹ também reportaram diferenças rele-

vantes entre as concentrações dos alérgenos do grupo 1 e do grupo 2 em diferentes extratos para ITASL, até com um *ratio* médio superior a 3. Contudo, Nolte H et al²³ descreveram concentrações muito sobreponíveis de alérgenos dos grupos 1 e 2, mas em extratos para imunoterapia subcutânea disponíveis nos Estados Unidos. O significado destas diferenças nos *ratios* entre o grupo 1 e o grupo 2 de alérgenos *major* não está estabelecido e só poderá ser relevante quando nos doentes se souber também a intensidade da sensibilização para cada um destes dois grupos principais e, assim, poder individualizar melhor a escolha da imunoterapia com alérgenos.

Claramente não podemos afirmar se as diferenças entre estes estudos e o presente são reais ou se se devem apenas a diferenças metodológicas. Adicionalmente também está por clarificar se estas diferenças se traduzem ou não em diferentes eficácias clínicas e imunológicas das distintas soluções alérgicas para imunoterapia sublingual, o que só poderá ser avaliado em estudos de comparação diretos *head-to-head* ou então através da comparação de resultados obtidos em estudos que utilizem exatamente os mesmos *end-points* de eficácia e segurança, quando estes passarem a ser exigidos pelas agências reguladoras para autorizar a comercialização desses produtos terapêuticos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem-nos concluir que, apesar de pequenas variações detetadas entre diferentes soluções para ITASL com ácaros comercializadas em Portugal, a maior parte delas tem concentrações de Der p1 (1,2 a 1,4 µg/ml) e de Der p2 (0,75 a 0,85 µg/ml), semelhantes, existindo apenas uma que apresentou valores um pouco mais baixos de Der p1 (1,0 µg/ml) e muito mais baixos de Der p2 (0,08 µg/ml), com uma alteração significativa dos valores do quociente Der p1 / Der p2.

Em todas as soluções de ITASL com ácaros, as concentrações alérgicas do alérgeno *major* Der p1 foram sempre superiores às do alérgeno *major* Der p2.

Estes resultados são diferentes dos publicados na literatura, onde se identificam maiores diferenças entre extratos para ITA de diferentes laboratórios, o que vem uma vez mais sublinhar a necessidade de uniformizar os métodos de avaliação e de requerer que os laboratórios produtores indiquem a composição em alérgenos *major* de cada um dos seus produtos para imunoterapia.

Financiamento: nenhum.

Declaração de conflito de interesses: nenhum

Contacto:

Maria da Conceição Pereira dos Santos
Laboratório de Imunologia Clínica
Instituto de Medicina Molecular
Faculdade de Medicina – Universidade de Lisboa
Av. Prof. Egas Moniz
1649-035 Lisboa
E-mail: mcgalvaos@medicina.ulisboa.pt

REFERÊNCIAS

1. Moingeon P, Mascarell L. Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clin Dev Immunol* 2012; 623474
2. Compalati E, Passalacqua G, Bonini M, Canonica GW. The efficacy of sublingual immunotherapy for house dust mite respiratory allergy: results of a GA2LEN meta-analysis. *Allergy* 2009; 64:1570-9.
3. Casset A, Valenta R, Vrtala S. Allergen content and in vivo allergenic activity of house dust mite extracts. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 161:287-8.
4. Curin M, Reininger R, Swoboda I, Focke M, Valenta R, Spitzauer S. Skin prick test extracts for dog allergy diagnosis show considerable variations regarding the content of major and minor dog allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 154:258-63.
5. Chapman MD, Briza P. Molecular approaches to allergen standardization. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012; 12:478-84.
6. Rossi R, Monasterolo G, Passalacqua G. The biological potency of different extracts for sublingual immunotherapy assessed by skin prick tests. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2010; 2: 112-4.
7. Branco Ferreira M, Viegas LP, Resende A, Machado C, Pereira Barbosa M. Imunoterapia específica subcutânea: Qual a persistência e adesão dos doentes na vida real? *Rev Port Imunoalergologia* 2013;21:177-86.

8. Durham S, Penagos M. Sublingual or subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:339-49.
9. Nelson H. Subcutaneous immunotherapy versus sublingual immunotherapy: which is more effective. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014;2:144-9.
10. Penagos M, Passalacqua G, Compalati E, Baena-Cagnani CE, Orozco S, Pedroza A, et al. Metanalysis of the efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic asthma in paediatric patients. *Chest* 2008;113:599-609.
11. Lin SY, Erekosima N, Kim JM, Ramanathan M, Suarez-Cuervo C, Chelladurai Y, et al. Sublingual immunotherapy for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis and asthma: a systematic review. *JAMA* 2013;309:1278-88.
12. Canonica GW, Cox L, Pawankar R, Baena-Cagnani CE, Baliss M, Bonini S, et al. Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. *World Allergy Organ J* 2014;7:6.
13. Van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. EU Forum: The CREATE Project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008; 63: 310-326.
14. Chapman MD, Ferreira F, Villalba M, Cromwell O, Bryan D, Becker WM, et al. CREATE consortium. The European Union CREATE project: a model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:882-9.e2
15. Park KH, Son M, Choi SY, Park HJ, Lee JH, Jeong KY, et al. In vitro evaluation of allergen potencies of commercial house dust mite sublingual immunotherapy reagents. *Allergy Asthma Immunol Res* 2015;7:124-9.
16. Tomková K, Cuhra P, Rysová J, Hanák P, Gabrovská D. ELISA kit for determination of egg white proteins: inter-laboratory study. *J AOAC Int* 2010;93:1923-29.
17. Batard T, Nony E, Hrabina M, Chabre H, Frati F, Moingeon P. Advances in the quantification of relevant allergens in allergenic extracts. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2013;45 (Suppl 2):33-7.
18. Koeberl M, Clarke D, Lopata AL. Next generation of food allergen quantification using mass spectrometric systems. *J Proteome Res* 2014;13:3499-509.
19. Monaci L, Losito I, De Angelis E, Pilolli R, Visconti A. Multi-allergen quantification of fining-related egg and milk proteins in white wines by high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectro* 2013; 27:2009-18.
20. Moreno-Benitez F, Espinazo-Romeu M, Letrán Camacho A, Mas S, Garcia-Cózar FJ, Tabar AI. Variation in allergen content in sublingual allergen immunotherapy with house dust mites. *Allergy* 2015;70:1413-20.
21. Larenas-Linnemann D, Esch R, Plunkett G, Brown S, Maddox D, Barnes C et al. Maintenance dosing for sublingual immunotherapy by prominent European allergen manufacturers expressed in bioequivalent allergy units. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;107:448-58.
22. Brunetto B, Tinghino R, Braschi MC, Antonicelli L, Pini C, Iacovacci P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. *Allergy* 2010;65:184-90.
23. Nolte H, Plunkett G, Grosch K, Larsen JN, Lund K, Bollen M. Major allergen content consistency of SQ house dust mite sublingual immunotherapy tablets and relevance across geographic regions. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2016;117:298-303.