



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Avaliação e comparação de extractos de látex comercialmente disponíveis em Portugal para testes cutâneos por picada**

**Marta Sofia da Fonseca Gabriel**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

**Covilhã, Junho de 2011**

Folha em branco

# Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, sem elas nenhum dos meus objectivos se concretizaria... O meu mais sincero obrigado a vós PAIS E MANO, pelo incondicional apoio, amor e motivação que me têm dado, não só nesta fase mas também ao longo da vida! Agradeço também pelos sacrifícios que tantas vezes passaram para que a nossa vida seja melhor e para a realização dos meus ideais... Vocês estão na génese de tudo!!!

Quero também atenciosamente agradecer à Professora Cândida Tomaz pela orientação e conhecimento científico que me permitiu adquirir e pela confiança que sempre demonstrou depositar em mim.

Gostaria também de expressar a minha gratidão para com o Dr. Paulo Tavares, pelo incentivo e disponibilidade demonstrada para a concretização deste projecto.

Aos imunoalergologistas que integraram este projecto e se disponibilizaram para a realização dos testes cutâneos por picada, nomeadamente à Dra. Ana Margarida Romeira, Dr. Carlos Lozoya, Dr. Luís Taborda Barata e Dra. Rosarinho Tomaz.

Ao Dr. Jorge Martínez e à Dra. Idoia Postigo da Universidade de Vitória, País Vasco pela realização dos ensaios de inibição por microarrays.

À Phadia Iberia agradeço a disponibilidade demonstrada pelos respectivos representantes e pelo fornecimento dos ImmunoCAPs e dos microarrays (ISAC-ImmunoCAP).

A todos os meus familiares, amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para que eu permanecesse motivada na realização desta dissertação...

De forma especial, quero agradecer à Catarina Nunes, Célia Peixinho e Sara Costa por toda a ajuda, amizade e conhecimento que me disponibilizaram ao longo deste ano académico.

Às anteriores, quero acrescentar a Andreia, Diana e Rita pelos momentos de boa disposição e amizade que partilharam comigo.

A ti, Daniel agradeço todo o apoio, amor e paciência que tens tido para comigo...

Folha em branco

## Resumo

A prevalência da alergia ao látex de borracha natural (LBN) tem-se revelado reduzida na população em geral, contudo está descrita como permanecendo um importante problema de saúde em subpopulações consideradas de risco, como é o caso particular dos trabalhadores da área da saúde (TAS) e doentes com espinha bífida (DEB). A principal meta para a prevenção de reacções alérgicas severas baseia-se na correcta e precoce identificação de indivíduos alérgicos e sensibilizados, com propensão para sofrer sintomas após exposição repetida a produtos de látex. De entre as metodologias de diagnóstico disponíveis, os testes cutâneos por picada (TCP) constituem o método mais fiável para o diagnóstico da sensibilização às proteínas do látex, contudo estes testes são grandemente afectados pela qualidade dos reagentes alergénicos aplicados. Actualmente, existem vários extractos de LBN comercialmente disponíveis em Portugal, produzidos por diferentes fabricantes, cuja variabilidade no conteúdo proteico e alergénico pode constituir um factor de influência nos resultados dos TCP. De facto, apesar de ser do conhecimento geral que tais preparações alergénicas são passíveis de apresentar grande heterogeneidade, até à data poucos são os estudos publicados que visaram a sua avaliação, pelo que tais variações não se encontram, actualmente, bem documentadas. Tendo por base estes conhecimentos, estabeleceu-se como objectivo deste projecto, a avaliação do nível real de variabilidade entre extractos comercialmente disponíveis de entidades fabricantes distintas e a análise do efeito de tais variações de conteúdo, na eficiência de indução de reactividade cutânea por TCP. Para tal, foram utilizados extractos actualmente comercializados em Portugal, fornecidos por sete fabricantes distintos. Todos os extractos foram analisados para o seu conteúdo proteico por Bradford e electroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Procedeu-se também à quantificação dos quatro alergénios *major* Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 e Hev b 6.02 utilizando kits comerciais de ensaio imunoenzimático (EIA). Por fim, os extractos foram analisados quanto à sua actividade alergénica *in vivo* e *in vitro*, por TCP e *microarrays*, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram marcada variabilidade no conteúdo em proteína total dos extractos de diferentes fabricantes, sendo que os respectivos valores variaram de teores proteicos inferiores a 8,0 a 526,5 µg/mL, o que corresponde a um surpreendente nível de heterogeneidade de aproximadamente 65 vezes. Estas diferenças acentuadas de conteúdo proteico entre extractos foram qualitativamente confirmadas pelos resultados de SDS-PAGE, sendo obtidos perfis electroforéticos completamente distintos. No que respeita à quantificação dos quatro alergénios *major*, esta também se demonstrou bastante variável, sendo que em alguns dos extractos não foram detectadas quantidades mensuráveis de Hev b 3 e Hev b 5. Ambos os resultados de TCP e dos ensaios de *microarrays* demonstraram diferenças notáveis na capacidade alergénica entre os extractos de diferentes

fabricantes. Particularmente, pelos resultados de TCP foi claramente observado que na maior parte dos doentes, a variabilidade de eficiência de diagnóstico foi tão acentuada que houve extractos que induziram respostas de TCP positivas e outros que não foram capazes de induzir qualquer reactividade cutânea, num mesmo doente alérgico. Pelas evidências demonstradas ao longo deste trabalho pode concluir-se que os extractos de látex de diferentes fabricantes, comercialmente disponíveis, apresentam uma heterogeneidade de conteúdo proteico e alérgico bastante marcada, o que certamente influencia as respectivas eficiências de diagnóstico, em consequência de diferentes capacidades alérgicas. Assim, sugere-se a necessidade do estabelecimento de metodologias de uniformização e melhoramento dos extractos alérgicos actualmente disponíveis para o diagnóstico da alergia ao látex.

## Palavras-chave

Alergénios *major*, alergia ao látex, extractos alérgicos, *microarrays*, testes cutâneos por picada

Folha em branco

# Abstract

The prevalence of allergy to natural rubber latex (NRL) has proved to be reduced in the general population, however it has been described as a significant health problem in subpopulations considered at risk, especially among health care workers (HCW) and *spina bifida* patients (SBP). Identifying individuals who have become sensitized and are likely to suffer from symptoms upon repeated exposure to latex products is the major goal of prevention of allergic reactions. Among available diagnostic methodologies, skin prick tests (SPT) are the most reliable method for assessment of sensitization to latex proteins, but their diagnostic performance and reproducibility are highly dependent on the quality of the used reagents. Nowadays, there are several extracts for skin prick testing commercially available in the Portuguese market, produced by different companies, whose protein and allergen variability may be a factor that influences the accuracy of the tests. Despite it is generally known that such preparations are likely to show great heterogeneity, to date there are only a few published studies that aimed their evaluation. For this reason, such variations are not currently well documented. Taking this into account, the aim of this project was to assess the real level of variability among commercial available extracts, from different manufacturers and to evaluate the effect of such content variations on the ability to induce skin reactivity by SPT. Thus, for its accomplishment, commercially available extracts from seven different manufacturers were used. All latex SPT extracts were analysed for protein content by Bradford's method and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The four *major* allergens Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 and Hev b 6.02 were also quantified using an enzyme immunoassay (EIA). All commercial extracts were tested for their *in vitro* allergenic capacity by microarray-inhibition assays and for their ability to induce biological reactivity in latex-allergic patients by SPT. The obtained results showed broad variations in protein composition among products from different manufacturers, ranging from below 8.0 to 526.5 µg/mL of extract, which corresponds to a surprising level of heterogeneity of approximately 65-fold. Broad differences in protein profiles among all extracts from different manufacturers were also observed by SDS-PAGE, with completely distinct electroforectic profiles. There was a marked variability regarding the contents of all four *major* allergens with undetectable Hev b 3 and Hev b 5 in certain extracts. Both microarray-inhibition assays and SPT demonstrated significant differences in allergenic capacity among the different extracts. Importantly, SPT results clearly showed that in most patients, the variability of diagnostic effectiveness was so pronounced that there were extracts which were able to induce positive skin responses by SPT, and others that were unable to induce any skin reactivity in the same allergic patient. Based on demonstrated evidences it can be concluded that commercially available latex extracts from different manufacturers present a marked heterogeneity in their protein and allergen content, which certainly influences the respective

diagnostic efficiency, because of their different allergenic capacities. Thus, it is suggested the need for improvement and standardization of latex extracts used for the diagnosis of latex allergy.

## Keywords

Allergen extracts; latex allergy; *major* allergen; microarrays; skin prick test

Folha em branco

# Índice

1	Introdução	1
1.1	Látex de borracha natural	1
1.1.1	Descrição geral	1
1.1.2	Composição Bioquímica	2
1.1.3	Processamento durante a Manufactura	2
1.1.4	Produtos à base de látex de borracha natural	3
1.2	Alergia/sensibilidade ao látex	4
1.2.1	Enquadramento histórico e conceitos básicos	4
1.2.2	Alergénios identificados no látex de borracha natural	5
1.2.3	Mecanismo de sensibilização e alergia aos alergénios do látex	7
1.2.4	Prevalência da alergia ao látex	9
1.2.5	Factores e grupos de risco	9
1.2.6	Alergénios <i>major</i> para os dois grupos de risco mais relevantes	11
1.2.7	Vias de sensibilização	12
1.2.8	Manifestações clínicas	13
1.2.9	Reactividade cruzada - Síndrome látex-frutos(-pólenes)	14
1.2.10	Tratamento	14
1.2.11	Prevenção	15
1.3	Diagnóstico da alergia ao látex	17
1.3.1	Testes <i>in vitro</i> de detecção de IgE específica	18
1.3.2	Testes cutâneos por picada	18
1.3.2.1	Extractos alergénicos de diagnóstico	19
2	Descrição dos Objectivos	22
3	Materiais e Métodos	23
3.1	Extractos comerciais para testes cutâneos por picada	23
3.2	Determinação da concentração em proteína total pelo método de Bradford	23

3.3 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	25
3.4 Ensaio Imunoenzimático	26
3.5 Ensaio de inibição por <i>Microarrays</i>	29
3.6 Caracterização dos doentes alérgicos ao látex	31
3.7 Determinação da IgE sérica específica para o látex	31
3.8 Testes cutâneos por picada	32
4 Apresentação dos Resultados	34
4.1 Análise quantitativa e qualitativa do conteúdo proteico dos extractos comerciais	34
4.2 Quantificação dos alérgenos <i>major</i>	37
4.3 Ensaio de inibição por <i>Microarrays</i>	39
4.4 Análise da actividade alérgica <i>in vivo</i>	40
4.4.1 Caracterização da população de doentes alérgicos	40
4.4.2 IgE específica para o látex	42
4.4.3 Testes cutâneos por picada	42
5 Discussão dos Resultados	45
5.1 Enquadramento teórico	45
5.2 Análise da variabilidade de conteúdo proteico e alérgico dos extractos comerciais	46
5.3 Análise da actividade alérgica dos extractos comerciais	48
6 Conclusão	52
7 Este estudo como ponto de partida para o melhoramento das preparações alérgicas	53
8 Perspectivas Futuras	54
9 Referências	55
10 Anexos	67
10.1 Protocolo de consentimento informado	67
10.2 <i>Abstract</i> aceite no <i>30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i> , Istambul, Turquia, 2011 (Comunicação em Painel)	68
10.3 Manuscrito submetido	69

Folha em branco

## Lista de Figuras

Figura 1.1 - A. Processo de incisão da casca da *Hevea brasiliensis* ([http://www.medicaexamglove.com/latex-gloves/mp\\_tapping\\_rubber\\_tree.html](http://www.medicaexamglove.com/latex-gloves/mp_tapping_rubber_tree.html)); B. Fluxo de LBN produzido pelas células laticíferas da planta (<http://www.kew.org/plants/rubber.html>).

Figura 1.2- Processo de produção de luvas de látex por imersão de moldes no LBN na sua forma líquida ([http://www.boston.com/bigpicture/2009/02/at\\_work.html](http://www.boston.com/bigpicture/2009/02/at_work.html)).

Figura 1.3- Mecanismo de desencadeamento de resposta alérgica (adaptado de [30]). APC - célula apresentadora de antígeno; FCεRI - receptor de IgE de alta afinidade; IFNγ - interferão-γ; MHC - complexo *major* de histocompatibilidade; TCR - receptor de célula T; TGFβ - factor de transformação de crescimento β; TNF - Factor de necrose tumoral; T<sub>Reg</sub> - Célula T reguladora.

Figura 3.1 - Curvas de calibração obtidas por aplicação do método de Bradford, numa gama de concentrações **A-** de 8 a 80 µg de proteína/mL de solução (Micro-Bradford); e **B-** de 50 a 500 µg de proteína/mL de solução.

Figura 3.2 - Esquema ilustrativo do processo de detecção de alérgenos individuais por EIA (Adaptado de [http://www.mitosciences.com/sandwich\\_elisa\\_assay\\_overview.html](http://www.mitosciences.com/sandwich_elisa_assay_overview.html)).

Figura 3.3- Esquema geral das placas de EIA. Legenda: C1 - C6 : Calibradores; Ct: controlo; E<sub>A</sub> - E<sub>G</sub>: amostras (extractos das empresas A-G).

Figura 3.4 - Curvas de calibração obtidas por FITkit™. **A-** Para os calibradores de Hev b 1 numa gama de concentrações entre 10 e 1000 µg/L. **B-** Para o Hev b 3 utilizando calibradores cujas concentrações estavam compreendida entre 10 e 1000 µg/L. **C-** Respectivo ao Hev b 5 cujos limites mínimos e máximos de concentração são 5 e 100 µg/L de solução. **D-** Para o Hev b 6.02 utilizando padrões de concentrações situadas na gama entre 5 e 200 µg/L.

Figura 3.5 - Esquematização do procedimento de aplicação de reagentes de testes cutâneos por picada no antebraço de um doente alérgico (<http://www.medinik.com/allergy/skin-allergy-test>).

Figura 4.1 - Análise por SDS-PAGE em gel de gradiente 4-20% dos sete extractos comerciais de látex (A-G) correntemente utilizados para TCP. M: Marcador de pesos moleculares (KDa).

Figura 4.2 - Análise por SDS-PAGE em gel a 12,5% de acrilamida de dois lotes diferentes fornecidos por quatro das empresas em estudo. M: Marcador de pesos moleculares (KDa); A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>- Lotes 1 e 2 de extractos do fabricante A; C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>- Lotes 1 e 2 de extractos do fabricante C;

D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>- Lotes 1 e 2 de extractos do fabricante D; F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>- Lotes 1 e 2 de extractos do fabricante F.

Figura 4.3 - Percentagens de inibição obtidas para o Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 8 em cada um dos extractos comerciais (fabricantes A- G)

Folha em branco

# Lista de Tabelas

Tabela 1.1- Composição aproximada do látex fresco, recolhido directamente da *Hevea brasiliensis* [2]

Tabela 1.2- Alergénios do látex reconhecidos e listados pela IUIS [27]

Tabela 4.1 - Determinação da concentração em proteína total de sete extractos alergénicos de látex de diferentes fabricantes (A a G) pelo método de Bradford.

Tabela 4.2 - Análise do conteúdo proteico em dois lotes diferentes de extractos de látex do mesmo fabricante.

Tabela 4.3 - Quantificação por EIA do conteúdo em Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 e Hev b 6.02 nos sete extractos de látex de (A-G) utilizados no diagnóstico da alergia ao látex *in vivo*.

Tabela 4.4 - Quantidades de IgE específica para os alergénios Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 8 detectadas nos ensaios de inibição-microarrays e respectiva percentagem de inibição para os extractos comerciais (fabricantes A a G).

Tabela 4.5 - Dados clínicos dos onze doentes alérgicos ao látex incluídos no estudo.

Tabela 4.6 - Diâmetro médio da pápula resultante da realização de testes cutâneos por picada em onze doentes alérgicos com alergia ao LBN confirmada, e respectivos valores dos níveis séricos de IgE látex-específica.

Tabela 4.7 - Valores descritivos dos resultados de TCP para cada extracto comercial no diagnóstico de alergia ao látex (n=11).

Folha em branco

# Lista de Acrónimos

ABCs	Vias aéreas, respiração e circulação ( <i>Airway, Breathing and Circulation</i> )
APCs	Células apresentadoras de antígeno ( <i>Antigen-Presenting Cells</i> )
BSA	Albumina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CHCB	Centro Hospitalar Cova da Beira, Covilhã
CSN	Centro de Saúde de Nelas
DEB	Doentes com espinha bífida
Der p 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> 1
EAACI	Academia Europeia de Alergia e Imunologia Clínica ( <i>European Academic of Allergy and Clinical Immunology</i> )
EIA	Imunoensaio enzimático ( <i>Enzyme ImmunoAssay</i> )
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade
HAL	Hospital Amato Lusitano, Castelo Branco
HDE	Hospital Dona Estefânia, Lisboa
Hev b	<i>Alergénio da Hevea brasiliensis</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HRP	Peroxidase ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )
IFN $\gamma$	Interferão- $\gamma$
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ISAC	<i>Immuno Solid-phase Allergy Chip</i>
ISU	Unidades normalizadas ISAC ( <i>ISAC standardized units</i> )

IUIS	União Internacional de Sociedades Imunológicas ( <i>International Union of Immunological Societies</i> )
KDa	Kilo Dalton
LBN	Látex de borracha natural
MHC	Complexo <i>Major</i> de Histocompatibilidade ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
REF	Factor de alongamento da borracha
rHev b	Alergénio recombinante da <i>Hevea brasiliensis</i>
SD	Desvios padrões ( <i>Standard Deviations</i> )
SDS	Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SPSS	Software estatístico - <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAS	Trabalhadores da área de saúde
TCP	Testes cutâneos por picada
TCR	Receptor de célula T
TGFB	Factor de transformação de crescimento B ( <i>Transforming Growth Factor-B</i> )
T <sub>H</sub>	Células T auxiliares
TNF	Factor de necrose tumoral
TR	Tampão de redução
T <sub>Reg</sub>	Células T reguladoras

Folha em branco

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Látex de borracha natural

#### 1.1.1 Descrição geral

O látex de borracha natural (LBN) consiste na seiva leitosa produzida por células especializadas, em mais de 2000 espécies de plantas. Porém, a obtenção desta matéria-prima, em quantidades comerciais, faz-se quase exclusivamente a partir da árvore tropical *Hevea brasiliensis*, pertencente à família das Euphorbiaceae. As células da planta especializadas na produção de LBN, denominadas laticíferas, formam uma rede tipo tubo ao longo da árvore, que facilita a circulação do seu produto a todos os locais da planta. Este produto leitoso desempenha um importante papel no mecanismo fisiológico da planta, nomeadamente, na cicatrização de locais eventualmente danificados ou feridos. Para o favorecimento do fluxo do LBN procede-se, correntemente, ao ferimento, por incisão, da casca mole do caule da *H. brasiliensis*, promovendo deste modo a libertação do conteúdo citoplasmático das células laticíferas, o que permite a sua recolha para a sua posterior utilização na indústria da borracha (Figura 1.1 A e B) [1].



Figura 1.1 - A. Processo de incisão da casca da *Hevea brasiliensis* ([http://www.medicalexamglove.com/latex-gloves/mp\\_tapping\\_rubber\\_tree.html](http://www.medicalexamglove.com/latex-gloves/mp_tapping_rubber_tree.html)); B. Fluxo de LBN produzido pelas células laticíferas da planta (<http://www.kew.org/plants/rubber.html>).

### 1.1.2- Composição Bioquímica

O principal constituinte do LBN, recolhido directamente da planta de origem, é, além da água, a borracha natural, um hidrocarboneto cis-poliisopreno polimérico (Tabela 1.1). Esta matéria-prima possui também na sua composição outras substâncias derivadas da planta, incluindo hidratos de carbono (açúcares), glicósidos esteróides, resinas, cinzas e um conjunto significativamente grande de proteínas, que devido ao facto do LBN não ser um fluido homogéneo, não se encontram uniformemente dispersas [2]. O conteúdo proteico do LBN tem sido claramente considerado a causa de desenvolvimento da alergia ao látex em humanos, e proteínas específicas têm sido estabelecidas como alergénios dominantes para vários subgrupos populacionais[3] como vai ser mais profundamente abordado ao longo desta dissertação.

Tabela 1.1- Composição aproximada do látex fresco, recolhido directamente da *Hevea brasiliensis* [1].

Constituintes	Percentagem (%)
Água	55-65
Borracha (cis-1,4-poliisopreno)	30-40
Proteínas	2-3
Resinas	1,5-3,5
Açúcares	1,0-2,0
Cinzas	0,5-1,0

### 1.1.3 Processamento durante a Manufactura

De uma forma geral, a maioria das proteínas detectadas no LBN, ocorrem na sua forma nativa nos produtos de látex finais, contudo, ocasionalmente, são detectadas nestes numa configuração alterada, devido à possibilidade de formação de neo-alergénios durante o processamento do LBN [4, 5]. Ou seja, por vezes, o conteúdo proteico do látex é afectado pelo processo de manufactura, sendo portanto necessário conhecer bem as etapas que integram este processo, de forma a permitir a compreensão da alergenicidade dos produtos comerciais, os quais constituem potenciais fontes de sensibilização.

É do conhecimento geral que durante as primeiras fases do processo de manufactura da borracha diversas quantidades de amónia são, frequentemente, adicionadas à matéria-prima. Neste sentido, vários estudos têm demonstrado que o látex amoniado e extractos de luva podem conter alergénios similares aos existentes no LBN fresco [6]. Porém, também tem sido

descrito em alguns estudos que ambas as propriedades imunológicas e quantitativas das proteínas do LBN podem ser modificadas após a adição da amónia [6, 7], e portanto, que o potencial alergénico do látex amoniado pode estar alterado relativamente à matéria-prima extraída da árvore de origem [7]. Além da amónia, outros compostos, são muitas vezes adicionados, para tratamento do LBN durante o processo de manufactura, tais como catalisadores, óxidos metálicos, antioxidantes, entre outros. Muitos destes podem também influenciar o conteúdo proteico dos artigos de látex resultantes. As temperaturas de processamento do látex, bem como outras variáveis de produção, podem igualmente afectar o teor e a integridade proteica [8]. Assim, a possibilidade de formação de novos epítomos alergénicos em algumas proteínas ou péptidos do látex durante, e em consequência do processo de manufactura de artigos de LBN, designadamente das luvas, tem vindo a ser descrita por alguns autores [9].

#### **1.1.4 Produtos à base de látex de borracha natural**

O látex da *Hevea brasiliensis* foi considerado pela Medicina Moderna como um material inócuo e relativamente inerte em termos imunológicos. Este pensamento, associado à sua notável flexibilidade, elasticidade e conforto, tornaram-no atractivo para uma vasta variedade de aplicações, nomeadamente no fabrico de instrumentos médicos [10, 11]. De forma particular, as propriedades atractivas do LBN, articuladas com as suas excelentes qualidades de barreira e a inerente resistência ao rasgo, conduziram ao seu uso generalizado como uma forma conveniente e eficaz de limitar a propagação de doenças transmissíveis, tais como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV - *Human Immunodeficiency Virus*) e a hepatite C [10]. De facto, está descrito um aumento exponencial na produção de produtos de látex, especialmente, de luvas de LBN e no seu uso, principalmente entre pessoal médico e paramédico, no final da década de 80 em resposta ao HIV e à hepatite viral pandémica [12].

Dependendo das características desejadas para os artigos finais, a matéria-prima provinda da *Hevea brasiliensis* é usada numa de duas formas: LBN líquido concentrado ou LBN seco. O LBN na sua forma líquida é usado na produção de artigos comuns de uso médico e do quotidiano tais como, luvas, preservativos, cateteres, tubos de traqueotomia e balões. Numa forma seca este é, correntemente, utilizado na manufactura de chupetas, êmbolos de seringas, máscaras, adesivos e rolas de borracha [13, 14]. Para além dos referidos, existe uma gama extremamente numerosa de artigos contendo LBN na sua composição, estimando-se que subsistam cerca de 40 000 destes produtos actualmente disponíveis no mercado [15].



Figura 1.2- Processo de produção de luvas de látex por imersão de moldes no LBN na sua forma líquida ([http://www.boston.com/bigpicture/2009/02/at\\_work.html](http://www.boston.com/bigpicture/2009/02/at_work.html)).

De entre os produtos de LBN, as luvas médicas descartáveis, em particular as luvas contendo pó lubrificante na sua superfície interna, estão descritas como o principal reservatório de alergénios de LBN, responsáveis pela sensibilização ao látex em humanos [16, 17]. Este pó é frequentemente adicionado ao interior das luvas cirúrgicas e de exame, aquando do processo de manufactura, com o objectivo de facilitar a sua utilização pelos usuários. Apesar disso, todos os produtos de látex, de uma forma geral, representam fontes de alergénios susceptíveis de induzir o desenvolvimento de reacções alérgicas em indivíduos recorrentemente expostos [18].

## 1.2 Alergia/sensibilidade ao látex

### 1.2.1 Enquadramento histórico e conceitos básicos

O termo “alergia” foi originalmente definido em 1906 por Von Pirquet como “uma capacidade alterada do corpo de reagir a uma substância estranha”, o alergénio. Essa resposta, segundo o conceito introduzido na altura, poderia resultar num efeito de imunidade e protecção contra o agente externo ou numa reacção de hipersensibilidade com consequências prejudiciais para o hospedeiro. Com o passar do tempo, a palavra alergia em ambientes clínicos de investigação caiu em desuso, e nos dias hoje é frequentemente designada como doença alérgica mediada por imunoglobulina E (IgE) [19].

A IgE foi identificada em 1967 por Ishizaka e Johansson como a reagina sérica que medeia as reacções de hipersensibilidade imediata. Esta constitui aproximadamente 0,0005% das imunoglobulinas séricas totais em adultos. A IgE circula no soro sanguíneo como um monómero, numa concentração altamente dependente da idade. De facto, os níveis de IgE sérica permanecem baixos no cordão umbilical (<2 KU/L), pois não atravessa a barreira placentária em quantidades significativas. Posteriormente, os níveis médios de IgE aumentam

progressivamente em crianças saudáveis até a faixa etária dos 10 a 15 anos e diminuem da segunda até à oitava década de vida [20].

Atopia foi um termo proposto por Coca e Cooke em 1923 para identificar a tendência hereditária para desenvolver alergias clínicas [21]. Actualmente, tendo como base este conceito, define-se atopia como a propensão genética para desenvolver anticorpos IgE em resposta à exposição alérgica [22].

O primeiro relato de alergia ao látex surgiu em 1927, publicado na Alemanha, no qual um indivíduo desenvolveu urticária generalizada após o uso de uma nova dentadura feita à base de látex [23]. No que respeita às reacções de hipersensibilidade imediata às luvas de LBN, estas começaram apenas a ser relatadas, mais tarde, na década de 70 [24]. Após isto, e devido aos elevados padrões de higiene em medicina, o uso de produtos de LBN aumentou exponencialmente durante o final dos anos 80s e 90s e, contemporaneamente, foram publicados numerosos relatos da ocorrência de reacções alérgicas severas, após variados contactos com artigos de LBN [23]. Efectivamente, dessa data até aos dias de hoje, devido ao seu uso generalizado, o número de possíveis contactos, desde o nascimento, com objectos de látex susceptíveis de induzir reacções alérgicas ou de sensibilizar indivíduos expostos é inestimável [25].

### **1.2.2 Alergénios identificados no látex de borracha natural**

Ao longo do tempo, têm sido realizados vários esforços por um grande número de investigadores, em todo o mundo, com o intuito de identificar e caracterizar as proteínas alérgicas individuais do LBN. Actualmente, de entre as mais de 250 proteínas identificadas no LBN, um número restrito tem sido implicado no desencadeamento de respostas alérgicas em humanos e listado como alergénios do látex. Estas proteínas com características alérgicas são denominadas em relação à espécie e género da planta parental por “Hev b” e sequencialmente numeradas por ordem de identificação [3]. Actualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Comité de Nomenclatura da União Internacional de Sociedades Imunológicas (IUIS - *International Union of Immunological Societies*) reconhece e lista oficialmente, de entre as centenas de proteínas que estão incluídas no LBN, treze alergénios, denominados de Hev b 1 a Hev b 13 [3]. Na tabela 1.2 estão apresentadas as características básicas de cada um dos alergénios do LBN, oficialmente reconhecidos.

Tabela 1.2- Alergénios do látex reconhecidos e listados pela IUIS [26].

Nomenclatura IUIS [26]	Designação Bioquímica [26]	Massa Molecular (KDa) [1, 27]	Função Biológica [27]
Hev b 1	Factor de alongamento da borracha (REF)	14,6	Biossíntese da borracha
Hev b 2	β-1,3-glucanase	35,1	Anti-fúngica
Hev b 3	REF-like (proteína das pequenas partículas de borracha)	23-27	Biossíntese da borracha
Hev b 4	Homóloga da lecitinase	50-57	Proteína estrutural
Hev b 5	Proteína ácida do látex	16	Proteína estrutural
Hev b 6.01	Proheveína	20	Precursor da Heveína
Hev b 6.02	Heveína (domínio N-terminal da proheveína)	4,7	Anti-fúngica
Hev b 6.03	Fragmento C-terminal	14	Desconhecida
Hev b 7.01 Hev b 7.02	Patatina-like	42,9	Ação insecticida
Hev b 8	Profilina do látex	10,2-15,7	Proteína estrutural do citoesqueleto: Regulação da polimerização da actina
Hev b 9	Enolase do látex	46	Função glicolítica
Hev b 10	Superóxido dismutase	25,8	Destruição de radicais livres
Hev b 11	Quitinase da classe I	32	Anti-fúngica
Hev b 12	Proteína de transferência de lípidos	9,3	Ação antimicrobiana
Hev b 13	Esterase do látex	43	Esterase Lipolítica (propriedades defensivas)

Esta série de alérgenos possui epítomos ligantes de IgE responsáveis pela sensibilização ao látex e constituem proteínas que ocorrem em elevada (ex. Hev b 6) ou em baixa concentração (Hev b 1-5, Hev b 7-13) na árvore do LBN [28]. Tal como apresentado na tabela

1.2, tais alergénios desempenham fundamentalmente quatro funções básicas: alongação do poliisopreno, defesa da planta de origem, função enzimática ou estrutural [5].

A maioria destes componentes alergénicos foi clonada, sequenciada e expressa em vectores adequados estando, actualmente, disponíveis como proteínas recombinantes.

### 1.2.3 Mecanismo de sensibilização e alergia aos alergénios do látex

O processo de sensibilização aos alergénios do látex, inicia-se com a exposição a artigos ou ambientes contendo LBN. Num organismo predisposto, em consequência da exposição, as células apresentadoras de antigénio (APCs- *Antigen-Presenting Cells*), reconhecem e processam os alergénios do látex, apresentando-os às células T auxiliares ( $T_H$ ) (Figura 1.3). Como primeira consequência deste processo surge a diferenciação e activação de células específicas, fundamentalmente células  $T_{H2}$ , que, uma vez activas, libertam um conjunto de citocinas características, nomeadamente interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13), responsáveis pela estimulação da proliferação de células B e pelo favorecimento de mudança de isotipo para produção de anticorpos IgE látex-específicos. Por sua vez, estes anticorpos ligam a receptores de IgE de alta afinidade (FcεRI) na superfície de um determinado número de células, particularmente, de mastócitos e basófilos, criando um estado de sensibilização no doente. Nesta fase há um concomitante estabelecimento de células B IgE<sup>+</sup> e células  $T_{H2}$  de memória.

Numa reacção alérgica imediata, também designada de hipersensibilidade de tipo I, a consequente exposição alérgica promove a desgranulação dos mastócitos sensibilizados com as IgE ligadas à sua superfície, culminando com um aumento dos níveis de cálcio intracelulares e a libertação de mediadores pré-formados, nomeadamente, histamina e proteases, e também de mediadores derivados de lípidos recentemente sintetizados, tais como leucotrienos e prostaglandinas. Os sintomas alérgicos podem subsequentemente ocorrer como um resultado de alterações fisiológicas e anatómicas induzidas por estes mediadores, nomeadamente o aumento da permeabilidade vascular, contracção do músculo liso e produção de muco [29-31]. As quimiocinas libertadas pelos mastócitos e outros tipos de células podem, por sua vez, direccionar o recrutamento de células inflamatórias, que contribuem para o desenvolvimento de resposta alérgica tardia (hipersensibilidade de tipo IV), a qual é caracterizada por um influxo de células  $T_{H2}$  e eosinófilos. Neste tipo de reacções, as células  $T_{H2}$  podem constituir uma importante fonte de citocinas, tais como interleucina-3 (IL-3), interleucina-5 (IL-5) e IL13 e os eosinófilos, por sua vez, são responsáveis por libertar um grande número de mediadores pró-inflamatórios, incluindo leucotrienos e proteínas básicas. Adicionalmente, respostas mediadas por células  $T_{H1}$  podem também ser responsáveis por algumas das características patogénicas em doentes que sofrem de formas crónicas de atopia, incluindo a apoptose epitelial e activação de células do músculo liso. As células T reguladoras ( $T_{Reg}$ ) são outro subtipo de células T CD4<sup>+</sup> com

implicações na supressão de respostas de células  $T_H2$  em humanos, envolvendo citocinas inibidoras, tais como a interleucina-10 (IL-10) e o factor de transformação de crescimento  $\beta$  (TGFB- *Transforming Growth Factor- $\beta$* ). Outro tipo de células T  $CD4^+$ , conhecido por células TH17, produtoras de interleucina-17 (IL-17) e interleucina-22 (IL-22), parecem estar especificamente associadas a eventos inflamatórios neutrofílicos que ocorrem durante a exacerbação da doença e a remodelação tecidual [30].

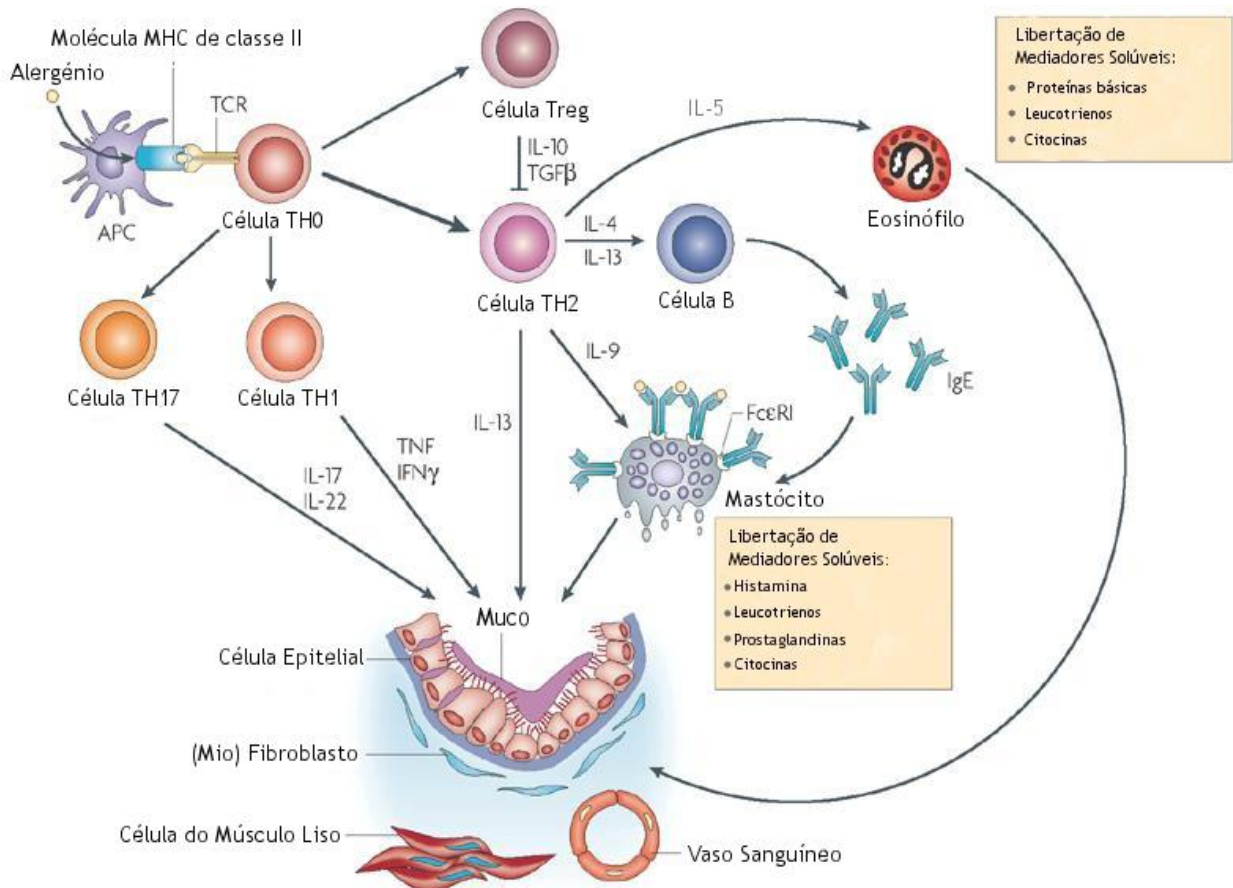


Figura 1.3- Mecanismo de desencadeamento de resposta alérgica (adaptado de [30]). APC - célula apresentadora de antígeno; FCεRI - receptor de IgE de alta afinidade; IFN $\gamma$  - interferon- $\gamma$ ; MHC - complexo *major* de histocompatibilidade; TCR - receptor de célula T; TGFB - factor de transformação de crescimento  $\beta$ ; TNF - Factor de necrose tumoral; T<sub>Reg</sub> - Célula T reguladora.

Em resultado do mecanismo apresentado, podem ser definidos dois estados distintos nos doentes sensíveis ao látex: o de sensibilidade e o de alergia. Numa forma breve, o estado de sensibilidade ao látex, é caracterizado pela presença de IgE específica para os alérgenos do LBN, sem qualquer manifestação clínica após exposição a produtos contendo látex. O estado de alergia ao látex consiste, por sua vez, na hipersensibilidade mediada por IgE em resposta aos alérgenos do LBN com o desenvolvimento de sintomas clínicos [32].

#### **1.2.4 Prevalência da alergia ao látex**

Ao longo das últimas décadas, na tentativa de determinar a magnitude do problema associado à alergia ao látex, vários investigadores têm efectuado numerosos estudos epidemiológicos para definir a sua prevalência na população em geral e em subgrupos populacionais, os quais se suspeita ser de risco.

Na população em geral, a prevalência estimada da alergia às proteínas do LBN demonstrou ser inferior a 2% [33]. Esta prevalência, bastante reduzida, deve ser considerada cautelosamente, visto que, é importante ter em conta que alguns dos indivíduos sensibilizados são assintomáticos, e portanto não considerados nos estudos epidemiológicos [34]. Além disso, a proporção de doentes assintomáticos com sensibilidade ao látex que progride para futura reactividade clínica não é conhecida [10].

Apesar da percentagem pouco significativa de indivíduos afectados na população em geral, a alergia e sensibilidade ao látex constituem problemas médicos, potencialmente sérios, em várias subpopulações distintas, as quais experienciam uma exposição aumentada a ambientes ricos em LBN [32]. A prevalência da sensibilização ao látex em doentes com espinha bífida (DEB), os quais apresentam características clínicas de hipersensibilidade e alergia ao látex, é considerada a maior prevalência na população global [32], tendo-se apresentado entre 25% e 72% em vários estudos [35-37]. Adicionalmente, tem sido relatado que o risco de anafilaxia durante o período intra-operativo e perioperativo nestes doentes é também significativamente maior que na população em geral [38, 39]. Podendo, efectivamente, o risco de desenvolvimento de reacção alérgica ao látex severa e não esperada em DEB ser 500 vezes superior ao risco a que a população em geral está sujeita [38]. Por sua vez, estudos nos quais se analisou a prevalência de alergia ao látex entre trabalhadores da área de saúde (TAS) apontaram para uma prevalência que variou de 2,9% a 17% [40, 41], podendo atingir os 36% [42]. Na população atópica a prevalência da alergia ao látex também é significativamente superior à da população em geral, sendo estimada entre 1,2% e 16,6% [43, 44].

Durante a última década, a aplicação de medidas de redução da exposição a produtos de látex concomitante com o uso de tratamentos específicos, têm conduzido a uma diminuição significativa da ocorrência de acidentes característicos de alergia ao látex. Apesar disso, a sua prevalência permanece elevada e ainda representa, actualmente, uma complicação potencialmente fatal [45].

#### **1.2.5 Factores e grupos de risco**

Muitas pessoas da população em geral são passíveis de desenvolver hipersensibilidade ao látex, nomeadamente, crianças que brincam regularmente com brinquedos de borracha, indivíduos sujeitos a cirurgias recorrentes, trabalhadores da indústria da borracha, pessoas que usam regularmente luvas de látex, trabalhadores envolvidos na recolha e processamento do LBN das árvores da borracha, entre outros [46, 47]. De facto, parece ser indiscutível que a

sensibilização é consistente com a frequente exposição a produtos de LBN, sendo este considerado o factor de risco primordial para o desencadeamento de mecanismos fisiológicos de sensibilização [45, 48, 49]. Além deste, a disposição atópica, isto é a existência de um historial familiar e/ou pessoal de alergia e o número de intervenções cirúrgicas compreendem também fortes e consistentes factores de risco para o desenvolvimento da alergia ao látex [50-52]. Apesar da disposição atópica e a frequência de exposição ao látex serem consideradas independentes para a sensibilização, Moneret-Vatrin sugeriu, num dos seus estudos, a existência de um efeito de sinergismo entre estes, relatando um risco cumulativo de 36,4% [53].

Outras subpopulações consideradas de alto risco para sensibilização ao látex constituem indivíduos ocupacionalmente expostos a produtos de LBN e indivíduos frequentemente expostos ao LBN enquanto utentes [54]. Assim, tal como foi apresentado no tópico anterior, existem dois subgrupos populacionais bem definidos como sendo de alto risco para o desenvolvimento de alergia ao látex: doentes com espinha bífida (DEB) e trabalhadores da área de saúde (TAS) [46, 55]. Tem sido sugerido que a sensibilização às proteínas do LBN em DEB é devida à exposição intensa e frequente, desde cedo, a produtos de LBN no decorrer de múltiplas cirurgias, exames médicos e testes de diagnóstico a que são submetidos, nomeadamente, através de cateterização e implantação de materiais contendo látex [50]. Estes procedimentos médicos são frequentemente requeridos devido às complicações, designadamente urológicas, que surgem em consequência da presença de espinha bífida [32]. Tendo isto em conta, vários são os estudos que têm identificado e mencionado factores de risco para o desenvolvimento de hipersensibilidade ao látex, especificamente para este grupo de indivíduos. Nestes, foi sugerido que o número de operações (o risco de alergia aumenta com cada cirurgia), a idade da primeira operação e o tipo de procedimentos cirúrgicos ao qual são submetidos, constituem factores importantes da indução de reactividade ao látex em DEB [56, 57]. No que respeita à sensibilização ao látex em TAS, esta é fundamentalmente desenvolvida em consequência do contacto diário com luvas de látex e com um ambiente de trabalho contendo um elevado teor em aeroalergénios [32]. Vários autores têm sugerido que, efectivamente, os TAS têm um risco aumentado de sensibilização e de sintomas alérgicos ao látex [42], três a cinco vezes superior em enfermeiras e médicos que em pessoal não envolvido directamente no tratamento de utentes [58, 59]. Neste grupo, acredita-se que existam evidências suficientes para concluir que a alergia ao látex aumenta com a duração e intensidade de exposição ocupacional, ou seja, que existe uma correlação positiva entre o risco de alergia e a duração da ocupação na área de saúde [60]. Tem sido também referido que a asma ocupacional associada ao LBN é devida, quase exclusivamente, ao uso continuado de luvas de látex contendo pó lubrificante no seu interior [10]. Isto tem sido, frequentemente, associado ao facto de que quando as luvas de látex são calçadas e retiradas pelos utilizadores as partículas deste pó, apesar de não serem consideradas alergénicas, vão ser dispersas no ar transportando consigo alergénios do látex, que desta forma se tornam

facilmente inalados e causadores de reacções alérgicas do foro respiratório, como a asma [61]. Nesta linha de investigação, Baur e seus colaboradores [62], determinaram que os níveis de aeroalergénios ambientais estão directamente relacionados com uma prevalência de sensibilização e sintomatologia aumentada, definindo estes níveis como um factor de risco de importância elevada para o desenvolvimento de reactividade às proteínas do LBN em TAS.

Indivíduos com uma história de alergia alimentar a frutos tropicais, tais como kiwi, banana, abacate e castanhas, assim como indivíduos com alergia a determinados pólenes de espécies relacionadas, estão em maior risco de desenvolver reacções alérgicas ao látex, uma vez que estes produtos vegetais partilham epítomos alérgénicos similares aos apresentados no LBN [63]. Alguns perfis genéticos podem também potenciar reacções às proteínas do LBN [64]. Além disso, indivíduos com antecedentes de eczema e/ou dermatite das mãos também apresentam um risco acrescido, após utilização de luvas de látex, visto que, a pele seca e rachada das mãos facilita a penetração das proteínas do látex e, portanto, a sensibilização [65].

Por fim, é importante realçar, que o denominador comum à maioria dos factores de risco apresentados é o elevado nível de exposição aos alergénios do LBN [32].

### **1.2.6 Alergénios *major* para os dois grupos de risco mais relevantes**

Está actualmente bem estabelecido que os principais alergénios, denominados alergénios *major*, responsáveis pela sensibilização em TAS são diferentes dos que estão envolvidos na sensibilização em DEB. A designação de alergénio *major* refere-se a uma definição publicada na qual a IgE específica desse alergénio é demonstrável em mais de 50% dos doentes alérgicos que integram o estudo [66].

Num estudo desenvolvido por Alenius e seus colaboradores, 73% de uma população de crianças com espinha bífida alérgicas ao látex apresentou IgE específica contra ambos Hev b 1 e Hev b 3, sendo que apenas 7% dessa população não apresentou IgE específica contra nenhum destes dois alergénios [67]. Outros estudos confirmam que estas proteínas hidrofóbicas, Hev b 1 e Hev b 3, que se encontram ligadas às partículas da borracha, constituem alergénios muito importantes na sensibilização de DEB ao látex [68, 69], convencionando-se estes alergénios como os alergénios do LBN *major* para os DEB. Estudos adicionais, tais como o projectado por Wagner e seus colaboradores definiram o Hev b 7 como o terceiro alergénio *major* associado à sensibilização ao látex em DEB [50]. Por outro lado, estudos utilizando populações de TAS descreveram os alergénios hidrofílicos Hev b 5 e Hev b 6.02 como os alergénios mais importantes na sensibilização ao látex neste grupo populacional [70, 71]. Estudos complementares referem também o alergénio Hev b 13 como sendo um dos alergénios do LBN predominantemente participante na sensibilização de TAS [55].

### 1.2.7 Vias de sensibilização

A exposição aos alergénios do LBN, mais concretamente a penetração destas proteínas no organismo, pode ocorrer por várias vias:

- ❖ **cutânea**, que ocorre substancialmente pelo uso de luvas de látex [72];
- ❖ **respiratória**, por meio dos alergénios transportados pelo ar existentes no ambiente envolvente [72];
- ❖ **membranas mucosas**, como decorre durante procedimentos médicos, nomeadamente cirúrgicos ou dentários [72];
- ❖ **vascular**, através de administração intravenosa por utilização de seringas com êmbolos de látex e de tubagens médicas [73].

No que respeita aos dois principais grupos de risco, como foi referido no tópico anterior, os TAS são sensíveis a alergénios solúveis em água, enquanto os DEB reconhecem maioritariamente proteínas hidrofóbicas, as quais estão fortemente ligadas a partículas de borracha [15, 74]. Peixinho e colaboradores sugeriram que este perfil alergénico pode estar directamente relacionado com a interacção diferencial que os indivíduos têm com a fonte alergénica, em particular, as luvas cirúrgicas [75, 76]. Nestes estudos foi demonstrado que a superfície interna das luvas cirúrgicas de látex é fundamentalmente rica em proteínas hidrofílicas, enquanto que na superfície externa verificou-se a predominância de proteínas hidrofóbicas [75, 76]. Desta forma, foi sugerido que existe uma relação entre o tipo de alergénios existentes na superfície interna e externa das luvas cirúrgicas e a sensibilização apresentada pelos TAS e DEB, respectivamente. De facto, estas constatações experimentais estão de acordo com o que se verifica na prática, visto que os TAS contactam directamente com a superfície interna da luva, ocorrendo a sensibilização via contacto mucocutâneo ou por inalação de partículas existentes nas luvas com pó no seu interior [25], enquanto que os DEB, quando sujeitos a intervenções cirúrgicas, contactam principalmente com a superfície externa das luvas. Efectivamente, na maioria dos DEB a sensibilização e indução da alergia ao látex ocorre por contacto directo da mucosa interna com produtos de LBN durante as cirurgias, as quais são repetidas várias vezes após nascimento, ou por cateterização para a manutenção das vias de excreção [69]. Por outro lado, nos TAS a sensibilização e indução da alergia ocorre, fundamentalmente, por contacto cutâneo e respiratório pelo uso de luvas ou por inalação das proteínas de látex adsorvidas ao pó lubrificante [77].

### 1.2.8 Manifestações clínicas

As reacções adversas ao látex incluem dermatite de contacto não alérgica, hipersensibilidade tardia de tipo IV e hipersensibilidade imediata de tipo I. [78].

A dermatite de contacto irritante consiste numa resposta imediata a químicos e aditivos existentes em produtos de látex, apresentando-se correntemente com o desenvolvimento eritema cutâneo, formação de vesículas e prurido em áreas de contacto directo.

A hipersensibilidade do tipo IV, também comumente designada por dermatite de contacto alérgica, constitui também uma reacção de contacto cutâneo ou através das membranas mucosas. Contudo, ocorre apenas 24-26 horas após a exposição a químicos existentes em produtos de látex, podendo ou não expandir além da área de contacto directo. Os sintomas característicos incluem eritema, prurido, eczema, pápulas e vesículas.

Apesar de menos prevalente, a hipersensibilidade de tipo I é a resposta clínica mais séria e considerada mais importante num contexto de doença alérgica [78]. As respostas mediadas por IgE de tipo I desenvolvem-se dentro de minutos a horas após exposição aos alérgenos do LBN e podem variar de reacções locais moderadas, a reacções sistémicas severas. A pele constitui o local de reacções alérgicas mais frequente, no entanto, sintomas similares podem ser observados em membranas mucosas [79]. Neste caso, a sintomatologia típica é caracterizada por prurido, eritema e edema. Contudo, à medida que a sensibilidade e a exposição alérgica aumenta, pode também desenvolver-se urticária, inicialmente restrita ao local de contacto mas que pode eventualmente estender-se a áreas contíguas e, finalmente, tornar-se sistémica. A exposição a aeroalérgenos do látex pode levar ao desenvolvimento de sintomas oculares, nasais e pulmonares. Os sintomas oculares iniciam-se usualmente com prurido e progridem para lacrimejamento, quemose e edema. Frequentemente, o contacto directo com os produtos de látex leva ao inchaço súbito das pálpebras. Por sua vez, os sintomas nasais incluem espirros, rinorreia aquosa e congestão nasal, porém, os doentes alérgicos podem ainda desenvolver dor de garganta, irritação da laringe ou tosse. Relativamente aos sintomas pulmonares, estes podem variar de tosse a asma potencialmente fatal [4], sendo que a asma induzida pelo LBN desenvolve-se como resposta à exposição respiratória crónica a aeroalérgenos do látex, que gera sensibilização das vias aéreas e respostas inflamatórias características da asma alérgica [80, 81]. Por esta razão, os relatos de asma LBN são bastante raros entre indivíduos alérgicos ao látex sensibilizados enquanto utentes. Em contraste, esta condição não é rara naqueles com exposição ocupacional [10]. A alteração da função pulmonar e sintomas torácicos podem ou não estar presentes em doentes expostos a aeroalérgenos. Além dos anteriores, sintomas gastrointestinais, cardiovasculares e geniturinários de alergia ao látex têm sido também documentados. As formas severas de alergia ao látex são mais comumente associadas a

exposição através das membranas mucosas [79] e são caracterizadas por sibilos, estridor, espirros, prurido ocular, urticária, angioedema, hipotensão e anafilaxia [4].

Relativamente aos grupos de risco que têm especial importância, associado a vias de sensibilização e perfis alergénicos distintos, as manifestações clínicas apresentadas por DEB e TAS também diferem. Estas consistem, principalmente, em urticária generalizada em DEB, enquanto que TAS adultos apresentam, maioritariamente, urticária de contacto e sintomas respiratórios [82].

### **1.2.9 Reactividade cruzada - Síndrome látex-frutos(-pólenes)**

A problemática da alergia ao látex torna-se ainda mais complexa pela possibilidade de ocorrência de reactividade cruzada com um largo número de frutos e pólenes [25]. De facto, o desenvolvimento de reacções alérgicas a frutos e pólenes em indivíduos que são alérgicos ao látex [83] e de reacções alérgicas ao látex em indivíduos que são alérgicos a frutos e/ou pólenes [84] têm recebido crescente atenção e têm sido correntemente designadas de síndrome de alergia látex-frutos(-pólenes). Este fenómeno ocorre devido à existência de similaridades estruturais e biológicas entre os vários alergénios proteicos [72]. Efectivamente, o LBN partilha epítomos alergénios com alguns frutos comuns, tais como a banana, o abacate, a papaia, o kiwi, a castanha, entre outros, e com pólenes de espécies botanicamente relacionadas, tais como a *Ricinus communis* e *Mercurialis annua* [85, 86]. Desta forma, é relativamente comum que anticorpos IgE de doentes alérgicos aos frutos e pólenes referidos reajam quando expostos às proteínas do látex [78]. As consequentes reacções adversas ao látex associadas à reactividade cruzada com pólenes e frutos são relativamente frequentes e potencialmente fatais [10]. De uma forma geral, as manifestações clínicas que são experienciadas por indivíduos com síndrome látex-frutos(-pólenes) após a ingestão destes alimentos são similares às que ocorrem quando o indivíduo está exposto ao látex [15].

A possibilidade de ocorrência deste tipo de reactividade cruzada torna, ainda mais difícil, um diagnóstico correcto de alergia ao látex, tanto *in vivo* como *in vitro*. Este facto impõe que a reactividade cruzada das proteínas do LBN com numerosos alergénios característicos de alimentos e plantas constitua um importante factor a ser considerado para a correcta avaliação de indivíduos sensibilizados ao látex [54].

### **1.2.10 Tratamento**

Actualmente, não existe um tratamento totalmente eficaz e seguro para a alergia ao LBN, excepto a total ausência de contacto a fontes de alergénios do LBN. Por esta razão, a restrição de contacto directo com objectos ou ambientes ricos em látex, acompanhada do tratamento da sintomatologia alérgica, é a terapia mais correntemente recomendada a indivíduos sensibilizados [25].

Para gestão dos sintomas de alergia ao látex são prescritos fármacos e acções médicas específicas para cada situação:

- ❖ As dermatites de contacto, tanto a alérgica como a irritante, podem ser reguladas com a aplicação de corticosteróides tópicos [78].
- ❖ As reacções de tipo I moderadas sem desconforto respiratório podem ser tratadas por administração de esteróides tópicos e anti-histamínicos [78].
- ❖ A hipersensibilidade de tipo I com desconforto respiratório, inchaço da língua, laringe ou faringe e anafilaxia requer a avaliação das ABCs (Airway, Breathing and Circulation) - vias aéreas, efectividade da respiração e circulação/pulso- e activação de serviços médicos de emergência. Nos casos de anafilaxia devem ser administradas doses de epinefrina [78]. Doentes com história de alergia de tipo I severa podem transportar consigo uma caneta auto-injectora de epinefrina para eventuais eventos de reacções severas [65].

A imunoterapia específica, em situações pontuais, pode constituir uma opção de tratamento da alergia a longo prazo, no entanto, para este procedimento ser seguro e efectivo é necessária a utilização de um reagente contendo quantidades conhecidas e definidas dos alergénios clinicamente relevantes [79]. Associado ao facto de não estar disponível um reagente bem caracterizado para fins terapêuticos, esta modalidade de tratamento é considerada bastante delicada no que respeita ao risco inerente de ocorrência de reacções sistémicas, nomeadamente de choques anafiláticos [25].

O fornecimento de informação aos doentes sobre a possibilidade da ocorrência de reacções cruzadas e aconselhamento sobre alternativas seguras, nomeadamente produtos livres de látex, constituem também medidas que os clínicos devem ter em conta [72].

### **1.2.11 Prevenção**

A prevenção constitui o primeiro e mais efectivo passo no tratamento da alergia ao látex, contudo, uma vez que os alergénios do látex são muito comuns, tanto no ambiente profissional, como no ambiente privado de muitas pessoas, um ambiente estritamente livre de látex pode ser difícil de ser conseguido e mantido [79]. No entanto, e apesar do intenso progresso, que se tem vindo a desenvolver nos últimos anos, no âmbito do diagnóstico e gestão da alergia ao LBN, a abordagem mais efectiva para o alívio desta doença alérgica é, efectivamente, a redução da exposição dos doentes às fontes alergénicas. Nesse sentido, têm sido realizadas pressões no sector industrial que visam, fundamentalmente, dois objectivos: a redução do conteúdo proteico dos produtos de LBN finais e o controlo e redução de aeroalergénios no ambiente hospitalar [54]. Para tal, têm sido propostos protocolos de prevenção da alergia ao látex e legislação relativa à qualidade das luvas cirúrgicas para

peçoal médico e paramédico [25]. Este peçoal deve trabalhar, idealmente, num ambiente livre de quaisquer alergénios do látex, porque mesmo quantidades de LBN muito pequenas suspensas no ar são suficientes para o despoletar de uma reacção alérgica. Isto implica o uso de luvas livres de pó lubrificante e não alergénicas, bem como a substituição de todo o material susceptível de conter LBN nas salas de cirurgia e de examinação, o que inclui cateteres, torniquetes, emplastos e material de ventilação [25]. Estas medidas podem, efectivamente, constituir uma mais-valia para a prevenção da ocorrência de reacções alérgicas ao LBN, visto que está descrito que a redução da utilização de produtos de látex em hospitais pode contribuir para a redução da incidência da alergia ao látex entre os TAS e utentes hospitalizados [8].

Ao longo dos últimos anos, tem-se procedido à crescente substituição das luvas de látex por luvas de outras matérias-primas, contudo, um dos maiores problemas da introdução de luvas livres de látex é que os cirurgiões notam que estas dificultam o seu trabalho, uma vez que providenciam uma sensação táctil inferior às luvas de látex. Apesar disso, têm sido realizados esforços no sentido de produzir luvas livres de látex que forneçam uma sensação táctil similar. Outros problemas destas alternativas são o facto de estarem descritas como possuidoras de qualidades inferiores às do látex, nomeadamente como barreira de protecção (contra infecções), permeabilidade (drogas antineoplásicas), resistência (a desinfectantes, álcool) e custo aceitável [45, 87]. Assim, o LBN continua a ser preferido para determinadas aplicações, por razões quer de qualidade, quer económicas.

Durante os últimos anos várias empresas da borracha têm realizado uma intensa investigação no sentido de reduzir o conteúdo alergénico dos seus produtos [18]. Por conseguinte, no que respeita a estratégias de prevenção, é razoável encontrar procedimentos durante o processo de manufactura que visem a desnaturação e eliminação de proteínas a condições economicamente aceitáveis [23]. Esta e outras tentativas para minimizar a concentração alergénica das luvas de LBN, de forma a prevenir a sensibilização e o desenvolvimento de alergia clínica, são conhecidas como objectivos de mútuo interesse para as empresas da borracha e autoridades reguladoras de saúde [88]. Um estudo de Mahler *et al*, sugere a selecção e uso de luvas com baixos teores de alergénios como uma estratégia de prevenção viável contra a alergia ao látex [18]. Assim, a aplicação de uma metodologia fidedigna para a quantificação das proteínas de látex nos produtos comercialmente disponíveis pode constituir uma condição importante na gestão da alergia ao látex e também na sua prevenção [54].

É importante referir que estão publicadas evidências que demonstram que a restrição de contacto directo com produtos de látex resolve rapidamente os sintomas de alergia, no entanto, os níveis de IgE específica podem permanecer detectáveis por mais de cinco anos, sugerindo que a restrição a fontes de alergénios do LBN a longo-prazo deve ser recomendada em indivíduos com alergia ao látex conhecida [65].

A correcta identificação dos indivíduos que se tornaram sensibilizados e têm propensão para sofrer sintomas após exposição repetida a produtos de látex é a principal meta para a prevenção das reacções alérgicas [89]. Isto porque um reconhecimento precoce da sensibilização ao LBN pode permitir a aplicação de estratégias de protecção pessoais preventivas de forma a evitarem-se consequências maiores [90].

### 1.3 Diagnóstico da alergia ao látex

Tendo em vista as possíveis manifestações clínicas severas que podem advir em consequência da alergia ao látex, um diagnóstico correcto e detalhado é essencial para a aplicação de medidas preventivas adequadas e para o estabelecimento de um tratamento específico e efectivo. Além disso, um diagnóstico exacto é de extrema importância para uma correcta determinação da incidência e prevalência deste problema de saúde.

Actualmente, tem sido consensual que o passo inicial do processo de diagnóstico da alergia ao látex baseia-se na presença de uma história clínica compatível e fortemente sugestiva de reactividade às proteínas do LBN. Ou seja, um indivíduo suspeito de ter desenvolvido sensibilidade ao látex pode queixar-se de uma gama de sintomas alérgicos que este acredita estar associada com o uso ou exposição a produtos de LBN [91]. A apresentação da alergia ao látex inclui manifestações clínicas e morfológicas, o que implica que o seu diagnóstico positivo seja baseado em vários parâmetros [54]. Desta forma, os sinais clínicos e histórias médicas são usualmente confirmados por testes *in vivo*, como testes cutâneos por picada (TCP) e análises laboratoriais *in vitro* específicas para as proteínas do látex [92], metodologias que têm como base a detecção de IgE látex-específica existente na pele e no soro sanguíneo, respectivamente [29].

A maioria dos investigadores defende que a presença de reactividade positiva por TCP e/ou detecção positiva de IgE específica com histórias clínicas concordantes são suficientes, ou pelo menos fortemente sugestivas de alergia ao látex [93]. Nos casos nos quais se detecta discordância entre a sintomatologia e os resultados dos TCP ou do doseamento de IgE específica é aconselhado a execução de um teste de provocação, que deve ser repensado na eventualidade de se tratar de doentes com história de alergia ao látex relacionada com anafilaxia, daí não se considerar os testes de provocação como um teste de primeira-linha [79].

Na ausência de reagentes de TCP com conteúdos standardizados e devido ao risco inerente de anafilaxia durante os TCP, a quantificação de IgE específica do látex existente no soro de alérgicos tem sido proposta como o primeiro método confirmatório de alergia para estabelecer o diagnóstico de alergia ao látex [94]. No entanto, tem sido relatado que várias

técnicas de determinação dos níveis de IgE látex-específicas apresentam sensibilidade inadequada [95, 96]. De facto, a sensibilidade dos testes de doseamento de IgE específica é inferior à dos TCP, sendo que os testes de quantificação de IgE são positivos em apenas 60-90% dos doentes sensibilizados [97].

### 1.3.1 Testes *in vitro* de detecção de IgE específica

A vasta maioria dos testes *in vitro* de diagnóstico da alergia ao látex constitui métodos para detecção de anticorpos IgE anti-látex no soro dos doentes [5]. Estes podem ter como base o uso em laboratório de teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ou métodos comerciais, tais como sistemas de ImunoCAP (Phadia, Uppsala, Suécia), *Immulite* (Siemens, Berlim, Alemanha) e HY-TEC (Hycor/Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia), sendo que os três últimos são realizados por aparelhos de análise automatizados, maximizando a precisão do teste e minimizando o tempo dispendido [5, 29]. Recentemente, foi também introduzida uma metodologia de detecção de IgE sérica baseada em *microarrays* com alérgenos recombinantes do látex como uma ferramenta de elevado potencial para o diagnóstico da sensibilidade ao LBN [98].

A principal vantagem destes testes é que uma vez que se tratam de metodologias *in vitro*, elimina-se o risco de anafilaxia que é susceptível de ocorrer nos TCP. Opostamente, as limitações que acompanham estes métodos de diagnóstico, relativamente aos TCP, são: a sua sensibilidade inferior, o facto de envolverem custos monetários superiores e maior tempo de espera pelos respectivos resultados [65].

### 1.3.2 Testes cutâneos por picada

Os TCP constituem uma metodologia de diagnóstico bastante atractiva para os imunoalergologistas devido ao facto de serem considerados testes rápidos e sensíveis que envolvem uma resposta biológica clinicamente observável (pápula e eritema) [91].

Os TCP disponíveis na Europa são baratos, bastante sensíveis e específicos, no entanto, devem ser executados com medidas de segurança adequadas, uma vez que podem ocorrer reacções severas em consequência da aplicação de uma solução alérgica concentrada [45]. O facto de os TCP serem associados a reacções anafiláticas [99], juntamente com a existência de uma quantidade significativa de variáveis que influencia a sua exactidão e reprodutibilidade [100, 101], constituem as principais desvantagens desta metodologia. Podem ser obtidos resultados reprodutíveis por TCP realizados cuidadosamente com extractos de elevada qualidade e avaliação precisa da dimensão da pápula resultante. Contudo, isto é improvável de ocorrer num contexto clínico habitual, no qual os TCP são aplicados por diferentes operadores utilizando uma série de extractos alérgenos de composição variável [102].

É importante salientar que, em situações específicas, os ensaios laboratoriais de detecção de IgE são preferíveis a estes testes *in vivo*, nomeadamente, quando os doentes se encontram a tomar anti-histamínicos e em situações, nas quais, os TCP podem tornar-se de difícil execução ou interpretação, devido à existência de dermatografismo e eczema [92].

### 1.3.2.1 Extractos alergénicos de diagnóstico

Apesar de os TCP serem considerados a ferramenta de diagnóstico de alergia mais confiável, a sua precisão e reprodutibilidade pode ser influenciada pela utilização de reagentes de conteúdo não uniforme [103]. Isto deve-se ao facto do seu desempenho ser altamente dependente do tipo de extracto proteico utilizado, em particular da fonte proteica utilizada para a sua preparação [11]. Ao longo dos anos, os TCP têm sido realizados com extractos de proteínas do látex provenientes de variadas fontes, nomeadamente a partir de produtos de látex e da árvore de origem, a *Hevea brasiliensis* [54]. Nos dias de hoje a dúvida mantém-se, existindo ainda controvérsia relativamente à definição da fonte alergénica mais apropriada para a formulação de reagentes de diagnóstico *in vivo*.

Actualmente, o LBN no estado crude constitui a fonte alergénica preferida para produção de soluções de diagnóstico, visto que inclui um repertório abrangente dos alergénios do látex clinicamente relevantes [28]. Por esta razão, a realização de TCP com extractos látex fresco é o teste clínico mais frequentemente usado para o diagnóstico da alergia ao látex. No entanto, este tipo de extractos não corresponde a uma fonte de alergénios uniforme devido à sua esperada variabilidade de lote para lote e à sua instabilidade [104]. De facto, vários autores têm referido que apesar deste tipo de preparações ser eficiente na demonstração de IgE específica em doentes alérgicos ao látex, tais extractos não são bons candidatos para uniformização, devido à sua inerente variabilidade, falta de fiabilidade, complexidade dos componentes alergénicos e segurança questionável no seu uso *in vivo*. Além disso, estas preparações contêm, potencialmente, materiais reactivos que podem resultar numa inerente dificuldade de interpretação dos resultados obtidos, pelo que a sua aplicação não é a mais aconselhada [105].

As previstas variações do conteúdo proteico do LBN crude são devidas a muitos factores, nomeadamente associados ao solo de cultivo, sazonais, práticas agronómicas, e diferenças nas condições de armazenamento e de manipulação laboratorial das amostras [28]. Assim, para um dado lote de látex é possível que os diferentes componentes alergénicos variem nas suas quantidades relativas e na sua alergenicidade [2]. Além disso, também se estima que a sua composição em proteínas não alergénicas seja bastante elevada e que alergénios facilmente degradados possam estar completamente ausentes das soluções de diagnóstico [13]. Os factos enumerados anteriormente constituem as razões que justificam a conhecida dificuldade de produção de soluções para TCP uniformizadas e validadas [23]. Apesar disso, nas últimas décadas, a pressão para definir um processo de padronização alergénica tem

aumentado, e agências reguladoras em vários países europeus começaram a questionar os fabricantes de extractos alergénicos sobre o nível de alergénios *major* dos seus produtos, esperando-se que este se torne, num futuro próximo, um requisito de registo [106].

Actualmente, existem vários extractos de látex comercialmente disponíveis em Portugal para TCP, contudo há apenas dados limitados sobre o seu nível real de variabilidade de conteúdo e eficácia [107]. De entre estes, apenas está descrita a produção de uma preparação alergénica validada e uniformizada (Stallergènes SA, France) [7], o que vem colocar uma variabilidade adicional aos extractos disponíveis. Deste modo, é esperado que o perfil alergénico de um reagente de diagnóstico produzido por diferentes empresas, varie na sua composição proteica, potência alergénica e imunoreactividade [29].

Uma vez que o doente alérgico pode ser sensibilizado a fontes alergénicas com diferentes composições proteicas, em diferentes ocasiões, o material usado para avaliação clínica deve conter quantidades adequadas e equilibradas de todos os alergénios clinicamente relevantes [108]. Porém, é bastante difícil a produção de uma preparação alergénica contendo quantidades apropriadas de todos os alergénios, para os quais qualquer indivíduo pode tornar-se sensibilizado, uma vez que alguns desses são demasiado lábeis para sobreviverem a todos os passos integrantes da produção de uma preparação alergénica uniformizada [108]. Desta forma, a identificação de um indivíduo como sendo sensibilizado ao látex está altamente dependente do conteúdo alergénico do extracto proteico usado no teste de diagnóstico [89]. De facto, tem sido descrito que a sensibilidade de diagnóstico de alergia ao látex é afectada por determinados alergénios que estão fracamente representados e/ou desnaturados, tais como o Hev b 5 [89]. Como consequência da ausência de determinados componentes alergénicos importantes, as preparações usadas para diagnóstico têm potencial para gerar falsos negativos que resultam na perda de sensibilidade do teste, devido à discrepância proporcional nas concentrações dos alergénios individuais [28, 109]. Contudo, também se deve ter em conta a possibilidade da existência de elevadas doses de alergénios individuais que são passíveis de causar sérios efeitos colaterais que podem incluir risco de vida para o doente [110]. Assim, é importante garantir o conhecimento das doses individuais alergénicas, uma vez que, uma porção significativa de risco associado à *performance* de TCP pode ser atribuída ao uso de extractos não caracterizados [5].

Apesar de existirem evidências de que os reagentes de diagnóstico de diferentes fabricantes têm um conteúdo e potencial alergénico bastante diferentes, o nível real de heterogeneidade destes produtos comercialmente disponíveis e o seu impacto clínico não é conhecido [111]. De facto, apesar de nas últimas duas décadas, terem sido realizados vários esforços no desenvolvimento de reagentes de diagnóstico específicos para LBN, presentemente, ainda se revela uma necessidade de melhoramento da qualidade destas preparações [91]. Assim, a investigação prossegue nesta área visto que a obtenção de extractos alergénicos

uniformizados é essencial para a realização de diagnóstico seguro e reproduzível das doenças alérgicas [7].

# Capítulo 2

## 2. Descrição dos Objectivos

Os objectivos deste estudo são a comparação e avaliação da qualidade de diferentes extractos alergénicos de LBN para TCP, comercialmente disponíveis em Portugal, através das seguintes etapas:

1. Avaliação do nível de heterogeneidade dos extractos de diferentes fabricantes e de diferentes lotes de um mesmo fabricante por análise quantitativa e qualitativa do conteúdo proteico total;
2. Quantificação dos quatro alergénios mais relevantes na sensibilização ao látex em cada um dos extractos.
3. Análise das actividades alergénicas dos extractos por ensaios de *microarrays* e por TCP em doentes alérgicos ao látex.
4. Comparação do efeito da variabilidade de conteúdo proteico na capacidade de diagnóstico *in vivo* de reagentes dos diferentes fabricantes.

# Capítulo 3

## Materiais e Métodos

### 3.1 Extractos comerciais para testes cutâneos por picada

Actualmente, estão comercialmente disponíveis em Portugal, sete extractos de TCP para o diagnóstico da alergia ao látex, produzidos por diferentes fabricantes. As respectivas empresas são, por ordem alfabética: Alk-Abellò, Allergopharma, Bial-Aristegui, Leti, Lofarma, Q-Pharma e Stallergenes. Tais empresas comercializam os seus produtos não apenas em Portugal, mas também em outros países da Europa.

#### Procedimento de pedido dos extractos

Foi enviado um pedido de participação no projecto em questão às sete empresas referidas, sendo, concomitantemente, requerido o envio de extractos de látex para diagnóstico *in vivo* por TCP. Neste requerimento constava informação referente aos objectivos do trabalho, que se pretendia desenvolver, sendo salientado que a participação das entidades no estudo era de carácter voluntário. Todos os fabricantes contactados aceitaram participar no estudo e enviaram os respectivos produtos. Como indicado no acordo de transferência de material, todos os extractos foram codificados e, por essa razão, ao longo do presente estudo, os resultados serão apresentados com um código associado a cada extracto, de forma completamente aleatória (fabricante A-G), não se fazendo qualquer referência ao nome da correspondente empresa. Quatro das empresas em questão enviaram adicionalmente extractos de dois lotes diferentes (fabricantes A, C, D e F). Todos os extractos de látex recebidos foram guardados a 4°C durante o período de estudo, de acordo com as especificações dos fabricantes.

### 3.2 Determinação da concentração em proteína total pelo método de Bradford

Está, actualmente, disponível uma variedade de procedimentos para a quantificação do conteúdo proteico de um determinado extracto ou solução (Biureto, Bradford, BCA, Kjendahl, Lowry, etc). De entre estes, não existe um método absoluto uma vez que todos apresentam vantagens e desvantagens. Apesar disso, vários autores recomendam, para a quantificação

proteica, o método espectrofotométrico de Bradford devido às múltiplas vantagens que apresenta, em comparação com as restantes metodologias. Nomeadamente, o uso de um único reagente, a rapidez de reacção (apenas 5 minutos), a elevada estabilidade do complexo proteína-corante formado, a elevada reprodutibilidade e a ocorrência de interferências mínimas. Efectivamente, ao longo dos anos, estas vantagens associadas ao facto de se tratar de um teste simples e barato conferem-lhe uma utilização em múltiplas aplicações nas ciências experimentais [112].

### Princípio do método

O método de Bradford baseia-se na utilização de uma solução ácida de corante Azul brilhante de Coomassie G-250, que quando adicionado à solução proteica, liga à proteína solubilizada resultando numa mudança de cor de castanho avermelhado para azul [113]. Esta alteração colorimétrica resulta da alteração da absorvância máxima do corante de 465 nm para 595 nm, quando a ligação à proteína ocorre, o que permite a detecção da quantidade de complexo proteína-corante formado, ou seja, a quantificação das proteínas totais existentes na solução, por medição espectrofotométrica a 595 nm. Tem sido descrito que as ligações em questão são mediadas por interacções electrostáticas entre os grupos sulfónicos do corante à proteína, principalmente em resíduos de arginina, mas também, em menor extensão, a resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina [114].

### Procedimento experimental

A concentração de proteína total existente em cada um dos extractos foi quantificada pelo método de Bradford, recorrendo a um reagente comercial (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). Todos os ensaios foram realizados em conformidade com as instruções do fabricante. Para tal, foram construídas duas curvas de calibração (50 a 500 µg/mL e 8 a 80 µg/mL), utilizando soluções padrão de albumina sérica bovina (BSA - *Bovine Serum Albumin*) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). Cada um dos ensaios foi realizado três vezes e cada ponto foi testado em duplicado. Com o objectivo de realizar comparações directas entre os sete extractos de diferentes fabricantes e devido à baixa quantidade de proteína existente em alguns deles, todos os extractos foram analisados na forma não diluída. Os desvios padrões (SD- *Standard Deviations*) foram calculados utilizando o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

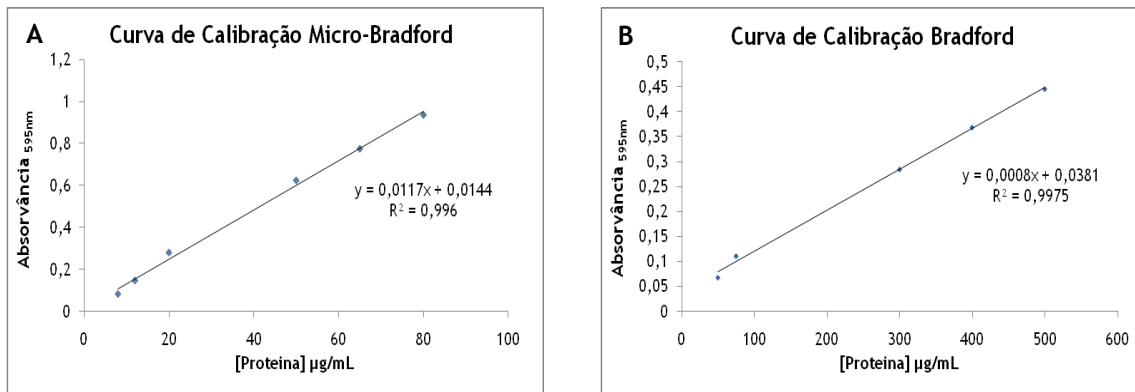


Figura 3.1 - Curvas de calibração obtidas por aplicação do método de Bradford, numa gama de concentrações A- de 8 a 80 µg de proteína/mL de solução (Micro-Bradford); e B- de 50 a 500 µg de proteína/mL de solução.

### 3.3 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

A electroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) é correntemente aplicada para a análise qualitativa de componentes proteicos de uma determinada mistura.

#### Princípio do método

Nesta metodologia, a amostra a analisar é inicialmente submetida a temperaturas elevadas, que em conjunto com o SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) e agentes redutores, garantem a desnaturação completa das proteínas. Na presença do SDS, detergente negativamente carregado, ocorre a ligação deste, numa proporção de massa constante, aos polipéptidos existentes em solução. Consequentemente, as proteínas vão ficar com uma carga tão negativa quanto maior for a sua massa molecular, de forma a que a razão carga/massa seja constante. Deste modo, e após o carregamento das amostras num gel de uma determinada concentração de acrilamida, garante-se que, por aplicação de um campo eléctrico, a migração electroforética das proteínas contidas nas amostras ocorra apenas em função da respectiva massa molecular [115].

#### Procedimento experimental

15 µL e 35 µL de cada extracto foram aquecidos a 100°C na presença de tampão de redução (TR) (contendo 500 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS, 0.02% azul de bromofenol (m/v), 0.2% glicerol (v/v) e 0.02% mercaptoetanol (v/v)) por 10 minutos. Após este tempo de desnaturação, os extractos foram carregados nos poços dos géis de poliacrilamida. Na

tentativa de otimizar o resultado de migração proteica foram preparados vários géis de diferentes concentrações de acrilamida (Bio Rad, Hercules, CA, EUA) (de 12,5 a 18 %), nos quais se carregou 15 µL de cada extracto com 7,5 µL de TR, sendo inclusive testado um gel comercial de gradiente 4% - 20% (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), que permitiu o carregamento de maior quantidade de cada extracto (35 µL com 17,5 de TR). Em todos os géis foi concomitantemente aplicado 6 µl de marcador de pesos moleculares proteicos (*Kaleidoscope Prestained Standards*, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA, no gel comercial, e *Full range rainbow protein standards*, GE Healthcare Biosciences, Uppsalla, Suécia, nos géis preparados laboratorialmente). A corrida electroforética foi efectuada a 150 V por, aproximadamente, 60-90 minutos, dependendo do gel em questão. Após a corrida, as proteínas foram coradas pelo azul brilhante de Coomassie R-250. Para tal, os géis foram colocados numa solução de coloração (62,5 mg de azul brilhante de Coomassie R-250, 100 mL de metanol, 17,5 mL de ácido acético glacial e 132,5 mL de água), por 30 minutos, sob agitação. Seguidamente, para a remoção do excesso de marcação, os géis foram imersos numa solução de descoloração (80 mL metanol, 14 mL de ácido acético glacial e 156 mL de água), nas mesmas condições de tempo e agitação. Por fim, os géis foram colocados *overnight* na solução de fixação (12,5 mL de metanol, 17,5 mL de ácido acético glacial e 220 mL água) e então embalados numa embalagem de plástico transparente para serem digitalizados. Para armazenamento e preservação dos géis de SDS-PAGE, estes podem ser guardados indefinidamente na solução de fixação.

### 3.4 Ensaio Imunoenzimático

Palosuo e o seu grupo de investigação, relataram que a quantificação de apenas quatro alergénios específicos (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 e Hev b 6.02) é altamente útil para inferir as propriedades alergénicas dos produtos do látex, nomeadamente, das luvas cirúrgicas, sugerindo que estes quatro alergénios contribuem significativamente para a alergenicidade de produtos de LBN e, portanto, para a sensibilização de utilizadores [88]. Tendo isto em conta, foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático (EIA - *Enzyme ImmunoAssay*) que se encontra comercialmente disponível, e que se baseia na quantificação destes quatro alergénios em ensaios separados, permitindo obter resultados individuais para cada um dos alergénios [3].

#### Princípio do método

Neste EIA os poços de uma microplaca são revestidos com anticorpos monoclonais de captura, específicos para um alergénio individual (Figura 3.2). Durante uma primeira incubação, este anticorpo imobilizado liga às moléculas do respectivo alergénio existentes na amostra a analisar. Após isto, o material que não ligou é removido por lavagem dos poços. Por sua vez, numa segunda incubação, anticorpos monoclonais de detecção alergénio-específicos,

marcados com uma peroxidase (HRP - *Horse*radish *Peroxidase*), ligam a diferentes epítomos das moléculas de alergénio. Nesta fase, os dois anticorpos vão estar combinados em par formando uma *sandwich* em torno do alergénio alvo. No final do processo, após lavagem, o substrato da HRP é adicionado e a intensidade de cor/sinal produzida é directamente proporcional à concentração de alergénio presente na amostra [116].

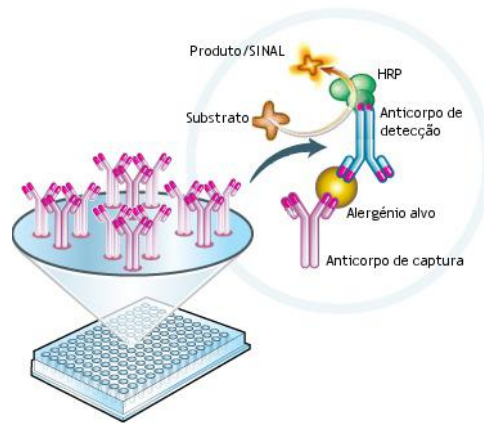


Figura 3.2 - Esquema ilustrativo do processo de detecção de alergénios individuais por EIA (Adaptado de [http://www.mitosciences.com/sandwich\\_elisa\\_assay\\_overview.html](http://www.mitosciences.com/sandwich_elisa_assay_overview.html)).

### Procedimento experimental

Para a análise quantitativa por método de EIA foram utilizados quatro kits comerciais (FITkit™, Icosagen AS, Estonia): FITkit® Hev b 1; FITkit® Hev b 3; FITkit® Hev b 5 e FITkit® Hev b 6.02. Cada um dos kits apresentava na sua embalagem os seguintes componentes:

- Microplaca com poços revestidos com anticorpo monoclonal com especificidade para o alergénio a quantificar, embalada num saco de alumínio sob vácuo.
- Tampão de ensaio
- Calibradores - Concentrações (µg/L): Hev b 1- 10; 50; 200; 1000  
Hev b 3- 10; 50; 200; 1000  
Hev b 5- 5; 10; 25; 50; 100  
Hev b 6.02- 0; 5; 15; 50; 100; 200
- Controlo liofilizado
- Conjugado enzimático (Anticorpo monoclonal alergénio-específico conjugado com HRP)
- Solução de lavagem concentrada
- Substrato para a HRP
- Solução de paragem (1% SDS)

Com o objectivo de delinear e orientar o procedimento de EIA executou-se a construção de um esquema comum para as quatro microplacas (uma para cada alergénio *major* a analisar):

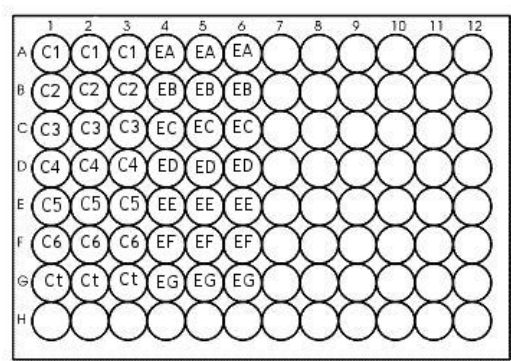


Figura 3.3- Esquema geral das placas de EIA. Legenda: C1 - C6 : Calibradores; Ct: controlo; E<sub>A</sub> - E<sub>G</sub>: amostras (extractos das empresas A-G).

O procedimento experimental foi executado em conformidade com as instruções cedidas pelo fabricante [116]. Assim, inicialmente, reconstituíram-se os controlos em 500  $\mu\text{L}$  de água destilada e efectuou-se a diluição de 50 mL da solução de lavagem concentrada com 450 mL de água destilada. Após se ter garantido que todos os componentes dos kits se encontravam à temperatura ambiente, foram adicionados a cada poço da microplaca 100  $\mu\text{L}$  de tampão de ensaio e 25  $\mu\text{L}$  de calibrador, controlo e amostra nos poços apropriados (Figura 3.3), em triplicado. Os ensaios de Hev b 1, Hev b 3 e Hev b 5 foram realizados com a aplicação dos extractos na sua forma não diluída, enquanto que no ensaio de Hev b 6.02 os extractos aplicados estavam sob a forma diluída numa proporção de 1:100. Seguidamente, incubou-se a microplaca, devidamente protegida da luz, durante 60 minutos à temperatura ambiente numa placa agitadora, a 150 rpm. Após este período, procedeu-se à aspiração e lavagem dos poços, por quatro vezes, com 300  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem. Posteriormente, procedeu-se à adição de 100  $\mu\text{L}$  de conjugado enzimático seguida de nova incubação, desta vez 30 minutos, nas mesmas condições de temperatura, agitação e protecção de luminosidade da anterior. Aspirou-se o conteúdo dos poços e fez-se a respectiva lavagem, quatro vezes, com 300  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem. Adicionou-se então 100  $\mu\text{L}$  da solução de substrato da HRP a cada poço, com períodos de tempos controlados por cronómetro. Após isto, seguiu-se um novo período de incubação, por 15 minutos nas condições anteriormente descritas. Induziu-se, então, a paragem da reacção por adição da solução de paragem a cada poço, com períodos de tempos fixos concordantes com os referentes ao início da reacção, de forma a assegurar que todos os poços tiveram exactamente o mesmo tempo de reacção. Na fase final deste procedimento, as microplacas foram agitadas durante 2 minutos, procedendo-se imediatamente à medição da absorvância a 405 nm utilizando um leitor de microplacas (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Áustria).

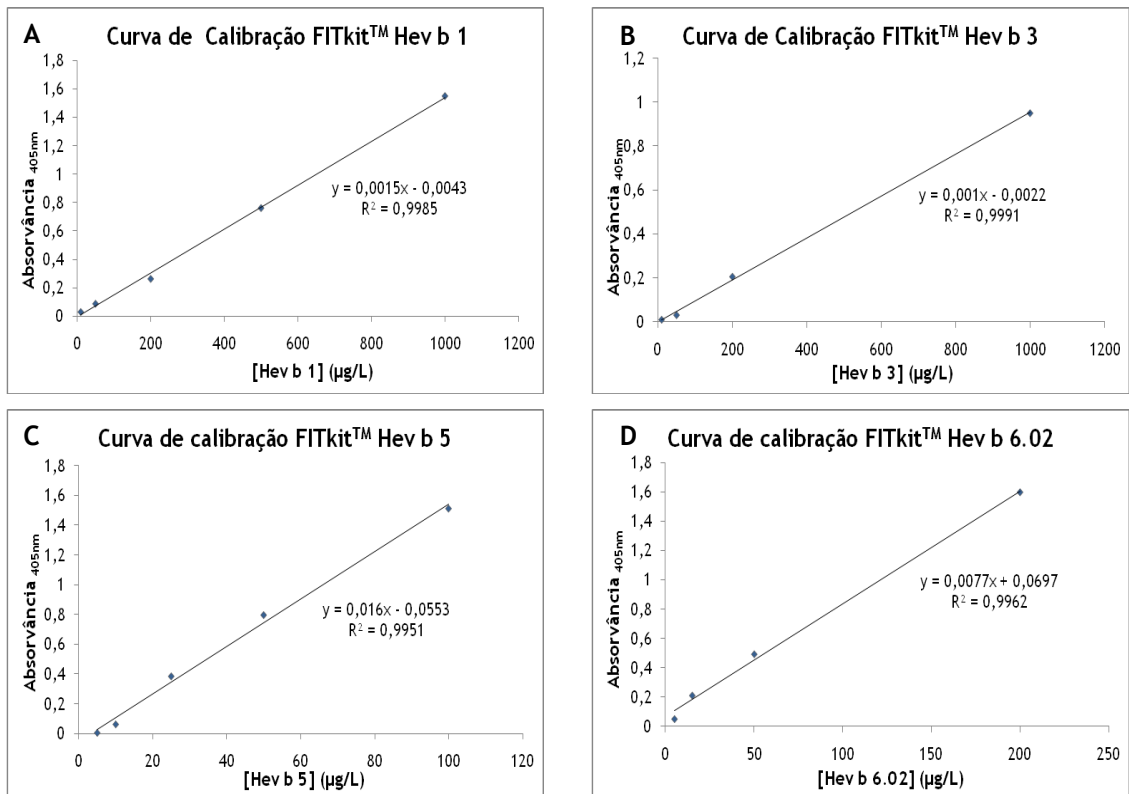


Figura 3.4 - Curvas de calibração obtidas por FITkit™. A- Para os calibradores de Hev b 1 numa gama de concentrações entre 10 e 1000 µg/L. B- Para o Hev b 3 utilizando calibradores cujas concentrações estavam compreendidas entre 10 e 1000 µg/L. C- Respectivo ao Hev b 5 cujos limites mínimos e máximos de concentração são 5 e 100 µg/L de solução. D- Para o Hev b 6.02 utilizando padrões de concentrações situadas na gama entre 5 e 200 µg/L.

### 3.5 Ensaios de inibição por *Microarrays*

Os ensaios de *microarrays* estão actualmente descritos como sendo uma ferramenta útil no diagnóstico da doença alérgica, especialmente para casos mais complexos, tais como os de anamnese incoerente, resposta insatisfatória ao tratamento ou doentes polissensibilizados. Esta técnica apresenta vantagens, relativamente às coexistentes, nomeadamente o facto de permitir a análise de centenas de alérgenos ao mesmo tempo com utilização de quantidades muito reduzidas de soro, envolvendo uma única análise. De facto, trata-se de um teste de diagnóstico *in vitro* extremamente avançado que utiliza uma tecnologia de *biochip* e que permite a medição simultânea de anticorpos específicos de vários componentes alérgenos num único teste [117].

### Princípio do método

A técnica *microarray* por ISAC (*Immuno Solid-phase Allergy Chip*)-*ImmunoCAP* constitui um imunoensaio no qual as proteínas (alergénios recombinantes ou naturais) estão imobilizadas numa fase sólida. Essas proteínas são incubadas, sob condições padronizadas, com quantidades bastante reduzidas de soro, promovendo-se a captura dos anticorpos séricos IgE específicos pelo respectivo alergénio imobilizado. Nesta fase é executado um passo de lavagem de forma a eliminar as substâncias não ligadas. As IgE específicas ligadas são então detectadas por adição de um anticorpo secundário marcado com um fluoróforo ou por uma enzima detectada por laser ou quimioluminescência [118]. Os resultados do ensaio são medidos com um scanner de *biochip* e avaliados utilizando um software específico. Este constitui um ensaio semi-quantitativo, sendo os respectivos resultados apresentados em unidades normalizadas ISAC (ISU - *ISAC standardized units*) [119].

Neste trabalho procedeu-se à aplicação de uma variante desta metodologia que se baseia na realização de ensaios de inibição da ligação de IgE sérica específica pela metodologia de inibição imunológica por *microarrays* (não descrita até à data). Para tal, introduz-se um passo antecedente aos ensaios típicos de *microarrays*, que consiste na incubação dos extractos alergénicos em estudo com um soro de conteúdo em IgE específica bem caracterizado. De uma forma geral, os ensaios de inibição imunológica baseados em IgE humana fornecem informação que permite a avaliação, de forma específica, da alergenicidade dos produtos [9], neste caso dos extractos alergénicos. Assim, o objectivo da aplicação desta metodologia é detectar a presença de alergénios individuais ligantes de IgE nos extractos comerciais por determinação da percentagem de inibição, induzida por cada extracto, da ligação da IgE específica ao alergénio do *biochip*.

### Procedimento experimental

Numa fase preparativa foi seleccionado um soro, a partir da seroteca do laboratório de Parasitologia e Imunoalergologia da Universidade do País Basco. Este soro foi previamente caracterizado por ISAC-*ImmunoCAP*, apresentando os seguintes valores de IgE específica para os alergénios do látex, em ISU/L: Hev b 1- 3; Hev b 5- 1,8; Hev b 6- 1,2 e Hev b 8- 3. Paralelamente, foi utilizado como controlo um soro com IgE específica para o alergénio *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 (Der p 1) (11 ISU/L). Para iniciar o procedimento dos ensaios de inibição todos os extractos comerciais em estudo foram centrifugados, e 10 µL do sobrenadante de cada um foram misturados com soro humano numa proporção de 1:1. Todas as amostras ficaram num período de incubação *overnight* a 4°C, sob agitação. Após isto, todas as amostras foram centrifugadas e 20 µL de cada foram analisados por ISAC-*immunoCAP* para os alergénios Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6.02 e Hev b 8 (ISAC™, Phadia, Uppsala, Suécia), de acordo com as instruções cedidas pelo fabricante. Os resultados de *microarrays* (ISU/L) foram convertidos nas respectivas percentagens de inibição de ligação IgE específica.

### **3.6 Caracterização dos doentes alérgicos ao látex**

Neste projecto foram incluídos onze doentes alérgicos ao látex. Destes indivíduos, cinco eram doentes com espinha bífida (denominados DEB 1 - 5) e os restantes seis trabalhadores da área de saúde (designados TAS 1 - 6). De entre os seis TAS participantes no estudo, três apresentavam características de síndrome látex-frutos. Todos os doentes foram seleccionados de entre doentes alérgicos ao látex registados em serviços de imunoalergologia dos seguintes centros hospitalares: Hospital Amato Lusitano, Castelo Branco; Hospital Dona Estefânia, Lisboa; Centro Hospital Cova da Beira, Covilhã e Centro de Saúde de Nelas. O critério de inclusão considerado foi a existência de prévio teste cutâneo por picada positivo e a apresentação de uma história clínica de alergia ao látex consistente, com evidenciada correlação das manifestações clínicas com a exposição a fontes de alergénios do látex. Além disso, foi garantido que todos os doentes envolvidos não foram submetidos a prévia imunoterapia, nem estavam sob administração de corticoesteróides e/ou anti-histamínicos no período antecedente e presente da efectuação das análises. Por contacto dos doentes que satisfaziam todas as condições referidas anteriormente, fez-se a convocatória individual para uma consulta com o imunoalergologista do centro hospitalar no qual o doente em questão estava registado.

Os doentes envolvidos no estudo foram informados dos objectivos do trabalho e deram o seu consentimento, mediante um formulário de consentimento informado (Anexo).

### **3.7 Determinação da IgE sérica específica do látex**

#### Princípio do método

Nesta abordagem laboratorial, o diagnóstico da alergia ao látex é baseado na quantificação de IgE específica num ensaio serológico. Para tal, um reagente de látex total, contendo um repertório de alergénios representativo do alergoma do LBN, actua como antigénio de captura associado a uma fase sólida, que liga com alta afinidade uma elevada densidade de alergénios (ImmunoCAP). O soro humano, uma vez em contacto com os alergénios imobilizados, se apresentar IgE látex-específica circulante, esta liga aos alergénios imobilizados. Assim, o sinal obtido vai ser directamente proporcional à quantidade de anticorpo IgE específico para o látex ligado, permitindo-se desta forma a quantificação de IgE látex-específica sérica de um doente com suspeita de alergia ao látex [91].

### Procedimento experimental

A todos os doentes alérgicos intervenientes no projecto foi colhida uma amostra de sangue. Estas amostras foram centrifugadas a 4000 g por 10 minutos, à temperatura ambiente. Os soros foram recolhidos, aliquotados e guardados a -20°C.

A IgE específica para o látex existente no soro dos doentes foi medida utilizando um extracto total de látex k82 e alergénios Hev b recombinantes (rHev b) (ImmunoCAPS™, Phadia, Suécia). Foi seguido o procedimento de acordo com as instruções do fabricante e os valores iguais ou superiores a 0,35 kUA/L foram considerados positivos.

### **3.8 Testes cutâneos por picada**

Esta metodologia constitui um teste clínico simples e barato, de sensibilidade incomparável, para a maioria dos alergénios, que permite a disponibilização imediata dos resultados aos imunoalergologistas e doentes, numa demonstração visível de reactividade cutânea [92].

#### Princípio do método

O TCP constitui um teste biológico que mimetiza a reacção de hipersensibilidade imediata natural, uma vez que neste é promovido o contacto entre o alergénio e os seus anticorpos IgE específicos à superfície dos mastócitos existentes na pele, resultando na libertação de mediadores locais e na formação de pápula local [120]. Os resultados obtidos são expressos em milímetros (mm) do diâmetro da pápula resultante [92]. É importante salientar que os resultados destes testes necessitam sempre de ser analisados no contexto de apresentação clínica de suspeita de alergia [102].



Figura 3.5 - Esquematização do procedimento de aplicação de reagentes de testes cutâneos por picada no antebraço de um doente alérgico ( <http://www.medinik.com/allergy/skin-allergy-test>).

### Procedimento experimental

Os TCP utilizando extractos de LBN de diferentes fabricantes foram realizados nos onze doentes alérgicos de acordo com as recomendações da Academia Europeia de Alergia e Imunologia Clínica (EAACI - *European Academic of Allergy and Clinical Immunology*). Cada teste foi efectuado de forma cega uma vez que a entidade comercializadora dos reagentes de diagnóstico era desconhecida para o imunoalergologista. Todos os testes foram realizados em duplicado na face anterior do antebraço. De forma a determinar a reactividade individual da pele foram realizados testes controlo com solução fisiológica salina (controlo negativo) e solução de histamina (0.1%; 10 µg/ml) (controlo positivo). Na prática clínica, o imunoalergologista procedeu à aplicação de uma gota de cada um dos extractos e das soluções controlo sobre a pele, de forma a que as respectivas gotas estivessem a uma distância de, aproximadamente, 4 cm umas das outras. Seguidamente, com a ajuda de uma lanceta foi efectuada a picada da pele, de uma forma rápida e ligeira, verticalmente através da gota. A leitura do resultado final do teste foi efectuada ao fim de 15 minutos por transferência da área afectada rodeada por uma caneta em fita-cola para papel. O tamanho da pápula cutânea resultante foi medida e registada de acordo com as directrizes da EAACI [121]. Os valores apresentados correspondem à média dos dois valores do diâmetro das pápulas resultantes dos duplicados. Foram interpretados como indicadores de diagnóstico de alergia ao látex positivos os resultados iguais ou superiores a 3 mm. Os valores descritivos dos resultados dos TCP foram determinados recorrendo às potencialidades do software SPSS, versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

## Capítulo 4

### Apresentação dos Resultados

#### 4.1 Análise quantitativa e qualitativa do conteúdo proteico dos extractos comerciais

O nível de heterogeneidade, em termos de conteúdo proteico, dos sete extractos comerciais de diferentes fabricantes, foi quantitativamente analisado por aplicação do método de Bradford. Os valores de concentração em proteína total dos extractos foram determinados e apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Determinação da concentração em proteína total de sete extractos alergénicos de látex de diferentes fabricantes (A a G) pelo método de Bradford.

Fabricantes	[Proteína total] Média ± SD*
A	526,5 ± 2,4
B	13,0 ± 0,7
C	143,2 ± 3,9
D	217,8 ± 0,9
E	61,5 ± 4,4
F	a.d.
G	281,5 ± 5,3

\* Os resultados apresentados são os valores médios de três determinações e respectivo desvio padrão. Estes são expressos em µg proteína/ml extracto.  
a. d.: abaixo do limite de detecção, < 8µg/mL.

Por observação da tabela 4.1 verifica-se que a concentração em proteína total dos extractos de diferentes fabricantes é muito variável. A concentração em proteína total mais baixa foi obtida no extracto comercializado pela empresa F, no qual, para a gama de concentrações em estudo, foram indetectáveis quantidades proteicas. Deste modo, relativamente a este extracto, apenas se pode afirmar que a respectiva concentração em proteína total é inferior a 8 µg de proteína/mL de extracto. Por outro lado, a concentração proteica mais elevada foi detectada no extracto do fabricante A, sendo obtido o valor 526,5 ± 2,4 µg/mL. Posto isto, e

de forma a adquirir informação sobre a magnitude do nível de heterogeneidade verificada por este procedimento, foi efectuada a razão entre os dois valores apresentados anteriormente. Assim, os extractos analisados apresentaram uma variação superior a 65 vezes. Simultaneamente, foi analisado o conteúdo em proteína total em dois diferentes lotes de quatro das empresas intervenientes neste estudo. Na tabela 4.2 é mostrado que existe uma ligeira variabilidade em termos do conteúdo em proteína total de lote para lote, sendo que os diferentes lotes do fabricante A são os que apresentam uma variabilidade superior.

Tabela 4.2 - Análise do conteúdo proteico em dois lotes diferentes de extractos de látex do mesmo fabricante.

Fabricante <sub>Lote</sub>	[Proteína] µg/mL
	Média ± SD
A <sub>1</sub>	444,8 ± 4,14
A <sub>2</sub>	526,5 ± 2,4
C <sub>1</sub>	138,6 ± 5,02
C <sub>2</sub>	143,2 ± 3,9
D <sub>1</sub>	217,8 ± 0,9
D <sub>2</sub>	189,4 ± 6,18
F <sub>1</sub>	a.d.
F <sub>2</sub>	a.d.

\* Os resultados apresentados são os valores médios de três determinações e respectivo desvio padrão. Estes são expressos em µg proteína/ml extracto.

a.d.: abaixo do limite de detecção, < 8µg/mL.

Seguidamente, visando a avaliação qualitativa da composição proteica dos extractos em estudo foram realizados ensaios de SDS-PAGE. De forma a otimizar/maximizar a distinção das bandas obtidas foram preparados vários géis de acrilamida. De entre os géis testados, o que apresentou melhores resultados foi o gel de gradiente 4 - 20%. Muito possivelmente, o factor que mais contribuiu para o melhoramento do perfil electroforético foi o facto de este permitir o carregamento de um volume maior de amostra, e conseqüentemente, a visualização de algumas bandas que não eram visíveis nos géis preparados manualmente. Além disso, o gradiente de concentração de acrilamida também contribuiu para uma melhor distinção das bandas em alguns dos extractos. Apesar disso, e devido à baixa quantidade proteica existente em alguns dos extractos, possivelmente algumas das proteínas separadas por SDS-PAGE encontraram-se no (ou abaixo do) limite de detecção da marcação pelo azul brilhante de Coomassie, não sendo portanto visualizadas.

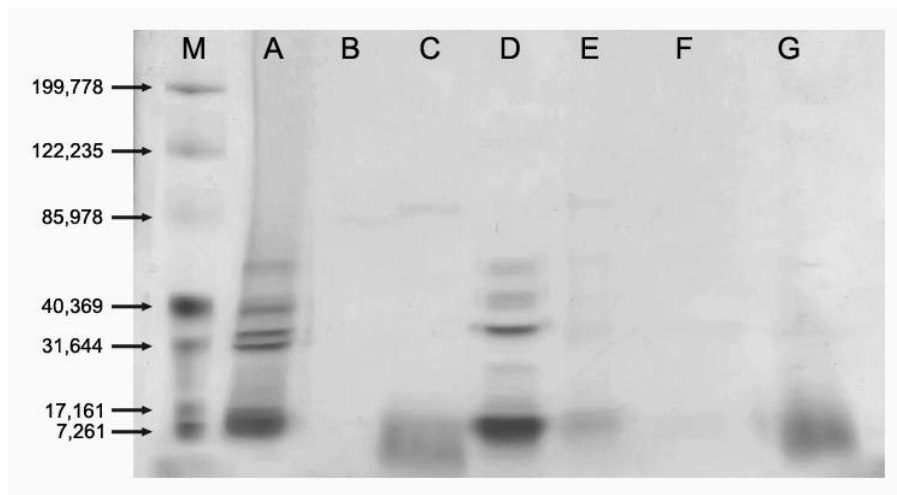


Figura 4.1 - Análise por SDS-PAGE em gel de gradiente 4-20% dos sete extractos comerciais de látex (A-G) correntemente utilizados para TCP. M: Marcador de pesos moleculares (KDa).

Como é observado na figura 4.1 os extractos em estudo apresentaram perfis electroforéticos totalmente distintos entre si, sendo que para dois dos extractos (fabricante B e F) não foram visualizadas quaisquer bandas por SDS-PAGE. Relativamente aos restantes cinco extractos, os perfis electroforéticos, no que respeita ao número, padrão e intensidade das bandas obtidas, foram altamente heterogéneos. Esta heterogeneidade foi principalmente evidente na área de massas moleculares situada entre 4 e 60 KDa (Kilo Dalton), na qual se situam as massas moleculares das proteínas oficialmente descritas como alergénios do látex (Tabela 1.2). Particularmente, nos perfis electroforéticos dos extractos em estudo, com excepção dos extractos dos fabricantes B e F, foi comum a observação de uma banda proteica expandida e densa na região de baixos pesos moleculares (< 20 KDa), contudo, as correspondentes intensidades foram consideravelmente variáveis entre os diferentes extractos. De facto, a maioria dos alergénios do LBN estão descritos como tendo massa molecular nesta gama, nomeadamente: Hev b 6.02 (4,7 KDa), Hev b 12 (9,3 KDa), Hev 6.03 (14,0 KDa), Hev b 1 (14,6 KDa), Hev b 8 (10,2-15,7 KDa), Hev b 5 (16 KDa) e Hev b 6.01 (20 KDa). No caso dos extractos dos fabricantes C e E é verificada a existência de uma banda de massa molecular aparente de 85 KDa. Esta banda corresponde, muito provavelmente, a agregados de proteínas do látex que resistiram à desagregação pelo SDS, a proteínas que não desnaturaram completamente no processo de preparação da amostra, ou a outro tipo de proteínas existentes no látex da *H. brasiliensis*, que não as reconhecidas como alergénios.

Paralelamente, o conteúdo proteico dos extractos de diferentes lotes foi separado por realização de SDS-PAGE num gel de acrilamida a 12,5% (Figura 4.2).

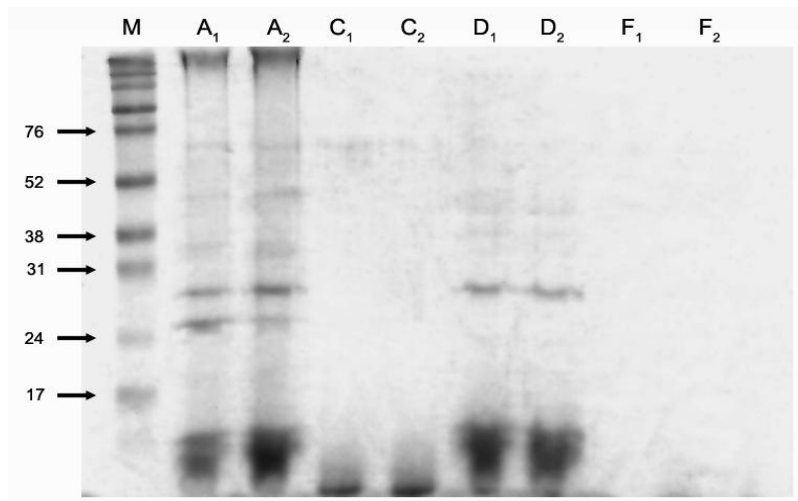


Figura 4.2 - Análise por SDS-PAGE em gel a 12,5% de acrilamida de dois lotes diferentes fornecidos por quatro das empresas em estudo. M: Marcador de pesos moleculares (KDa); A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>- Lotes 1 e 2 de extractos do fabricante A; C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>- Lotes 1 e 2 de extractos do fabricante C; D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>- Lotes 1 e 2 de extractos do fabricante D; F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>- Lotes 1 e 2 de extractos do fabricante F.

Os perfis electroforéticos obtidos para diferentes lotes de um mesmo fabricante foram similares em termos de padrão de bandas, contudo, verifica-se que as intensidades das bandas obtidas são ligeiramente variáveis entre diferentes lotes da mesma entidade produtora. Esta diferença é mais evidente para os extractos do fabricante A, sendo visível que o lote A2 apresenta o mesmo padrão/número de bandas que o lote A1, mas com intensidade de bandas, no geral, claramente superior. No entanto, é excepção a banda localizada na região dos 26 KDa (correspondente ao Hev b 3 e/ou Hev b 10) que aparece com intensidade superior no extracto A1 relativamente ao A2. Estes resultados podem constituir indícios sugestivos de que para além da concentração de proteína total ser variável entre lotes, as proporções relativas dos componentes alergénios individuais podem também variar. Para os restantes extractos as diferenças dos perfis electroforéticos entre lotes são menos notórias.

Apesar do conteúdo em proteína total e o perfil de bandas obtidas por SDS-PAGE ter demonstrado alguma variabilidade, mesmo que ligeira (possivelmente por se tratarem de lotes temporalmente próximos), a quantidade limitada de amostras das diferentes empresas e o facto de não se pretender uma bateria ainda maior de reagentes a aplicar nos doentes, foi desconsiderada a avaliação de diferentes lotes para os restantes ensaios.

## 4.2 Quantificação dos alergénios *major*

A quantificação dos quatro alergénios do látex considerados mais importantes no desenvolvimento de alergia, Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 e Hev b 6.02, nos sete reagentes de TCP comerciais foi realizada por EIA.

Tabela 4.3 - Quantificação por EIA do conteúdo em Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 e Hev b 6.02 nos sete extractos de látex (A-G) utilizados no diagnóstico da alergia ao látex *in vivo*.

Empresas Alergénios	A	B	C	D	E	F	G
	Hev b 1	>1000	199,00	148,34	141,00	>1000	280,34
Hev b 3	>1000	<10	<10	<10	218,20	<10	13,20
Hev b 5	> 100	17,61	6,18	<5	49,80	78,73	<5
Hev b 6.02	>20000	393,3	3125	>20000	9216	4631	105,5

\* Os resultados apresentados são a média dos triplicados  
Os valores são expressos em µg alérgénio/L extracto

Apesar de ser verificado que alguns dos valores obtidos superaram o valor do calibrador de concentração mais elevada não foram realizadas diluições dos extractos de forma a quantificar o valor preciso nessas situações. As razões intrínsecas a esta opção foram que os kits de EIA apresentam custos bastante elevados e que pelos resultados obtidos já é claramente observável e deduzível o elevado nível de variabilidade de conteúdo em alérgénios *major* entre os diferentes extractos.

Como é observado na tabela 4.3 a quantidade de cada um dos alérgénios individuais é altamente variável. No ensaio de quantificação do alérgénio Hev b 1, obtiveram-se resultados que variaram de 141,0 µg/L, no caso do extracto do fabricante D, a superior a 1000 µg/L para os reagentes do fabricante A e E. Por sua vez, no que respeita à detecção de Hev b 3, esta falhou para quatro dos extractos analisados (fabricantes B, C, D e F), sendo apresentados os valores não detectáveis como sendo inferiores a 10 µg/L (valor de concentração do calibrador menos concentrado do Fitkit™ Hev b 3). Este alérgénio foi detectado em maior quantidade no extracto comercializado pela empresa A, superando o valor de concentração do calibrador mais concentrado (>1000 µg/L). Relativamente ao Hev b 5, também se obtiveram valores indetectáveis (<5 µg/L) para alguns extractos (fabricantes D e G) e valores bastante elevados (>100 µg/L) no extracto da empresa A. Finalmente, para a quantificação do Hev b 6.02 foi requerida a diluição de 1:100 de todos os extractos, devido às elevadas concentrações deste alérgénio. Neste ensaio, o extracto da empresa G foi o que apresentou menor quantidade de Hev b 6.02 na sua constituição (105,5 µg/L), sendo que, por oposição, os extractos dos fabricantes A e D foram os que apresentaram quantidades deste alérgénio mais elevadas (>20000 µg/L). Assim, de uma forma geral, o Hev b 6.02 foi o alérgénio detectado em maiores concentrações nos extractos comerciais em estudo, enquanto que o Hev b 3 e o Hev b 5 foram os alérgénios encontrados em menor quantidade, sendo que a sua detecção falhou em alguns dos extractos. Foi também constatado que o extracto da empresa A constitui o reagente de

TCP em estudo no qual os quatro alergénios *major* se apresentaram melhor representados. Por oposição, o extracto do fabricante D é o que apresenta o conteúdo mais pobremente representado nestes alergénios, visto que neste reagente não foram detectadas concentrações quantificáveis de dois dos quatro alergénios em estudo. Numa visão global, todos os extractos, com excepção dos comercializados pelas empresas A e E falharam na detecção de pelo menos um dos alergénios *major* do LBN.

### 4.3 Ensaio de inibição por *Microarrays*

Visando a avaliação da capacidade de ligação dos componentes alergénicos dos extractos comerciais à IgE específica humana, procedeu-se à análise de um soro de um doente alérgico sensibilizado para quatro alergénios do látex (Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 8). Por incubação com esse soro, fez-se o estudo da alergenicidade dos extractos através de ensaios de inibição-*microarrays* para estes alergénios, sendo obtidos os valores da quantidade de IgE específica permanente no soro após incubação, em unidades ISU. O estabelecimento da relação entre os valores obtidos e as quantidades iniciais de IgE específica existente no soro, permitiu a determinação das respectivas percentagens de inibição (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Quantidades de IgE específica para o Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 8 detectadas nos ensaios de inibição-*microarrays* e respectiva percentagem de inibição para os extractos comerciais (fabricantes A a G).

	IgE (ISU/L)   % inibição								Controlo Der p 1	
	Hev b 1		Hev b 5		Hev b 6		Hev b 8			
Sem inibição	3		1,8		1,2		3		11	
A	0	100	0	100	0	100	0	100	12	0
B	0	100	0,5	73	0	100	2,8	7	11	0
C	0	100	0	100	0	100	2,6	13	13	0
D	0	100	0	100	0	100	2,2	26	11	0
E	0	100	0	100	0	100	2,6	13	12	0
F	0	100	0	100	0	100	2,5	16	12	0
G	0	100	0	100	0	100	1,9	36	11	0

Para que as diferenças de alergenicidades entre os extractos fossem mais facilmente observadas, as respectivas percentagens de inibição foram representadas graficamente (Figura 4.3).

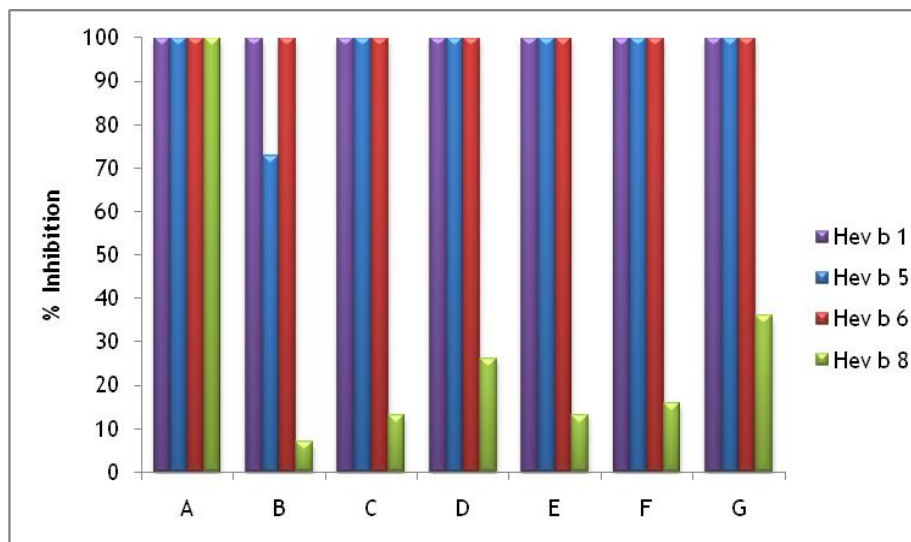


Figura 4.3 - Percentagens de inibição obtidas para o Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 8 em cada um dos extractos comerciais (fabricantes A- G).

Pela figura 4.3 pode ser constatado que todos os extractos apresentaram uma variabilidade observável, especialmente no que respeita à actividade alergénica do Hev b 8. De facto, para este alergénio a percentagem de inibição induzida foi distinta entre os sete extractos. Relativamente aos alergénios Hev b 1 e Hev b 6, todos os extractos induziram uma completa inibição (100%) da ligação de IgE específica aos respectivos alergénios imobilizados. Foram observados resultados similares para os ensaios de inibição-*microarrays* para o Hev b 5, nos quais apenas o extracto do fabricante B demonstrou uma capacidade de inibição inferior a 100% (73%). Para o soro controlo não foi detectado qualquer efeito de inibição pelos extractos (Tabela 4.4).

Numa avaliação global dos extractos estudados é claramente observável que apenas o extracto do fabricante A demonstrou uma capacidade alergénica total para o Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 8. Por outro lado, o extracto da empresa B foi o único que induziu 100% de inibição de ligação da IgE específica para apenas dois dos alergénios em estudo (Hev b 1 e Hev b 6).

## 4.4 Análise da actividade alergénica *in vivo*

### 4.4.1 Caracterização da população de doentes alérgicos

Com o intuito de estudar se a variabilidade de conteúdo alergénico dos extractos de diagnóstico afecta os resultados dos testes biológicos na prática clínica, procedeu-se à execução de TCP em onze doentes com alergia ao látex confirmada. O imunoalergologista que consultou cada doente forneceu a informação clínica, para caracterização individual dos doentes alérgicos, quanto às suas características demográficas e às manifestações clínicas desencadeadas por exposição a ambientes ou artigos contendo látex (tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Dados clínicos dos onze doentes alérgicos ao látex incluídos no estudo.

	Doentes	Sexo Idade	Sintomas clínicos relacionados com a exposição a ambientes e/ou artigos contendo LBN
Doentes com espinha bífida	DEB 1 HDE	Feminino 17	Prurido nasal e ocular
	DEB 2 HDE	Feminino 22	Urticária e opressão torácica
	DEB 3 HDE	Feminino 23	Prurido ocular com edema da pálpebra, prurido nasal, opressão torácica, pieira
	DEB 4 HDE	Masculino 15	Eritema nas mãos e na cara, erupções uricariformes, angioedema ocular, prurido ocular, prurido cutâneo nas mãos
	DEB 5 HDE	Feminino 19	Descritas reacções anteriores ao látex, mas presentemente assintomático
Trabalhadores da área da saúde	TAS 1 CHCB	Feminino 31	Prurido nasal e ocular, asma, dispneia ocasional, tosse, secreções brônquicas aumentadas.
	TAS 2 CSN	Feminino 34	Prurido nasal e ocular, dermatite nas mãos
	TAS 3 CSN	Feminino 40	Prurido nasal, edema das mãos com prurido
	TAS 4 HAL	Feminino 45	Rinoconjuntivite, dermatite nas mãos, prurido, crises de urticária, síndrome látex-frutos
	TAS 5 HAL	Feminino 33	Prurido nasal e ocular, crises de espirros, erupções uricariformes, anafilaxia, síndrome látex-frutos
	TAS 6 HAL	Feminino 20	Prurido nasal e ocular, crises de urticária, síndrome látex-frutos

CHCB: Centro Hospitalar Cova da Beira, Covilhã; CSN: Centro de Saúde de Nelas  
HAL: Hospital Amato Lusitano, Castelo Branco; HDE: Hospital Dona Estefânia, Lisboa

#### 4.4.2 IgE específica para o látex

Todos os doentes alérgicos, com excepção do trabalhador da área de saúde codificado como TAS 4, apresentaram níveis séricos de IgE específica para o látex superiores ao *cut-off* característico do k82 (0,35 KUA/L) (tabela 4.6). O TAS 4 apesar de apresentar um valor negativo de IgE específica para o látex foi incluído no estudo por apresentar uma história clínica de síndrome látex-frutos, com manifestações clínicas relevantes quando exposto a produtos de látex. Além disso, este doente alérgico apresentou TCP positivos para dois dos sete extractos de LBN comerciais (fabricantes A e D). No geral, os valores de IgE específica entre os indivíduos seleccionados variaram de 0,10 a 17,9 KUA/L (tabela 4.6)

#### 4.4.3 Testes cutâneos por picada

Como é observado na tabela 4.6, todos os doentes alérgicos em estudo desenvolveram uma resposta cutânea positiva a pelo menos um dos sete extractos comerciais de látex. É também constatado que para todos os indivíduos as reacções cutâneas, induzidas pela aplicação dos extractos em estudo, demonstraram-se altamente variáveis entre diferentes fabricantes.

Tabela 4.6 - Diâmetro médio da pápula resultante da realização de testes cutâneos por picada em onze doentes alérgicos com alergia ao LBN confirmada.

	Doentes com espinha bífida					Trabalhadores da área da saúde					
	DEB1	DEB2	DEB3	DEB4	DEB5	TAS1	TAS2	TAS3	TAS4	TAS5	TAS6
A	4	5	5,5	7,5	0	9	4,5	5,0	4	3	3
B	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>2,5</b>	3,5	<b>0</b>	4	<b>1,5</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
C	<b>2,5</b>	<b>2</b>	4,5	4,5	5	4	<b>2,5</b>	<b>2,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
D	4,5	8	10	5,5	<b>0</b>	4	3,5	3,0	3	<b>0</b>	<b>0</b>
E	<b>2,5</b>	3,5	6,5	5	<b>0</b>	4	4,0	3,5	<b>0</b>	3	<b>0</b>
F	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2,5</b>	3,5	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	4
G	<b>2,5</b>	4	4,5	4	4	3	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Histamina	4,5	5	4,5	5	4,5	12	5,0	5,5	8	9	6
k82 KUA/L	1,74	0,52	17,9	1,37	15,3	1,24	1,65	1,92	<b>0,10</b>	0,49	0,62

Os valores a negrito correspondem a valores negativos de acordo com o *cut-off* de < 3mm para os resultados dos TCP e < 0,35 KUA/L para a detecção de IgE látex-específica para k82

São muitas as situações de heterogeneidade que podem ser detectadas através da análise da tabela 4.6. Por exemplo, o extracto do fabricante D induziu ao desenvolvimento de uma pápula de 8 mm de diâmetro no DEB2 enquanto que os extractos dos fabricantes B e F não induziram qualquer reacção cutânea visível no mesmo doente. De facto, em quase todos os doentes alérgicos ocorreram respostas cutâneas negativas a pelo menos um dos extractos comerciais testados, sendo que apenas um (DEB4) dos onze doentes em estudo apresentou resultados de TCP positivos para todas as soluções comerciais aplicadas. No caso do grupo de indivíduos com diagnóstico confirmado concordante com síndrome látex-frutos (TAS 4 a 6), a maioria dos extractos deu origem a resultados de TCP negativos, sendo que cada um desses doentes apresentou reactividade cutânea positiva para apenas dois dos reagentes em estudo. Outro caso particular merecedor de realce corresponde ao alérgico DEB5, que apesar de apresentar níveis séricos de IgE látex-específica bastante elevados, apenas apresenta reactividade cutânea para dois extractos (fabricante C e G). Este resultado sugere que se trata de um indivíduo que se encontra, possivelmente, sensibilizado para um alérgénio, ou conjunto restrito de alérgénios, que apenas está adequadamente representado nesses dois extractos comerciais. Visando a observação mais clara da eficiência de desencadeamento de reactividade *in vivo* de cada um dos extractos comerciais, procedeu-se à determinação dos valores descritivos dos resultados de TCP obtidos.

Tabela 4.7 - Valores descritivos dos resultados de TCP para cada extracto comercial no diagnóstico de alergia ao látex (n=11).

Extracto	Média (SD [gama]) Mm	Interpretação dos resultados de TCP	Frequências	Percentagem (%)
A	4,59 (2,3 [0,0-9,0])	Negativo	1	9,1
		Positivo	10	90,9
B	1,36 (1,5 [0,0-4,0])	Negativo	9	81,8
		Positivo	2	18,2
C	2,45 (1,9 [0,0-5,0])	Negativo	7	63,6
		Positivo	4	36,4
D	3,77 (3,2 [0,0-10,0])	Negativo	3	27,3
		Positivo	8	72,7
E	2,91 (2,1 [0,0-6,5])	Negativo	4	36,4
		Positivo	7	63,6
F	1,54 (1,4 [0,0-4,0])	Negativo	9	81,8
		Positivo	2	18,2
G	2,41 (1,7 [0,0-4,5])	Negativo	6	54,5
		Positivo	5	45,5

Na tabela 4.7 é verificável que o extracto do fabricante A foi o que demonstrou, no geral, uma maior eficiência em induzir uma resposta *in vivo*, uma vez que corresponde ao reagente de diagnóstico que apresentou valor médio de diâmetro de pápula formada superior aos restantes e que apenas falhou a indução de reactividade cutânea num dos onze alérgicos. Por oposição, os extractos dos fabricantes B e F correspondem aos que apresentaram menor eficiência no desencadeamento de reactividade *in vivo*, visto que ambos falharam na formação de pápula de diâmetro superior ou igual a 3mm em nove dos onze alérgicos.

# Capítulo 5

## Discussão dos Resultados

### 5.1 Enquadramento teórico

A realização de um diagnóstico precoce e exacto é fundamental para a aplicação de uma abordagem terapêutica correcta [122], contudo o sucesso de um diagnóstico alérgico-específico está directamente dependente da composição alérgica do material utilizado. Os TCP permanecem o teste central para confirmação de uma resposta alérgica, o que se deve às suas vantagens, nomeadamente o facto de ser minimamente invasivo e dos seus resultados serem facilmente quantificados e bem correlacionados com a provocação orgânica [123]. Além disso, estes apresentam menor custo monetário do que outros testes disponíveis para o diagnóstico da doença alérgica [124]. Com todas estas vantagens associadas, este método de diagnóstico não deveria estar limitado pela aplicação de soluções alérgicas de baixa qualidade ou de qualidade variável de fabricante para fabricante.

No que respeita à alergia ao látex, existem vários extractos para aplicação por teste cutâneos de diagnóstico da alergia ao LBN comercialmente disponíveis em Portugal, produzidos e comercializados por diferentes empresas. Apesar de na literatura estar descrita a utilização de extractos provenientes de diversas fontes alérgicas, actualmente o LBN crude colhido da planta de origem, a *Hevea brasiliensis*, constitui a matéria-prima preferida pelas empresas para a preparação de reagentes utilizados em TCP. Esta escolha deve-se ao facto do extracto crude de LBN compreender na sua constituição um repertório bastante satisfatório dos alérgenos do látex clinicamente relevantes [28]. Porém, apesar da fonte alérgica ser a mesma, tais extractos são passíveis de apresentar variabilidade, contudo, o nível de heterogeneidade de conteúdo proteico dos extractos alérgicos de LBN produzidos por diferentes entidades e o seu efeito na respectiva potência alérgica não se encontram até à data bem documentados. De facto, estudos comparativos de soluções de TCP de diferentes produtores têm sido raramente efectuados. Relativamente à alergia ao látex, encontra-se publicado até à data apenas um estudo no qual se procedeu à avaliação de três soluções comerciais de TCP para o látex. Nesse estudo, Bernardini e seus colaboradores aplicaram estes extractos por realização de TCP em quarenta e nove doentes pediátricos com suspeita de alergia ao látex. As sensibilidades dessas três soluções variaram de 65% a 96% e as especificidades de 88% para 94% [122]. No presente estudo, o número de soluções de diagnóstico a testar foi aumentado para sete, obtidas de distintos fabricantes, cujos produtos estão actualmente disponíveis no mercado português, mas também noutros países da Europa.

Além disso, procedeu-se a uma caracterização química do conteúdo proteico e alergénio de forma a avaliar e comparar os efeitos da variabilidade do conteúdo na respectiva capacidade de indução de reactividade *in vivo*. A inclusão da análise do conteúdo proteico neste estudo é bastante importante, visto que o sucesso do uso de extractos alergénicos para fins clínicos depende da dose de alergénios que contêm [125].

## **5.2 Análise da variabilidade de conteúdo proteico e alergénico dos extractos comerciais**

Está descrito na literatura que embora um indivíduo susceptível de desenvolver alergia possa estar exposto a fontes de alergénios com composições distintas em situações diferentes, o material usado para avaliação clínica deverá conter todos os alergénios relevantes em concentrações individuais apropriadas [108]. Além disso, a uniformidade/consistência entre diferentes lotes de extractos de um fabricante e a homogeneidade entre extractos definitivos de diferentes empresas devem ser asseguradas [126]. Para testar o cumprimento de tais princípios nos sete extractos comerciais em estudo foi, primeiramente, analisada a sua variabilidade proteica. Deste procedimento foi revelado que os sete extractos comerciais de látex diferiram entre si numa magnitude superior a 65 vezes, relativamente ao seu conteúdo em proteína total. Embora este não seja necessariamente representativo da qualidade alergénica do extracto, a gama de variabilidade de concentração proteica observada entre diferentes fabricantes é bastante surpreendente. De facto, este nível de heterogeneidade proteica é o mais alto até agora publicado em estudos cujo objectivo também visou a avaliação da variabilidade do conteúdo proteico de extractos alergénicos produzidos por diferentes empresas [111, 127, 128]. No presente estudo foi também evidenciada uma ligeira variabilidade no que respeita à concentração em proteína total entre extractos de diferentes lotes do mesmo fabricante, que em nenhum caso ultrapassou a magnitude 2 vezes.

A destacada variabilidade proteica entre extractos de diferentes empresas foi confirmada qualitativamente por análise SDS-PAGE (Figura 4.1). De facto, os resultados obtidos demonstraram perfis electroforéticos completamente distintos entre os extractos em estudo, sendo observada a total ausência de quaisquer bandas visíveis para dois dos sete extractos comerciais. Esta ausência de visualização de bandas proteicas pode, possivelmente, ser explicada pelo facto das concentrações das proteínas individuais incluídas nesses extractos serem demasiado reduzidas, de forma a não atingirem o limite de detecção da marcação com o azul brilhante de Coomassie. Este facto pode também justificar a potencial falta de detecção de alguns componentes proteicos nos restantes extractos analisados. Esta limitação poderia ser ultrapassada laboratorialmente por realização de prévia concentração das soluções a aplicar na SDS-PAGE, contudo seria impossível uniformizar a quantidade proteica, devido à tão baixa concentração verificada para alguns dos extractos em análise, como é o

caso do extracto do fabricante F ( $< 8\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (tabela 4.1). Além disso, uma vez que o objectivo em questão é a directa comparação entre os diferentes extractos, a opção ideal baseou-se na uniformização do volume a carregar das soluções teste na sua forma não diluída. De forma geral, foram verificadas variabilidades nos padrões de bandas entre extractos de diferentes fabricantes, e adicionalmente, em alguns extractos foram também detectadas bandas de equivalente peso molecular com diferentes intensidades. Estes resultados constituem um indício de que os extractos alergénicos disponíveis e correntemente utilizados no diagnóstico da alergia ao LBN possuem um conteúdo proteico bastante desequilibrado.

Estabelecendo comparação dos resultados de SDS-PAGE com os obtidos por aplicação do método de Bradford, de uma forma geral, foi observado que extractos com maior concentração em proteína total apresentaram um padrão de bandas mais evidente, tanto no que respeita à intensidade, como número de bandas obtidas, sendo que os dois extractos nos quais foi determinada menor concentração proteica corresponderam àqueles nos quais não se obteve visualização de bandas por electroforese. Uma excepção a este facto, foi observada para os extractos das empresas D e G, em que o primeiro, apesar de apresentar uma concentração proteica ligeiramente inferior à verificada para o extracto do fornecedor G (tabela 4.1), por SDS-PAGE manifesta claramente maior número de bandas proteicas. Relativamente aos perfis de bandas proteicas observados para dois lotes diferentes de um mesmo fabricante (figura 4.2) verificou-se a completa correspondência de bandas, contudo, foi observado que a respectiva intensidade apresentou uma ligeira, mas detectável, variabilidade. De forma geral, os lotes que por SDS-PAGE apresentaram bandas mais intensas corresponderam aos lotes que por Bradford apresentaram maior concentração proteica.

Seguidamente, foi detectada uma variabilidade bastante marcada em termos dos alergénios de látex considerados mais importantes na alergenicidade das fontes de sensibilização (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 e Hev b 6.02). De facto, na tabela 4.3 foi verificado que todos os extractos apresentaram quantidades distintas dos alergénios *major* individuais quando analisados por EIA. Dos quatro alergénios do látex em estudo, o Hev b 6.02 foi o que se apresentou melhor representado em todos os sete extractos comerciais, sendo detectadas concentrações elevadas em todos os extractos, o que efectivamente está em concordância com o que está descrito por alguns autores que relatam a abundância e a presença generalizada deste alergénio no látex no estado crude [70, 71]. Por outro lado, os alergénios Hev b 3 e Hev b 5 não foram detectados em alguns dos extractos, nos quais certamente estão sub-representados. Esta observação também não surpreende, uma vez que também vai de encontro ao que tem sido relatado na literatura, especificamente, que alergénios facilmente degradados, tais como o Hev b 3 e Hev b 5, podem estar completamente ausentes nas soluções de diagnóstico [13, 108]. Apesar disso, é importante salientar que tais alergénios são reconhecidos e intensamente descritos como sendo muito importantes na sensibilização ao látex, estando correntemente definidos com alergénios *major*. Por esta razão, estes dois alergénios, bem como todos os outros relevantes na sensibilização ao látex, deveriam estar

presentes em quantidades adequadas e equilibradas em todos os reagentes de látex disponíveis para TCP. Estes dados reforçam a necessidade de melhoramento, especificamente de enriquecimento, de tais reagentes em alérgénios que se encontram pobremente representados.

Todos os métodos de análise de conteúdo proteico e alérgénico, seleccionados para integrarem este estudo, evidenciaram uma grande heterogeneidade entre os sete extractos de látex actualmente disponíveis em Portugal. Podem ser estabelecidos vários factores que podem potencialmente explicar as variabilidades observadas, nomeadamente, um diferente solo de cultivo, a época do ano na qual se efectua a recolha do LBN e o recorrer a diversas práticas agrónomicas. Todos estes factores podem afectar o estado morfológico da *Hevea brasiliensis* e por consequência, constituir fontes de variabilidade do conteúdo do LBN fresco, que dará origem aos reagentes de látex [28]. Adicionalmente, a aplicação de distintos métodos de extracção, tratamento (diferentes critérios de adição de compostos químicos como a amónia) e armazenamento implementados pelas diferentes empresas terá uma influência importante na heterogeneidade da composição alérgénica, nomeadamente na presença de determinados alérgénios e sua possível degradação [129].

### 5.3 Análise da actividade alérgénica dos extractos comerciais

A heterogeneidade de conteúdo observada pode não ter, necessariamente, impacto no nível de efectividade de diagnóstico de tais extractos alérgénicos, sendo que o seu conteúdo em proteína total e em alérgénios major constituem importantes parâmetros, mas não reflectem directamente o potencial de ligação à IgE humana látex-específica. Assim, para avaliar o impacto da variabilidade de conteúdo dos extractos comerciais a um nível de diagnóstico, foram realizados ensaios de inibição da ligação de IgE por *microarrays* e TCP *in vivo*.

Os resultados dos ensaios de inibição-*microarrays* mostraram que todos os extractos apresentaram na sua composição Hev b 1, Hev b 5 e Hev b 6 (alérgénios *major*) com elevada capacidade de ligação à IgE específica sérica. Tais resultados não são inesperados no que respeita aos alérgénios Hev b 1 e Hev b 6, visto que nos ensaios de EIA foram detectadas quantidades significativas, apesar de distintas, de ambos os alérgénios em todos os extractos comerciais. No entanto, para o Hev b 5 os resultados são bastante surpreendentes, uma vez que este alérgénio foi indetectável em alguns dos extractos na quantificação por EIA. Este resultado pode constituir um indício de que a presença residual deste alérgénio em algumas soluções, em especial nos extractos dos fabricantes D e G, é suficiente para ligar quantidades significativas de IgE Hev b 5-específica. Uma vez que estes resultados não são reveladores de heterogeneidade da capacidade alérgénica entre os extractos de diferentes fabricantes, sugere-se que se deveriam realizar diluições dos extractos a aplicar nos ensaios de inibição

para estes alérgenos. Porém, tal não foi efectuado visto que estes ensaios foram realizados em cooperação com a Universidade de Vitória, sendo que a falta de reagentes e de tempo constituem os factos justificativos da não optimização desta técnica. Apesar disso, a variabilidade de actividade alérgica *in vitro* foi claramente observável nos ensaios com o alérgeno Hev b 8, no qual os extractos comerciais apresentaram diferentes capacidades de ligação à IgE Hev b 8-específica. De uma forma geral, pelos resultados obtidos por *microarrays*, o extracto do fabricante A foi o que apresentou maior alergenidade em termos de Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 8, enquanto que o extracto da empresa B foi o que demonstrou possuir menor capacidade alérgica.

No que respeita aos ensaios *in vivo* por TCP, um pressuposto primordial que se pode estabelecer relativamente aos diversos reagentes, comercialmente disponíveis para diagnóstico da alergia ao látex, é que se estes possuísem um conteúdo de alérgenos individuais idêntico, seria de esperar que cada um dos sete reagentes de diagnóstico desse origem a uma reacção cutânea semelhante, quando aplicado ao mesmo tempo, nas mesmas condições e num mesmo doente. Ao longo deste trabalho, foram demonstradas evidências que contestam desde já a primeira parte do pressuposto, uma vez que pelos testes quantitativos e qualitativos de análise de conteúdo proteico e alérgico foi evidenciada uma notável variabilidade. Assim, visando a avaliação do impacto da heterogeneidade na capacidade dos extractos em teste induzirem uma reacção cutânea visível em doentes alérgicos ao látex, foram efectuados TCP a onze indivíduos com alergia ao látex confirmada.

Os ensaios *in vivo* foram efectuados em doentes alérgicos seleccionados dos dois mais importantes subgrupos populacionais considerados de risco para o desenvolvimento da alergia ao látex, DEB e TAS. De facto, como já foi referido anteriormente na parte introdutória desta dissertação, a prevalência da alergia ao LBN entre estes indivíduos é bastante significativa e superior à da população em geral, tomando valores entre 25% e 72% para os DEB [35, 36] e entre 2,7% e 36% para os TAS [40, 42]. Todos os ensaios de TCP foram realizados nas mesmas condições adoptadas pelos imunoalergologistas durante a sua actividade habitual, de forma a reproduzir o que realmente ocorre na prática clínica de diagnóstico da doença alérgica. Assim, durante o processo de realização dos TCP foram tomadas precauções importantes a fim de evitar variabilidades induzidas por factores irrelevantes para o estudo, nomeadamente, a utilização de lancetas estéreis descartáveis da mesma empresa para o mesmo doente, o descarte recorrente destas lancetas, sendo utilizada uma lanceta nova para cada local de TCP e a certificação de que a distância entre os locais de TCP fosse suficientemente grande, para que os efeitos de proximidade possam ter sido excluídos.

Os resultados dos TCP obtidos nos onze doentes alérgicos ao látex intervenientes no estudo demonstraram uma notável variabilidade na intensidade da reacção cutânea induzida por extractos de diferentes entidades comerciais (tabela 4.6). Num estudo recente, com soluções alérgicas de TCP de *Phleum pratense* de quatro fabricantes foi também demonstrada uma

grande variabilidade em termos do conteúdo alergénico, contudo, nesse estudo todos os reagentes originaram uma reacção positiva por TCP em 10 doentes alérgicos ao pólen de gramíneas [128]. No caso presente, para a maioria dos doentes, com excepção do DEB 4, pelo menos um dos extractos não foi eficiente na indução de reactividade cutânea que traduzisse um resultado cutâneo positivo para alergia ao látex (>3 mm). Na prática clínica, os resultados observados para os TCP sugerem que dependendo do extracto utilizado por um imunoalergologista particular, um indivíduo suspeito de ter desenvolvido sensibilidade e alergia ao LBN pode ter um diagnóstico de alergia positivo ou negativo. Desta forma, o uso de soluções de TCP com baixa sensibilidade pode resultar em consequências desastrosas, se as decisões clínicas forem somente baseadas nos resultados de TCP. Efectivamente, as evidências de heterogeneidade de conteúdo alergénico demonstradas pelos testes químicos podem suportar a constatação de que a ausência de componentes alergénicos importantes nos reagentes utilizados para TCP pode afectar o diagnóstico final da alergia ao látex.

Outro pressuposto que muitas vezes é levantado para os TCP é que se apenas a concentração alergénica entre os diferentes extractos fosse objecto de variabilidade mas a proporção das concentrações alergénicas fosse constante, seria de esperar que a actividade biológica, isto é, a reactividade que estas soluções são capazes de induzir *in vivo*, apenas diferísse num certo factor constante. De facto, este estudo também deita por terra este pressuposto, visto que pelos resultados obtidos é claramente observável que não pode ser estabelecido um factor constante que traduza a heterogeneidade dos resultados cutâneos, e evidentemente a variabilidade de conteúdo alergénico entre produtos de diferentes empresas não é apenas em termos de concentração dos alergénios individuais, mas também das suas desiguais proporções. Isto reforça a ideia já referida de que os reagentes de diagnóstico analisados neste estudo apresentam conteúdos mal caracterizados, com concentrações de alergénios individuais muito desequilibradas.

Numa análise mais pormenorizada da eficiência dos extractos individuais em estudo, os que se revelaram mais eficazes no diagnóstico *in vivo* foram os dos fabricantes A e D, visto que apresentaram valores médios de diâmetro da pápula induzida superiores e menor número de falsos negativos. Opostamente, os reagentes de TCP dos fabricantes B e F foram os que apresentaram menor diâmetro médio de pápula formada, bem como o maior número de falsos negativos (ambos em 9 dos 11 doentes alérgicos) (tabela 4.7). Efectuando uma comparação criteriosa entre os respectivos conteúdos proteicos/alergénicos e a capacidade individual dos extractos induzirem reactividade *in vivo*, é constatável que, por exemplo, o extracto do fabricante A, que apresentou um conteúdo mais enriquecido, tanto no que respeita à quantidade de proteína total, como à presença dos quatro alergénios *major* quantificados, exibiu a maior capacidade de indução de resposta *in vivo*. Relativamente ao segundo extracto mais eficiente na demonstração de reactividade cutânea (extracto comercializado pela empresa D), a correlação conteúdo-alergenicidade *in vivo* não é assim tão linear. Isto porque este extracto comercial falhou na detecção de dois dos alergénios *major* (Hev b 3 e Hev b 5)

(tabela 4.3), e portanto seria de esperar que este apresentasse uma eficiência de diagnóstico por TCP reduzida, em comparação com os restantes. O facto deste extracto ter demonstrado uma boa alergenicidade por TCP deve-se, muito possivelmente, ao seu conteúdo bastante enriquecido em Hev b 6.02, relativamente aos restantes. Efectivamente, nos ensaios laboratoriais por *immunoCAPs* utilizando alergénios de LBN recombinantes, foi detectada IgE sérica específica para o Hev b 6.02, na grande maioria dos doentes alérgicos inseridos no estudo (dados não apresentados). Assim, é completamente justificável que os extractos mais enriquecidos neste alergénio (reagentes dos fabricantes A e D) tivessem demonstrado maior capacidade de indução de reactividade cutânea por TCP. No que respeita aos extractos das entidades comerciais B e F, os quais demonstraram uma baixa eficiência de diagnóstico, correspondem, efectivamente, às soluções comerciais nas quais foram detectadas menores quantidades de proteína total. Contudo, os respectivos conteúdos em termos dos quatro alergénios *major* analisados não foram dos piores, o que pode indicar que esta baixa eficiência de diagnóstico pode estar relacionada com o facto do seu conteúdo alergénico estar mal equilibrado ou apresentar alergenicidade reduzida, podendo ter contribuição de proteínas alergénicas não quantificadas neste estudo que estejam, eventualmente, ausentes nestes extractos. De facto, nos estudos de alergenicidade *in vitro* foi verificado que o extracto da empresa B foi o que demonstrou menor capacidade de ligação aos anticorpos IgE específicos para o Hev b 5 e Hev b 8.

Dos resultados obtidos por TCP é ainda observado que os doentes alérgicos com características clínicas de síndrome látex-frutos, isto é, indivíduos com clara evidência de uma associação clínica significativa entre a alergia ao látex e a certos frutos [130] apresentaram resultados de TCP bastante irregulares. Nestes indivíduos a grande parte dos extractos deu origem a resultados negativos, sendo que em cada indivíduo apenas ocorreu reactividade cutânea positiva para dois dos sete extractos em estudo, e nos três doentes os pares de extractos que induziram essas respostas foram diferentes. De facto, está descrito que o diagnóstico da alergia ao látex encontra-se dificultado em indivíduos com síndrome látex-frutos [54]. Estes resultados estão em conformidade com os obtidos pelos ensaios de inibição-*microarrays*, nos quais se demonstrou uma baixa capacidade de inibição pelo Hev b 8 da maioria dos extractos (tabela 4.4). Tal relação é relevante visto que este alergénio está descrito como um alergénio característico desta síndrome [131]. Efectivamente o extracto A, que apresentou Hev b 8 com elevada capacidade de ligação à IgE específica foi o único extracto que induziu a uma reactividade cutânea positiva nos três doentes alérgicos com síndrome látex-frutos.

## Capítulo 6

### Conclusão

Numa conclusão geral, pela execução deste trabalho de investigação foi demonstrado que os extractos de LBN comercialmente disponíveis em Portugal, apresentam um nível de heterogeneidade bastante acentuado em termos do seu conteúdo proteico e na sua composição em alergénios *major*, tendo sido também, claramente constatado que tal variabilidade afecta negativamente a eficiência de diagnóstico de tais preparações alergénicas. Estas constatações devem servir de alerta para os imunoalergologistas da notável variabilidade da reactividade cutânea que pode advir da aplicação de extractos de LBN de diferentes empresas produtoras, bem como levantar questões similares no que respeita a outros extractos comerciais recorrentemente utilizados na prática clínica, tanto com fins de diagnóstico como terapêutico. De facto, tem sido descrito que a matéria-prima, isto é os extractos alergénicos de LBN utilizados para a preparação de soluções de testes cutâneos são também utilizados para a preparação de vacinas terapêuticas [34]. Isto leva a inferir que diferenças na presença ou ausência de determinados alergénios clinicamente relevantes pode ter implicações ainda mais importantes para tais extractos terapêuticos, uma vez que os alergénios que estão ausentes ou presentes em quantidades residuais falharão na indução de respostas imunes protectoras contra esses componentes.

Adicionalmente, as evidências resultantes deste trabalho de investigação sugerem que apesar do considerável progresso que tem vindo a ser desenvolvido na área da uniformização e qualidade de extractos alergénicos [110], ainda existem problemas significativamente alarmantes de variabilidade e, portanto, ainda permanece a existência de um espaço considerável para melhoramento e uniformização da qualidade dos reagentes formulados por diferentes empresas.

## Capítulo 7

### Este estudo como ponto de partida para o melhoramento das preparações alergénicas

No presente trabalho foi evidenciado que muitas das soluções alergénicas disponíveis no mercado apresentam deficiências de conteúdo alergénico que se traduzem na diminuição da sua eficiência de diagnóstico, estimando-se que tais deficiências sejam relativamente comuns na generalidade de extractos alergénicos provenientes de fontes naturais. Como primeiro passo para superar tais limitações sugere-se a execução de uma caracterização completa do conteúdo alergénico de cada lote de reagente, produzido por um determinado fabricante. Uma vez que é do conhecimento geral que tanto o diagnóstico, como a imunoterapia específica são, actualmente, realizados sem informação detalhada sobre a quantidade de alergénios individuais que está a ser administrado [28], a generalização deste procedimento a todas as empresas produtoras de soluções alergénicas para fins clínicos constituiria uma importante mais-valia. Assim, as agências reguladoras devem estar atentas a este facto e requerer a aplicação de métodos de uniformização. Contudo, é importante ter em conta que por este tipo de metodologia, já aplicada para uma variedade de extractos, não possibilita influenciar a composição proteica de extractos de origem natural, visto que apenas permitem revelar a sua composição mas não influenciá-la. Assim, o segundo passo, que para ser adequadamente executado depende da realização do primeiro, passaria pelo estabelecimento de métodos de melhoramento das soluções alergénicas. Neste, as entidades produtoras em conjunto com entidades reguladoras são aconselhadas a reunir esforços no sentido de desenvolver e estabelecer metodologias para a produção de reagentes de conteúdo equilibrado. Para tal, as futuras soluções propostas passam pelo enriquecimento das soluções actuais em alergénios específicos, que se encontram ausentes ou em quantidades reduzidas, quer por adição das respectivas moléculas recombinantes, quer por alergénios individuais ou grupos restritos de alergénios purificados directamente de produtos de látex, tais como as luvas. Porém, este enriquecimento deve ser efectuado de forma criteriosa e prudente devido ao possível risco de ocorrência de reacções severas, que podem advir em consequência da administração de elevadas doses alergénicas.

## Capítulo 8

### Perspectivas Futuras

Para a continuação futura deste projecto seria interessante a optimização da técnica de inibição-*microarrays* como ferramenta útil na determinação da alergenicidade de extractos alergénicos. Esta optimização deveria envolver a extensão da análise a um maior número de alergénios, bem como a avaliação de várias diluições dos extractos, de forma a encontrar o factor de diluição, no qual a variabilidade entre extractos é mais evidente para cada alergénio a testar.

De uma forma mais geral, devem continuar-se a reunir esforços para que continuem a ser realizados estudos de avaliação e caracterização de extractos alergénicos, que permitam o conhecimento das limitações inerentes à sua eficiência, bem como o estabelecimento de técnicas adequadas para o seu melhoramento. Tais estudos devem estender-se a todos os extractos comerciais, principalmente aos que são obtidos a partir de fontes biológicas, uma vez que estes aparentam uma susceptibilidade acrescida de apresentar elevados níveis de heterogeneidade. Estudos similares devem ser aplicados na caracterização de vacinas terapêuticas da alergia, de forma a que seja conseguido o conhecimento da efectividade de indução de tolerância imunológica em indivíduos sensibilizados a alergénios distintos. Assim, nesta vertente seria interessante a futura realização de estudos que visassem, para além da caracterização química, a efectividade terapêutica das vacinas alergénicas comercialmente disponíveis em grupos definidos de doentes sensibilizados a um alergénio ou a um grupo de alergénios particular.

# Capítulo 9

## Referências

1. Ebo, D.G., *IgE mediated allergy from natural rubber latex*. Monograph. 2000: The UCB Institute of Allergy, Brussels, Belgium.
2. Yeang, H.Y., Arif, S.A., Yusof, F., Sunderasan, E., *Allergenic proteins of natural rubber latex*. *Methods*, 2002. **27**(1): p. 32-45.
3. Yeang, H.Y., Arif, S.A., Raulf-Heimsoth, M., Loke, Y.H., Sander, I., Sulong, S.H., Lau, C.H., Hamilton, R.G., *Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(3): p. 593-8.
4. Kurup, V.P., Fink, J.N., *The spectrum of immunologic sensitization in latex allergy*. *Allergy*, 2001. **56**(1): p. 2-12.
5. Kelly, K.J., *Diagnosis and Treatment of Latex Allergy*, in *Allergy Frontiers: Therapy and Prevention*. 2010, Springer. p. 653-674.
6. Alenius, H., Turjanmaa, K., Palosuo, T., Makinen-Kiljunen, S., Reunala, T., *Surgical latex glove allergy: characterization of rubber protein allergens by immunoblotting*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1991. **96**(4): p. 376-80.
7. Turjanmaa, K., Palosuo, T., Alenius, H., Leynadier, F., Autegarden, J.E., Andre, C., Sicard, H., Hrabina, M., Tran, T.X., *Latex allergy diagnosis: in vivo and in vitro standardization of a natural rubber latex extract*. *Allergy*, 1997. **52**(1): p. 41-50.
8. Heitz, J.W., Bader, S.O., *An evidence-based approach to medication preparation for the surgical patient at risk for latex allergy: is it time to stop being stopper poppers?* *J Clin Anesth*, 2010. **22**(6): p. 477-83.
9. Palosuo, T., Alenius, H., Turjanmaa, K., *Quantitation of latex allergens*. *Methods*, 2002. **27**(1): p. 52-8.
10. Charous, B.L., Blanco, C., Tarlo, S., Hamilton, R.G., Baur, X., Beezhold, D., Sussman, G., Yunginger, J.W., *Natural rubber latex allergy after 12 years: recommendations and perspectives*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **109**(1): p. 31-4.

11. La Grutta, S., Mistrello, G., Varin, E., Pajno, G.B., Passalacqua, G., *Comparison of ammoniated and nonammoniated extracts in children with latex allergy*. *Allergy*, 2003. **58**(8): p. 814-8.
12. Kutting, B., Weber, B., Brehler, R., *Evaluation of a dipstick test (Allergodip-Latex) for in vitro diagnosis of natural rubber latex allergy*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001. **126**(3): p. 226-30.
13. Breiteneder, H., Scheiner, O., *Molecular and immunological characteristics of latex allergens*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998. **116**(2): p. 83-92.
14. Yip, E., Cacioli, P., *The manufacture of gloves from natural rubber latex*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **110**(2 Suppl): p. S3-14.
15. Condemi, J.J., *Allergic reactions to natural rubber latex at home, to rubber products, and to cross-reacting foods*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **110**(2 Suppl): p. S107-10.
16. Elliott, B.A., *Latex allergy: the perspective from the surgical suite*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **110**(2 Suppl): p. S117-20.
17. Wan, K.S., Lue, H.C., *Latex allergy in health care workers in Taiwan: prevalence, clinical features*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2007. **80**(5): p. 455-7.
18. Mahler, V., Fischer, S., Fuchs, T., Ghannadan, M., Valent, P., Fartasch, M., Kraft, D., Schuler, G., Valenta, R., *Prevention of latex allergy by selection of low-allergen gloves*. *Clin Exp Allergy*, 2000. **30**(4): p. 509-20.
19. Kay, A.B., *Allergy and allergic diseases. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(1): p. 30-7.
20. Hamilton, R.G., Adkinson, N.F., Jr., *Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(2 Suppl): p. S687-701.
21. Blumenthal, M.N., *New thoughts regarding the genetics of atopy*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **169**(5): p. 555-6.
22. Arbes, S.J., Jr., Gergen, P.J., Vaughn, B., Zeldin, D.C., *Asthma cases attributable to atopy: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(5): p. 1139-45.
23. Cremer, R., Rihs, H. P., Raulf-Heimsoth M., *Natural Rubber Latex Allergy in Pediatric Patients*. *Current Pediatric Reviews*, 2008. **4**(4): p. 258-265.

24. Nutter, A.F., *Contact urticaria to rubber*. Br J Dermatol, 1979. **101**(5): p. 597-8.
25. Leynadier, F., Herman, D., Vervloet, D., Andre, C., *Specific immunotherapy with a standardized latex extract versus placebo in allergic healthcare workers*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(3): p. 585-90.
26. *Allergen nomenclature. International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee*. [cited 2011 March 4]; [WWW document.] <http://www.allergen.org>].
27. Rolland, J.M. ,O'Hehir, R.E., *Latex allergy: a model for therapy*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(6): p. 898-912.
28. Yeang, H.Y., Hamilton, R.G., Bernstein, D.I., Arif, S.A., Chow, K.S., Loke, Y.H., Raulf-Heimsoth, M., Wagner, S., Breiteneder, H., Biagini, R.E., *Allergen concentration in natural rubber latex*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(8): p. 1078-86.
29. Hamilton, R.G., *Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S284-96.
30. Holgate, S.T. ,Polosa, R., *Treatment strategies for allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 218-30.
31. Valenta, R., *The future of antigen-specific immunotherapy of allergy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 446-53.
32. Bozkurt, G., Sackesen, C., Civelek, E., Kalayci, O., Akalan, N., Cataltepe, O., *Latex sensitization and allergy in children with spina bifida in Turkey*. Childs Nerv Syst, 2010. **26**(12): p. 1735-42.
33. Liss, G.M. ,Sussman, G.L., *Latex sensitization: occupational versus general population prevalence rates*. Am J Ind Med, 1999. **35**(2): p. 196-200.
34. Reunala, T., Alenius, H., Turjanmaa, K., Palosuo, T., *Latex allergy and skin*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(5): p. 397-401.
35. Nieto, A., Estornell, F., Mazon, A., Reig, C., Garcia-Ibarra, F., *Allergy to latex in spina bifida: a multivariate study of associated factors in 100 consecutive patients*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(3): p. 501-7.
36. Kattan, H., Harfi, H.A., Tipirneni, P., *Latex allergy in Saudi children with spina bifida*. Allergy, 1999. **54**(1): p. 70-3.

37. Yeh, H.H., Su, H.J., Chao, Y.C., *Genome characterization and identification of viral-associated dsDNA component of banana bunchy top virus*. Virology, 1994. **198**(2): p. 645-52.
38. Kelly, K.J., Pearson, M.L., Kurup, V.P., Havens, P.L., Byrd, R.S., Setlock, M.A., Butler, J.C., Slater, J.E., Grammer, L.C., Resnick, A., et al., *A cluster of anaphylactic reactions in children with spina bifida during general anesthesia: epidemiologic features, risk factors, and latex hypersensitivity*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **94**(1): p. 53-61.
39. Brehler, R., Kutting, B., *Natural rubber latex allergy: a problem of interdisciplinary concern in medicine*. Arch Intern Med, 2001. **161**(8): p. 1057-64.
40. Yassin, M.S., Lierl, M.B., Fischer, T.J., O'Brien, K., Cross, J., Steinmetz, C., *Latex allergy in hospital employees*. Ann Allergy, 1994. **72**(3): p. 245-9.
41. Mugula, J.K., Lyimo, M.H., Kessy, F.L., *Production and storage stability of non alcoholic banana beverage powder*. Plant Foods Hum Nutr, 1994. **45**(2): p. 155-63.
42. Bousquet, J., Flahault, A., Vandenplas, O., Ameille, J., Duron, J.J., Pecquet, C., Chevrie, K., Annesi-Maesano, I., *Natural rubber latex allergy among health care workers: a systematic review of the evidence*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(2): p. 447-54.
43. Weising, K., Ramser, J., Kaemmer, D., Kahl, G., *Multilocus DNA fingerprinting and genetic relatedness in plants: a case study with banana and tomato*. EXS, 1994. **69**: p. 45-59.
44. Burns, T.M., Harding, R.M., Dale, J.L., *Evidence that banana bunchy top virus has a multiple component genome*. Arch Virol, 1994. **137**(3-4): p. 371-80.
45. De Queiroz, M., Combet, S., Berard, J., Pouyau, A., Genest, H., Mouriquand, P., Chassard, D., *Latex allergy in children: modalities and prevention*. Paediatr Anaesth, 2009. **19**(4): p. 313-9.
46. Niggemann, B., Buck, D., Michael, T., Wahn, U., *Latex provocation tests in patients with spina bifida: who is at risk of becoming symptomatic?* J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(4 Pt 1): p. 665-70.
47. Sastre, J., Fernandez-Nieto, M., Rico, P., Martin, S., Barber, D., Cuesta, J., de las Heras, M., Quirce, S., *Specific immunotherapy with a standardized latex extract in allergic workers: a double-blind, placebo-controlled study*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(5): p. 985-94.

48. Bode, C.P., Fullers, U., Roseler, S., Wawer, A., Bachert, C., Wahn, V., *Risk factors for latex hypersensitivity in childhood*. *Pediatr Allergy Immunol*, 1996. **7**(4): p. 157-63.
49. Porri, F., Pradal, M., Lemiere, C., Birnbaum, J., Mege, J.L., Lanteaume, A., Charpin, D., Vervloet, D., Camboulives, J., *Association between latex sensitization and repeated latex exposure in children*. *Anesthesiology*, 1997. **86**(3): p. 599-602.
50. Wagner, B., Buck, D., Hafner, C., Sowka, S., Niggemann, B., Scheiner, O., Breiteneder, H., *Hev b 7 is a Hevea brasiliensis protein associated with latex allergy in children with spina bifida*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **108**(4): p. 621-7.
51. Garabrant, D.H., Roth, H.D., Parsad, R., Ying, G.S., Weiss, J., *Latex sensitization in health care workers and in the US general population*. *Am J Epidemiol*, 2001. **153**(6): p. 515-22.
52. Watts, D.N., Jacobs, R.R., Forrester, B., Bartolucci, A., *An evaluation of the prevalence of latex sensitivity among atopic and non-atopic intensive care workers*. *Am J Ind Med*, 1998. **34**(4): p. 359-63.
53. Moneret-Vautrin, D.A., Beaudouin, E., Widmer, S., Mouton, C., Kanny, G., Prestat, F., Kohler, C., Feldmann, L., *Prospective study of risk factors in natural rubber latex hypersensitivity*. *J Allergy Clin Immunol*, 1993. **92**(5): p. 668-77.
54. Tomazic, J., *Natural rubber latex allergens*. *Methods*, 2002. **27**: p. 1-2.
55. Rouge, P., Culerrier, R., Campistron, M., Granier, C., Bienvenu, F., Bienvenu, J., Didier, A., Barre, A., *Allergenicity of Hev b 13, a major esterase allergen in natural rubber latex (Hevea brasiliensis) allergy, does not only depend on its carbohydrate moiety*. *Mol Immunol*, 2010. **47**(4): p. 871-7.
56. Cremer, R., Hoppe, A., Korsch, E., Kleine-Diepenbruck, U., Blaker, F., *Natural rubber latex allergy: prevalence and risk factors in patients with spina bifida compared with atopic children and controls*. *Eur J Pediatr*, 1998. **157**(1): p. 13-6.
57. Michael, T., Niggemann, B., Moers, A., Seidel, U., Wahn, U., Scheffner, D., *Risk factors for latex allergy in patients with spina bifida*. *Clin Exp Allergy*, 1996. **26**(8): p. 934-9.
58. Turjanmaa, K., *Incidence of immediate allergy to latex gloves in hospital personnel*. *Contact Dermatitis*, 1987. **17**(5): p. 270-5.

59. Filon, F.L., Radman, G., *Latex allergy: a follow up study of 1040 healthcare workers.* *Occup Environ Med*, 2006. **63**(2): p. 121-5.
60. Larese Filon, F., Bosco, A., Fiorito, A., Negro, C., Barbina, P., *Latex symptoms and sensitisation in health care workers.* *Int Arch Occup Environ Health*, 2001. **74**(3): p. 219-23.
61. Swanson, M.C., Ramalingam, M., *Starch and natural rubber allergen interaction in the production of latex gloves: a hand-held aerosol.* *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **110**(2 Suppl): p. S15-20.
62. Baur, X., Chen, Z., Allmers, H., *Can a threshold limit value for natural rubber latex airborne allergens be defined?* *J Allergy Clin Immunol*, 1998. **101**(1 Pt 1): p. 24-7.
63. Kwittken, P.L., Sweinberg, S.K., Campbell, D.E., Pawlowski, N.A., *Latex hypersensitivity in children: clinical presentation and detection of latex-specific immunoglobulin E.* *Pediatrics*, 1995. **95**(5): p. 693-9.
64. Rihs, H.P., Chen, Z., Cremer, R., Baur, X., *HLA class II antigens DR4 and DQ8 are associated with allergy to hevein, a major allergen of Hevea latex.* *Tissue Antigens*, 1997. **49**(1): p. 92-5.
65. Pollart, S.M., Warniment, C., Mori, T., *Latex allergy.* *Am Fam Physician*, 2009. **80**(12): p. 1413-8.
66. Bernstein, D.I., Biagini, R.E., Karnani, R., Hamilton, R., Murphy, K., Bernstein, C., Arif, S.A., Berendts, B., Yeang, H.Y., *In vivo sensitization to purified Hevea brasiliensis proteins in health care workers sensitized to natural rubber latex.* *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(3): p. 610-6.
67. Alenius, H., Palosuo, T., Kelly, K., Kurup, V., Reunala, T., Makinen-Kiljunen, S., Turjanmaa, K., Fink, J., *IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies.* *Int Arch Allergy Immunol*, 1993. **102**(1): p. 61-6.
68. Yeang, H.Y., Cheong, K.F., Sunderasan, E., Hamzah, S., Chew, N.P., Hamid, S., Hamilton, R.G., Cardoso, M.J., *The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy.* *J Allergy Clin Immunol*, 1996. **98**(3): p. 628-39.
69. Lu, L.J., Kurup, V.P., Hoffman, D.R., Kelly, K.J., Murali, P.S., Fink, J.N., *Characterization of a major latex allergen associated with hypersensitivity in spina bifida patients.* *J Immunol*, 1995. **155**(5): p. 2721-8.

70. Alenius, H., Kalkkinen, N., Lukka, M., Reunala, T., Turjanmaa, K., Makinen-Kiljunen, S., Yip, E., Palosuo, T., *Prohevein from the rubber tree (Hevea brasiliensis) is a major latex allergen*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(7): p. 659-65.
71. Yagami, A., Suzuki, K., Saito, H., Matsunaga, K., *Hev B 6.02 is the most important allergen in health care workers sensitized occupationally by natural rubber latex gloves*. Allergol Int, 2009. **58**(3): p. 347-55.
72. Katelaris, C.H., *Latex allergy*. Med J Aust, 2006. **185**(6): p. 339.
73. Shojaei, A.R., Haas, D.A., *Local anesthetic cartridges and latex allergy: a literature review*. J Can Dent Assoc, 2002. **68**(10): p. 622-6.
74. D'Auzac J., Jacob J.L., Prevot J.C., *The regulation of cis-polyisoprene production (natural rubber) from Hevea Brasiliensis*. Recent Research and Development in Plant Physiology, 1997. **1**: p. 273-332.
75. Peixinho, C., Tavares, P., Tomaz, M.R., Taborda-Barata, L., Tomaz, C., *Differential expression of allergens on the internal and external surfaces of latex surgical gloves*. Allergol Immunopathol (Madr), 2006. **34**(5): p. 206-11.
76. Peixinho, C., Tavares-Ratado, P., Tomas, M.R., Taborda-Barata, L., Tomaz, C.T., *Latex allergy: new insights to explain different sensitization profiles in different risk groups*. Br J Dermatol, 2008. **159**(1): p. 132-6.
77. Liss, G.M., Sussman, G.L., Deal, K., Brown, S., Cividino, M., Siu, S., Beezhold, D.H., Smith, G., Swanson, M.C., Yunginger, J., Douglas, A., Holness, D.L., Lebert, P., Keith, P., Wasserman, S., Turjanmaa, K., *Latex allergy: epidemiological study of 1351 hospital workers*. Occup Environ Med, 1997. **54**(5): p. 335-42.
78. Kean, T., McNally, M., *Latex hypersensitivity: a closer look at considerations for dentistry*. J Can Dent Assoc, 2009. **75**(4): p. 279-82.
79. Alenius, H., Turjanmaa, K., Palosuo, T., *Natural rubber latex allergy*. Occup Environ Med, 2002. **59**(6): p. 419-24.
80. Tomazic, V.J., Champaine, E.L., Lamanna, A., Withrow, T.J., Adkinson, N.F., Jr., Hamilton, R.G., *Cornstarch powder on latex products is an allergen carrier*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **93**(4): p. 751-8.
81. Vandenplas, O., *Occupational asthma caused by natural rubber latex*. Eur Respir J, 1995. **8**(11): p. 1957-65.

82. Cistero Bahima, A., Sastre, J., Enrique, E., Fernandez, M., Alonso, R., Quirce, S., Gandarias, B., Parmiani, S., Rico, P., *Tolerance and effects on skin reactivity to latex of sublingual rush immunotherapy with a latex extract.* J Investig Allergol Clin Immunol, 2004. **14**(1): p. 17-25.
83. Makinen-Kiljunen, S., *Banana allergy in patients with immediate-type hypersensitivity to natural rubber latex: characterization of cross-reacting antibodies and allergens.* J Allergy Clin Immunol, 1994. **93**(6): p. 990-6.
84. Lavaud, F., Cossart, C., Reiter, V., Bernard, J., Deltour, G., Holmquist, I., *Latex allergy in patient with allergy to fruit.* Lancet, 1992. **339**(8791): p. 492-3.
85. Blanco, C., Carrillo, T., Castillo, R., Quiralte, J., Cuevas, M., *Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits.* Ann Allergy, 1994. **73**(4): p. 309-14.
86. Palosuo, T., Panzani, R.C., Singh, A.B., Ariano, R., Alenius, H., Turjanmaa, K., *Allergen cross-reactivity between proteins of the latex from Hevea brasiliensis, seeds and pollen of Ricinus communis, and pollen of Mercurialis annua, members of the Euphorbiaceae family.* Allergy Asthma Proc, 2002. **23**(2): p. 141-7.
87. Ebo, D.G., Stevens, W.J., *IGE-mediated natural rubber latex allergy: an update.* Acta Clin Belg, 2002. **57**(2): p. 58-70.
88. Palosuo, T., Reinikka-Railo, H., Kautiainen, H., Alenius, H., Kalkkinen, N., Kulomaa, M., Reunala, T., Turjanmaa, K., *Latex allergy: the sum quantity of four major allergens shows the allergenic potential of medical gloves.* Allergy, 2007. **62**(7): p. 781-6.
89. Wagner, S., Bublin, M., Hafner, C., Kopp, T., Allwardt, D., Seifert, U., Arif, S.A., Scheiner, O., Breiteneder, H., *Generation of allergen-enriched protein fractions of Hevea brasiliensis latex for in vitro and in vivo diagnosis.* Int Arch Allergy Immunol, 2007. **143**(4): p. 246-54.
90. Tarlo, S.M., Easty, A., Eubanks, K., Parsons, C.R., Min, F., Juvet, S., Liss, G.M., *Outcomes of a natural rubber latex control program in an Ontario teaching hospital.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4): p. 628-33.
91. Hamilton, R.G., Peterson, E.L., Ownby, D.R., *Clinical and laboratory-based methods in the diagnosis of natural rubber latex allergy.* J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(2 Suppl): p. S47-56.

92. Williams, P., Sewell, W.A., Bunn, C., Pumphrey, R., Read, G., Jolles, S., *Clinical immunology review series: an approach to the use of the immunology laboratory in the diagnosis of clinical allergy*. Clin Exp Immunol, 2008. **153**(1): p. 10-8.
93. Turjanmaa, K., Alenius, H., Makinen-Kiljunen, S., Reunala, T., Palosuo, T., *Natural rubber latex allergy*. Allergy, 1996. **51**(9): p. 593-602.
94. Ebo, D.G., Stevens, W.J., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., *Latex-specific IgE, skin testing, and lymphocyte transformation to latex in latex allergy*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(5): p. 618-23.
95. Bubak, M.E., Reed, C.E., Fransway, A.F., Yunginger, J.W., Jones, R.T., Carlson, C.A., Hunt, L.W., *Allergic reactions to latex among health-care workers*. Mayo Clin Proc, 1992. **67**(11): p. 1075-9.
96. Kurup, V.P., Kelly, K.J., Turjanmaa, K., Alenius, H., Reunala, T., Palosuo, T., Fink, J.N., *Immunoglobulin E reactivity to latex antigens in the sera of patients from Finland and the United States*. J Allergy Clin Immunol, 1993. **91**(6): p. 1128-34.
97. Lebenbom-Mansour, M.H., Oesterle, J.R., Ownby, D.R., Jennett, M.K., Post, S.K., Zaglaniczny, K., *The incidence of latex sensitivity in ambulatory surgical patients: a correlation of historical factors with positive serum immunoglobulin E levels*. Anesth Analg, 1997. **85**(1): p. 44-9.
98. Ott, H., Schroder, C., Raulf-Heimsoth, M., Mahler, V., Ocklenburg, C., Merk, H.F., Baron, J.M., *Microarrays of recombinant Hevea brasiliensis proteins: a novel tool for the component-resolved diagnosis of natural rubber latex allergy*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2010. **20**(2): p. 129-38.
99. Kelly, K.J., Kurup, V., Zacharisen, M., Resnick, A., Fink, J.N., *Skin and serologic testing in the diagnosis of latex allergy*. J Allergy Clin Immunol, 1993. **91**(6): p. 1140-5.
100. Palosuo, T., Makinen-Kiljunen, S., Alenius, H., Reunala, T., Yip, E., Turjanmaa, K., *Measurement of natural rubber latex allergen levels in medical gloves by allergen-specific IgE-ELISA inhibition, RAST inhibition, and skin prick test*. Allergy, 1998. **53**(1): p. 59-67.
101. Turjanmaa, K., *Diagnosis of latex allergy*. Allergy, 2001. **56**(9): p. 810-2.
102. Ahlstedt, S., Murray, C.S., *In vitro diagnosis of allergy: how to interpret IgE antibody results in clinical practice*. Prim Care Respir J, 2006. **15**(4): p. 228-36.

103. Turjanmaa, K., Reunala, T., Rasanen, L., *Comparison of diagnostic methods in latex surgical glove contact urticaria*. *Contact Dermatitis*, 1988. **19**(4): p. 241-7.
104. Lee, M.F., Wang, N.M., Han, J.L., Lin, S.J., Tsai, J.J., Chen, Y.H., *Estimating allergenicity of latex gloves using Hev b 1 and hevamine*. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2010. **20**(6): p. 499-505.
105. Kurup, V.P., Sussman, G.L., Yeang, H.Y., Elms, N., Breiteneder, H., Arif, S.A., Kelly, K.J., Bansal, N.K., Fink, J.N., *Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy*. *Clin Mol Allergy*, 2005. **3**: p. 11.
106. van Ree, R., *Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **119**(2): p. 270-7; quiz 278-9.
107. Blanco, C., Carrillo, T., Ortega, N., Alvarez, M., Dominguez, C., Castillo, R., *Comparison of skin-prick test and specific serum IgE determination for the diagnosis of latex allergy*. *Clin Exp Allergy*, 1998. **28**(8): p. 971-6.
108. Lundberg, M., Chen, Z., Rihs, H.P., Wrangsjo, K., *Recombinant spiked allergen extract*. *Allergy*, 2001. **56**(8): p. 794-5.
109. Khan, S., Holding, S., Dore, P., Sewell, C., *Pitfalls in the diagnosis of latex allergy*. *Allergol Int*, 2010. **59**(3): p. 305-8.
110. van Ree, R., *The CREATE project: EU support for the improvement of allergen standardization in Europe*. *Allergy*, 2004. **59**(6): p. 571-4.
111. Brunetto, B., Tinghino, R., Braschi, M.C., Antonicelli, L., Pini, C., Iacovacci, P., *Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis*. *Allergy*, 2010. **65**(2): p. 184-90.
112. Bonjoch, N.P., *Protein content quantification by Bradford method*, in *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, M.J.R. Roger, Editor. 2001, Kluwer Academic Publishers. p. 283-295.
113. Tian, S., Shi, Y., Zhou, X., Ge, L., Upur, H., *Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different Ziziphora clinopodioides Lam. extracts*. *Pharmacogn Mag*, 2011. **7**(25): p. 65-8.
114. Zou, S., Carey, J.R., Liedo, P., Ingram, D.K., Yu, B., *Prolongevity effects of a botanical with oregano and cranberry extracts in Mexican fruit flies: examining interactions of diet restriction and age*. *Age (Dordr)*, 2011.

115. Marshall, T., *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of serum after protein denaturation in the presence or absence of 2-mercaptoethanol*. Clin Chem, 1984. **30**(3): p. 475-9.
116. Icosagen, A.S., *Fitkit™ The first specific test for identifying and quantifying individual NRL allergens*, in *Brochure*. 2009: Estonia.
117. Ferrer, M., Sanz, M.L., Sastre, J., Bartra, J., del Cuviillo, A., Montoro, J., Jauregui, I., Davila, I., Mullol, J., Valero, A., *Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2009. **19 Suppl 1**: p. 19-24.
118. Hartmann, M., Roeraade, J., Stoll, D., Templin, M.F., Joos, T.O., *Protein microarrays for diagnostic assays*. Anal Bioanal Chem, 2009. **393**(5): p. 1407-16.
119. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., De Knop, K.J., Verweij, M.M., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Stevens, W.J., *Component-resolved diagnosis from latex allergy by microarray*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(2): p. 348-58.
120. Chinoy, B., Yee, E., Bahna, S.L., *Skin testing versus radioallergosorbent testing for indoor allergens*. Clin Mol Allergy, 2005. **3**(1): p. 4.
121. *Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology*. Allergy, 1993. **48**(14 Suppl): p. 48-82.
122. Bernardini, R., Pucci, N., Azzari, C., Novembre, E., De Martino, M., Milani, M., *Sensitivity and specificity of different skin prick tests with latex extracts in pediatric patients with suspected natural rubber latex allergy--a cohort study*. Pediatr Allergy Immunol, 2008. **19**(4): p. 315-8.
123. Oppenheimer, J., Nelson, H.S., *Skin testing*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2006. **96**(2 Suppl 1): p. S6-12.
124. Borghesan, F., Bernardi, D., Plebani, M., *In vivo and in vitro allergy diagnostics: it's time to re-appraise the costs*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(3): p. 391-5.
125. Cox, L., Nelson, H., Lockey, R., Calabria, C., Chacko, T., Finegold, I., Nelson, M., Weber, R., Bernstein, D.I., Blessing-Moore, J., Khan, D.A., Lang, D.M., Nicklas, R.A., Oppenheimer, J., Portnoy, J.M., Randolph, C., Schuller, D.E., Spector, S.L., Tilles, S., Wallace, D., *Allergen immunotherapy: a practice parameter third update*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(1 Suppl): p. S1-55.
126. Larsen, J.N., Dreborg, S., *Standardization of allergen extracts*. Methods Mol Med, 2008. **138**: p. 133-45.

127. 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**(3): p. 258-63.
128. Focke, M., Marth, K., Flicker, S., Valenta, R., *Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(8): p. 1400-8.
129. Malling, H.J., *Skin prick testing in biological standardization of allergenic products*. Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M, 1997(91): p. 157-63.
130. Turjanmaa, K., Makinen-Kiljunen, S., *Latex allergy: prevalence, risk factors, and cross-reactivity*. Methods, 2002. **27**(1): p. 10-4.
131. Ganglberger, E., Radauer, C., Wagner, S., Riordain, G., Beezhold, D.H., Brehler, R., Niggemann, B., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E., Breiteneder, H., *Hev b 8, the Hevea brasiliensis latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **125**(3): p. 216-27.

# Capítulo 10

## Anexos

### 10.1 Protocolo de consentimento informado

INVESTIGAÇÃO BIO-MÉDICA NO HOMEM

PROTOCOLO DE CONSENTIMENTO

Conforme a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964;Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong-Kong 1989), a informação ou explicação a prestar ao doente deverá obrigatoriamente versar os objectivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto; além disso deve ser afirmado ao doente o seu direito de recusar a todo o tempo a sua participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo na sua assistência. Por outro lado, os registos dos resultados poderão ser consultados pelos responsáveis científicos do projecto de investigação, e ser objecto de publicação: todavia os dados de carácter pessoal deverão ser sempre considerados estritamente confidenciais.

DESIGNAÇÃO DO ESTUDO: Aplicação de uma bateria de sete extractos comerciais por teste cutâneo por picada em doentes alérgicos ao látex para avaliação do nível de heterogeneidade de reactividade cutânea entre extractos de diferentes fabricantes.

Eu, abaixo assinado (*nome completo do doente*), \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

compreendi a explicação que me foi fornecida acerca do meu caso clínico e do método ou tratamento que se tenciona instituir, tendo-me sido dada oportunidade de discutir e fazer as perguntas que julguei necessárias.

Por isso consinto que me seja aplicado o método ou tratamento agora proposto.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## 10.2 Abstract aceite no 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Istambul, Turquia, 2011 (Comunicação em Painel)

### Evaluation and comparison of commercially available latex extracts for skin prick tests

Marta Gabriel<sup>1,2</sup>, Célia Peixinho<sup>1,2</sup>, Paulo Tavares-Ratado<sup>1,2,4</sup>, Luís Taborda-Barata<sup>1,2,5</sup>,  
Cândida T. Tomaz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>2</sup> Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>3</sup> Department of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>4</sup> Laboratory of Clinical Pathology, Sousa Martins Hospital, ULS Guarda, Portugal

<sup>5</sup> Department of Allergy & Clinical Immunology, Cova da Beira Hospital, Covilhã, Portugal

**Background:** Skin prick tests (SPT) with crude latex extracts are commonly used for the diagnosis of natural rubber latex (NRL) allergy. Nevertheless, the variation in protein and allergen composition among latex extracts from different manufacturers can affect the correct allergy diagnosis. The aim of this study was to analyze the protein and allergen heterogeneity of all latex extracts commercially available in Portugal and to evaluate its effectiveness in diagnosis of latex allergy.

**Method:** Seven latex SPT extracts were analysed for protein content and by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The four major allergens Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 and Hev b 6.02 were also quantified using an enzyme immunoassay (EIA). The reactivity of latex-allergic patients to the extracts was evaluated by SPT and by measuring latex specific IgE using the commercial latex extracts as solid phase.

**Result:** The extracts showed broad variations in protein composition, ranging from 8,0 to 526,5 µg/mL extract. Wide differences in protein profile among all extracts from different manufacturers were observed by SDS-PAGE. There was a marked variability regarding the contents of all four major allergens with undetectable Hev b 3 and Hev b 5 in certain extracts. SPT and specific IgE results also showed a great difference of reactivity in the same patient to the different extracts.

**Conclusion:** Latex extracts from different manufacturers showed a marked heterogeneity in protein and allergen content that could explain the broad spectrum of SPT and specific IgE reactivity found in the patients. These results suggest a need for improvement and standardization of latex extracts used for the diagnosis of latex allergy.

## 10.3 Manuscrito submetido

Evaluation and comparison of commercially available latex extracts for skin prick tests

Short title: Commercially available latex skin test extracts

M. F. Gabriel<sup>á\*</sup>, P. Tavares-Ratado<sup>\*,§,¶</sup>, C. M. Peixinho<sup>á\*</sup>, A. M. Romeira<sup>†</sup>, L. Taborda-Barata<sup>\*,§,#</sup>,  
I. Postigo<sup>£</sup>, J. Martínez<sup>£</sup>, C. T. Tomaz<sup>\*</sup>

<sup>á</sup> Department of Chemistry, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>\*</sup> CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>§</sup> Department of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>¶</sup> Laboratory of Clinical Pathology, Sousa Martins Hospital, ULS Guarda, Portugal

<sup>†</sup> Department of Allergy & Clinical Immunology, Dona Estefânia Hospital, Lisbon, Portugal

<sup>#</sup> Department of Allergy & Clinical Immunology, Cova da Beira Hospital, Covilhã, Portugal

<sup>£</sup> Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Basque Country, Vitoria, Spain

**Corresponding author:**

Prof. Cândida Tomaz, Ph.D.

CICS - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior

6201-001 Covilhã, Portugal

E-mail: ctomaz@ubi.pt

Fax: +351 275 329 099

## **Abstract**

*Background:* Crude latex extracts are commonly used in Skin prick tests (SPT) for the diagnosis of natural rubber latex (NRL) allergy. Nevertheless, the variation in protein and allergen composition among latex extracts from different manufacturers can affect the correct diagnosis of allergy. The aim of this study was to analyze the protein and allergen heterogeneity of seven extracts from different manufacturers and to evaluate its effectiveness in the diagnosis of latex allergy.

*Methods:* Seven latex SPT extracts were analysed for protein content and by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The four major allergens Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 and Hev b 6.02 were also quantified using an enzyme immunoassay (EIA). All commercial extracts were tested for their *in vitro* allergenic capacity by microarray-inhibition assays and for their ability to induce biological reactivity in latex-allergic patients by SPT.

*Results:* The extracts showed broad variations in protein composition, ranging from 8.0 to 526.5 µg/mL of extract. Broad differences in protein profiles among all extracts from different manufacturers were also observed by SDS-PAGE. There was a marked variability regarding the contents of all four major allergens with undetectable Hev b 3 and Hev b 5 in certain extracts. Microarray-inhibition assays and SPT demonstrated significant differences in allergenic capacity among the different extracts.

*Conclusions:* Latex extracts from different manufacturers showed a marked heterogeneity in protein and allergen content that could explain the broad spectrum of SPT found in the patients. These results suggest a need for improvement and standardization of latex extracts used for the diagnosis of latex allergy.

**Keywords:** allergen extracts; latex allergy; microarrays; skin prick test

## Introduction

Natural rubber latex (NRL) is widely used for the manufacture of medical devices and in a variety of everyday articles, particularly medical gloves (1, 2). Upon repeated exposure to NRL products, human adverse reactions to latex include nonallergic contact dermatitis, delayed type IV hypersensitivity (allergic contact dermatitis) and immediate type I hypersensitivity (3). This epidemic of adverse reactions to NRL has proved to be especially prevalent in certain occupational groups, such as health care workers (HCW) and spina bifida patients (SBP) (4, 5).

Identifying individuals who have become sensitized and are likely to suffer from symptoms upon repeated exposure to latex products is a major goal of prevention of allergic reactions (6). For this issue, it is now generally accepted that the diagnosis of allergy must be based on a positive clinical history of symptoms and on a confirmative assay which may include *in vivo* tests such as skin prick tests (SPT) and/or laboratory-based *in vitro* analyses (7, 8). With regard to latex allergy, SPT are indeed the most reliable method for diagnosis of sensitization to latex proteins. However, many variables influence the accuracy of the skin test (9). In fact, it is recognised that the diagnostic performance and reproducibility of these assays are highly dependent on the allergen composition and concentration of the reagents used and, in particular, on the raw material used in its preparation (6, 10). At present, SPT in latex allergic individuals are frequently performed with commercial crude NRL extracts that are complex and also variable in its composition because of their biological source (11, 12). Ideally, allergen extracts from different manufacturers should be qualitatively similar with an adequate amount of all relevant allergen components. Nevertheless, this is a complex task because of the difficulty in obtaining well-characterized extracts (13). Therefore, the complexity of allergen extracts and their standardization continue to be a major challenge in the further optimization of diagnostic assays (14). This process of standardization of allergen extracts is essential in order to control variability and to achieve consistency and reproducibility in a clinical setting (15). Moreover, it has been reported that both safety and efficacy are dependent on the relative amounts of individual major allergens, and to a lesser extent, even minor allergens (16). For these reasons, over the past decades, regulatory agencies in several European countries have started asking allergen manufacturers for major allergen levels of their products, and it is expected that this will, in the near future, become a requirement for registration (17).

Since the allergenic profile of an allergen-containing reagent can vary in its protein composition, allergenic potency, and immunoreactivity (18), the aims of this study were to detect and compare the level of heterogeneity of protein and allergenic composition among different manufacturers, and to investigate its effect upon diagnostic effectiveness.

## **Materials and methods**

### **Commercial latex allergen extracts**

Seven European manufacturers of latex allergen extracts were requested to participate in this study. They were informed about the purpose of the project and it was underlined that the participation was on a voluntary basis. All companies which had products distributed in the Portuguese market accepted to participate in the study. These companies were, in alphabetic order, Alk-Abellò, Allergopharma, Bial-Aristegui, Leti, Lofarma, Q-Pharma, Stallergenes. Each manufacturer which participated in the project sent its material for *in vivo* diagnosis. As stated in the material transfer agreement, all products were codified. Throughout the present study, the results will be shown with a code without the name of the company in a random order (i.e. manufacture A-G).

### **Total protein content**

The total protein concentration of the extracts was estimated by Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).<sup>(19)</sup> Two standard curves ranged from 50 to 500 µg/ml and 8 to 80 µg/ml of bovine serum albumin (BSA) were performed. Each experiment was carried out at least three times and each point was tested in duplicate. To make direct comparisons of the protein concentrations among different extracts and due to very small amount of protein present in some of these, all the seven extracts were analysed in undiluted form. The standard deviations (SD) were calculated using SPSS software, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

### **Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

Latex extract proteins were separated by electrophoresis in 4-20% polyacrilamide gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Gels were loaded with equal volumes (35µL/lane) of each commercial latex extract. A protein molecular weight marker (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used as a standard. Proteins were visualized by Coomassie Blue staining.

### **Capture enzyme immunoassay (EIA)**

Analysis of major allergen content in the extracts was performed using a commercial kit (FITkit<sup>TM</sup>, Icosagen AS, Estonia) according to the manufacturer's instructions. Allergen content was measured for Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 and Hev b 6.02. Each extract was analysed in undiluted form for FITkit Hev b 1, FITkit Hev b 3 and FITkit Hev b 5 assays. Due to expected high amounts of Hev b 6.02, each extract was analysed with the 1:10 and 1:100 dilutions for quantification by FITkit Hev b 6.02. All assays were performed in triplicate. For each extract, the three points interpolated in the linear range of the curve were selected and a medium value was calculated.

### **Inhibition assays by microarrays**

A previously characterized serum by ISAC-ImmunoCAP (specific IgE as ISAC standardized units (ISU/L) - Hev b 1: 3; Hev b 5: 1,8 ; Hev b 6: 1,2 and Hev b 8: 3) was selected from the serum bank of Department of Immunology and Parasitology of University of the Basque Country. A serum with specific IgE against Der p 1 (11 ISU/L) was used as control. After centrifugation of each latex extract, 10µL of supernatant was mixed with serum in a 1:1 ratio and incubated overnight at 4°C under agitation. Then all samples were centrifuged and 20µL of each was analysed by ISAC-immunoCAP for Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 and Hev b 8 (ISAC™, Phadia, Uppsala, Sweden) as recommended by the manufacturer.

### **Latex-allergic patients**

Eleven latex-allergic patients (five SBP and six HCW) were studied. Three HCW had clinical and laboratory features of latex-fruit syndrome. They were selected among patients attending the allergy units at the following hospitals: Castelo Branco (Amato Lusitano Hospital), Lisboa (Dona Estefânia Hospital) and Covilhã (Cova da Beira Hospital). The inclusion criteria were a clinical registration of a previous positive SPT to a latex allergen solution and a consistent clinical history, showing correlation between symptoms and latex exposure. The subjects were not on allergen-specific immunotherapy, corticosteroid or antihistamine therapy. Written informed consent to participate in the study was obtained from all volunteers. Serum samples were collected, aliquoted and stored at -20°C.

### **Determination of allergen-specific IgE**

Latex-specific IgE levels in the patients' sera were measured using total latex extract k82 (ImmunoCAPS™, Phadia).

### **Skin prick tests (SPT)**

SPT with NRL extracts from the seven manufacturers were performed in eleven patients in accordance with recommendations of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Skin prick testing was performed in duplicate on the patient's forearms with disposable lancets. Histamine (0.1%; 10 µg/ml) was used as a positive control and saline solution as a negative control. Each test was carried out in a single-blinded way, as the product identities were unknown to the allergist. Reactions were recorded 15 min after testing by transferring the ballpoint pen-surrounded wheal area with a scotch tape to paper. According to guidelines, skin wheal size was measured and registered (20). Each result was the mean of two values and 3 mm was considered the positivity cut-off.

## Results

### Quantitative and qualitative protein analysis

Data presented in Table 1 show a high variability in total protein amounts of the seven commercial extracts. The lowest total protein concentration was found in the extract from company F (below detection limit - 8 µg/mL), and the highest in the extract from company A (526.5 ± 2.4 µg/mL), demonstrating an approximately 65-fold variation. We also analysed the total protein content in two different batches from four of the study's manufacturers (A, C, D and F), and a significant batch-to-batch variability in protein concentration was observed (data not shown).

As shown in Fig.1 the pattern and intensity of protein bands obtained by SDS-PAGE analysis were highly heterogeneous since all electrophoretic profiles are different. The pattern both in terms of the number and intensity of the bands between 4 and 60 KDa, corresponding to molecular weight of the important latex allergens, was highly heterogeneous. Extracts from manufacturers B and F had no visible bands at all. In the electrophoretic profile of the extracts, except for manufacturers B and F, an expanded protein band in the low molecular weight area (<20 KDa) was observed. However, the corresponding observed intensities were very variable among these. In fact, most of latex allergens have molecular weights within this range, namely Hev b 6.02 (4.7 KDa), Hev b 12 (9.3 KDa), Hev 6.03 (14.0 KDa), Hev b 1 (14.6 KDa), Hev b 8 (10.2-15.7 KDa), Hev b 5 (16 KDa) and Hev b 6.01 (20 KDa). The appearance of a band with an apparent molecular weight greater than 60 KDa (approximately 85 KDa) in extracts C and E raised the possibility that some latex proteins form aggregates that resist SDS disaggregation, that some latex proteins fail to denature completely or that they may represent another kind of latex protein. Simultaneously, the four extracts from different batches were also analysed by SDS-PAGE. The obtained electrophoretic profiles showed variability, especially with regard to band intensities (data not shown).

### *Major NRL allergens quantification by EIA*

The levels of the four latex allergens studied in the extracts ranged from below detection limit (b.d.) to above detection limit (a.d.), as can be observed in Table 2. The results varied from 141.0 to over 1000 µg/L (a.d.) for Hev b 1, from 10 µg/L (b.d) to over 1000 µg/L (a.d) for Hev b 3, from 5 µg/L (b.d) to over 100 µg/L (a.d) for Hev b 5 and from 105.5 µg/L to over 20000 (a.d.) for Hev b 6.02. Thus, Hev b 1 and Hev b 6.02 were the only ones that were detected in all commercial latex extracts. On the other hand, the most difficult NRL allergen to detect was Hev b 3, since this allergen was not quantified in four of the seven studied extracts. Moreover, manufacturer A's extract was the SPT reagent in which all major NRL allergens were better represented. By contrast, the extract from manufacturer D showed the poorest content in major allergens, since two of the four major allergens were not detected.

Globally, all commercial NRL extracts, with the exception of extracts from companies A and E, failed to detect at least one of the major NRL allergens.

### **Microarray-inhibition assays**

IgE microarrays inhibition experiments showed a visible variation among the seven commercial extracts, especially regarding Hev b 8 allergenic activity (Fig. 2). In fact, for this latex allergen all extracts showed distinct inhibition percentages. On the other hand, the inhibition for Hev b 1 and Hev b 6 was 100% for all extracts. Similar results were shown for Hev b 5 assays, in which only extract from manufacturer B presented an inhibition capacity below 100% (73%). For serum control it was not detected any inhibition effect. Among all analysed extracts, the manufacturer A was the only one that showed a total allergenic activity for Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 and Hev b 8.

### ***In vivo* analysis of allergenic activity**

All latex-allergic patients (except HCW4) had detectable serum latex-specific IgE and a positive SPT result to at least one of the seven commercial extracts (Table 3). Despite HCW4 having negative latex-specific IgE, he was included in the study because this patient had a consistent clinical history of latex-fruit syndrome, with relevant clinical symptoms when exposed to latex products. Moreover, HCW4 had positive SPT for two (manufacturer A and D) of the seven commercial extracts. For all patients, the wheal reactions induced with the studied extracts showed high variability (Table 3). For example, extract from manufacturer D induced a wheal diameter of 8 mm in patient SBP2 whereas extracts from manufactures B and F did not induce any visible skin reaction, in the same patient. In fact, in almost all individuals the skin response was negative (< 3mm) for at least one of the seven available extracts. Among the eleven allergic patients only one (SBP4) had positive skin reactivity to all applied commercial extracts. In what regards latex-allergic patients with clinical features of latex-fruit syndrome (HCW 4-6) most of the extracts resulted in negative SPT reactivity, with each of these patients presenting positive *in vivo* reactivity to only two commercial solutions. Another interesting case is patient SBP5 that despite having one of the highest values of serum latex-specific IgE levels, showed skin reactivity by SPT to only two extracts (manufacturers C and G). This finding suggests that this patient is sensitized to an allergen that is adequately represented only in these two SPT reagents.

## Discussion

An early and accurate diagnosis is important for a correct therapeutic approach (21). However, the success of allergen-specific diagnosis is dependent on the allergen composition of the material used. Although the allergic patient might be exposed to allergen sources with different allergen composition on different occasions, the material used for clinical evaluation should contain all relevant allergens in appropriate concentrations (22). Moreover, batch to batch consistence among the extracts from a manufacturer and homogeneity across the same type of extract from different manufacturers should be ensured (15). In what regards latex allergy, there are several extracts for skin prick testing commercially available in the European market, produced by different companies. Crude natural rubber latex is the preferred raw material by manufacturers for development of reagents used in SPT (23), however, the resultant allergen extracts are complex mixtures, whose level of heterogeneity of protein content and its effect on allergenic potency are not well understood. Taking this into account, we aimed to analyse and to compare the protein content and the effectiveness of extracts currently used for diagnosis of latex allergy from seven different European manufacturers, commercially available in Portugal.

Our work, firstly revealed that the latex allergen SPT extracts differed approximately 65-fold regarding the total protein among different manufacturers (Table 1). Surprisingly, this value is the highest so far published in the evaluation of total protein content of commercial allergen extracts (13, 24, 25). This evident heterogeneity in protein content was qualitatively confirmed by SDS-PAGE (Fig. 1). In this experiment, different patterns of bands were observed across extracts from different manufacturers and, in some extracts, equivalent bands with different intensities were also detected. These results are an indication of the unbalanced protein content of allergen extracts currently used in diagnosis of NRL allergy.

Secondly, a marked variability in the most important latex allergens (Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 and Hev b 6.02) was detected, with the finding of distinct amounts of these allergens in all extracts. Hev b 6.02 was the allergen better represented in all of them (Table 2). In fact, the abundance and widespread presence of Hev b 6.02 in crude latex have been described (26, 27). On the other hand, Hev b 3 and Hev b 5 were not detected in some extracts, in which they are apparently underrepresented. This finding is not surprising since it has been reported that easily degraded allergens, such as Hev b 3 and Hev b 5, may be entirely absent in the diagnostic solutions (22, 28). However, it is known that both allergens are very important in latex sensitization, being characterized as major latex allergens. Therefore, these two allergens, like all clinically relevant latex allergens, should be present in all of allergen SPT extracts, which stresses the need for improvement of extract content, namely in terms of enrichment with allergens that are poorly represented in solutions used for clinical purposes. In fact, one possibility to overcome the lack of certain components in extracts would be the addition of defined recombinant allergen (25).

There are several explanations for the observed variations in the studied extracts. Differences regarding allergen contents may be caused by factors such as arising from agricultural practice, storage and laboratory handling (23). Additionally, different methods of extraction and treatment of extracts implemented by distinct manufacturers will have a major influence on the presence of allergens and their possible degradation (29).

Finally, we found remarkable variations in regards the *in vitro* and *in vivo* allergenic activity among different SPT solutions. *In vitro* assays by microarray-inhibition showed that all extracts had Hev b 1, Hev b 5 and Hev b 6 with high ability to bind specific IgE. However, this did not happen for minor allergen Hev b 8. In fact, in this case all extracts presented different Hev b 8 allergenic capacity, with reagent from manufacturer A showing the high value of inhibition percentage. Hev b 5 microarray-inhibition results were quite surprising because, despite this allergen was undetectable in some extracts by EIA assay, their residual content especially in solutions from manufacturers D and G were enough to bind significant amounts of specific IgE. *In vivo* assays were performed in patients selected from two important risk groups, SBP and HCW, in which the prevalence of latex allergy is 25% - 72% (30, 31) and 2,7% - 36% (32, 33), respectively. All SPT were performed in the same conditions adopted by clinicians during their habitual activity, to reproduce what really happens in the typical clinical practice. The SPT results obtained in eleven latex-allergic patients showed a striking variability in the intensity of the observed skin reaction (Table 3). Indeed, for most of patients, at least one of extracts was not able to elicit a positive result. In practice, these results suggest that depending on the extract used by a particular allergist, a latex-allergic patient may be recorded as either negative or positive in terms of the presence of latex allergy. Thus, the use of SPT solutions with poor sensitivity may result in disastrous consequences if clinical decisions are made solely on the basis of these results. This fact confirmed that the absence of important components in SPT reagents can affect the outcome of diagnosis of latex allergy. Additionally, it has been described that some allergen extracts used for the preparation of skin test reagents will also be used for the preparation of allergen-specific immunotherapy treatments. The differences in the presence of allergens may have even more important implications for such therapeutic extracts because allergens that are missing or that are present in small amounts will fail to induce protective immune responses against these components (25).

In summary, commercially available latex extracts from different manufacturers show considerable heterogeneity in their protein and major allergen composition and this may negatively affect the accuracy of SPT testing. These findings should alert physicians to the variable skin reactivity of NRL extracts across different manufacturers. In addition, similar questions about other commercial extracts, namely therapeutic extracts should also be raised. Moreover, this work suggests that there is considerable room for improvement and standardization of the reagents currently used for clinical purposes.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank to Alk-Abellò, Allergopharma, Bial-Aristegui, Leti, Lofarma, Q-Pharma and Stallergenes for kindly providing the latex extracts and Phadia (Iberia) for providing the microarrays and ImmunoCAPs.

## References

1. Mahler V, Fischer S, Fuchs T, Ghannadan M, Valent P, Fartasch M et al. Prevention of latex allergy by selection of low-allergen gloves. *Clin Exp Allergy* 2000;**30**(4):509-520.
2. Charous BL, Blanco C, Tarlo S, Hamilton RG, Baur X, Beezhold D et al. Natural rubber latex allergy after 12 years: recommendations and perspectives. *J Allergy Clin Immunol* 2002;**109**(1):31-34.
3. Kean T, McNally M. Latex hypersensitivity: a closer look at considerations for dentistry. *J Can Dent Assoc* 2009;**75**(4):279-282.
4. Liss GM, Sussman GL. Latex sensitization: occupational versus general population prevalence rates. *Am J Ind Med* 1999;**35**(2):196-200.
5. Wagner B, Buck D, Hafner C, Sowka S, Niggemann B, Scheiner O et al. Hev b 7 is a Hevea brasiliensis protein associated with latex allergy in children with spina bifida. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**108**(4):621-627.
6. Wagner S, Bublin M, Hafner C, Kopp T, Allwardt D, Seifert U et al. Generation of allergen-enriched protein fractions of Hevea brasiliensis latex for in vitro and in vivo diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;**143**(4):246-254.
7. Leynadier F, Herman D, Vervloet D, Andre C. Specific immunotherapy with a standardized latex extract versus placebo in allergic healthcare workers. *J Allergy Clin Immunol* 2000;**106**(3):585-590.
8. Ebo DG, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Latex-specific IgE, skin testing, and lymphocyte transformation to latex in latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;**100**(5):618-623.
9. Turjanmaa K. Diagnosis of latex allergy. *Allergy* 2001;**56**(9):810-812.
10. La Grutta S, Mistrello G, Varin E, Pajno GB, Passalacqua G. Comparison of ammoniated and nonammoniated extracts in children with latex allergy. *Allergy* 2003;**58**(8):814-818.
11. Blanco C, Carrillo T, Ortega N, Alvarez M, Dominguez C, Castillo R. Comparison of skin-prick test and specific serum IgE determination for the diagnosis of latex allergy. *Clinical and Experimental Allergy* 1998;**28**(8):971-976.
12. Kurup VP, Fink JN. The spectrum of immunologic sensitization in latex allergy. *Allergy* 2001;**56**(1):2-12.

13. 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**(2):184-190.
14. Williams P, Sewell WA, Bunn C, Pumphrey R, Read G, Jolles S. Clinical immunology review series: an approach to the use of the immunology laboratory in the diagnosis of clinical allergy. *Clinical and Experimental Immunology* 2008;**153**(1):10-18.
15. Larsen JN, Dreborg S. Standardization of allergen extracts. *Methods Mol Med* 2008;**138**:133-145.
16. van Ree R. The CREATE project: EU support for the improvement of allergen standardization in Europe. *Allergy* 2004;**59**(6):571-574.
17. van Ree R. Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**119**(2):270-277; quiz 278-279.
18. Hamilton RG. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**(2 Suppl 2):S284-296.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-254.
20. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993;**48**(14 Suppl):48-82.
21. Bernardini R, Pucci N, Azzari C, Novembre E, De Martino M, Milani M. Sensitivity and specificity of different skin prick tests with latex extracts in pediatric patients with suspected natural rubber latex allergy--a cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* 2008;**19**(4):315-318.
22. Lundberg M, Chen Z, Rihs HP, Wrangsjo K. Recombinant spiked allergen extract. *Allergy* 2001;**56**(8):794-795.
23. Yeang HY, Hamilton RG, Bernstein DI, Arif SA, Chow KS, Loke YH et al. Allergen concentration in natural rubber latex. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**(8):1078-1086.
24. 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**(3):258-263.
25. Focke M, Marth K, Flicker S, Valenta R. Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. *Clin Exp Allergy* 2008;**38**(8):1400-1408.

26. Alenius H, Kalkkinen N, Lukka M, Reunala T, Turjanmaa K, Makinen-Kiljunen S et al. Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin Exp Allergy* 1995;**25**(7):659-665.
27. Yagami A, Suzuki K, Saito H, Matsunaga K. Hev B 6.02 is the most important allergen in health care workers sensitized occupationally by natural rubber latex gloves. *Allergol Int* 2009;**58**(3):347-355.
28. Breiteneder H, Scheiner O. Molecular and immunological characteristics of latex allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;**116**(2):83-92.
29. Malling HJ. Skin prick testing in biological standardization of allergenic products. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* 1997(91):157-163.
30. Nieto A, Estornell F, Mazon A, Reig C, Garcia-Ibarra F. Allergy to latex in spina bifida: a multivariate study of associated factors in 100 consecutive patients. *J Allergy Clin Immunol* 1996;**98**(3):501-507.
31. Kattan H, Harfi HA, Tipirneni P. Latex allergy in Saudi children with spina bifida. *Allergy* 1999;**54**(1):70-73.
32. Yassin MS, Lierl MB, Fischer TJ, O'Brien K, Cross J, Steinmetz C. Latex allergy in hospital employees. *Ann Allergy* 1994;**72**(3):245-249.
33. Bousquet J, Flahault A, Vandenplas O, Ameille J, Duron JJ, Pecquet C et al. Natural rubber latex allergy among health care workers: a systematic review of the evidence. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**(2):447-454.

## Figure legends

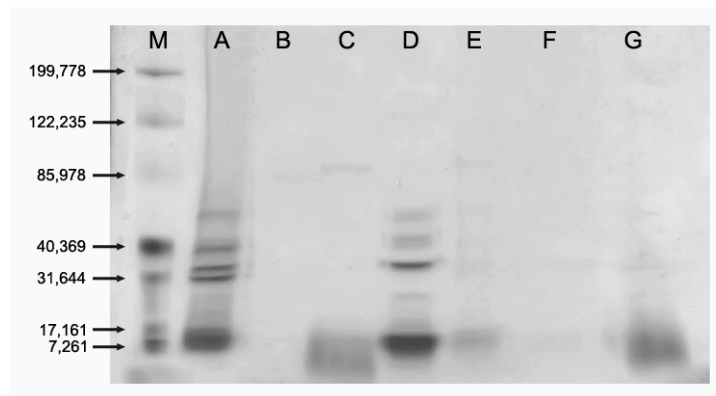


Figure 1. SDS-PAGE 4-20% analysis of latex commercial extracts (manufacturers A to G). M- Molecular weight marker (KDa).

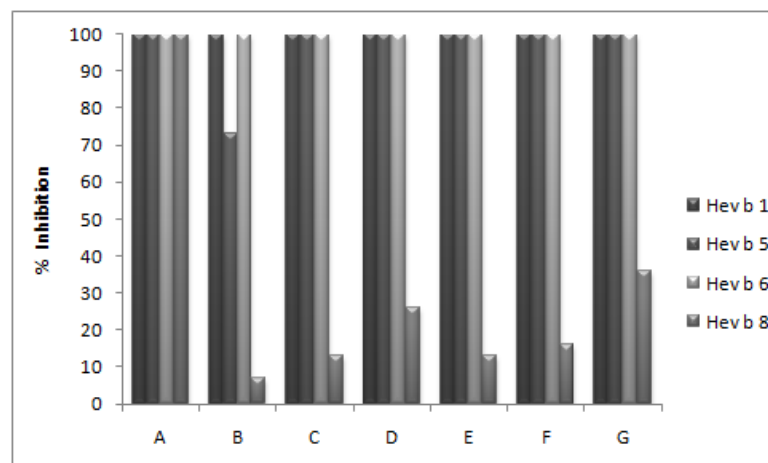


Figure 2. Percentages of microarrays IgE inhibition binding to Hev b 1, Hev b 5, Hev b 6 and Hev b 8 in the seven commercial extracts (manufacturers A-G).

Table 1. Quantification of total protein by Bradford's method in latex extracts from manufacturers A to G.

Manufacturers	Protein Mean* $\pm$ SD
A	526.5 $\pm$ 2.4
B	13.0 $\pm$ 0.7
C	143.2 $\pm$ 3.9
D	217.8 $\pm$ 0.9
E	61.5 $\pm$ 4.4
F	b.d.
G	281.5 $\pm$ 5.3

\*Results are the mean of three different determinations. Values are expressed as  $\mu\text{g}$  protein/ml extract.  
b.d.: below detection limit < 8 $\mu\text{g}$ /mL  
SD-standard deviation

Table 2. Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 and Hev b 6.02 quantification by EIA in latex extracts from different manufacturers (A to G).

Manufacturers Allergens	A	B	C	D	E	F	G
	Hev b 1	>1000	199.00	148.34	141.00	>1000	280.34
Hev b 3	>1000	<10	<10	<10	218.20	<10	13.20
Hev b 5	> 100	17.61	6.18	<5	49.80	78.73	<5
Hev b 6.02	>20000	393.3	3125	>20000	9216	4631	105.5

\*Results are the mean of triplicates. Values are expressed as  $\mu\text{g}$  allergen/L extract

Table 3. Wheal mean diameters after skin prick test with different products (A to G) in eleven patients with confirmed NRL allergy, and respective levels of latex-specific IgE (k82).

	<i>Spina Bifida</i> Patients					Health Care Workers					
	SBP1	SBP2	SBP3	SBP4	SBP5	HCW1	HCW2	HCW3	HCW4	HCW5	HCW6
A	4	5	5.5	7.5	0	9	4.5	5	4	3	3
B	2.5	0	2.5	3.5	0	4	1.5	1	0	0	0
C	2.5	2	4.5	4.5	5	4	2.5	2	0	0	0
D	4.5	8	10	5.5	0	4	3.5	3	3	0	0
E	2.5	3.5	6.5	5	0	4	4	3.5	0	3	0
F	2	0	2.5	3.5	0	0	1.5	1.5	0	2	4
G	2.5	4	4.5	4	4	3	2	2.5	0	0	0
Histamine	4.5	5	4.5	5	4.5	12	5	5.5	8	9	6
k82 KUA/L	1.74	0.52	17.9	1.37	15.3	1.24	1.65	1.92	0.10	0.49	0.62

Bold types are negative values according to cut off < 3mm for SPT results and < 0.35 KUA/L for detection of latex-specific IgE by k82