

2ej
113



*Universidad Nacional
Autónoma de México*

Facultad de Química

**PRESENCIA DE ENDOTOXINAS MICROBIANAS
EN ALERGENOS
(POLVO CASERO)**

T E S I S
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

ADRIANA SAHAGUN PARTIDA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Jurado Asignado según el tema:

Presidente Prof: MARIA DOLORES LASTRA AZPILICUETA.
Vocal Prof: SALVADOR MARTIN SOSA.
Secretario Prof: RODOLFO PASTELIN PALACIOS.
1er. Suplente Prof: PATRICIA CALDERON GOMEZ.
2do. Suplente Prof: ISABEL MUGGENBURG RODRIGUEZ.

Sitio donde se desarrolló el tema:

SERVICIO DE ALERGIA E INMUNOLOGIA CLINICA DEL HOSPITAL GRAL.
DE MEXICO S.S.A.

Asesor del tema

Dr. Salvador Martín Sosa.

Sustentante

Adriana Sahagún Partida.

CONTENIDO

| | |
|-----------------------------------------------|----|
| 1.- INTRODUCCION | |
| 2.- CAPITULO # 1 | |
| 1.1 ANTECEDENTES | 1 |
| 1.2 CLASIFICACION DE LOS ALERGENOS INHALABLES | 4 |
| 1.3 EL POLVO CASERO COMO ALERGENO | 5 |
| 1.4 NATURALEZA QUIMICA | 7 |
| 3.- CAPITULO # 2 | |
| ENDOTOXINAS MICROBIANAS. | |
| 2.1 GENERALIDADES | 8 |
| 2.2 EFECTOS BIOLÓGICOS | 9 |
| 2.3 ACTIVIDAD PIROGENICA DE LAS ENDOTOXINAS | 9 |
| 4.- CAPITULO # 3 | |
| PREPARACION DE ANTIGENOS | 13 |
| 5.- CAPITULO #4 | |
| 4.1 MATERIAL Y REACTIVOS | 23 |
| 4.2 METODOLOGIA Y TABLA DE RESULTADOS | 24 |
| 4.3 RESULTADOS Y CONCLUSIONES | 35 |
| 6.- ANEXO 1 | 44 |
| 7.- BIBLIOGRAFIA | 48 |

INTRODUCCION

Una de las enfermedades más frecuentes que se presentan en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Gral. - de México, es la alergia al polvo casero. En los pacientes - produce procesos de asma, rinitis, infecciones de las vías - respiratorias altas y en algunas ocasiones eczema.

Los alérgenos utilizados en las pruebas cutáneas son muy im - portantes como ayuda en el diagnóstico clínico. (10)

En el estudio de extractos de polvo casero, se menciona que - están constituidos por una mezcla heterogénea de hidratos de carbono y mucoproteínas, que se supone son los que causan los síntomas. Paterson y Col. (21) mencionan que las propiedades alergizantes del polvo casero varían dependiendo del medio - ambiente. Los extractos completos de polvo casero, contienen alérgenos provenientes principalmente de bacterias, ácaros , mohos y caspa de animales.

La situación geográfica de la ciudad de México, con su creci - miento demográfico e industrial desordenados, el fecalismo, - la basura, han dado lugar a un aumento importante de los trans - tornos de las vías respiratorias, en ocasiones con complicacio - nes serias, debido posiblemente al gran contenido de bacterias; por lo tanto, los extractos de polvo casero pueden contener - endotoxinas microbianas y es por ello que algunas veces des - pués de la inyección del preparado se registra el aumento de - temperatura corporal, y esto se debe a los productos pirogéni - cos. (9)

El objetivo principal de este trabajo es demostrar la presencia de endotoxinas microbianas en el extracto de polvo casero e intentar por métodos químicos la eliminación de los factores irritantes de dichas endotoxinas, conservando su poder inmunogénico.

CAPITULO # 1

1.1 ANTECEDENTES

En 1980, Von Behring descubrió el uso profiláctico del antisue-
ro contra la toxina diftérica. En la búsqueda de otros antisue-
ros profilácticos Portier y Richet notaron una reacción seme -
jante al choque anafiláctico, en un perro sensibilizado a la
toxina de una anémona marina: denominaron a esta reacción nociva,
anafilaxis para distinguirla de la profilaxis. En la década si -
guiente se reconoció a la fiebre del heno y al asma como equiva-
lentes a la reacción observada en el animal, y se consideró a la
histamina como el mediador farmacológico primario de tales sínto -
mas. (10)

Aunque sabemos que la función del sistema inmunitario es proteger
al huésped de los antígenos extraños, las respuestas inmunes anor -
males pueden producir lesión de los tejidos y enfermedades. Gell
y Coombs han clasificado los mecanismos de las lesiones hísticas
inmunológicas en cuatro tipos distintos de reacción, lo que per -
mite comprender mejor la inmunopatogénesis de la enfermedad.

TIPO 1: REACCIONES ANAFILACTICAS O DE HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA.

La unión del antígeno a anticuerpos IgE preformados unidos a la -
superficie del mastocito o del basófilo libera mediadores como la
histamina, la sustancia de reacción lenta de la anafilaxis y el -
factor quimiotáctico eosinofílico de la anafilaxis, que producen
las manifestaciones clínicas. Ejemplos de enfermedades tipo 1 son
el shock anafiláctico, la rinitis alérgica, el asma alérgica y la
alergia aguda a la penicilina.

TIPO 11: REACCIONES CITOTÓXICAS:

En las reacciones citotóxicas se produce la unión de un anticuerpo IgG o IgM a un antígeno, unido a su vez a una célula.

La unión antígeno-anticuerpo activa la cascada del complemento y determina la destrucción de las células (citólisis) a la que está unido el antígeno. Son ejemplos de lesiones hísticas por ese mecanismo la anemia hemolítica inmune y la enfermedad hemolítica Rh - del recién nacido.

TIPO 111: REACCIONES MEDIADAS POR INMUNOCOMPLEJOS:

Los inmunocomplejos se forman cuando los antígenos se unen a los anticuerpos y generalmente desaparecen de la circulación por la intervención del sistema fagocítico. Sin embargo, el depósito de los complejos en los tejidos o en el endotelio vascular puede producir lesiones hísticas mediadas por inmunocomplejos. Dos factores importantes que conducen a la lesión por este mecanismo son el incremento de la cantidad de complejos circulantes y la presencia de aminas vasoactivas, que aumentan la permeabilidad vascular y favorecen el depósito hístico de los complejos. El depósito de inmunocomplejos condiciona la activación del complemento, la generación de anafilotoxinas (C3a, C5a), la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares, la fagocitosis y la lesión hística. Son ejemplos clínicos de este tipo de reacción la enfermedad del suero, algunas nefritis y determinados aspectos de la endocarditis bacteriana.

TIPO 1V: HIPERSENSIBILIDAD TARDÍA:

La hipersensibilidad tardía está mediada principalmente por los linfocitos T. Los ejemplos clásicos de este tipo de reacción son la prueba cutánea de la tuberculina y la dermatitis de contacto.

(28)

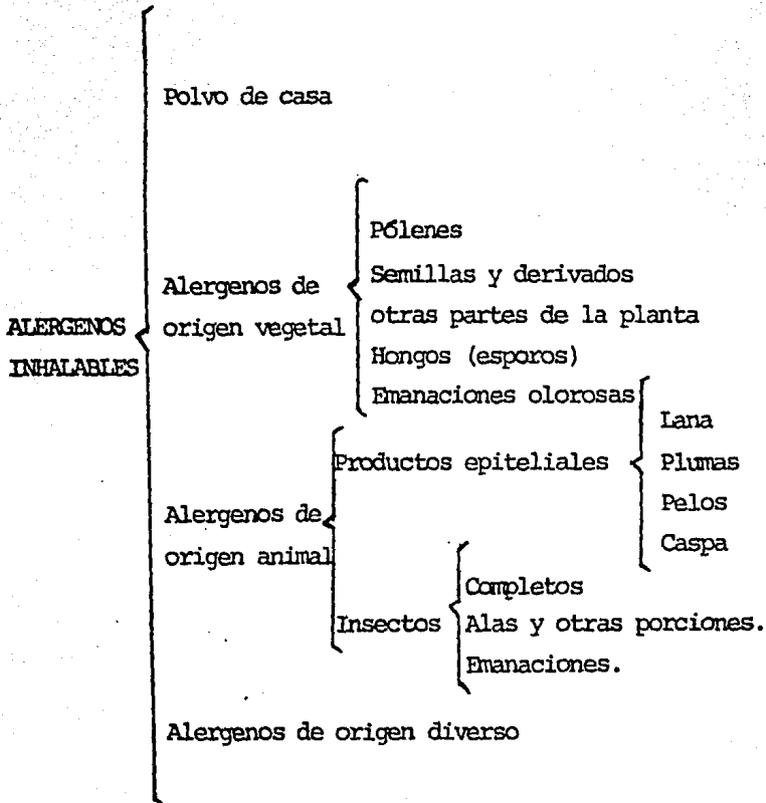
Las reacciones tipo 1 son las que tienen importancia en este trabajo, debido a que son las responsables del proceso alérgico. Posteriormente se descubrió que podría emplearse la piel para hacer el diagnóstico específico, y que una serie prolongada de inyecciones de estos antígenos podría aliviar los síntomas alérgicos. (10)

Actualmente sabemos que esos antígenos mejoran en forma notable los síntomas alérgicos, empleándose rutinariamente como ayuda en diagnóstico clínico.

Fue así como se encontró que las endotoxinas de bacterias Gram-negativas principalmente eran los elementos pirogénicos cuya presencia era necesario verificar en el alérgeno inyectable, como causa principal de las reacciones irritativas específicamente en el alérgeno de polvo casero; por lo tanto su neutralización sería recomendable para obtener vacunas que se toleren bien, y ese sería un parámetro del control de calidad en la elaboración de estas vacunas.

1.2 CLASIFICACION DE LOS ALERGENOS

INHALABLES



(24)

1.3 EL POLVO CASERO COMO ALERGENO

Kern (1921) y Cooke (1922) (5) fueron los primeros que dedicaron su atención a las propiedades alergénicas de los factores caseros, al describir casos de asma bronquial condicionados por la sensibilización al polvo casero.

El trabajo de Adelsberger (1929) fue uno de los primeros intentos para revelar el principio activo del alergeno de polvo casero. La fracción obtenida por este autor era termolábil y se disolvía bien en agua y soluciones salinas amortiguadas pero no en los disolventes químicos ordinarios.

Gran aporte en la identificación de los componentes específicos - activos del alergeno de polvo casero ha sido la serie de informes realizados por Boatner y Col. (1942) y Sutherland (1942) (27). Mediante precipitaciones fraccionadas del producto original, con la utilización de disolventes orgánicos y sulfato de amonio, el grupo de Boatner realizó la concentración de los preparados.

Sutherland empleó, como método para el fraccionamiento del alergeno de polvo casero, la adsorción del alergeno en ácido benzoico,

el cual generalmente ha sido utilizado para la obtención de glucoproteínas. Al producto obtenido mediante filtración se agregaba acetona, provocando con ello la dilución del ácido benzoico y al mismo tiempo la precipitación del alergeno; para eliminar los vestigios del ácido benzoico, el alergeno después de centrifugado se lavaba con acetona, alcohol y éter. El preparado se secaba al vacío, a temperatura ambiente, se disolvía en agua y se volvía a precipitar con acetona.

Luego se realizaba diálisis contra ácido cítrico al 2% y el producto resultante era propiamente el alergeno.

Algunos autores como Versie (31), Monard y Geubelle, perfeccionaron el método descrito. En todos los casos los preparados obtenidos se caracterizaban por su actividad alta en las pruebas cutáneas. Tratados con ácido clorhídrico 0.5N (100°C) las propiedades alergénicas desaparecían, solamente, mediante hidrólisis con concentraciones mayores de este ácido.

Para la identificación de los componentes activos, primero se empleó la electroforesis en solución amortiguada de fosfatos (pH8), y para obtener una información más completa, se utilizó cromatografía en columna de DEAE- celulosa. Las fracciones obtenidas fueron glucoproteínas.

En la literatura de los años 60 dedicada a la alergología, apareció una serie de trabajos que indicaban la gran importancia de los microácaros- Dermatophagoides pteronysinus y D farinae en el desarrollo de la sensibilización y de las manifestaciones de las reacciones al polvo casero, en los pacientes con enfermedades alérgicas y de los órganos del oído, nariz y laringe.

G.V. Gurguenidze (1976) realizó también las pruebas intradérmicas con el alérgeno del polvo casero en pacientes con asma bronquial atópica, y resultó que en los individuos con el grupo sanguíneo O la incidencia del asma de origen alérgico al polvo es bastante más alta, en comparación con los pacientes de los grupos sanguíneos A y B.

Conviene señalar, una vez más, que el sustrato del cual se elabora el preparado incluye un sistema ecológico complejo, integrado por materiales orgánicos y por representantes del micromundo.

1.4 NATURALEZA QUIMICA:

El polvo casero se compone de material orgánico e inorgánico, y se ha demostrado que el material orgánico induce síntomas alérgicos. El polvo inorgánico puede provocar síntomas en grado variable mediante irritación inespecífica, pero la alergia a él es rara (30).

El análisis del extracto de polvo casero por inmunoelectroforesis, confirma su complejidad demostrando 43 inmunoprecipitantes y confirmando la presencia de Ag derivados, como ya se mencionó, de ácaros, caspa de animales y de humanos, proteínas séricas de humanos, hongos y una gran variedad de contenido de endotoxinas.

Los extractos de polvo de casa de diferentes partes del mundo pueden tener igual reactividad cutánea, sugiriendo al menos, componentes alérgicos de Ag comunes. (18)

El agente alérgico del polvo casero, parecía desarrollarse durante el proceso de envejecimiento de las fibras de algodón y posiblemente a través de la acción de una autoenzima o como un producto de desdoblamiento de la acción bacteriana o de la proliferación de los mohos. (13)

En resumen; el polvo casero es una mezcla variable de muchos componentes y está constituido en un 40% a 50% por sustancias orgánicas, en cerca de 30% por cuarzo; alrededor del 29% por minerales de arcilla y en aproximadamente el 10% por cal. (13)

CAPITULO # 2

ENDOTOXINAS MICROBIANAS

2.1 GENERALIDADES:

Sabemos que la endotoxina es un complejo proteína-polisacárido-lipoide. (29). La calidad antigénica específica del complejo está determinada por el carbohidrato, que no es tóxico en sí mismo. La fracción proteica tiene poco poder antigénico, pero posee notable capacidad para combinarse con los carbohidratos de otras especies Gram-negativas, así como con los polisacáridos humanos del grupo A, y hacerlos antigénicos.

Estos antígenos han sido estudiados detalladamente por Boivin y Col. (20)

Un análisis de la fracción de polisacárido libre del lípido A, indica que consiste de un gran porcentaje de ácido-beta-hidroximíristico y ácidos similares; también pudo ser detectada hexosamina-P en la preparación. (26)

Los síntomas producidos por las endotoxinas son: elevación de la temperatura, shock, diarrea, postración, hiperglucemia seguida de hipoglucemia, congestión, edema y hemorragias en vísceras abdominales y pulmones. Estas toxinas forman parte de la pared celular de los organismos intactos y se supone que lo sintetiza la membrana citoplásmica. Las toxinas crudas de este tipo parecen tener más o menos la misma proteína, independientemente de la especie o de la virulencia inherente a la cepa de la cual se derivaron. (25)

2.2 EFFECTOS BIOLÓGICOS:

Los efectos biológicos producidos son varios:

1) Fiebre; 2) reacción alterada a la adrenalina; 3) choque vasomotor; 4) necrosis hemorrágica en tumores malignos; 5) abortos en animales ; 6) necrosis cutánea; 7) reacción de Schwartzman local y generalizada, y 8) un efecto protector no específico de las endotoxinas.

2.3 ACTIVIDAD PIROGENICA DE LAS ENDOTOXINAS:

El mecanismo de la producción de fiebre por la inyección de endotoxinas ha sido revisado por Bennet y Beeson, Cluff, Wood y Thomas (29). El hombre tiene el mismo umbral que algunos animales para el estímulo pirógeno de la endotoxina, pero a dosis mayores son más pirogénicas y tóxicas para el hombre que para el conejo. Este material pirogénico es muy potente, y produce en el hombre reacciones febriles intensas con 0.1 microgramos de una endotoxina purificada.

Cuando se inyecta al conejo diariamente endotoxina, van teniendo cada vez menos fiebre y finalmente no presentan reacción febril ; después de varias semanas vuelve la reactividad.

Esta reactividad alterada se llama tolerancia, ya que no se ha demostrado que intervenga una reacción antígeno-anticuerpo. (25)

Se ha observado que las endotoxinas aumentan profundamente la capacidad del sistema retículo - endotelial y la actividad funcional tanto de los polimorfonucleares como de los fagocitos mononucleares.

La naturaleza de la respuesta del huésped a las endotoxinas difiere de la respuesta inmunológica clásica en dos formas principalmente.

- La instalación es extremadamente rápida, tanto, que su demostración se presenta en horas y la "provocación" del efecto por un sólo producto es seguido por una actividad contra un amplio grupo de organismos Gram-negativos no relacionados.

Esto sugiere que las endotoxinas pueden estimular en el huésped la producción de anticuerpos que tienen "especificidad múltiple" o, alternativamente, que las bacterias Gram-negativas poseen un antígeno común, posiblemente en el componente lipídico de las endotoxinas, contra el cual se producen anticuerpos. Aún no se ha demostrado un antígeno común.

Existen otras posibilidades, como por ejemplo que alguna "sustancia inespecífica capaz de actuar como anticuerpo" puede aparecer después de la administración de endotoxina.

También puede considerarse la posibilidad de que las endotoxinas estimulen un aumento general en el nivel de anticuerpos que, aunque son específicos individualmente, en este caso la aparente "especificidad múltiple" puede ser una consecuencia de una activación de todos los anticuerpos que poseemos. (17)

Una serie de estudios comenzados en 1941 por Delawney y Boquet les permitieron describir las reacciones características de los primeros estados de la respuesta sistémica a las endotoxinas de bacterias Gram-negativas. Más tarde, Thomas observó que después de una inyección intravenosa de endotoxina en conejos se producía una intensa y prolongada contracción arteriolar, respuesta análoga a la estimulación con adrenalina.

Los puntos de semejanza entre las reacciones a adrenalina y a endotoxina incluyen leucocitosis, inflamación de tejidos con la producción de petequias hemorrágicas y necrosis en la pared del estómago, y fuera del tracto gastrointestinal en los nódulos linfáticos mesentéricos, y necrosis fibrinoide de la pared de arterias coronarias. Cada uno de estos efectos ha sido observado en animales de experimentación después de la administración de adrenalina y endotoxina. (29)

La endotoxina tiene acción en algún área dominada por la reactividad de la adrenalina, encontrándose así que inyectando en una región de la piel una mezcla de endotoxina y adrenalina se produce localmente una necrosis hemorrágica. Esta lesión aumenta en tamaño e intensidad a las 24 hrs.

Así mismo, se ha observado que la endotoxina produce una drástica alteración de la acción de la adrenalina, convirtiendo el efecto normal vasoconstrictor en un efecto necrosante poderoso, capaz de causar necrosis hemorrágica en la piel.

Esto se debe a la respuesta vasoconstrictora de los vasos capilares periféricos producida por la adrenalina.

Pequeñas dosis de endotoxina producen un gran aumento de la vasoconstricción en vasos que no son afectados normalmente por la adrenalina. Las dosis grandes causan una reversión de este efecto. Se cree, por lo tanto, que la acción de la endotoxina es aparentemente sobre los vasos sanguíneos, arterias y venas (aún las pequeñas venas que normalmente son las menos reactivas) y las arteriolas precapilares, impidiendo la circulación capilar y aumentando la presión sanguínea en el interior de las vénulas unidas.

En el estudio de Thomas también se encontraron petequias hemorrágicas en capilares dilatados, vénulas y estais sanguínea.

Al iniciar estos estudios se pensaba que la adrenalina era la responsable del cuadro de necrosis, pero se encontró que la adrenalina inyectada se destruye rápidamente: su vida media en el organismo es de unos minutos, produce una vasoconstricción en la mayor parte de las redes vasculares e impide así la rápida absorción de la endotoxina, dando lugar a la necrosis.

Al aplicar pequeñas dosis de la mezcla de endotoxina y adrenalina se crea un estado no específico de tolerancia a los efectos patológicos de la endotoxina, como son pirogenicidad, postración, shock y la reacción de Swartzman, los cuales no se presentan si se repiten dosis de la mezcla en el mismo animal, debido a la acumulación local de leucocitos.

CAPITULO # 3

PREPARACION DE ANTIGENOS

Actualmente en todo el mundo la preparación de antígenos se realiza de acuerdo a métodos empíricos. (8)

No es aconsejable substituir un extracto de una fabricación con otro, sin que se lleve a cabo de nuevo una prueba cutánea para garantizar su actividad terapéutica. (23)

De la selección de los alérgenos dependen los resultados del tratamiento y la calidad alérgica.

En el caso de productos preparados con organismos vivos (parásitos, insectos, animales, bacterias, plantas), es necesario especificar la extracción, condiciones de vida y origen, edad, dieta y medio de cultivo.

En el polvo es necesario indicar claramente las condiciones en que se tomó y conservó.

EXTRACTOS ALERGENICOS TERAPEUTICOS: Actualmente los extractos se encuentran como:

1.- **EXTRACTOS ACUOSOS;** Se preparan con distintos productos como pólenes, derivados epidérmicos, hongos, polvo doméstico, veneno de insectos y alimentos. El material, antes de extraerse, generalmente se desengrasa con un disolvente orgánico (éster), se suspende a 40°C en un volumen determinado de suero salino fisiológico y se deja mezclar durante 4 o más horas. Seguidamente, esta mezcla se esteriliza mediante filtración en filtros de membrana. La metodología la detallaremos más adelante:

Antiguamente, los médicos confeccionaban sus propios extractos - pero hoy en día la mayoría adquiere productos concentrados (p.ej. diluciones al 1:10 ó al 1:20) de firmas comerciales y preparan diluciones estériles en la consulta. Los extractos acuosos se expenden en 4 formas: conservados en fenol, conservados en glicerina, liofilizados y conservados en fenol con albúmina sérica como estabilizante.

1.1 LOS EXTRACTOS CONSERVADOS EN FENOL son los más utilizados como productos terapéuticos. El fenol (0.2 - 0.5%) inhibe el crecimiento microbiano, pero los extractos pierden potencia más rápidamente que los glicerinados, especialmente con temperaturas de almacenamiento elevadas y diluciones débiles.

Tener presente el factor térmico es importante, ya que los médicos suelen tener sus extractos terapéuticos y para pruebas cutáneas a la temperatura ambiente durante muchas horas al día.

Los extractos deben mantenerse, siempre que sea posible, entre 2 y 8°C.

La dilución de las soluciones antigénicas acelera también la pérdida de potencia, y las preparaciones diluidas (más de 1:1000) para pruebas o tratamiento deben cambiarse por lo menos cada 2 - meses.

1.2 LOS EXTRACTOS GLICERINADOS (conservados con glicerina al 50% con o sin fenol) son mejores que los fenolizados en lo que se refiere a la pérdida de potencia alergénica. Se utilizan para pruebas epicutáneas (escarificación o punción), y si se diluyen a menos del 5%, pueden emplearse también para pruebas intradérmicas. Las concentraciones elevadas de glicerina aumentan la incidencia de molestias y reacciones locales.

1.3 LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS se fabrican mediante un proceso de congelación-dsecación, que da lugar a un material antigénico estable que retiene su potencia cuando se reconstituye.

Debido a su elevado precio, los extractos liofilizados se utilizan principalmente para prácticas de poco volumen y trabajos de investigación en exceso.

1.4 Como diluyente para los extractos de proteínas de veneno, se utiliza una solución de ALBUMINA SERICA humana normal al 0.03% - (0.9% de cloruro sódico y 0.4% de fenol), la albúmina sérica humana constituye un excelente estabilizador para los extractos alergénicos.

2.- PREPARACIONES PRECIPITADAS CON ALUMBRE son extractos acuosos absorbidos sobre hidróxido de aluminio, para retardar la liberación del antígeno y prolongar así el estímulo antigénico. Estos agentes se emplean exclusivamente para inmunoterapia, y no con fines diagnósticos.

Existen en el comercio extractos precipitados con alumbre (Center - AL) de gramíneas, árboles y malezas. Los estudios sobre la eficacia de esos extractos son incompletos, pero entre sus inconvenientes figuran los siguientes:

- Una mayor incidencia de reacciones locales y formación de nódulos (en comparación con los extractos acuosos).
- La posibilidad de que se produzcan reacciones sistémicas tardías por la liberación lenta del alérgeno.
- Imprecisión en la dosificación del alérgeno, cuando las suspensiones se mezclan insuficientemente.

3.- EXTRACTOS PRECIPITADOS EN ALUMBRE Y EXTRAIDOS CON PIRIDINA

(Allpyral)

Hacen uso de una base terciaria débil, la piridina, para extraer el polen no desengrasado antes de proceder a la precipitación con alumbre. En estudios con antígeno de ambrosía, el proceso de extracción con piridina parece alterar o destruir la alergenicidad del material, lo que produce niveles de anticuerpos bloqueantes y beneficios clínicos menores, pero también menos reacciones locales.

4.-LAS NUEVAS FORMAS DE EXTRACTOS para inmunoterapia, no disponibles en el comercio en el momento actual, pueden reducir las reacciones alérgicas frente a los extractos y mantener integra su potencia de inmunogenicidad. Entre esos productos, se encuentran los antígenos alérgoides, polimerizados y fotoinactivados.

4.1 Para producir los ANTIGENOS ALERGOIDES, se tratan con formol los extractos de polen. Cuando se combinan con lisina como adyuvante, producen mayores títulos de anticuerpos bloqueantes que los extractos totales de polen por sí solos, al aumentar la tolerancia a una mayor cantidad de proteína sin que se produzcan reacciones locales. La mejoría clínica obtenida con esos productos es equivalente a la que se obtiene con los extractos totales.

4.2 LA POLIMERIZACION del antígeno E o de extractos totales de polen de ambrosía y gramíneas con glutaraldehído produce una respuesta clínica favorable, y se precisan menos inyecciones que con los extractos acuosos.

4.3 LA FOTOINACTIVACION con luz ultravioleta permite administrar dosis mayores de antígenos con menos efectos adversos, sobre todo los extractos de polvo doméstico. (28)

Los procedimientos generales a seguir en la preparación de estos alérgenos son:

- 1) Reducir el tamaño de las partículas por trituración o disgregación.
- 2) Remover las grasas.
- 3) Extraer la fracción soluble.
- 4) Filtrar para eliminar las partículas grandes y clarificar el extracto.
- 5) Dializar para remover contaminantes, irritantes y material colorido.
- 6) Esterilizar, pasando a través de filtro bacteriológico.
- 7) Probar la esterilidad por cultivo.
- 8) Estandarizar.
- 9) Diluir los extractos, para usarlos en pruebas cutáneas y en tratamientos, para tener las concentraciones apropiadas en las soluciones inyectables.

1) REDUCCION EN TAMAÑO:

La extracción es más eficiente si el material que va a ser extraído es pulverizado y reducido a partículas lo más pequeñas posible, para presentar el número más grande de partículas al medio de extracción.

2) ELIMINACION DE GRASAS:

La proteína es la parte importante del material de extracción y debe estar libre de impurezas.

Los pólenes tienen una cantidad significativa de grasas que es in deseable para propósitos de pruebas cutáneas y terapia específica, por lo que debe ser removida por extracción.

Particularmente otros materiales alergénicos ambientales y alimen-
tos contienen también grasas; algunas frutas, vegetales y mohos -
son la excepción.

Para desengrasar se adicionan solventes orgánicos a la mezcla y -
los más usados son éter, formaldehído, tolueno y acetona. El éter
se considera el mejor desengrasante para los polenes, el formol -
para cabellos, polvo y mohos; el tolueno es satisfactorio para to-
dos los materiales excepto pólenes, carne y pescados.

El método de extracción más simple es cubrir el material que se -
va a desengrasar con el solvente y agitar, cambiando el solvente
a intervalos frecuentes. El material se expone al aire y se deja
secar.

3) EXTRACCION:

El propósito de la extracción es obtener la fracción alergénica -
soluble en agua del material.

Prácticamente ninguna solución fisiológica puede ser usada para -
la extracción. Las soluciones empleadas en E.U. y Gran Bretaña son
las siguientes: (6)

1.- Solución salina amortiguada (EVANS)

| | |
|-------------------------------------------|---------|
| - Cloruro de Sodio _____ | 5 g |
| - Fosfato monobásico de potasio _____ | 0.36 g |
| - Fenol _____ | 4 mL |
| - Fosfato dibásico de Sodio anhidro _____ | 1.43 g |
| - Agua destilada c.b.p. _____ | 1000 mL |

2.- Fluido de extracción alcalina (COCA)

| | |
|-------------------------------|---------|
| - Cloruro de Sodio _____ | 5 g |
| - Bicarbonato de Sodio _____ | 2.75 g |
| - Agua destilada c.b.p. _____ | 1000 mL |
| - Fenol _____ | 4 mL |

3.- Glicerosalina (Stier)

| | |
|-------------------------------|---------|
| - Glicerina _____ | 4.60 mL |
| - Cloruro de Sodio _____ | 40 g |
| - Agua destilada c.b.p. _____ | 1000 mL |

4.- Glicerosalina (COCA): Se trata de un fluido de extracción (2) alcalino con partes iguales de glicerina.

5.- Fluido de extracción con Dextrosa (Unger).

| | |
|-------------------------------|---------|
| - Dextrosa _____ | 45 g |
| - Bicarbonato de Sodio _____ | 2 g |
| - Fenol _____ | 5 mL |
| - Agua destilada c.b.p. _____ | 1000 mL |

6.- Solución amortiguadora de glicerol (Alles, Piness, Miller)

| | |
|--------------------------------|------------|
| - 1 parte de KH_2PO_4 _____ | 40.85 g/mL |
| - 4 partes de K_2HPO_4 _____ | 52.27 g/mL |
| - 5 partes de glicerina. | |

7.- Amortiguador de Formaldehído Sulfoxilato de Sodio. (Stauss , Spain).

| | |
|-------------------------------------------|----------|
| - Fosfato ácido de potasio _____ | 2.725 g |
| - Hidróxido de Sodio 1N _____ | 15.73 mL |
| - Formaldehído-Sulfoxilato de Sodio _____ | 10 mL |
| - Agua destilada c.b.p. _____ | 1000 mL |

El fenol se emplea como conservador, la consistencia del fluido no es el factor más importante; lo más importante es la calidad irritante o la falta de ésta en la última dilución, y la potencia que tenga el extracto.

La glicerina actúa como estabilizador y permite que el extracto mantenga su potencia por un período de tiempo considerable, algunas veces a lo largo de 7 a 10 años.

En el New York Graduate Allergy Lab., la Coca alcalina como fluido de extracción es usado para pólenes, hongos y polvo.

El amortiguador salino es usado para algunos alimentos y pelos de animales; el fluido de Formaldehído-Sulfoxilato de Sodio se usa en diferentes alimentos y tabaco, y el líquido de Stier para alimentos.

De acuerdo con Vaughan, el uso apropiado de el extracto está resumido a continuación:

- 1) Para vía intracutánea la sol. de Evans es un buen diluyente - glicerinado de extracción.
- 2) Para pruebas intradérmicas con pólenes y polvo, la Sol. de Evans también es buen diluyente.
- 3) Para pruebas de escarificación, los extractos glicerinados son los mejores.

El proceso de extracción es un simple acarreo de partículas por agitación del material a ser extraído en el líquido de extracción, por varios días; una vez obtenida la mezcla, agitar mecánicamente hasta que la mezcla tenga color. Es preferible llevar a cabo la extracción con el fluido dentro del refrigerador durante el tiempo indicado, o en un cuarto frío.

CLARIFICACION:

Este proceso tiene por objeto eliminar partículas grandes. La clarificación se lleva a cabo, con papel filtro o algodón, varias veces si es necesario. El filtrado es un líquido relativamente libre de material particulado. Cuando el material es gelatinoso se le adiciona algún "ayuda filtro", como tierra de diatomácea, que ayuda al proceso y a la clarificación del material.

DIALISIS:

El líquido obtenido es coloreado y quizá contenga sustancias irritantes. El extracto alergénico puede aclararse por diálisis, para lo cual se coloca el extracto en un tubo de diálisis, y éste se introduce en agua o solución amortiguadora.

Las partículas que contienen el material alergénico se mantienen en el tubo y salen las moléculas como el material coloreado y los electrolitos. Se cambia el líquido dializante hasta que no tenga color.

CONCENTRACION:

Se puede concentrar por simple pervaporación el extracto alérgico dentro de la bolsa de celofán, para lo cual se expone al aire hasta el volumen deseado (en frío de preferencia).

ESTERILIZACION:

Si el principio activo alergénico es termolábil, la esterilización se hace por medio de placas o membranas filtrantes capaces de retener gérmenes contaminantes y el líquido filtrado se recibe en un matraz estéril.

PRUEBAS DE ESTERILIDAD:

El objetivo es probar que no existan microorganismos aerobios ni anaerobios en el material alergénico filtrado bacteriológicamente. Se emplea medio de tioglicolato con 1% de agar. Se siembra e incuba durante siete días a 37°C, y si hay crecimiento se debe volver a filtrar. Para control de contaminantes por hongos se utiliza el medio líquido de Sabouraud. (6)

CAPITULO # 4

4.1 MATERIAL Y REACTIVOS

- Medios de cultivo específicos para enterobacterias.
- Acido tricloroacético al 0.1%
- Solución de Evans.
- Adrenalina al 0.1 %
- Peróxido de hidrógeno al 2%
- Reactivo de Limulus
- Solución Salina Isotónica.
- Polvo casero de diferentes regiones de la República.

- Material para pruebas de rutina del laboratorio de Inmunología y bacteriología.
- Conejos de 1.5 kg de peso, de raza Nueva Zelanda.

4.2 METODOLOGIA

PREPARACION DEL ALERGENO DE POLVO CASERO:

La preparación del alérgeno de polvo casero tuvo por objeto hacer un concentrado de este extracto, para ser empleado en las pruebas de endotoxinas y en la detoxificación por oxidación.

Se utilizó el procedimiento de preparación del Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Gral. de México, SSA (24).

Preparación de Solución de Evans (modificada):

| | |
|-----------------------------------------|---------|
| NaCl _____ | 5 g |
| Fosfato monobásico de potasio _____ | 0.36 g |
| Fosfato dibásico de sodio anhidro _____ | 7 g |
| Fenol _____ | 4 g |
| Agua destilada c.b.p. _____ | 1000 mL |

En todo el estudio el Evans se preparó sin fenol para evitar irritación en la piel de los animales.

Una vez preparada esta solución se suspendieron 100 g de polvo casero en 100 mL de la misma.

Se agitó durante 6 horas, se centrifugó a 1 500 rpm. durante 5 min. y el sobrenadante se puso a dializar contra agua destilada, para eliminar el exceso de sales.

Posteriormente se concentró hasta 1/4 del volumen original.

Se centrifugó 60 min. a 3 000 rpm., se filtró a esterilidad con membrana de 0.22 micrómetros, se distribuyó en frascos estériles y se conservó en refrigeración.

IDENTIFICACION DE BACTERIAS VIVAS EN EL POLVO CASERO.

El polvo casero en estudio puede contener bacterias, ya sean vivas o muertas.

La identificación de las bacterias es muy importante para poder relacionar la presencia de ellas con el tamaño de la zona de necrosis en los conejos.

Para la identificación de las bacterias se prepararon los siguientes medios de cultivo:

- Agar Salmonella - Shigella (SS)
- Agar Eosina¹ azul de metileno (EAM)
- Agar Verde-Brillante (v/B)

Se hizo una suspensión del polvo casero (1g de polvo en 2 mL de solución salina isotónica) y se inoculó 0.2 mL de la misma en cada caja Petri con los medios mencionados; a las 24 hrs. se obtuvo crecimiento y se hizo tinción de Gram de material obtenido de algunas colonias a fin de contar con una base para realizar las pruebas bioquímicas. Por medio de estas pruebas pudimos identificar colonias de E. coli y de Klebsiella pneumoniae.

PREPARACION DE ANTIGENOS TIPO BOIVIN:

Los antígenos Boivin son complejos de proteínas- lípidos-lipopoli-
sacáridos. Estas sustancias pueden ser aisladas de varias bacterias
por extracción con ácido tricloroacético, dietilenglicol o por di-
gestión triptica.

METODO DE PREPARACION:

1) Se pesaron 2 gramos de polvo casero proporcionado por los paci-
entes de:

- | | |
|------------|-------------------------------------------------------|
| - Hidalgo | - Bajío |
| - Jalisco | - D.F. |
| - La Paz | - Sur |
| - Pacífico | - Mezcla de todos los ante- - Centro Norte riores. |

El polvo debe ser recolectado de la siguiente manera:

Se le indica al paciente que no sacuda, ni aspire su casa por lo
menos durante una semana o 15 días. Pasado este tiempo se debe re-
coger el polvo de los muebles, colchones y alfombras, de preferen-
cia con aspiradora y depositarlo en una bolsa de papel, no debe -
usarse en este tiempo insecticidas y procurar recoger el polvo de
lugares en donde no haya mucho sol.

2) Se suspendió cada muestra en agua destilada fría, en un volu -
men de 5 veces su peso seco, y se dejó a -20°C por 3 Hrs. con un
volumen igual de ácido tricloroacético frío al 0.1%.

3) Se agitó durante 24 hrs en un agitador tipo "Shaker" y luego se
centrifugó por 60 min. a 4 000 rpm.

- 4) Se dializó contra agua destilada en frío durante una semana.
- 5) Se concentró hasta la mitad del volumen original, por perva_ poración en frío.
- 6) Finalmente se probó en conejos aplicando 0.1 mL del antígeno tipo Boivin con 0.1 mL de adrenalina al 1%, por vía intradér_ mica. (12)

OBTENCION DE TOXINA PURA COMO CONTROL POSITIVO:

En este trabajo se empleó una cepa de Salmonella paratyphi B.
El primer paso fué verificar la pureza de la cepa y una vez comprobado que se trataba de una cepa pura se prosiguió a la extracción de la endotoxina.

- a) Se recogió el crecimiento de las cajas Petri con solución salina isotónica, y se depositó en un tubo estéril.
- b) La extracción de la endotoxina se llevó a cabo por el método - tipo Boivin ya mencionado.
- c) Después de centrifugar a 4 000 rpm. durante 1 hora, el procedimiento fue igual al mencionado anteriormente (puntos del 4 al 6).

PRUEBA DE LIMULUS

Esta prueba está destinada a determinar la presencia de sustancias pirogénicas en un material inyectable y/o de sus materias primas, por comparación con las pruebas in vivo sobre el conejo.

Se empleó esta técnica porque permite conocer con gran sensibilidad, rapidez de ejecución y facilidad de aplicación, la presencia de pirógenos en nuestra muestra de prueba.

FUNDAMENTO:

El principio del método se basa en la formación, a un tiempo determinado, de un gel o coágulo, señalando la presencia de pirógenos en el momento en que 0.1 mL del reactivo de Limulus es puesto en presencia de 0.1 mL del producto en ensaye, mientras la mezcla es mantenida a 37°C.

La sensibilidad es 15 a 20 veces mayor que la de la prueba en el conejo.

TECNICA:

Preparación del reactivo (Prueba de Limulus para pirógenos, Rontí de México, S.A.).

- 1.2 mL de agua para inyectables estéril y apirogénica, se agrega el reactivo liofilizado. Agitar suavemente para evitar la formación de espuma. Conservar entre +4 y +8°C.
- Repartir asépticamente el reactivo a razón de 0.1 mL en tubos con tapa y despirogenados, cuyo diámetro no debe pasar de 7.5mm.

- Ponerlos en baño maría a 37°C.

PREPARACION DE LA MUESTRA A ENSAYAR:

- Ajustar el pH entre 6 y 7, asépticamente, utilizando ácido clorhídrico 0.1 N o bien con Na OH 0.1N preparados con agua estéril y apirogénica.

PREPARACION DE LA SOLUCION TESTIGO POSITIVA:

- Solución de endotoxina a la concentración de 5 ng/mL.

Tiene por objeto verificar la ausencia de poder inhibidor de la solución a ensayar.

ENSAYOS PRELIMINARES:

Tubo 1 Testigo negativo que contiene 0.1 mL de reactivo y 0.1 mL de agua para inyectables.

Tubo 2 Testigo positivo que contiene 0.1 mL de la dilución de endotoxina y 0.1 mL de agua para inyectables, estéril y apirogénica.

Tubo 3 Testigo de prueba de inhibición y endotoxina de referencia diluida en la solución a ensayar 0.1 mL + 0.1 mL del reactivo.

La lectura se efectúa al cabo de 15 minutos de incubación a 37°C.

LA PRUEBA PROPIAMENTE DICHA:

- A 0.1 mL de reactivo de Limulus, agregar 0.1 mL de la solución a ensayar. Los tubos son observados al cabo de 15 a 20 min. de incubación a 37°C.

- Gel firme _____ prueba positiva

- Ausencia del Gel _____ prueba negativa

(11).

Los resultados obtenidos en las muestras probadas fueron :

POLVO CASERO

RESULTADOS

| | |
|----------------------------------------------------|-------------|
| - Sur | - Gel firme |
| - Bajío | - Gel firme |
| - D.F. | - Gel firme |
| - Hidalgo | - Gel firme |
| - Pacífico | - Gel firme |
| - La Paz | - Gel firme |
| - Centro Norte | - Gel firme |
| - Jalisco | - Gel firme |
| - Polvo casero conc. sin detoxificar (mezcla) | - Gel firme |
| - Polvo conc. detoxificado (mezcla) | - Gel firme |

METODO DE INOCULACION EN CONEJOS

Para poder realizar este trabajo se necesitaron conejos de aproximadamente 1.5 kg. Se debe tener la plena seguridad de que los animales estuvieron en cuarentena y que no tienen ningún padecimiento. El procedimiento utilizado fué el siguiente:

- Rasurar el conejo de los costados, mojando el pelo con detergente y agua.
- Limpiar perfectamente bien la zona de inoculación.
- Cuando estén limpios ambos costados, se aplica cada una de las muestras a probar, con un espacio de 2 cm. entre cada inyección.
- Emplear jeringas de tuberculina o insulina estériles y nuevas, con aguja de 25 por 16 mm.
- Cargar la jeringa con 1/10 mL del extracto y 1/10 mL de adrenalina.
- Colocar un control positivo que será un extracto de Salmonella paratiphy B (endotoxina pura).
- Colocar un control negativo de Evans y adrenalina.
- Leer las reacciones a las 24, 48 y 72 hrs., y anotar resultados.

METODO DE DETOXIFICACION

El primer método empleado fue el que probaron Dean y Adamson en 1916 quienes experimentaron la detoxificación del bacilo disenterico por oxidación con peróxido de hidrógeno al 2%, encontrando que la propiedad protectora del antígeno fue conservada, en tanto que un 90% de la toxicidad se eliminó.

Los extractos se someten a la oxidación con peróxido de hidrógeno al 2% durante 24 hrs. a temperatura ambiente.

La relación de extracto y peróxido es 1:1

Este método no dió los resultados esperados puesto que el conejo presentó necrosis en menor grado, pero tuvo reacciones secundarias de edema e inflamación de la zona en donde se probó el extracto. Debido a ésto se buscó un nuevo método de oxidación, empleando una oxidación directa con oxígeno burbujeado. (14)

- El extracto concentrado se oxidó, burbujeando oxígeno del empleado en los enfermos, durante 1 hr.
- Todo debe realizarse estérilmente y el extracto obtenido debe - conservarse en refrigeración.

Los resultados obtenidos con este método fueron excelentes, los - conejos no presentaron necrosis ni reacciones secundarias. Se probó en un conejo sensibilizado al polvo casero y mantuvo su anti - genicidad.

4.2 TABLA DE RESULTADOS

| POLVO CASERO | PRESENCIA DE BACTERIAS. Klebsiella-pneumoniae y E. Coli | INOCULACION EN CONEJOS CON: ANTIGENO BOI - VIN + ADRENALINA. | PRUEBA DE LIMULUS | INOCULACION EN CONEJOS DE ANTI GENO + ADRENALINA | |
|--------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|
| | | | | OSIDACION | |
| | | | | H ₂ O ₂ | O ₂ BURBUJEADO |
| Sur | + | NECROSIS | GEL FIRME | NECROSIS | - |
| Bajío | + | NECROSIS | GEL FIRME | NECROSIS | - |
| D.F | + | NECROSIS | GEL FIRME | NECROSIS | - |
| Hidalgo | + | NECROSIS | GEL FIRME | NECROSIS | - |
| La Paz | + | NECROSIS | GEL FIRME | NECROSIS | - |
| CENTRO Nte. | + | NECROSIS | GEL FIRME | NECROSIS | - |
| Jalisco | + | NECROSIS | GEL FIRME | NECROSIS | - |
| Mezcla Concentrada | + | NECROSIS | GEL FIRME | NECROSIS | - |

4.3 RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En primer lugar, se comprobó la presencia de bacterias vivas: esto es importante para poder correlacionar la necrosis producida con la cantidad de bacterias muertas por desecación y por las condiciones ambientales de cada lugar y debe ser proporcional la cantidad de bacterias y la necrosis producida al extraerles sus endotoxinas.

La extracción de las endotoxinas se hizo por el método de Boivin, y se demostró la presencia de ellas por medio de la inoculación en conejos, administrando adrenalina y endotoxina; un resultado positivo era la necrosis producida en el piel de los conejos. Los resultados fueron excelentes y se muestran a continuación.

La fotografía No. 1

muestra la necrosis producida por el testigo positivo.

- Se empleo como testigo positivo, endotoxina pura de :
Salmonella paratiphy B.
- La necrosis es bastante aparente y se presentó a las 48 hrs.

FOTOGRAFIA No. 1



La fotografía No. 2 muestra la necrosis producida por los extractos de cada uno de los siguientes polvos; a las 48 hrs:

- Polvo casero del centro-norte; la necrosis se presentó claramente hasta las 72 hrs. en la fotografía se puede ver que es menor que otras a las 48 hrs.
- Polvo casero del D.F; presenta zona de una necrosis muy grande y además se presentó desde las 24 hrs.
- Polvo casero del Bajío: la necrosis fué menor que la del centro - norte.

- Polvo casero del Sur: la necrosis fué aparente hasta las 72 hrs.
- Polvo concentrado detoxificado por oxidación con peróxido de hidrógeno al 2%: La necrosis fué mucho mayor que en cualquiera de las otras muestras probadas; se trataba de una mezcla de todos los polvos caseros de las diferentes regiones de la República y como podemos ver la detoxificación por este método no fué la adecuada.
- El control negativo de adrenalina no presentó necrosis.

FOTOGRAFIA No. 2

La fotografia No. 3 presenta la necrosis producida por los extrac
tos de polvo casero de:

- Jalisco: la necrosis producida fue bastante aparente y se presen
tó también desde las 24 hrs.
- Mezcla de polvos y extractos concentrados: la zona de necrosis-
fué muy grande y se presentó también desde las 24 hrs.
- Hidalgo: la necrosis producida por el polvo casero de Hidalgo -
fué la menor.
- Pacífico: la necrosis es aparente y se presentó desde las 24 hrs.
- La Paz: también el polvo casero de La Paz produjo necrosis, aun
que de menor tamaño que la de Jalisco y la mezcla de polvos.

FOTOGRAFIA No. 3



Una manera de corroborar que en realidad el alergeno del polvo ca sero contenía endotoxinas que al ser aplicadas con adrenalina producían necrosis, fue aplicar un alergeno, en este caso de fresno con 1/10 mL de adrenalina, y los resultados fueron los esperados, no hubo necrosis, se observó durante 72 hrs. y los resultados - fueron negativos.

La fotografía No. 4 muestra la ausencia de necrosis.

FOTOGRAFIA No. 4



El segundo paso a seguir fué comprobar por medio de la prueba de Limulus que se trataba realmente de endotoxinas; esta prueba es específica y muy sensible para detectar pirógenos en inyectables. Todas las muestras probadas fueron positivas, aún la del polvo casero que había sido previamente detoxificado por oxidación con peróxido de hidrógeno al 2%. En un principio se pensó que se trataba de una reacción falsa positiva, debido a que esta prueba es muy sensible y todo el material que se use debe estar libre de pirógenos, aún el agua para la preparación de los extractos; en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hosp. Gral. de México SSA. en la preparación de los alérgenos se utiliza agua destilada y el material se esteriliza en autoclave pero no es tratado con agua apirogénica.

Por lo tanto se volvió a aplicar en los conejos cada uno de los extractos de polvo casero y la necrosis fué aparente en todos a las 24 hrs. El conejo que se utilizó para esta prueba era hembra y estaba preñada; gracias a que la endotoxina se localiza en un solo lugar con la adrenalina, el animal no presentó ningún efecto por la endotoxina.

Comprobado ya por medio de los antígenos tipo Boivin y por la prueba de Limulus que los alérgenos de polvo casero contienen endotoxinas capaces de producir necrosis, se prosiguió con la detoxificación.

El primer método de detoxificación empleado fué aplicado en una proporción 1:1 peróxido de hidrógeno al 2%, los resultados no fueron los esperados como ya se dijo: en la fotografía No. 2 se puede notar la necrosis que se produjo al ser aplicado con adrenalina.

Hubo una reacción secundaria a los 3 días, de edema e inflamación, provocadas quizá por el tratamiento dado al peróxido comercial que puede contener componentes irritantes.

Se pensó en otro método rápido y que fuera 100% efectivo, pues - nuestro objetivo principal era eliminar la capacidad toxigénica de la endotoxina, manteniendo su capacidad antigénica que es indispensable en el alérgeno, debido a que la endotoxina es uno de los - principales causantes del proceso alérgico de los pacientes sensibilizados al polvo casero.

El segundo método empleado fué una oxidación directa del alérgeno, para lo cual utilizó oxígeno para burbujear directamente el alérgeno durante media hora, y al ser probado el alérgeno en el conejo disminuyó la necrosis pero aún aparecía.

La fotografía No. 5 muestra los resultados.



Se volvió a oxidar el alérgeno de la misma manera pero durante una hora y los resultados fueron excelentes; el conejo no presentó necrosis y no hubo reacciones secundarias. Se observó el animal durante una semana.

Ahora se debía comprobar que en realidad el alérgeno perdía la capacidad toxigénica pero mantenía su antigenicidad; para ello se utilizó un conejo que había sido previamente sensibilizado al polvo casero, se probó que tuviera 3 cruces de reacción con el alérgeno empleado actualmente en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hosp. Gral. de México SSA. , y se aplicó el nuevo alérgeno oxidado. Los resultados fueron favorables pues el animal presentó la misma intensidad de reacción con ambos alérgenos.

De esta manera el objetivo del trabajo se llevó a cabo obteniendo un alérgeno de mejor calidad y que conserva sus características antigénicas, lo cual es muy importante para los pacientes puesto que se evitan reacciones secundarias, causadas por las toxinas que puedan de alguna manera causarle complicaciones, como un aumento de la temperatura, que como ya se dijo en algunos pacientes puede pasar desapercibida pero en ocasiones da lugar a una sintomatología de mayor severidad. Es de vital importancia que cualquier preparación para uso humano tenga un estricto control de calidad, para evitarle a los pacientes trastornos secundarios a la aplicación del producto. Es importante hacer notar que todo el material empleado debe ser lavado y esterilizado correctamente (Anexo 1), y se debe indicar al paciente de una manera clara y sencilla, como debe ser aplicada su vacuna y la forma de mantenerla en condiciones adecuadas de temperatura.

El empleo de los alergenos en las vacunas no elimina el pedecimiento, pero de alguna manera, si es empleado adecuadamente, disminuye la sintomatología y el paciente puede controlar su proceso alérgico por mucho tiempo.

ANEXO 1

USO ADECUADO DEL MATERIAL DE LABORATORIO:

En la práctica de alergia es muy importante la limpieza y esterilidad. Se debe tener un cuidado apropiado de viales y jeringas, no solo para prevenir enfermedades transmisibles, sino también para evitar la administración de un antígeno equivocado al paciente, lo cual es posible cuando se usaron jeringas previamente, no se procedió apropiadamente y tienen restos de otro antígeno.

Cuidado de la Cristalería:

- 1) Remojar y remover tapones. Los tapones se manejan por separado.
- 2) Hervir los viales en solución detergente (por ejemplo Extran) por 3 minutos o remojar toda la noche y enjuagar bien en agua.
- 3) Enjuagar bien en ácido clorhídrico diluido (10 mL de ácido clorhídrico en 4 litros de agua) llenando cada uno de los viales.

El objeto de este procedimiento es neutralizar la alcalinidad residual de algunos detergentes, pero no todos los detergentes lo necesitan.

- 4) Enjuagar muy bien con agua corriente y finalmente con agua destilada .
- 5) Extender los viales en toalla o en estante, permitiendo el secado durante toda la noche, o secar en horno.
- 6) Esterilizar en autoclave a 15 lb por 15 min. (1.1 hg/cm^2), o en horno de aire seco a 160°C por 2 horas.

LAVADO DE JERINGAS:

El simple lavado con detergente no necesariamente remueve el material antigénico, por lo que se requiere un enjuague escrupuloso para removerlo:

LAVADO DE JERINGAS:

- 1) Introducir las en detergente diluido apropiadamente.
- 2) Enjuagar bien a chorro de agua.
- 3) Enjuagar bien en agua destilada.
- 4) Llenar la jeringa y remojar toda la noche.
- 5) Enjuagar una vez más con agua destilada y esterilizar en autoclave por 15 min. a 15 lb (1.1 kg/cm²) de presión.

CUIDADO DE AGUJAS:

Es muy importante que las agujas estén bien afiladas; para pruebas intradérmicas esto es de vital importancia, si la prueba ha de ser realizada correctamente.

Se puede verificar que la aguja esté afilada pasándola por algodón y observando la punta con un lente de aumento. Es recomendable utilizar agujas desechables calibre 27 (de insulina). El lavado de agujas desechables consiste en introducir las en una solución de detergente y posteriormente enjuagar con abundante agua destilada. La esterilización se realiza a 15 lb (1.1 kg/cm²).

CUIDADO DE TAPONES DE HULE:

- 1) Restregar los tapones o capuchones hasta remover cualquier partícula.

- 2) Remojar toda la noche en solución detergente.
- 3) Lavar 3 veces a chorro de agua.
- 4) Enjuagar con agua destilada.
- 5) Secar por toda la noche.
- 6) Esterilizar en autoclave a 15 lb (1.1 kg/cm²) por 15 min.

ESTERILIZACION:

El propósito de la esterilización es destruir virus, hongos y bacterias tanto en su forma esporulada como no esporulada. El uso de germicidas químicos tales como alcohol, fenol, sales cuaternarias de amonio y agentes similares más bien resulta adecuado para desinfección. El método más adecuado es por calor. El calor destruye a la bacteria en el lugar donde se encuentra, al igual que sustancias tóxicas y enzimas. Algunas bacterias son más difíciles de destruir que otras; por ejemplo las formas esporuladas que son resistentes al calor. Por lo tanto, un factor importante en la esterilización por calor es el tiempo de exposición y los grados de temperatura necesarios .

Puede emplearse:

a) ebullición, b) aceite caliente, c) presión de vapor y c) calor seco, con el uso de horno, es un método efectivo de esterilización para instrumentos cortantes, aceites, ceras, polvos y diversos materiales que resisten temperaturas de 160 a 180 °C.

El material utilizado en pruebas de alergia es habitualmente esterilizado en autoclave.

ESTERILIZACION MECANICA (FILTRACION BACTERIANA):

Se emplea cuando el material a esterilizar es fluido y puede ser destruido por el calor; es particularmente importante para extractos alergénicos cuando la porción antigénica de éstos sea termolábil.

El filtro más empleado por largo tiempo es el Seitz, cuyas placas están formadas por fibras de asbesto y celulosa, pero en los últimos años se ha generalizado el uso de filtros de membrana por tener algunas ventajas.

Es conveniente filtrar a presión para evitar la desnaturalización de proteínas del extracto, lo cual puede ocurrir si se filtra al vacío. (6)

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson, Mc,y Baer, H. (1982) " Antigenic and Allergenic Chan
ges during storage of a pollen extract" J. Allergy. Clin.Immu
nol. 69 , p. 3
- 2.- Ayuso, R., Rubio, Herrera T. (1984) " Stability of Lolium pere
ne Extracts" Annals of Allergy 53
- 3.- Berrens L., Van Dijk A. (1974) " Phisicochemical and Immunoche
mical quantitation of house dust allergens" Intern WHC-IABS
Symp. on Standarization and control of Allergens " 29 Genova.
- 4.- Boatner, C.H., et.al. (1941)" Studies whith Antigens" J. Aller
gy, 12 p. 176.
- 5.- Cooke, R. (1947) Allergy in Theory and Practice, Philadelphia
p. 131.
- 6.- Coleman, M., Harris, M, D. and Shure (1969) T.A. Davis Comp.-
Philadelphia p. 361.
- 7.- Davis, Dulbecco, et. al. (1980) Tratado de Microbiología 2ª Ed.
Salvat Editores S.A. España.
- 8.- Desbordes, Jr. (1974) " Develop Biol. Standardization" Interna
tional WHO-IABS Symp. on Standardization and control of aller
gens administered to man. 29 p. 267.
- 9.- Frandkin, V.A. (1980) Alergenos Ed. Mir. URSS. p. 131
- 10.-Fudenberg, H.H. (1980) Manual de Immunología Clinica. 5ª Ed.
Al Manual Moderno, S.A. México p. 2,32,279,300,561,801,563,-
564,259 y 521.
- 11.-Fusseilier, F. (1983) " La prueba de Limulus para pirógenos "
Ronti de México, S.A. 12 p. 411.

- 12.- Gwapenski, J.B., M.D., D.M., et. al. (1972) " Methodology of Immunochemical and Immunological. research" Weley Interscience. p. 74.
- 13.- Hansen, K., Werner, M. (1970) Alergia Clinica, Salvat Editores España. p. 155 y 588.
- 14.- Kadis, Solomon, Weibaum, George, et. al. (1971) " Microbial Toxins a Comprehensive Treatise" Academic Press V p. 104.
- 15.- Kjell, A.S.S. (1976) " Perspectives in allergen standardization Suggested starting requirements" Excerpta Médica International Congress Series. Buenos Aires.
- 16.- Kwong, Frank, K., M.D. (1981) " Allergen Extracts and Purified Allergen in Immunotherapy " Annals of Allergy 47.
- 17.- Landy and Braun (1964) Bacterial Endotoxins. Quinn and Boden Company, Inc., New Jersey. p. 458.
- 18.- Middleton, E., Jr., Reed, C. (1983) Allergy Principles and Practice . 2ª Ed. St. Louis. p. 258.
- 19.- Norman, P.S., and Lichtenstein, L.M. (1978) " The Clinical and Immunologic Specificity of Immunotherapy" J. Allergy - Clin. Immunol.
- 20.- Pardo, G.E. (1970) Farmacología terapéutica. La Prensa Médica Mexicana 2ª Ed. México p. 456.
- 21.- Paterson, R., Wicklung P., et. al. (1964) " Endotoxin Activity of a house Dust Extract " J. Allergy . p. 134.
- 22.- Prince, H. E., Meyer, G.H. (1977) " Stability of Lyophilized Alternaria y Hormodendrum conc." Annals Allergy 20.

- 23.- Relyveld, E.H., Henocq, E. (1980) " Analysis and Standardization of Allergen Extracts Intended for Therapeutic Use " - Allergy p. 218.
- 24.- Salazar Mallén, M. (1958) La Alergia en la teoría y en la Práctica, Méndez Oteo. México p.196 y 588.
- 25.- Smith Conant, Overman, Beard, et. al. (1963) Microbiología de Zinsser . 3ª Ed. UTHEA p.p. 352 y 865.
- 26.- Springer-Velarg (1972) Celular Antigens . Ed. Alois Nowotny. Philadelphia. p. 320.
- 27.- Sutherland, C. H. (1942) " The preparation of house dust Extracts" Brit. Med. Journal. 2 p. 280.
- 28.- Thomas J. Fischer, M.D., et. al. (1985) Manual de Alergia e Inmunología Diagnóstico y tratamiento. Salvat Editores S.A. Barcelona p.88
- 29.- Thomas, L. (1956) " El efecto de la epinefrina en las reacciones producidas por endotoxinas de bacterias Gram-negativas " Journal Exp. Med. 104 p. 865.
- 30.- Tuft, Louis, M. D., Harry Louis Mueller (1971) Alergia en el niño. Editorial Pediátrica. Barcelona p. 154.
- 31.- Versie, R., Brocteur, J. (1967) " Identification de Proteinas humaines dans des extraits allergeniques de Poussieres maison" Acta Allergy. p. 11
- 32.- Yunginger, J.W. (1984) " Estandarization of Allergens" Journal Allergy Clin. Immunol. 73.