

14
2 Eje



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

ESTUDIO EN CONEJOS DE ALGUNOS EFECTOS BIOLÓGICOS PRODUCIDOS POR ENZIMAS PROTEOLÍTICAS CONTENIDAS EN DETERGENTES

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
Presenta:
ALEJANDRO GARCÍA RUBIO

Directora de la Tesis:
Q.F.I. GILDA FLORES ROSALES



Cuautitlán, Edo. de México

1984

V N A M



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

I N D I C E

I.	INTRODUCCION	1
II.	GENERALIDADES	6
III.	OBJETIVOS	21
IV.	MATERIALES Y METODOS	23
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	37
VI.	CONCLUSIONES	62
VII.	APENDICE	65
VIII.	RESUMEN	69
IX.	BIBLIOGRAFIA	72

I N T R O D U C C I O N

I

I. INTRODUCCION

Desde la concepción teórica de los detergentes sintéticos en 1933 hasta la fecha, ha habido un gran progreso en el desarrollo de productos para lavar; diferentes y "mejores" que el jabón. Uno de los eventos más importantes en tecnología de los detergentes para lavar ropa, se introdujo a nivel de prueba en 1967, incorporando al detergente - cantidades pequeñas de enzimas proteolíticas y amilolíticas (18,31).

Las enzimas en los detergentes sirven como catalizadores en el proceso de rompimiento de las moléculas de proteínas y carbohidratos que se adhieren a la tela llamadas comúnmente "mugre". Las moléculas de "mugre", una vez fragmentadas, son más fácilmente eliminadas durante el enjuague de la ropa; esto aumenta la eficiencia de las formulaciones de detergente para lavar ropa (31).

Asociados con la producción de detergentes con enzimas aparecieron dos aspectos de medicina ocupacional. El primero es una dermatitis irritante primaria, asociado por el contacto excesivo con el concentrado de enzimas y el segundo, es una obstrucción aguda de las vías respiratorias debido a la inhalación de polvo de enzimas en altas concentraciones (14,16). Estas afecciones han sido reportadas únicamente en el personal de la industria manufacturera de los detergentes; la seguridad para el consumidor en el manejo de los detergentes biológicos

ha sido confirmada y previamente reportada (6,13,21).

Desde entonces, con la adición de enzimas al polvo de lavandería en el hogar en 1967, ha habido un incremento de interés en la posibilidad de reacciones alérgicas que ocurran a los consumidores; más importante - todavía ha sido lo concerniente a reportes de casos de asma y bronquitis en trabajadores, quienes han estado expuestos a la enzima en la producción de estos productos de lavado (22,11).

En 1969, los investigadores Flind y Pepis de Inglaterra fueron los primeros en reportar el peligro potencial que existe durante la fabricación de detergentes con enzimas. El resultado de algunos estudios fué que los detergentes con enzimas a diferencia de las enzimas solas, pueden producir alergia respiratoria (asma) en un porcentaje de la población de la fábrica y que este porcentaje aumenta con el tiempo de exposición (31,11,27).

No existe ningún riesgo para la salud del consumidor, debido a que tanto la máxima concentración posible como el tiempo de exposición están muy por debajo de los máximos aceptables (29,16). Aún así, se han reportado casos en amas de casa que han sido susceptibles a una irritación en las palmas de las manos, mediada por ardor y prurito, al estar en contacto con los detergentes, aunque las enzimas se encuentren en mínimas concentraciones (9). (Fig. 1).

Esta fué una buena razón para que los gobiernos de algunos países hayan hecho prohibitiva la fabricación de este tipo de detergentes, para así eliminar por completo cualquier supuesto caso de irritación hacia el consumidor, aunque éstas hayan sido en una población extremadamente pequeña.

Hoy en día se cuenta con un amplio conocimiento acerca del riesgo que pueden tener los trabajadores en las fábricas de detergentes con enzimas. Algunos países, no así México, tienen cierta información acerca de los posibles daños ocurridos al consumidor durante el uso de estos productos de lavado.

IRRITACION EN PIEL



FIGURA No. 1.

Fotografía tomada a una ama de casa después de haber estado en con
tacto con el detergente.

GENERALIDADES

II. GENERALIDADES

A. PRODUCCION Y CONTROL DE POLVO.

El proceso que se sigue para la manufactura de la enzima proteolítica es mediante una fermentación utilizando especies seleccionadas de bacilos no patógenos (*Bacillus subtilis*) (19).

Los estándares microbiológicos y los controles de calidad aseguran que no existe contaminación alguna con otros microorganismos, esporas, en dotoxinas, micotoxinas o antibióticos. Desde sus orígenes, el producto terminado no contiene más de 50 esporas por gramo (6,13). Esta cantidad de microorganismos es menor a la que contienen muchos alimentos secos y aún no excede el estándar recomendado para cosméticos (10).

Los pasos de la purificación de la enzima requieren un control de calidad muy cuidadoso. Esto se logra por medio de un proceso de manufactura en serie. Después de la purificación (eliminación de microorganismos) se produce un polvo de enzima concentrado por medio de precipitación, filtración y secado (13).

Para asegurarse de que el ambiente esté limpio, el polvo se trabaja en un sistema cerrado. En la industria de los detergentes se presta mucha atención a los detalles de ingeniería en donde pueden ocurrir los derrames o los escapes de polvo (13).

En la manufactura del detergente, la enzima que es sensible al calor, tiene que incorporarse al detergente base después de que éste se fabrica en una torre de secado a altas temperaturas (22). Después de la adición de las enzimas y otras materias químicas, el producto se mezcla y se coloca dentro de grandes bolsas, para luego ser vaciadas a las tolvas dosificadoras dentro del departamento de empaque.

Anteriormente ésta era un área donde se trabajaba con mano de obra intensiva y las exposiciones de los trabajadores ocurrían fácilmente; actualmente se tiene un gran control con el fin de reducir estas exposiciones. La polvosidad del producto se ha disminuído al encapsular las enzimas; hoy en día las compañías fabricantes de enzimas han realizado grandes progresos al formar "marumes" o "prills". Estas son microesferas que contienen las enzimas encapsuladas en una matriz no polvosa. La "prill" se produce mezclando la enzima con un material orgánico no iónico y aspersándolo en una tolva de enfriado donde las gotas se enfrían para formar pequeñas esferas sólidas, bien formadas y no polvosas (17).

Desde la adición de las enzimas a los detergentes, muchas industrias han introducido el control de polvo en sus fábricas, sin embargo, estos sistemas han resultado insuficientes para controlar el polvo de los detergentes con enzimas. Es por esto que aparecieron problemas alérgicos en el personal, poco tiempo después de haberse iniciado su fabricación (29).

Por lo anterior, las industrias han tomado una serie de medidas técnicas para controlar el nivel de polvosidad en sus plantas (29). Dentro de éstas cabe citar las siguientes:

1. Medidas técnicas: Diseño de equipos más eficientes, para controlar el polvo.
 - a) Muestreo del aire ambiente para medir el contenido de polvo en suspensión (4).
 - b) Rediseño en la forma de adición de enzimas al producto. "Prills" o "marumes".
 - c) Rediseño de equipos para asegurar un máximo de 1 mg. por metro cúbico de aire ambiente.

El resultado de estas medidas debe asegurar que la cantidad de enzimas en el ambiente resulta menos que 1/3 de microgramo por metro cúbico.

Cuando estas medidas se cumplen, las pruebas médicas indican que por debajo de esta concentración no se producen casos de sensibilización en los trabajadores.

2. Medidas de higiene industrial: Reeducación de los trabajadores en sus hábitos de operación (29).
 - a) Eliminación de escobas, cepillos, etc., que levanten polvos finos y consecuentemente, enseñar a los trabajadores a uti-

lizar "aspiradoras especiales", para hacer el aseo de sus áreas de trabajo.

- b) Uso obligatorio de mascarillas respiradoras especiales que han sido probadas con efectividad para retener el polvo de enzimas, que puede ser sumamente fino. Hasta aproximadamente de 60 a 70 micrones.
- c) Seminarios de orientación a los trabajadores sobre los efectos potenciales de las enzimas, si no se observan estrictamente las reglas de higiene.
- d) Exigir el más alto nivel de limpieza en las áreas de operación con el arreglo de equipo.

B) CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LA ENZIMA.

Las proteasas, enzimas utilizadas en detergentes biológicos actúan para hidrolizar la proteína produciendo pequeños fragmentos solubles con el agua que se eliminan fácilmente con la acción del detergente (22).

Estas enzimas, son proteínas que poseen una estructura de aproximadamente 75 aminoácidos, cuyo peso molecular es de 27,500 daltons; es completamente soluble en agua desde su estado seco y polvoso (1,30).

La acción enzimática logra su rendimiento óptimo a un pH aproximado

de 8.0 con un rango efectivo de 7.0 a 9.5, rango en el cual se encuentra el agua de lavado; debe notarse que los extremos de pH originan una degradación e inactivación de la actividad enzimática. La temperatura óptima para la actividad proteolítica fluctúa desde 22°C a 65°C. Por supuesto, las temperaturas superiores a 65°C hacen inactiva la proteína (13,15,22).

C) EFECTO IRRITANTE PRIMARIO.

La dermatitis se debe a un efecto irritante primario y no a una sensibilización por contacto; por otro lado, se ha demostrado consecutivamente que las manifestaciones de la piel no están asociadas a una sensibilización percutánea (18). Las lesiones se limitan generalmente a:

- a) Las superficies de las palmas de las manos
- b) Las callosidades y las yemas de los dedos
- c) La cara en los puntos de contacto con el respirador

En cada caso se presenta la activación de la enzima por humedad (transpiración) y fricción. Es común una apariencia rojiza, húmeda y brillante. Estas lesiones, a pesar de su apariencia, no son dolorosas; por lo general desaparecen completamente y sin secuela cuando se reduce o se elimina la exposición con un equipo de protección personal adecuado y una mejor higiene personal (6,9,22).

Las medidas preventivas de control incluyen (31,32):

- a) Lavado frecuente de las áreas expuestas con jabón de barra y agua.
- b) El uso de guantes protectores de hule al manejar materias primas con enzimas, o cuando no se puede evitar un contacto excesivo, con cualquier fase del producto.
- c) Cambios de ropa de trabajo por lo menos dos veces a la semana o cuando se experimenta un ensuciamiento excesivo.

Generalmente no se han recomendado cremas protectoras. Si las cremas no se usan adecuadamente, el no limpiar bien las manos provoca un efecto "sandwich" y permite un contacto excesivo con las enzimas, sin embargo, si se lavan bien las manos y se aplican las cremas adecuadamente, se proporciona una buena protección. Se han probado un número se leccionado de cremas, dos de las cuales (Silicote y Kerodex 71), han resultado satisfactorias y se han utilizado con cierto éxito en individuos bien motivados (22).

D) DIFICULTADES RESPIRATORIAS.

Después de la adición de enzimas en detergentes en la industria, se han reportado síntomas que varían desde nariz tapada, rinorrea, lagrimeo, irritación de la garganta, catarro bronquial, tos y falta de aliento (asma) (2,22,23,31).

Ha sido notorio que los síntomas de las vías respiratorias altas ocurren en el lugar de trabajo, mientras que los síntomas de las vías respiratorias bajas ocurren característicamente de unas 3 a 8 horas, después que los empleados terminan sus labores.

Parece que los síntomas respiratorios menores ocurren a niveles relativamente bajos de polvo de enzimas, mientras que los síntomas más severos, que están asociados con la reducción de la acción pulmonar, están asociados con exposiciones máximas (15,22). Estos síntomas generalmente bajan después de varias horas y el trabajador cuando retorna a la planta al día siguiente, se siente completamente normal (17,23).

Los rayos X del tórax no han revelado anomalías, tampoco durante un estado de síntomas agudos (bronquitis crónica) ni en los períodos siguientes tan largos como 36 meses después de haber sido expuestos - (5,23).

El resultado de los estudios fué que los detergentes con enzimas, a diferencia de las enzimas solas, pueden producir alergia respiratoria "asma", en un porcentaje de la población de la fábrica y que este porcentaje aumenta con el tiempo de exposición (3,15,33).

Los casos de asma se han presentado con mucho menor frecuencia en las fábricas de enzimas, aunque las concentraciones de éstas en el aire -

ambiente sean mucho mayores. La razón de esta aparente aberración es que en las fábricas de detergente el polvo ambiental penetra en los pulmones con el detergente que se deposita en las mucosas pulmonares y rompe la tensión superficial de las mismas, pasando al torrente sanguíneo a través de los alveolos pulmonares (ósmosis sanguínea) (33).

Cuando este polvo contiene enzimas, las defensas biológicas del cuerpo humano detectan la presencia de las proteínas y fabrican anticuerpos para destruirlas (33).

Flind especula que la inhalación del material puede conducir al daño irreversible del funcionamiento del pulmón y que este daño puede ocurrir sin episodios de enfermedad evidente. Por otro lado, establece que, a la ausencia de síntomas en individuos sensibilizados, es difícil de evitar la posibilidad de un desarrollo incidioso del daño pulmonar que ocurre o puede ocurrir si se está expuesto continuamente - (11,16).

E) BRONQUITIS CRONICA.

Algunos análisis que se han llevado a cabo han revelado tres tipos clínicos de asma: El inmediato, el no inmediato y el doble. El asma inmediata se produce de los 10 a los 15 minutos después de la exposición y dura de 1 a 3 horas. En otros casos, el asma se desarrolla lentamente en alrededor de 6 horas a un máximo de 8 horas, durante hasta 24 horas.

Las características clínicas incluyen sudor, palidez y ansiedad, con una taquicardia y disnea muy marcada. Hay síntomas de tos con esputo mínimo. La ronquera se escucha con frecuencia, pero el grado de broncoespasmo es menor de lo que se esperaba para la disnea observada. - Las crepitaciones no son una característica notable, aunque ocasionalmente están presentes.

El asma en el trabajo, debido a antígenos no industriales pueden causar confusión. Los atópicos tienden a tener un asma inmediata, mientras que los no atópicos tienden a responder de 6 a 8 horas después. El tiempo que se lleva para la recuperación de la función respiratoria después de un ataque de broncoespasmo, producida por enzima proteolítica, depende de la duración del estímulo, de la dosis y del grado de sensibilización.

Se han dado ejemplos de una recuperación total y en la forma en que el individuo ha podido reaccionar a otros polvos irritantes inmediatamente después de un ataque de asma alérgica. Los ataques de asma nocturna en noches sucesivas después del episodio inicial, han sido estudiadas y la similitud del cuadro visto con otros antígenos ha sido tomada en cuenta. (5,24,34).

F) ASPECTOS INMUNOLOGICOS.

Se ha discutido sobre el amplio conocimiento adquirido acerca de los

efectos inmunológicos obtenidos en estudios clínicos de individuos y de grupos de trabajadores en fábricas que producen detergentes con enzimas.

La única respuesta alérgica probada en el hombre a los polvos de detergentes con enzimas, es de inmunoglobulinas de la clase IgE, mediada por asma o rinitis y ocasionalmente conjuntivitis (5,28,36). Las enzimas, como los antígenos ambientales comunes, por ejemplo los pólenes de pasto, también estimulan la formación predominante de anticuerpos de la clase IgE (31).

La alergia inducida por enzimas están casi limitados a los trabajadores en fábricas expuestas a los polvos, generalmente por períodos más o menos largos (2,28).

La literatura reporta una excepción, y fué una ama de casa sensibilizada, quien estuvo expuesta a antígenos llevados a su casa en las ropas contaminadas y pelo de su esposo, que era un obrero que trabajaba en una fábrica de detergentes con enzimas. (15)

La incidencia de la sensibilización depende de las cantidades de antígenos de enzimas que se encuentran en las áreas de trabajo, la duración de la exposición y en cierto grado, la susceptibilidad de los trabajadores.

En una fábrica cuando los niveles de polvo son elevados, todas las personas atópicas son más susceptibles a las no atópicas. Si sólo hay trazas de polvo tal como sucede en algunas fábricas, muy pocas personas, si es que hay alguna, se vuelve sensible (7).

La detección de una hipersensibilización específica, se realiza por medio de la prueba PRICK y RAST (ver apéndice). La prueba positiva en la piel o RAST (radio-alergosorbent) positivo, puede ocurrir antes que aparezcan los síntomas clínicos (12,32). Los efectos clínicos de polvo se interpretan más fácilmente con la ayuda de los resultados de las pruebas inmunológicas (32,36).

Para obtener resultados confiables con las pruebas de PRICK, es esencial que se lleve a cabo un proceso estándar benigno, con concentraciones de antígeno que no induzcan irritaciones antigénicas no específicas (28). Las preparaciones de enzima cruda contienen componentes del medio de cultivo, células de desecho y algunos organismos bacteriales, por lo tanto, se requiere un antígeno para la prueba de PRICK que contenga todos los alérgenos de la enzima (32).

Zacharie (32,35), de Dinamarca, reportó el uso de las pruebas de PRICK con alcalasa; seis por ciento de atópicos y otros pacientes de un total de 280 fueron positivos, pero sólo uno tenía un RAST positivo; por tal motivo, creyó que la prueba de piel no sería específica algunas veces y que la de RAST sería útil para confirmar una alergia.

En un estudio llevado por Pepys (28) en varios miles de personas atópicas que fueron examinadas, rutinariamente, con antígenos de enzima cuando estuvieron en una clínica de alergia, ya sea que hubieran o no utilizado detergentes con enzimas en su casa, no mostraron predisposición alérgica a las enzimas. Una encuesta parecida con más de 300 - amas de casa, reportada por Dijkman (7), llegó a la misma conclusión.

Se repitieron las pruebas de piel con muchos cientos de personas, demostrándose así que no produce sensibilización a aquellos que les hicieron las pruebas. Algunas reacciones a las pruebas de PRICK se presentaron 6 u 8 horas después de efectuada y en algunos casos, con respuesta severa (24).

Por tal motivo, se llevó a cabo una fuerte discusión acerca de este tipo de respuesta; tenía características comparables con una reacción de Arthus (12,17), pero no existe prueba inmunológica. Esta respuesta puede no ser inmunológica, ya que las sustancias con bacterias - tienden a inducir respuestas inflamatorias parecidas a las reacciones Arthus en ausencia de un anticuerpo apropiado (25). Algunas personas que presentan tales reacciones a una prueba, no la presentan cuando ésta se repite 6 o 12 meses después; esto no es típico de una sensibilización (Arthus) de personas expuestas continuamente a antígenos - (21).

Se ha presentado evidencia de que el aumento de IgE en el suero puede ocurrir al año o a los dos años después de la aparición de pruebas - PRICK positivas (20). Casi un 25% de empleados que han tenido resultados positivos a la prueba de piel, nunca han desarrollado niveles - elevados de IgE (20). Esto muestra que el estudio de la alergia en - trabajadores de fábricas de detergentes con la prueba de RAST única- mente, puede no detectar casos de hipersensibilidad incipiente, pero los "falsos positivos" son evitados (21,31).

Durante un estudio consecutivo de seis años en una de las fábricas de los Estados Unidos, se mostró que, desde 1969, la proporción de traba jadores que se habían convertido en prueba de PRICK positiva dentro - de los seis meses siguientes, varió de 0% a 39%, dependiendo del tra- bajo, pero en 1970 la reducción en los niveles de polvosidad y la pro ducción menos frecuente del producto, había reducido grandemente la - incidencia. Ninguno de los que empezó a trabajar después de 1970 fue ron sensibles.

En esta fábrica no hubo diferencia estadística importante en los gra- dos de sensibilización de los atópicos y de los no atópicos, como se mida, ya sea por la prueba de piel o la de RAST (17).

Se han realizado otros estudios en suero de personas expuestas a pol- vos de enzimas, en las cuales se han empleado técnicas más precisas,

capaces de detectar cantidades muy pequeñas de anticuerpos (RID, RIEP) (17). Mediante el uso de estas técnicas se ha confirmado la presencia de otro anticuerpo perteneciente a la clase IgG (8).

Estos anticuerpos han sido detectados solamente en el suero de personas expuestas a polvos de enzimas en fábricas y en muy bajas cantidades; aún así, fueron detectados en el suero de individuos que contienen también anticuerpos de la clase IgE.

OBJETIVOS

III

III. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo un estudio en conejos - sobre algunas reacciones que causan los detergentes biológicos, demostrándose el efecto irritante primario que causan las enzimas contenidas en detergentes, así como la susceptibilidad de adquirir dificultades respiratorias o algunas alteraciones de este aparato, debido a la exposición de polvos de detergentes y a una posible respuesta inmune del organismo, inducida por la presencia de las enzimas.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

IV

IV. MATERIALES Y METODOS

A) MATERIALES

1. Material Biológico:

- Animales de prueba: Se utilizan conejos hembras entre 4 y 7 meses de edad; se escogió de este sexo ya que éstos son más susceptibles a generar una respuesta más eficiente que el macho. Estos se distribuyeron de la siguiente manera:

3 conejos para pruebas en piel y 1 blanco como testigo

3 conejos para pruebas de polvosidad

4 conejos para pruebas intradérmicas

Nota: Los conejos testigos para obtener las constantes en las pruebas del aparato respiratorio, son los mismos utilizados.

- Suero de conejo obtenido por punsión cardíaca.

2. Material Químico:

- Solución Buffer de fosfatos pH 7.2. Es utilizada para la preparación de los medios para inmunodifusión.
- Solución de agar noble al 80%. Disuelto en Buffer de fosfatos pH 7.2, para la preparación de las cajas correspondientes para inmunodifusión.

- Soluciones de proteasa alcalina. Utilizadas como antígeno para el inóculo intradérmico en sus respectivas concentraciones (0.75; 0.5; 0.25; 0.1 mg/ml).
- Adyuvante de Freund completo. Se utiliza para la preparación del antígeno en relación 1:1.
- Solución enzimática al 0.1%. Utilizada para pruebas de precipitación en capilar e inmunodifusión.
- Solución de proteasa con glicerina. Se utiliza en aplicaciones tópicas para reacciones cutáneas al 20%; 10% y 0.1% respectivamente.
- Solución fisiológica de NaCl al 0.9%. Utilizada para la dilución de la enzima en inmunoprecipitación e inmunodifusión.
- Detergente con enzimas. Se utiliza para pruebas sobre el efecto en aparato respiratorio.
- Detergente sin enzimas. Se utiliza para pruebas sobre el efecto en aparato respiratorio.
- Enzimas aisladas (Prills). Se utilizan para pruebas sobre el efecto en aparato respiratorio.

3. Equipo:

- Cámara sellada con ventilador integrado. Utilizada para someter al animal a una polvosidad, tratando de igualar a la que existe en la industria de los detergentes. (Fig. 2).

- Estetoscopio. Se utiliza para medir el ritmo respiratorio y la frecuencia cardíaca antes y después de someter al conejo a la cámara para producir polvosidad.

- Termómetro. Se utiliza para medir la temperatura antes y después de someter al conejo a la cámara para producir polvosidad.

CAMARA PARA PRODUCIR POLVOSIDAD

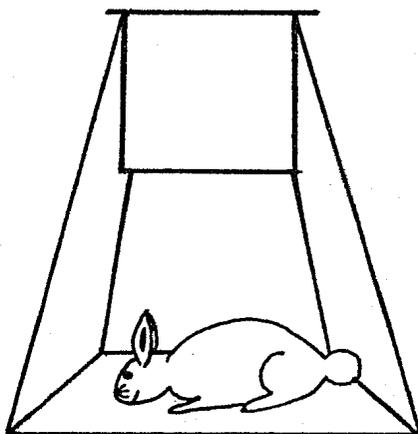


FIGURA No. 2.

Esquema representativo, el cual muestra la forma en donde los animales son sometidos a la polvosidad.

B) METODOS

1. Medición del efecto de la enzima en la piel:

Para medir el efecto de las enzimas en piel, se preparan 3 tipos de soluciones enzimáticas en glicerina al 20%, 10% y 0.1%, de la siguiente manera:

La enzima se disuelve desde su estado seco y polvoso en glicerina a las concentraciones antes mencionadas; estas son aplicadas tópicamente en la parte anterior de una de las patas traseras de cada uno de los tres conejos de prueba, teniendo como control un conejo que se le aplica únicamente glicerina.

La aplicación de los tópicos enzimáticos es variable, dependiendo del grado de irritación y molestias de los animales. En general, estas aplicaciones son cada 4 días de un total de 5 a 7 aplicaciones por conejo.

2. Producción de anticuerpos por vía intradérmica:

Se inoculan intradérmicamente 4 conejos con diferentes concentraciones de una solución 1:1 de proteasa alcalina y adyuvante de Freund completo de acuerdo al cuadro No. 1.

**INOCULACION Y TIEMPO DE INCUBACION
DE PROTEASA ALCALINA**

CONEJO	CONCENTRACION DEL INOCULO	NO. INOCULACIONES	PERIODO INCUBACION	OBTENCION DE SUERO
1	0.75 mg/ml	5	13-18 días	Punsión card.
2	0.50 mg/ml	5	13-18 días	Punsión card.
3	0.25 mg/ml	5	13-18 días	Punsión card.
4	0.10 mg/ml	4	13-18 días	Punsión card.

CUADRO No. 1.

El cuadro anterior muestra la concentración del inóculo, el número de - inoculaciones y el periodo de incubación del antígeno realizada para ca da uno de los conejos.

Posterior a cada inoculación y esperando el correspondiente tiempo de incubación, se obtiene suero sanguíneo por medio de una punsión cardíaca (Fig. 3), y así con éste, poder llevar a cabo una serie de precipitaciones en capilar de cada uno de los sueros para así determinar la concentración de anticuerpos presentes (Fig. 4).

El antisuero utilizado para realizar estas pruebas es proteasa alcalina 1 mg/ 1 ml.; de esta solución se preparan diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, respectivamente, de tal manera que de éstas se pueda detectar el título de anticuerpos de los diferentes sueros. Cuadro 2.

Finalmente, después del último período de incubación correspondiente a la última inoculación de la enzima y cuando el título del antígeno sea constante según la técnica del capilar, se realizan inmunodifusiones en caja para cada suero; éstos por el método Ouchterlony. (Fig. 5).

DIAGRAMA DEL PROCESO DE OBTENCION DEL SUERO

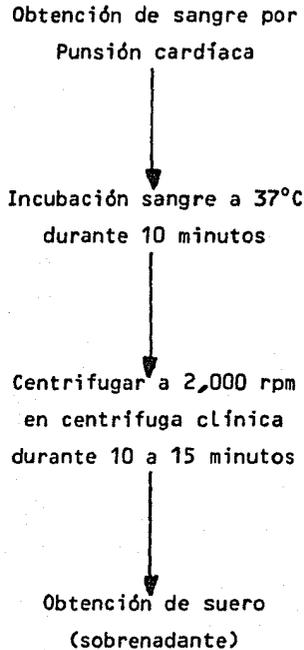


FIGURA No. 3.

Este diagrama representa la forma en que es obtenido el suero sanguíneo para las pruebas de precipitación en capilar e inmunodifusión.

TECNICA PARA LA INMUNOPRECIPITACION EN CAPILAR

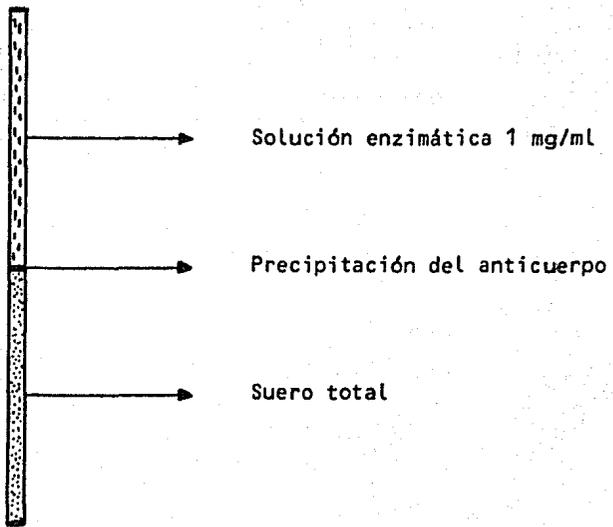


FIGURA No. 4.

En el tubo capilar se observa una línea de precipitación exactamente en la zona de contacto del antígeno y el anticuerpo.

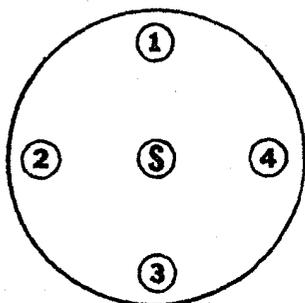
**PREPARACION DEL ANTIGENO PARA
LA PRECIPITACION EN CAPILAR**

T U B O	1	2	3	4	5
Solución de NaCl 0.9% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Solución Enzimática 1 mg/ml (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dilución	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32

CUADRO No. 2.

Muestra la preparación del antígeno para la correspondiente precipitación en capilar de los sueros obtenidos después de cada periodo de incubación.

INMUNODIFUSION EN EL GEL DE AGAR
POR EL METODO DE OUCHTERLONY



S - Suero total

1 - Dilución de la enzima (1:2)

2 - Dilución de la enzima (1:4)

3 - Dilución de la enzima (1:8)

4 - Dilución de la enzima (1:16)

FIGURA No. 5.

Representación de la inmunodifusión esquematizando la forma de aplicación del suero y antisuero. Las cajas de petri se hicieron con agar noble al 80% en Buffer de fosfatos pH 7.2.

3. Efecto de la polvosidad en aparato respiratorio:

Se someten tres conejos dentro de una cámara para producir polvosidad (Fig. 2), según lo muestra el Cuadro No. 3.

Antes de exponer a los conejos a la polvosidad, se realizan pruebas piloto de control a los tres conejos antes de entrar a la cámara y después de salir de la misma, con el objeto de medir ciertas constantes, tales como ritmo respiratorio, frecuencia cardíaca y temperatura.

Así entonces, se someten los animales a la exposición de cada uno de los polvos, siguiendo un parámetro estricto en el tiempo y días de exposición. También para éstos se evalúa el ritmo respiratorio, frecuencia cardíaca y la temperatura antes y después de cada exposición.

Al finalizar los días de exposición a los polvos, se sacrifica un conejo expuesto al detergente con enzima y otro blanco como control; a éstos se les observa y se les compara el aparato respiratorio respectivamente.

EXPOSICION DE LOS POLVOS

CONEJO	EXPOSICION	TIEMPO DE EXPOSICION	DIAS DE EXPOSICION
1	Detergente con enzima	1 hora	10
2	Detergente sin enzima	1 hora	10
3	Enzima aislada (prills)	1 hora	10

CUADRO No. 3.

Muestra las diferentes exposiciones de los polvos en tiempo y días de cada uno de los conejos que fueron sometidos a la cámara de polvos.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

V

V. RESULTADOS Y DISCUSION

A) MEDICION DEL EFECTO DE LA ENZIMA EN PIEL

Para facilitar la comprensión de las observaciones efectuadas a los animales después de la aplicación tópica de la enzima, el Cuadro No. 4 y la Figura No. 6, pueden darnos una idea más clara acerca del daño ocurrido en piel después de una exposición continua de la proteasa alcalina.

B) PRODUCCION DE ANTICUERPOS POR VIA INTRADERMICA

A continuación se presentan los resultados en cuanto a precipitación en capilar e inmunodifusión obtenidas después de las inoculaciones repetidas con las diferentes concentraciones de proteasa - descritas anteriormente.

- Concentración del inóculo 0.75 mg. (Cuadro No. 5), (Gráfica No. 1) y (Figura No. 7: Fotografía)
- Concentración del inóculo 0.5 mg. (Cuadro No. 6), (Gráfica No. 2) y (Figura No. 8).
- Concentración del inóculo 0.25 mg. (Cuadro No. 7), (Gráfica No. 3) y (Figura No. 9).
- Concentración del inóculo 0.1 mg. (Cuadro No. 8), (Gráfica No. 4), y (Figura No. 10)

EFFECTOS DE LA ENZIMA EN PIEL

CONCEN. DEL TÓPICO	Nº. DE APLIC.	OBSERV. AL DIA	ACUM.	QUERATOSIS CEBORRECIA	ERITEMA	URTICARIA	EXEMA SIMPLE	EXEMA CON SECRECIÓN Serosa	PRURITO	ERITEMA MULTIFORME	PAPULAS PURULENTAS	EXCITACION	ANOREXIA	FETIDEZ	
1	20%	1a.	3°	3	++	+									
		2a.	2°	5	++	++	+	+	+	+		+		+	
		3a.	5°	10	+++	+++	++	++	++	+			+++	+	+++
		-	4°	14	++++	++++	++	++	+++	+	++	+++	++	+++	+++
2	1%	1a.	5°	5	+	+									
		2a.	4°	9	+	++									
		3a.	4°	13	+++	+++	++	+	+						
		4a.	4°	17	+++	++++	++	+	+				+		
		5a.	3°	20	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	+++	+	
3	0.1%	1a.	5°	5											
		2a.	4°	9	+	+		+							
		3a.	2°	11	++	+		+							
		4a.	6°	17	+++	++		+	+						
		5a.	2°	19	+++	+++		+	+						
		6a.	2°	21	++++	+++	+	+	+					+	
		7a.	4°	25	++++	+++	++	+	+					+	

SIMBOLOGIA: + leve; ++ moderado; +++ severo; ++++ grave.

CUADRO No. 4.

El cuadro muestra los efectos producidos por la enzima para cada uno de los conejos, después de las aplicaciones tópicas a las concentraciones de 20%, 1% y 0.1% respectivamente.

EFFECTOS DE LA ENZIMA EN PIEL



FIGURA No. 6.

La fotografía muestra los daños ocasionados después de la séptima aplicación tópica de la enzima al 0.1% en glicerina.

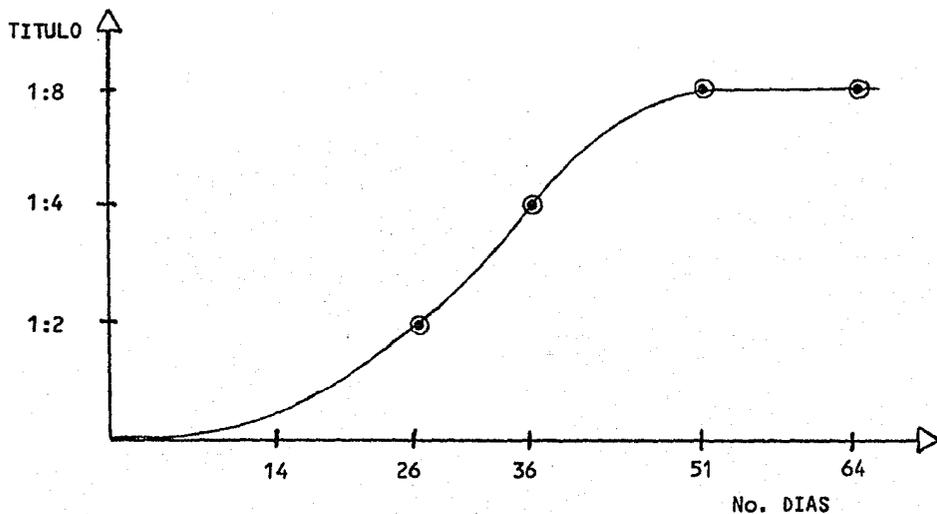
INOCULO ENZIMATICO DE 0.75 MG.
(PRECIPITACION EN CAPILAR)

FECHA DEL INOCULO	OBTENCION DE SUERO		TITULO PRECIP. EN CAPILAR
	DIAS	ACUM	
20 01 83	14	-	-
04 02 83	12	26	1:2
23 02 83	10	36	1:4
09 03 83	15	51	1:8
23 04 83	13	64	1:8

CUADRO No. 5.

Expresión gráfica de los títulos obtenidos por precipitación en capilar del inóculo enzimática 0.75 mg.

INOCULO ENZIMATICO DE 0.75 MG.
(PRECIPITACION EN CAPILAR)

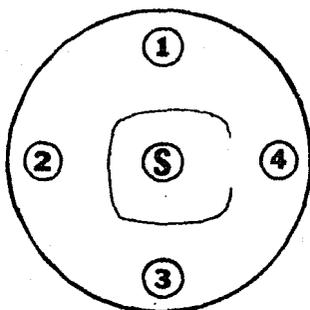


GRAFICA No. 1.

Expresión gráfica de los títulos obtenidos por precipitación en capilar con suero hiperinmune y una solución enzimática al 0.1%, según lo muestra el cuadro No. 5.

INMUNODIFUSION PARA EL SUERO 0.75 MG.

Fecha de incubación: 03 - 05 - 83
Fecha de lectura: 08 - 05 - 83
Suero al centro: Total - anti proteasa



Interpretación:

1. Dilución de la proteasa 1:2
2. Dilución de la proteasa 1:4
3. Dilución de la proteasa 1:8
4. Dilución de la proteasa 1:16

FIGURA No. 7.

La figura muestra las bandas de precipitación obtenidas en la inmunodifusión al reaccionar el suero del conejo inmunizado con 0.75 mg. de enzima, con diluciones aumentadas de la misma al 0.1%.

INMUNODIFUSION SUERO 0.75 MG.

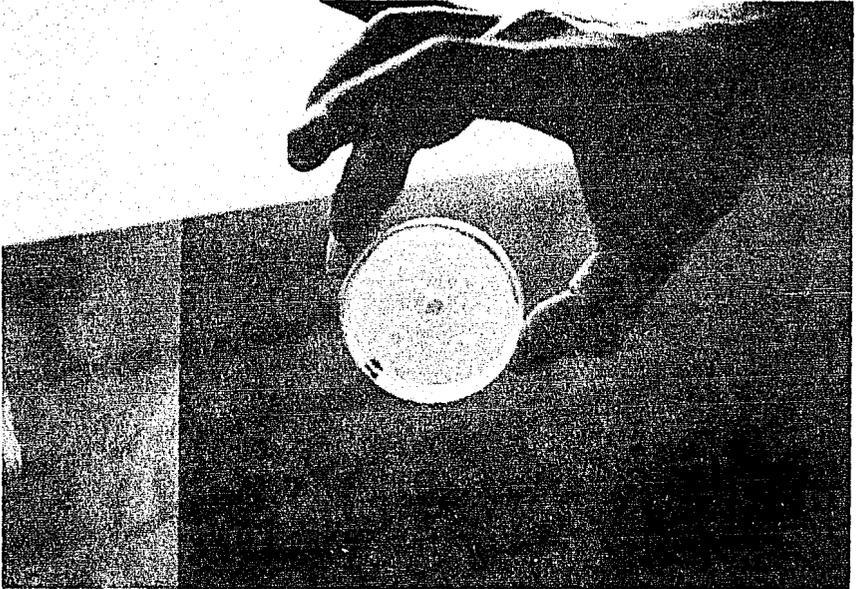


FIGURA No. 7.

La fotografía muestra claramente las bandas de precipitación en la inmunodifusión al reaccionar el suero del conejo inmunizado con 0.75 mg. de enzima con diluciones aumentadas de la misma al 0.1%.

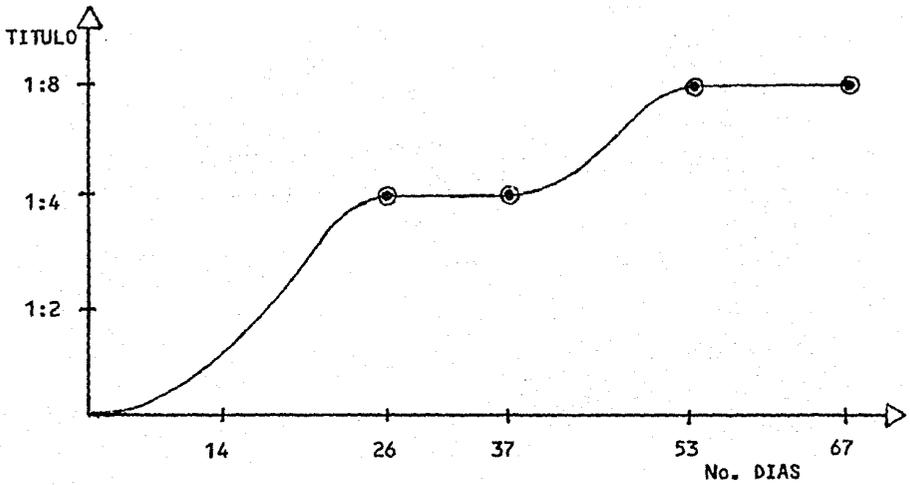
INOCULO ENZIMATICO DE 0.5 MG.
(PRECIPITACION EN CAPILAR)

FECHA DEL INOCULO	OBTENCION DE SUERO		TITULO PRECIP. EN CAPILAR
	DIAS	ACUM	
20 01 83	14	-	-
04 02 83	12	26	1:4
23 02 83	11	37	1:4
09 03 83	16	53	1:8
23 03 83	14	67	1:8

CUADRO No. 6.

Este cuadro muestra los títulos obtenidos por precipitación en capilar del inóculo enzimático de 0.5 mg.

INOCULO ENZIMATICO DE 0.5 MG.
(PRECIPITACION EN CAPILAR)

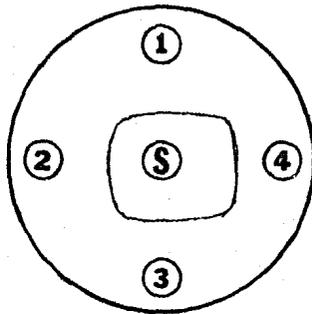


GRAFICA No. 2.

Expresión gráfica de los títulos obtenidos por precipitación en capilar con suero hiperinmune y una solución enzimática al 0.1%, según lo muestra el cuadro No. 6.

INMUNODIFUSION PARA EL SUERO 0.5 MG.

Fecha de incubación: 16 - 05 - 83
Fecha de lectura: 22 - 05 - 83
Suero al centro: Total anti-proteasa



Interpretación:

1. Dilución de la proteasa 1:2
2. Dilución de la proteasa 1:4
3. Dilución de la proteasa 1:8
4. Dilución de la proteasa 1:16

FIGURA No. 8.

La figura muestra las bandas de precipitación obtenidas en la inmunodifusión al reaccionar el suero del conejo inmunizado con 0.5 mg. de enzima con la misma al 0.1%.

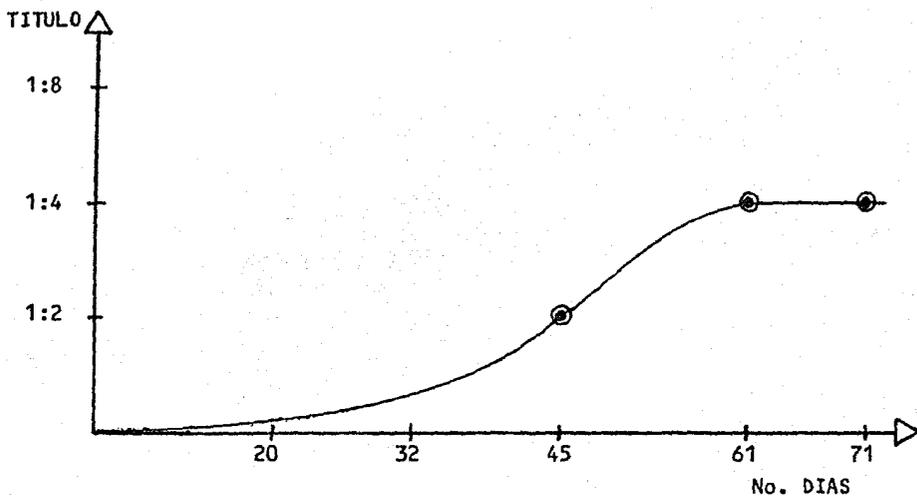
INOCULO ENZIMATICO DE 0.25 MG.
(PRECIPITACION EN CAPILAR)

FECHA DEL INOCULO	OBTENCION DE SUERO		TITULO PRECIP. EN CAPILAR
	DIAS	ACUM	
21 09 83	20	-	-
13 10 83	12	32	-
25 10 83	13	45	1:2
08 11 83	16	61	1:4
28 11 83	10	71	1:4

CUADRO No. 7.

Este cuadro muestra los títulos obtenidos por precipitación en capilar del inóculo enzimático 0.25 mg.

INOCULO ENZIMATICA DE 0.25 MG.
(PRECIPITACION EN CAPILAR)

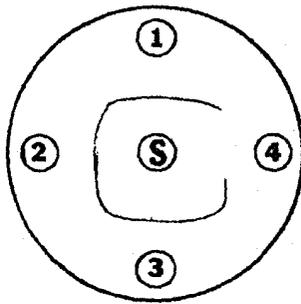


GRAFICA No. 3.

Expresión gráfica de los titulos obtenidos por precipitación en capilar con suero hiperinmune y una solución enzimática al 0.1%, según lo muestra el cuadro No. 7.

INMUNODIFUSION PARA EL SUERO 0.25 MG.

Fecha de incubación: 30 - 11 - 83
Fecha de lectura: 13 - 12 - 83
Suero al centro: Total anti-proteasa



Interpretación:

1. Dilución de la proteasa 1:2
2. Dilución de la proteasa 1:4
2. Dilución de la proteasa 1:8
4. Dilución de la proteasa 1:16

FIGURA No. 9.

La figura muestra las bandas de precipitación obtenidas en la inmunodifusión al reaccionar el suero del conejo inmunizado con 0.25 mg. de enzima con diluciones aumentadas de la misma al 0.1%.

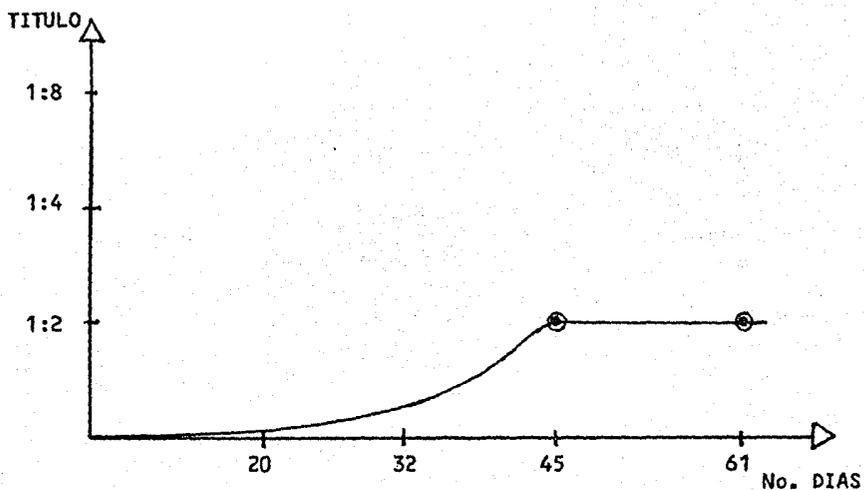
INOCULO ENZIMATICO DE 0.1 MG.
(PRECIPITACION EN CAPILAR)

FECHA DEL INOCULO	OSTENCION DE DIAS	SUERO ACUM	TITULOS PRECIP. EN CAPILAR
21 09 83	20	-	-
13 10 83	12	32	-
25 10 83	13	45	1:2
08 11 83	10	61	1:2

CUADRO No. 8.

Muestra los títulos obtenidos por precipitación en capilar del inóculo enzimático de 0.1 mg.

INOCULO ENZIMATICO DE 0.1 MG.
(PRECIPITACION EN CAPILAR)

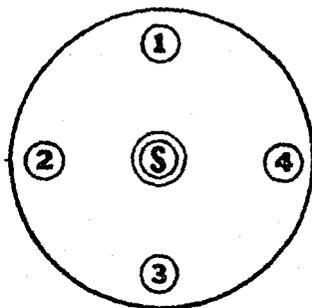


GRAFICA No. 4.

Expresión gráfica de los títulos obtenidos por precipitación en capilar con suero hiperinmune y una solución enzimática al 0.1% según lo muestra el cuadro No. 8.

INMUNODIFUSION PARA EL SUERO 0.1 MG.

Fecha de incubación: 30 - 11 - 83
Fecha de lectura: 13 - 12 - 83
Suero al centro: Total anti-proteasa



Interpretación:

1. Dilución de la proteasa 1:2
2. Dilución de la proteasa 1:4
3. Dilución de la proteasa 1:8
4. Dilución de la proteasa 1:16

FIGURA No. 10.

La figura muestra las bandas de precipitación obtenidas en la inmunodifusión al reaccionar el suero del conejo inmunizado con 0.1 mg. de enzima con diluciones aumentadas de la misma al 0.1%.

C) EFECTO DE LA POLVOSIDAD EN APARATO RESPIRATORIO

Como se mencionó anteriormente, fueron determinadas ciertas constantes como lo son el ritmo respiratorio, frecuencia cardíaca y la temperatura, éstas con el objeto de obtener ciertas medidas de control y así ser comparadas con los resultados de las diferentes pruebas - en general.

Estas medidas de control consisten en someter a los animales a ciertos efectos que pueden intervenir en el ritmo respiratorio, frecuencia cardíaca y temperatura, como lo son el estar aislado durante - una hora en una cámara de 50 X 50 X 70 cms., y al ruido del ventilador.

Estas constantes al igual se efectuaron antes y después de la polvosidad, como se observa en el Cuadro No. 9.

Una vez obtenidas estas medidas de control, se sometieron a cada - uno de los animales a la cámara y se les administraron los polvos - según el Cuadro No. 10.

MEDIDAS DE CONTROL PARA LOS CONEJOS

CONEJO	ANTES DE CAMARA Y VENTIL.				ANTES DE CAMARA Y VENTIL.		
	RITMO RESP/min.	FREC. CARD/min.	TEMP. °C		RITMO RESP/min.	FREC. CARD/min.	TEMP. °C
1	104	288	38.5		88	240	39.3
2	112	240	39.2		104	232	39.6
3	81	200	38.8		78	216	39.6

CUADRO No. 9.

El cuadro muestra los resultados obtenidos antes y después de someter a los animales a la cámara de polvosidad sin la administración de polvos.

RESULTADOS DE LA EXPOSICION A LOS POLVOS

CONEJO ADMÓN.	DIAS	ANTES DE POLVOSIDAD			DESPUES DE POLVOSIDAD			
		RITMO RESP/min.	FREC. CARD/min.	°C TEMP.	RITMO RESP/min.	FREC. CARD/min.	°C TEMP.	
1 POLVOSIDAD DEL DETER- GENTE SIN ENZIMAS.	1	94	308	39.1		86	280	38.6
	2	90	308	39.2		86	280	38.6
	3	90	266	38.0		83	280	38.4
	4	130	288	39.7		96	264	39.0
	5	112	272	40.1		88	248	39.0
	6	102	256	39.5		81	240	40.0
	7	98	264	39.8		84	456	39.5
	8	94	286	38.1		92	256	38.7
	9	100	288	39.9		82	246	38.8
	10	94	285	39.2		96	280	39.0
2 POLVOSIDAD DEL DETER- GENTE CON ENZIMAS	1	104	264	38.8		77	256	38.8
	2	108	258	38.5		92	268	39.0
	3	108	224	40.5		100	256	40.0
	4	106	232	40.2		100	256	30.0
	5	108	240	38.5		96	256	38.9
	6	110	226	39.7		102	248	40.0
	7	114	220	40.7		88	216	39.5
	8	96	256	40.6		98	248	39.0
	9	108	232	40.5		92	240	39.3
	10	106	222	40.4		100	248	39.6
3 ENZIMAS AISLADAS (PRILLS)	1	66	280	39.0		84	322	38.8
	2	104	256	39.4		106	240	40.0
	3	112	248	40.5		110	216	39.9
	4	104	232	39.5		66	240	39.7
	5	96	216	39.4		100	216	38.7
	6	82	256	38.3		84	246	38.3
	7	82	264	40.4		114	264	40.0
	8	104	232	39.0		100	216	39.5
	9	115	216	39.5		100	268	39.7
	10	104	248	39.8		100	246	40.0

CUADRO No. 10.

El cuadro muestra los resultados obtenidos antes y después de someter a los conejos a la cámara de polvosidad de un total de 10 días exponiéndolos 1 hora al día.

Al finalizar la exposición de los animales a los polvos, se decidió realizar la disección de dos conejos. Uno blanco como control, el cual nunca estuvo expuesto a ningún polvo, y otro problema, que es el que estuvo expuesto a los polvos del detergente con enzimas. Estas disecciones se realizaron con el fin de observarles y compararles el aparato respiratorio respectivamente.

Al realizar la comparación entre estos dos aparatos, se observa que en general no existen cambios morfológicos aparentes a lo largo de este aparato. En ambos, existen zonas de petequias, sulfusiones y hepatizaciones rojas y grises en los lóbulos derecho diafragmático anterodorsal, características de estos animales.

Los lóbulos pulmonares se encuentran en perfecto estado y mediante una insuflación pulmonar se comprobó que no hay desgarramientos en el tejido, es decir, que la capacidad de ventilación es normal.

Al realizar un corte longitudinal de la tráquea, se observa que en el animal problema existe un desprendimiento de la mucosa traqueal, aunado a un daño celular. (Fig. 11).

COMPARACION DE AMBOS APARATOS



FIGURA No. 11.

La fotografía muestra los daños en la tráquea ocasionados por la administración del detergente por vía respiratoria.

DISCUSION

Con respecto al efecto que tiene la enzima en piel, se observa que ésta causa una dermatitis irritante primaria dependiendo del tiempo de contacto con la misma. Las lesiones que genera la proteasa, pueden ir desde un simple eritema hasta un exema con secreción serosa.

Para la producción de anticuerpos por vía intradérmica, los resultados muestran que a mayor concentración del inóculo, mayor será el título de anticuerpos en el suero. Para cada uno de los sueros se observa que después de los 45 días, el título tiende a ser constante.

En las gráficas 1 y 2, correspondientes a las concentraciones de 0.75 y 0.5 mg., se puede notar que en general el primer título se detecta dentro de los primeros 26 días, a diferencia de los sueros 3 y 4, que aparecen sus primeros títulos a los 45 días para ambos.

Con relación a las inmunodifusiones y para hacer cierta comparación con la técnica de precipitación en capilar, se observa que dentro de las tres primeras concentraciones (Fig. 7, 8 y 9), las bandas de precipitación se notan claramente y caen dentro del punto de equivalencia para cada una de las precipitaciones en capilar. La última placa, para una concentración de 0.1 mg. (Fig. 10), no muestra cla-

ramente tales bandas, por lo que se infiere que en este caso, aunque el título es bajo, la cantidad de anticuerpos no fué suficiente para delinear estas bandas de precipitación.

Por otro lado, se observa que no existe una relación clara en las variables como lo son la frecuencia cardíaca, el ritmo respiratorio y la temperatura, ya que los conejos poseen rangos fisiológicos bastante amplios; la temperatura varía de 37.2°C a 39.3°C, teniendo una media de 38.3°C. La frecuencia cardíaca varía de 250 a 300/min., y el ritmo respiratorio es de 32 a 60/min. En general los resultados presentados caen dentro de estos rangos, ya sea antes o después de la polvosidad, a excepción de la frecuencia respiratoria que rebasa el rango superior.

Analizando estos datos por separado, se observa en los tres conejos que el ritmo respiratorio es mayor antes de someterlos a los polvos, y tanto la frecuencia cardíaca como la temperatura, en general se mantienen constantes.

Cabe mencionar que durante la exposición de los animales a los polvos, estos mostraban cierta excitación con movimientos continuos durante un lapso de 10 minutos. El resto del tiempo a la exposición, permanecían totalmente inmóviles apuntando la cabeza hacia alguna de las aristas inferiores de la cámara y con los ojos totalmente cerrados. Es por esto que no hubo alguna irritación en los orbitales oculares de ninguno de los animales.

El efecto que tiene el detergente sobre el aparato respiratorio es que éste se deposita en las mucosas, rompiendo la tensión superficial de las mismas, facilitando la entrada de la enzima directamente al torrente sanguíneo, para así formar anticuerpos y poder combatir a estos agentes extraños.

CONCLUSIONES

VI

VI. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. Existen efectos biológicos importantes causados por el detergente con enzimas tales como dermatitis, producción de anticuerpos y separación de la mucosa traqueal, aún a bajas concentraciones.
2. En las pruebas de dermatitis se comprobó que en concentraciones bajas (semejantes a las que podrían estar expuestas las amas de casa), existe una irritación primaria, quizás hasta ahora no reportada o confundida.
3. La respuesta antigénica no es rápida; tampoco proporciona títulos elevados. Después de cierto inóculo, el título de anticuerpos permanece constante, por lo tanto, la proteína se pudiera considerar como poco antigénica.
4. Los efectos de la polvosidad en aparato respiratorio son mínimos y están en relación al tiempo de exposición y a la concentración; se sigue observando que el papel más importante lo desempeña el detergente.

5. No existe ningún riesgo para la salud del consumidor debido a que tanto la máxima concentración posible como el tiempo de exposición están mucho muy por debajo de los máximos aceptables. Sin embargo, pueden presentarse casos de hipersensibilidad y dar lugar a irritaciones cutáneas en amas de casa, las cuales pueden convertirse en graves daños si se continúa con la exposición.

A P E N D I C E

VII

VII. APENDICE

REACCIONES ARTHUS

Estas son respuestas de pruebas de la piel que ocurren de 4 a 8 horas después de un trato con antígeno, ya sea solos o como una respuesta doble con edema y ampula. Pueden ser eritematosas, con una zona de edema alrededor, o con áreas más extensas de edema definido, con o sin foco central. Las reacciones varían grandemente de acuerdo al grado de hipersensibilidad y concentración del antígeno. Las pruebas intradermales pueden inducir a reacciones severas de contagiamiento o hemorragias.

PRUEBA DE RAST

Esta prueba "radio-allergosorbent" fué diseñada para detectar cantidades muy pequeñas de anticuerpos IgE en el suero. El antígeno se auna a las partículas inertes o discos y el anticuerpo en el suero que se prueba, se une con los antígenos. Después el antígeno se trata con globulina anti - IgE clasificado con un isótopo radioactivo. La cantidad de radio actividad generalmente se expresa en "cuenta por minuto" y tiene una relación directa a la cantidad de IgE en la prueba del suero que se supone tiene el antígeno.

En el caso de la alcalasa, se producen aglomerados en el suero almacenado por más de uno o dos años; éstos pueden combinarse con la enzima aunada al substrato de prueba. Los agregados contienen IgE y provocan una reproducción pobre de RAST. La eliminación de los aglomerados por centrifugación vence esto.

PRECIPITACION DE DIFUSION DOBLE (OUCHTERLONY)

Esta prueba para precipitar el anticuerpo se lleva a cabo en capas de gel de agar, donde el anticuerpo se esparce en un agujero o dentro del gel para encontrarse con el antígeno que se esparce por otros circunvecinos a él. Si el anticuerpo reacciona con el antígeno, líneas o bandas de precipitación ocurren donde el anticuerpo se une con el antígeno.

RID (RADIOINMUNODIFUSION)

El procedimiento es el mismo a seguir que el Ouchterlony, excepto que el antígeno está marcado con un isótopo radioactivo y las líneas de precipitación se detectan por la exposición de una placa fotográfica. Esta técnica detecta cantidades de anticuerpos precipitantes demasiado pequeñas para observarse bajo el microscopio.

RIEP (RADIOINMUNOELECTROFORESIS)

La prueba en el suero se separa en un gel de agar y las posiciones de las inmunoglobulinas se detectan por los antisueros para cada uno. Un antígeno marcado con isótopo radioactivo se añade posteriormente con anticuerpo para el antígeno particular, el cual se adhiere. Esta técnica detecta cantidades muy pequeñas de anticuerpos.

PRUEBA DE PRICK

Esta prueba es muy utilizada actualmente para saber si el trabajador es sensible a la enzima. Esta prueba es bastante sencilla y ofrece un rango de confiabilidad bastante amplio. La técnica para esta prueba es la siguiente: A partir de una solución de proteasa alcalina al 0.1%, una gota de esta solución se coloca en la parte ventral del brazo y mediante una aguja hipodérmica, se hace un pequeño "rasguño" exactamente en el lugar de aplicación de la solución. Si después de 15 minutos existe una ampulita \geq a 3 mm. se considera como una reacción positiva.

R E S U M E N
VIII

VIII. RESUMEN

Con la introducción de los detergentes biológicos para el lavado de la ropa en 1967, aparecieron dos aspectos de medicina ocupacional; el primero es una dermatitis irritante primaria asociada por el con tacto excesivo con el concentrado de enzimas y el segundo es una - aguda obstrucción de las vías respiratorias, debido a la inhalación de polvos de enzimas en altas concentraciones.

Con estas interrogantes se llevó a cabo un estudio en conejos sobre algunas reacciones que causan las enzimas contenidas en detergentes - el cual comprende la aplicación tópica de proteasa alcalina (enzima contenida en detergente), disuelta en glicerina al 20%, 1% y 0.1%;- por otro lado, la inoculación intradérmica de la enzima a concentraciones sucesivas al 0.1%, 0.25%, 0.50% y 0.75%, obteniendo el suero de los animales inmunizados para así comprobar la presencia de anticuerpos por medio de inmunodifusión (Ouchterlony). Por último fué probado el efecto que tienen estos productos de lavado sobre el aparato respiratorio, utilizando una cámara para producir polvosidad, tratando de igualar a la que existe en la Industria.

Los resultados muestran que en las pruebas en piel existe una irritación, aún a mínimas concentraciones, dependiendo también del tiempo de exposición. Las placas de agar noble al 80% para inmunodifusión, revelaron la presencia de anticuerpos en contra de la enzima.

El efecto que tienen este tipo de detergentes sobre al aparato respiratorio es mínimo, dependiendo del tiempo de exposición; aún así, se sigue observando que el papel más importante lo desempeña el detergente.

B I B L I O G R A F I A

IX

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Belin, L. Falsen E. and Hoborn J.: Enzymes sensitization in consumer of enzyme containing washing powder. *Lancet* Vol. 2 1153 (1970).
2. Bernstein, I.L.: Enzyme allergy in populations exposed to - long term, low level concentrations of household laundry products, *Journal of Allergy Immunology*, Vol. 49, No. 4, 219-237 (1972).
3. Bernstein, I.L.: Preliminary investigations of sensitization phenomena in populations not exposed to high concentrations of enzyme dust. *Journal of Allergy Immunology*. Vol. 47, No. 2, - pag. 97 (1971).
4. Bruce C.F.; Dunn E.; and Davis D.R.: Methods of Measuring - biologically active enzyme dust in the enviromental air of - detergent factories association. *Journal of Occupational Hygiene*. Vol. 21, 1-20 (1978).
5. Carl-John Göthe; Ake Nilzen and Alf Holmguen: Medical problems in detergent industrial caused by proteolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Acta Allergologica*, Vol. 27, No. 1 (1974).

6. Carter R.O. and Mc. Murrain K.D. Jr.: Consumer safety of enzyme detergents. *Journal of American Medical Association*. Vol. 211, No. 2017 (1970).
7. Dijkman J.H. and Borgham J.G.: Allergic bronchial reactions to inhalation of enzymes of *Bacillus subtilis*. *American Review of Respiratory Disease*. Vol. 107, 387 (1973).
8. Dolovich J.: Correlates of skin test reactions to *Bacillus subtilis* enzyme preparations. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. Vol. 49, No. 1, 43-53 (1972).
9. Falleron, A.E. and Schwarts, R.P.: Immediate hypersensitivity to enzyme detergents. *Lancet*, Vol. 1, 548 (1971).
10. Federal regulations and practical central microbiology for disinfectants, drugs and cosmetics. Cyril J. Corum (ed). S.I.M. Special Publication (1974).
11. Flindt, M.L.: Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme. *Lancet* Vol. 1, No. 1177 (1969)
12. Fudenberg, H. and Coldmel L.: *Inmunologia clinica*. Editorial Manual Moderno, 3a. edición (1982).

13. Fulwiler, R.D.: Detergent enzymes. An Industrial Hygiene Challenge. American Industrial Hygiene Association Journal. Vol. 32, No. 73 (1971).
14. Fulwiler, R.D., and Parcy F.J.: Evaluation of detergents enzymes in air. American Industrial Hygiene Association Journal. Vol. 33, No. 231 (1972).
15. Gaffuri, E.: Respiratory Effects of biological detergents. - British Medical Journal, Vol. 4 (1970).
16. Gandevia, B. and Mitchel C.: The dangers of proteolytic enzymes to workers, Medical Journal Aust. Vol. 1, 1032-1033 (1971).
17. Gilson J.C., Janitor, C.P., Martin R.B. and Weill H.: Biological effects of proteolytic enzyme detergents. Report of a symposium held at the M.R.C. Pneumoconiosis Unit Cardiff, sponsored by the Medical Research Council, U.K. 4-5 May (1976).
18. Griffith, J.F., Weaver, J.E. and Whitehouse: Safety evaluation of enzyme detergents. Oral and cutaneous toxicity, irritation and skin sensitization studies. Food Cosmet. Toxic. - Vol. 7, 581-593 (1969).

19. Henningsen, S.J. and Zachariae H.: Kinin formation and inactivation by alcalase, a proteolytic enzyme, *Proc.Soc.Exp.Biol. Med.*; Vol. 132, No. 459 (1969).
20. How, M.J. and Cambridge, G.W.: Prick-test and serological test in the diagnosis of allergic reactivity to enzymes used in washing products. *British Journal of Industrial Medicine*. Vol. 28, 303 (1974).
21. Juniper, C.P.: Respiratory allergies in industry: A review of a recent advance and current clinical practice. *Journal of the Society of Occupational Medicine*. Vol. 25, 50.
22. Mc. Murrain, K.D. Jr.: Dermatologic and pulmonary responses in the manufacturing of detergents enzyme products. *Journal of Occupational Medicine*, Vol. 12, No. 10 (1970).
23. Mc. Murrain, K.D. Jr., Brooks A. and Bernstein, I.L.: Clinical immunologic and physiologic observations in factory workers exposed to *Bacillus subtilis* enzyme dust, *Journal of Allergy*, Vol. 47, No. 3, 170-180 (1971).
24. Newhouse, M.L., Tagg B.: An epidemiological study of workers producing enzyme washing powder, *Lancet*, Vol. 1, 689-693 (1970).

25. Parish, W.E.: Short term anaphylactic IgG antibodies in human sera, *Lancet* II, 591 (1980).
26. Pepis, J., and Hergreave, F.E.: Allergic reactions of the lungs to enzyme of *Bacillus subtilis*, *Lancet* I, 1181-1184 (1969).
27. Pepis, J., Longbottom, J.L. and Hergreave F.E.: Hypersensitivity diseases of the lungs due to Fungi and Organic Dust, *Basle*. (1969).
28. Pepis, J., Wells: Clinical and immunologic responses to enzymes of *Bacillus subtilis* in factory workers and consumers, *Clinical Allergy*, Vol. 3 143 (1973).
29. Procter and Gamble.: Detergentes con enzimas, México. Publicación especial. Junio (1982).
30. Procter and Gamble.: Enzymes and their practical usefulness in the detergency (Sponsored by P.S. & D.D. Products Research Department), Mayo (1970).
31. Shapiro R.S., and Eisenberg B.C.: Sensitivity to proteolytic enzymes in laundry detergents. *Journal of Allergy*. Vol. 47, - No. 2, 76 (1970).

32. Sienesen, B., Wide, L. and Zachoniease H.: Prick and Radioallergosorbent (RAST) to Alcalase in a population not exposed to enzyme detergents. *Acta Allergológica*, Vol. 31, 71-77 (1976).
33. Slavin, R.G. and Lewis, C.R.: Enzyme asthma: An occupational disease of laundry detergent workers, *Journal of Allergy*, Vol. 47, No. 2 97-98 (1971).
34. Witmeur, O, Wolf-Jurgensen: Medical experience in enzyme production. *Acta Allergológica*, Vol. 28, No. 250. (1973).
35. Zachariae, H. and Thomsom K.: Occupational enzyme dermatitis. Results of patch testing with alcalase. *Acta Dermato-Venerológica*, Vol. 53, 145 (1973).
36. Zetterstram, O. and Wide, L.: IgE antibodies and skin test reactions to a detergent enzyme in Swedish consumers, *Clinical Allergy*, Vol. 4, 273-280 (1974).