

24-22



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ESTANDARIZACION DE ALERGENOS

T E S I S

LAURA CASTOR PINEDA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1987



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 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Título: ESTANDARIZACION DE ALERGENOS

Tabla de Contenido

I.- INTRODUCCION	1
II.- GENERALIDADES	
1.-Antecedentes.....	4
2.-Alergenos.....	7
3.-Estandarización de Alergenos	13
III.- PARTE EXPERIMENTAL	
1.-Diagrama.....	22
2.-Técnicas de preparación de extractos alérgicos.	
2.1 - Técnica de extracción de polvo casero y polen	23
2.2 - Técnica de extracción de hongos.....	25
2.3 - Medidas de seguridad.....	28
3.-Valoración de los alérgenos en Animales	
3.1 - Método de alérgización a conejos. al polvo casero, ...	29
a hongos y polen	
3.2 - Aplicación de pruebas cutáneas en conejos.....	30
4.- Valoración de los alérgenos en pacientes	
4.1 - Pruebas cutáneas intradérmicas	3
4.2 - Técnica de aplicación de pruebas cutáneas.....	5
en pacientes	

5.-Valoración fisico-química de los alérgenos

5.1 - Determinación espectrofotométrica de proteínas..... 37
a 280nm

5.2 - Determinación espectrofotométrica de carbohidra- .. 38
tos por el método de la antrona

IV.- RESULTADOS 40

V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES 49

VI.- RESUMEN 51

APENDICE 53

VII.- BIBLIOGRAFIA 56

I.- INTRODUCCION

Durante muchos años se han utilizado extractos de alérgenos para diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos. Sin embargo, dichos antígenos no han tenido un buen control de calidad, por lo que su actividad y especificidad pudieran no ser muy confiables.

Las preparaciones de este tipo son elaboradas y comercializadas en varias partes del mundo, aunque su producción es un tanto empírica y varía de acuerdo con el fabricante. Existen diferentes técnicas de elaboración de los alérgenos o antígenos y todas tienen el mismo propósito: obtener un producto que sea biológicamente potente y específico, además de retener su potencia durante largo tiempo. La manera como se determina la hipersensibilidad hacia un antígeno o alérgeno es poniendo al paciente en contacto con el alérgeno, pero para ello es necesario obtener un "extracto" representativo del alérgeno respecto a su actividad y especificidad(1,17,33).

Los extractos alérgicos son una mezcla de componentes cuyas concentraciones son desconocidas y en la mayoría de los casos el principio activo no se ha podido establecer --- (11,21,47).

En la actualidad un gran número de productos antigénicos están relacionados con las reacciones alérgicas, por lo que es necesario desarrollar patrones en términos de su contenido

activo ya que los resultados en el diagnóstico y en la inmunoterapia dependen de la valoración y la proporción del principio activo, por lo tanto, si no se conocen todavía los componentes activos, los resultados clínicos varían dependiendo del método utilizado para su preparación (3,17).

Debido a las dificultades existentes en la estandarización biológica , durante los últimos diez años se han desarrollado modelos "in vitro" partiendo de criterios inmunológicos, para la valoración de la actividad de los alérgenos y garantizar con ellos la producción industrial de los extractos.

En la literatura actual puede encontrarse la descripción de estos métodos, por medio de los cuales se ha intentado estandarizar los alérgenos. Sin embargo, hasta ahora no se ha establecido un método que sea aceptado mundialmente (35).

En nuestro país, en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital General de la Secretaría de Salud, se pretende implantar un método de estandarización de algunos de los alérgenos utilizados en este Servicio que pueda llevarse a cabo rutinariamente y establezca una base más confiable para su preparación. El procedimiento de estandarización que se propone comprende tanto la técnica para la preparación del extracto como la valoración del contenido de proteínas y de carbohidratos; finalmente , permitirá obtener la relación entre la máxima dilución de el extracto que produzca la mayor reacción

y las concentraciones de proteínas y de carbohidratos.

El objetivo de este trabajo es establecer un método de valoración "in vitro" de algunos alérgenos, ya que en la actualidad la valoración de los extractos es empírico y se basa solamente de las reacciones cutáneas, las cuales están sujetas a grandes variaciones y no dan patrones estables como las valoraciones químicas.

1.- ANTECEDENTES

Desde la antigüedad se sabía que ciertos alimentos totalmente inofensivos para la mayoría de los individuos producían síntomas patológicos en otros; a esto lo denominaban Idio sincrasia, descrita como una disposición reactiva particular e individual. También en la Edad Media se describieron fenómenos tales como síntomas asmáticos, urticaria, edema y otras alteraciones. Posteriormente, a partir de una extraña enfermedad relacionada con las distintas estaciones del año, hubo varias opiniones acerca de las causas que provocaban dicha enfermedad. Primeramente se le atribuyó al aroma de las flores, pero Jacob de Rebecque(1691), quien sufría "catarro de heno", opinaba que las rosas emitían algo que irritaba su nariz y que provocaba una "agreción del color del agua"(30).

Más tarde, Postock(1819) hizo una descripción clínica exacta de la "fiebre de heno", la cual observó en sí mismo durante 30 años. Posteriormente fué Blackley(1873) quien demostró las causas de la producción del "catarro de heno", aplicando polen de toda clase de hierbas y plantas sobre la mucosa conjuntival y demostrando así su eficacia para producir ataques de catarro (5,16,30). Más tarde, diversos estudios llevaron a los investigadores al descubrimiento de la anafilaxia. Fueron Richet y Portier en 1901(30) quienes realizaron trabajos con extractos de anémonas de mar, las cuales producen exantemas muy intensos -

de tipo urticaria; dicho extracto fué aplicado a un perro dos veces, dejando un periodo de latencia, y ya recuperado el animal se le aplicó una tercera vez produciendo una reacción tan intensa que provocó la muerte. Esto dio lugar al descubrimiento de un nuevo fenómeno biológico.

Un año más tarde, Arthus(24,30) demostró que por medio de inyecciones repetidas por vía subcutánea de sustancias no tóxicas se producían infiltrados específicos que llegaban a convertirse en necrosis graves, asépticas, demostrando así la ausencia de sustancias tóxicas causantes de la lesión. Por esta época, Richard Otto explicó el mecanismo de la anafilaxia pasiva en animales por medio de transferencia de anticuerpos sensibilizadores, demostrando así la formación de anticuerpos en la anafilaxia. Estudios posteriores de Prausnitz y Küstner (24) demostraron la transferencia de anticuerpos anafilácticos en humanos comprobando la existencia de "sustancias específicas" como condición para que se produzca la reacción anafiláctica y denominadas "reaginas". Otro fenómeno observado fué la "enfermedad del suero", que se presenta en el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas por medio de sueros de animales. La explicación fué dada por Von Pirquet y Schick en 1905, quienes demostraron que, como consecuencia de la primera inyección de suero heterólogo, el hombre forma anticuerpos específicos contra dicho suero - (26,30).

El propio Von Pirquet (10), después de sus investigaciones sobre la enfermedad del suero, afirmó que en la intro

ducción intracutanea y percutanea de la tuberculina se produce una reaccion despues de la segunda inoculacion, y propuso el termino de "alergia" para designar la reaccion inmunologica alterada presente en la sensibilizacion con sustancias extrañas en general. Pero más tarde se modificó el significado de "alergia", -convirtiendose en sinónimo de hipersensibilidad y considerandose como un caso especial de inmunidad (42).

La alergia o hipersensibilidad en la actualidad se define como una reactividad inmunológica alterada a un antígeno, que puede dar lugar a reacciones patológicas en caso de contactos posteriores con este mismo antígeno. Existe un gran número de enfermedades humanas que representan a las reacciones alérgicas las cuales se manifiestan de diferente maneras y por ello resulta imposible clasificarlas dentro de un mismo grupo. Fue así como Gell y Coombs dividieron las reacciones en cuatro grupos:

Tipo I Anafiláctica o Hipersensibilidad inmediata

Tipo II Citotóxica

Tipo III Mediada por Inmunocomplejos

Tipo IV Hipersensibilidad Tardia

(10,24,26).

2.- ALERGENOS

En las reacciones alérgicas los antígenos causantes de la hipersensibilidad son llamados "alergenos", los cuales en una definición más general son aquellos que provocan cualquiera de las cuatro reacciones de hipersensibilidad (23). Pero para nuestros propósitos restringiremos la definición para aquellos causantes de la reacción tipo I en humanos, reacción inmediata que provoca rinitis alérgica, asma alérgica, urticaria, angioedema y anafilaxia. Sin embargo, estos alergenos no son dañinos para la mayoría de la gente, sino solo para aquellos individuos que están genéticamente predispuestos para responder inmunológicamente contra dichos alergenos (4).

Los alergenos son sustancias que se pueden encontrar comúnmente, ya que forma parte del medio ambiente y por lo tanto se tiene fácil y frecuente contacto con ellos. La mayoría se encuentran en el aire y suelen ser partículas relativamente grandes y complejas como pólenes, hongos, ácaros y polvo de las viviendas. Estas partículas contienen numerosos componentes, de los cuales solo algunos son antigénicos. Cuando se han identificado los componentes antigénicos específicos generalmente corresponden a proteínas con algunas subunidades de hidrato de carbono y la antigenicidad de esas moléculas depende fundamentalmente de su tamaño, configuración espacial

y grapes químicos (29,33,44)

La clasificación de los diferentes alérgenos se ha basado en su ubicuidad, localización e vía de penetración. Los pólenes por ejemplo, para producir manifestaciones alérgicas necesitan encontrarse en cantidades suficientemente grandes y ser transportados fácilmente por el viento, y deben ser producidos por una planta o hierba que esté ampliamente distribuida; además intervienen factores estacionales, ya que la cantidad de polen en la atmósfera depende también de las lluvias, el viento y el sol.

□ Las esporas de los hongos son transportadas por el aire lo cual puede ser una causa importante de alergia respiratoria. Este tipo de hongos no son patógenos; pueden presentarse en forma estacional o de manera perenne, y su crecimiento y distribución varían de acuerdo con las condiciones del clima. Así, el viento, la temperatura, la humedad y la localización geográfica determinan la abundancia del hongo.

La gravedad de las manifestaciones alérgicas producidas por hongos, al igual que en el caso de los pólenes, depende del grado de sensibilidad del enfermo, así como de su cantidad en el aire inspirado.

Entre los alérgenos inhalables se encuentran productos dárnicos de animales, como pelo y caspa de caballo, de gato, de perro y de conejo, plumas de aves, insecticidas, -- cereales y polvo casero (33).

Los alérgenos presentes en alimentos pueden producir las reacciones alérgicas casi instantáneamente después de haber ingerido el alimento o hasta diez horas después.

Los alérgenos que penetran por vía cutánea comprenden a los medicamentos y productos biológicos que se inyectan al individuo; aquí también pueden incluirse las picaduras de insectos como abejas, avispas y chinches.

En la actualidad se encuentran varias clasificaciones de alérgenos en la bibliografía, ya que no se ha establecido una clasificación aceptada mundialmente (17).

EXTRACCION DE ALERGENOS

En la actualidad existen diferentes formas de preparación de extractos de alérgenos, debido a que todavía no se adopta oficialmente ningún método. Entre estos se encuentran:

Extractos acuosos.-El material por extraerse generalmente se desengrasa con un disolvente orgánico(éter), - se suspende en amortiguador a 4°C, concluida la extracción se esteriliza mediante filtración en filtros microporosos, estos conservados en fenol, glicerina, liofilizados y en fenol con albúmina. El fenol inhibe el crecimiento microbiano, pero los extractos pierden potencia más rápidamente que con los glicerinados(7,15), especialmente a temperaturas de almacenamiento elevadas y diluciones débiles, por lo que deben mantenerse siempre que sea posible de 2-7°C.

Los extractos glicerinados son usados en pruebas cutáneas y en inmunoterapia, aunque las concentraciones elevadas de glicerina aumentan la incidencia de molestias y reacciones locales.

Los extractos liofilizados se utilizan principalmente para prácticas de poco volumen y trabajos de investigación debido a su alto costo.

Los extractos conservados en fenol con albúmina sérica humana se utilizan para los extractos de proteínas con veneno (33).

Extractos piridínicos("Allypyral").- Son suspen

ciones desarrolladas para satisfacer la necesidad de contar con antígenos que requieran absorción lenta, un menor número de inyecciones, aumentar la tolerancia de ciertos pacientes ultrasensibles a ciertos antígenos en particular y disminuir la posibilidad de reacciones generales. Ya que los extractos antigénicos hidrosolubles son absorbidos rápidamente, requieren inyecciones frecuentes y pueden producir efectos colaterales indeseables (25).

Los extractos alérgicos Allpyral son extraídos con piridina luego se agrega alumbre para precipitar complejos antigénicos que permiten retardar la liberación del antígeno y prolongar así el estímulo.

Los antígenos son lentamente absorbidos y puestos en circulación. Esta absorción gradual y sostenida disminuye las probabilidades de reacciones generalizadas. En estudios con antígenos de amebiasis, el proceso de extracción con piridina parece alterar o destruir la alérgenicidad del material, lo que produce niveles de anticuerpos bloqueantes y menos reacciones locales sistémicas (33).

Estos extractos contienen antígenos hidrosolubles y lipídicos y algunos investigadores mencionan que las fracciones oleosas son componentes importantes del complejo antigénico.

Estos extractos son empleados exclusivamente para inmunoterapia y no con fines diagnósticos, debido a su absorción lenta (23).

Existen nuevas formas de extractos pero actualmente - no se encuentran en el comercio, estos son los antígenos:alergoides, polimerizados y fotoinactivados. Estos antígenos pueden reducir las reacciones alérgicas frente a los extractos y mantener íntegra su potencia de inmunogenicidad.

Los antígenos alergoides se tratan con formol, los pólimeros cuando se combinan con lisina como adyuvante producen mayores títulos de anticuerpos bloqueantes que los extractos totales de polen por sí solos, aumentando la tolerancia a una mayor cantidad de proteína sin que se produzcan reacciones locales.

Los antígenos fotoinactivados con luz ultravioleta - permite administrar dosis mayores de antígenos con menores efectos adversos.

Los antígenos polimerizados con glutaraldehído producen una respuesta clínica favorable y se precisan menos inyecciones que con los extractos acuosos (3).

3.-ESTANDARIZACION DE ALERGENOS

La estandarización de los alérgenos implica el preparar patrones de extractos de alérgenos que representen la calidad y la actividad alérgica necesaria para su utilización en las pruebas de diagnóstico y para el tratamiento de enfermedades de origen alérgico.

Debido a que las enfermedades alérgicas son muy frecuentes en todo el mundo, existe una gran demanda de extractos alérgicos, de ahí la necesidad de contar con patrones adecuados para las pruebas de diagnóstico y tratamiento. Sin embargo en la actualidad no se llevan a cabo suficientes pruebas de control de calidad en la mayoría de los laboratorios que producen dichos extractos. Por lo tanto la calidad de los diferentes extractos varía de unos a otros según su fabricante y aún en diferentes lotes de un extracto preparado por el mismo laboratorio. Esto interfiere en los resultados de las pruebas, ya que dependen de la actividad alérgica presente en los alérgenos y ello crea frecuentemente desconfianza en los resultados de diagnóstico y dificultades para los tratamientos de desensibilización. (17).

La principal razón por la cual no se cuenta con patrones de extractos de alérgenos, es que sus principios activos son desconocidos en la mayoría de ellos, ya que son una mezcla

compleja de diversas sustancias y concentraciones desconocidas lo cual hace difícil la separación y purificación de sus componentes entre los que se encuentran proteínas, carbohidratos, lipoproteínas, compuestos nitrogenados no proteícos y sustancias irritantes (4,28,44).

Sin embargo son varias las técnicas que han sido utilizadas en investigación para su valoración, tanto de la actividad alergénica como de su composición química. Algunos adelantos se han obtenido por medio de técnicas biológicas, inmunológicas y fisicoquímicas. Entre estas técnicas se encuentran las pruebas cutáneas, la prueba de liberación de histamina de leucocitos, la prueba radicalergenesorbente (RAST), inmunoelectroforesis cruzada, radioinmunoelectroforesis cruzada e isoelectroenfoque (40,47,50).

Las pruebas cutáneas han sido utilizadas principalmente para diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas pero también, algunos científicos han intentado una estandarización, basándose en la pápula con eritema producida por una unidad de potencia equivalente de histamina, cuya concentración es de (1mg/ml) de clorhidrato de histamina (22).

Las pápulas provocadas por las inyecciones de los extractos son comparadas con esta unidad de potencia considerada como reacción positiva, determinando así la dilución de el extracto equivalente a esta referencia. Esta técnica es una de las más aceptadas por que es de fácil manipulación y el mate-

rial requerido es el común del laboratorio ya que no se necesitan aparatos sofisticados; otra de las razones es que es una prueba "in vivo", la cual puede valorarse en pocos minutos(2). Sin embargo esta técnica depende de muchas variables tales como la reactividad particular de la piel de cada paciente, la técnica utilizada para la preparación del extracto y otras sustancias irritantes presentes en este. Esta técnica comunmente es utilizada para comparar los resultados obtenidos de las pruebas "in vitro" (1,8,46,49).

La prueba de Liberación de Histamina de leucocitos -- sensibilizados es otro método que puede ser usado para determinar la potencia de los alérgenos, este método se asemeja más a la prueba "in vivo" por su sensibilidad(4,9). Esta técnica se fundamenta en la obtención de leucocitos de pacientes sensibilizados a un determinado extracto, en el cual un número constante de estos leucocitos es expuesto a diversas concentraciones del extracto en cuestión, provocando así la liberación de histamina de los leucocitos (28).

Esta prueba determina la cantidad de extracto necesario para la liberación del 50% del total de histamina.

Este método podría ser aplicado al problema general de la estandarización de los alérgenos . Sin embargo para la estandarización de extractos alérgénicos , uno requiere leucocitos frescos de pacientes sensibles, por lo tanto se requeri-

ría un gran número de pacientes sensibles a una considerable variedad de alérgenos como fuera necesario, si esta técnica fuera utilizada como un método general para la estandarización de los alérgenos (18,28,32).

La prueba "Radioalérgenosorbente" (RAST); es un procedimiento destinado a determinar la cantidad de anticuerpos - IgE circulantes específicos de el alérgeno, en el suero del paciente. Este alérgeno, unido en forma covalente a un disco de papel, reacciona con el anticuerpo IgE específico en la muestra del suero del paciente. Tras lavar la IgE inespecífica, se añaden anticuerpos marcados radiactivamente dirigidos contra la IgE, para formar un complejo, y la radiactividad de este complejo se mide fácilmente en un contador gama. Los resultados se comparan directamente con las cifras obtenidas en muestras de referencia corridas en paralelo con las muestras problema (33).

Para medir la potencia alérgica de los extractos se han utilizado principalmente dos procedimientos: el RAST directo y la inhibición del RAST. En el RAST directo, cantidades variables de extracto son acopladas a soportes de fase sólida y se determina la cantidad necesaria de extracto para obtener cierto grado de reactividad (28).

En la prueba de inhibición del RAST se determina la capacidad de el extracto para inhibir la unión de la IgE a la

fase sólida del alergeno, en el primer paso del RAST. Esto se basa en la competencia entre la fase sólida y la fase soluble del antígeno para unirse a los sitios receptores de la IgE y se expresa como la cantidad de extracto necesario para la -- inhibición del 50% de las uniones. En la práctica se determina el 50% de inhibición utilizando cantidades variables de -- extracto hasta definir la cantidad necesaria para producir -- el 50% de inhibición en la unión de anticuerpos IgE a la fase sólida del antígeno y como control se utiliza suero normal humano (6,27).

La inhibición del RAST es el método más recomendado porque permite una mejor cuantificación de la actividad de -- los componentes alérgicos en los extractos (32).

Algunos investigadores como Gleich, G. , opinan -- que el RAST es un método muy sensible y fácil de reproducir; en la fase sólida los alérgenos son muy estables y el anticuerpo IgE puede ser guardado indefinidamente después de ser liofilizado (28). Sin embargo el RAST no refleja directamente -- la potencia biológica de los alérgenos, por lo que se tiene -- que realizar conjuntamente con pruebas biológicas; este método es el que mejor correlaciona con las pruebas cutáneas pero no totalmente. La correlación entre el 50% de inhibición y -- las pruebas cutáneas, en varios estudios no fué la esperada; esto pudo deberse a que los extractos crudos utilizados probablemente tienen múltiples determinantes antigénicos por lo

tanto cada paciente no necesariamente produce anticuerpos contra los mismos determinantes, otra razón sería la presencia de IgE contra el mismo determinante (32,33,39).

El RAST se lleva a cabo bajo condiciones cuidadosas en laboratorios especializados usando material de alta calidad. Para poder utilizarse en la estandarización de extractos de alérgenos, este método primeramente debería ser estandarizado y comparado con una referencia estable. La estandarización del RAST involucra la estandarización del extracto del alérgeno acoplado al sorbente, del suero anti-IgE y del material sorbente y un sistema de referencia para el isótopo utilizado. La mezcla de suero humano como referencia es también una parte crítica ya que debería ser derivado de tantas personas como fuera posible para asegurar que los anticuerpos IgE de la mayoría de los antígenos estén presentes (1,22). - Los médicos generalmente no realizan este examen debido a su alto costo (32).

Los siguientes métodos que mencionaremos son técnicas que han sido utilizadas por los investigadores para fraccionar e identificar los componentes alérgicos en los extractos crudos. Estos métodos ofrecen gran información pero son costosos, sofisticados y requieren una cierta habilidad técnica.

Las técnicas de Inmunolectroforesis cruzada y de Radicinmunolectroforesis cruzada han sido utilizadas para -- fraccionar los extractos alérgicos. El análisis por medio de esta técnica ha revelado la gran heterogeneidad antigénica de los extractos. Ambas técnicas involucran electroforesis de un extracto alérgico, donde los componentes proteínicos de el extracto dependiendo de su carga eléctrica son separados -- por un campo eléctrico(32).

En la Inmunolectroforesis cruzada los extractos son analizados por electroforesis en agarosa, seguida por una -- electroforesis perpendicular a ésta, conteniendo antisuero de conejo, para indicar el número y posición de los diferentes -- componentes en el campo eléctrico, formandose una serie de -- bandas; posteriormente el gel es teñido con colorante para -- proteínas(43).

En la Radicinmunolectroforesis cruzada se realizan las dos electroforesis de igual manera y después el gel es -- prensado y secado para obtener una película fina; a esta se le adiciona IgG del suero de un paciente y la IgG reacciona con algunos de los antígenos presentes.

Las uniones IgG-Antígeno son identificadas y semi-cuantificadas agregando primero ¹²⁵I-anti-IgG , y después por -- medio de una autorradiografía es posible semi-cuantificar la actividad del isótopo unido a los complejos por medio de un --

sistema basado en el grado de radio-tinción de la autoradiografía y en la longitud de la línea de tinción.

La identificación de los antígenos que se encuentran en los complejos I-anti-IgE-IgE se realiza comparando la imagen obtenida en la inmunoelectroforesis cruzada y la obtenida en la Radioinmunoelectroforesis cruzada.

El tiempo de exposición de la película a los rayos X varía de un día a varias semanas, dependiendo de la actividad de las uniones(48).

Isoelectroenfoque.- Esta técnica ha sido una herramienta muy útil en el proceso de estandarización de los alérgenos ya que la mayoría de las técnicas comúnmente utilizadas emplean el extracto antigénico completo, sin tomar en cuenta la compleja mezcla de sustancias alérgicas y no alérgicas. Esta técnica se basa en hacer pasar el extracto completo a través de un gel de poliacrilamida preparado con un gradiente de pH, este gradiente permite a las diferentes proteínas que lo componen separarse unas de otras dependiendo de la región del gel donde se encuentre su punto isoelectrico (15).

Estudios realizados a diferentes preparaciones de extractos de un alérgeno por medio de esta técnica demuestra que hay una diferencia en la concentración de los componentes de los extractos de dicho alérgeno. De las fracciones que esta técnica revela no se sabe cuales son de importancia, pero

debido a la información que provee este método se puede obtener patrones que son usados para comparar un lote de otro y para identificar componentes de degradación y contaminantes (13,37).

Con ayuda de estas técnicas el grado de pureza de un alérgeno purificado puede ser determinado ya que demuestran gráficamente los numerosos componentes que contienen los extractos. También se puede obtener información acerca del comportamiento individual de los antígenos durante los procedimientos de extracción, almacenamiento y también sobre la reactividad cruzada entre los diferentes extractos. Así como de las uniones IgE del suero de pacientes alérgicos a uno o más antígenos de los extractos (9,32,37).

PART II EXPERIMENTAL

MÉTODOS

DIAGRAMA

Recolección del Material



Preparación de Alergenos



Alergización de conejos



Determinación de la máxima dilución que dé reacción positiva en conejos de 2+ o 3+



Determinación de la máxima dilución que dé reacción positiva de 2+ o 3+ en pacientes alergizados, tomando como patrón la mayor dilución positiva en conejos.



Caracterización química espectrofotométrica de la máxima dilución que dió reacción positiva 2+ o 3+ en pacientes alérgicos.

Todo el material y los reactivos utilizados en la parte experimental se encuentran en el Apéndice pag.

TECNICAS DE PREPARACION
DE
EXTRACTOS ALERGENICOS

2.1 TECNICA DE EXTRACCION DE POLVO CASERO Y POLEN

- 1.- Colectar el polen de las plantas ya sea flor, arbol o hierba, el polvo se recolecta de alguna habitación o de algún sitio geográfico, procurando lo más posible que esté libre de otras partículas contaminantes como partículas orgánicas procedentes de animales.
- 2.- Tamizar el polvo y el polen para obtener las partículas más finas.
- 3.- Se desengrasa con alcohol-éster (50%-50%).
- 4.- Se prepara una mezcla peso a volumen de el alergeno en solución acuosa. Se pesa 1g. de el alergeno por 100ml. de amortiguador pH 8.2 para extraer las fracciones solubles del alergeno. Esto se lleva a cabo a temperatura de refrigeración de 4° - 8° C con agitación constante durante ocho días.
- 5.- Centrifugar a 6000g durante 20min. con el proposito de separar la fase acuosa del precipitado.
- 6.- Filtrar el sobrenadante a través de papel filtro de poro grueso y luego más fino.
- 7.- Dialisar con papel celofán hasta eliminar sustancias colorantes y sustancias irritantes, aproximadamente durante cuatro días. La diálisis se hará contra amortiguador de fosfatos pH 8.2, con cambios de tres veces por día , el -

último día los cambios de amortiguador se harán con el de fosfatos pH 7.2 0.15M.

- 8.- Determinar la concentración de proteínas y carbohidratos espectrofotométricamente.
- 9.- Adicionar conservador en proporción a la cantidad preparada de el extracto. En este caso fenol al 4%.
- 10.- Esterilizar por medio de filtración con membrana de 0.22 micrometros.
- 11.- Envasar en frascos de tamaño apropiado e identificar de manera inequívoca cada extracto.
- 12.- Mantener en refrigeración a 4-7°C y descartar cualquier extracto que llegue a la fecha de caducidad - (6 meses a partir de la fecha de envasado final).

2.2 TECNICA DE EXTRACCION DE ANTIGENOS DE HONGOS

ALTERNARIA

- 1.- Preparar medio líquido Sabouraud en un matras de un litro, y medio sólido en tubos de ensayo 16X150 inclinados, esteril.
- 2.- Aislar una cepa de Alternaria, a partir de un cultivo del mismo, con ayuda de una asa micrológica se resienbra en un tubo con medio Sabouraud inclinado, y cuidadosamente caracterizar sus propiedades macroscópicas y microscópicas en medio sólido.
- 3.- La cepa aislada se resienbra en medio líquido de Sabouraud en matras de 1lt., para obtener una buena cantidad del hongo.
- 4.- El cultivo se mantiene durante 15 días, sin agitación, a temperatura ambiente.
- 5.- Se separa la nata formada por el hongo con una asa micrológica y se lava con solución salina isotónica, centrifugando a temperatura ambiente por echo a diez ocasiones, con el fin de eliminar el medio de cultivo.
- 6.- Con ayuda de papel filtro se absorbe toda la solución salina posible y se deja secar a temperatura ambiente.
- 7.- Se desengrasa con alcohol - éter (50%-50% v/v).
- 8.- Se pesa 1g del hongo y se adicionan 100ml. del amortiguador pH 8.2 para realizar la extracción.
- 9.- La extracción se realiza a temperatura de refrigeración -- (4°-7°C) con agitación constante durante 7 a 8 días.

- 10.- Se filtra por papel filtro de poro grueso y se obtiene el sobrenadante.
- 11.-Dializar en tubos de celofán durante siete días para eliminar pigmentos y posibles sustancias irritantes, con tres cambios de amortiguador pH 8.2 por día . Las dos últimas dialisis se harán contra amortiguador de fosfatos pH 7.2 0.15M.
- 12.- Determinar la concentración de proteínas y carbohidratos - por el método espectrofotométrico.
- 13.- Adicionar conservador en proporción a la cantidad preparada, en este caso fenol al 4% .
- 14.- Esterilizar por filtración con membrana de 0.22micrometro.
- 15.- Envasar en frascos tipo vacuna de 50ml.
- 16.- Mantener en refrigeración a 4^o-7^oC y descartar cualquier extracto que llegue a la fecha de caducidad(6 meses a partir de la fecha de envasado final).

CANDIDA

Los pasos 1, 2, 3, se llevan a cabo igual que con la Alternaria.

- 4.- El cultivo se mantiene durante 2 días, con agitación a temperatura ambiente.
- 5.- Se centrifuga a 2000 g. 3 minutos y se lava con amortiguador pH 8.2 cinco veces, con el fin de eliminar el medio de cultivo.
- 6.- Resuspender la Candida en amortiguador e inactivar a 56°C 15 minutos a baño maría.
- 7.- Se filtra por papel Whatman No. 42 y se deja secar en el papel filtro a temperatura ambiente.
- 8.- Desengrasar con alcohol -ster (50%-80% v/v).
- 9.- Resuspender con amortiguador pH 8.2
- 10.- Romper la pared celular congelando y descongelando aproximadamente 10 veces, de preferencia a -50°C.
- 11.- Centrifugar a 5000rpm. durante 30min.
- 12.- Obtener el sobrenadante.
- 13.- Dializar durante 2 días contra el amortiguador pH 8.2 ; las dos últimas dialisis se harán contra amortiguador pH 7.2 - 0.15N.

Los siguientes pasos se realizan igual que a partir del paso 12 de la Alternaria

2.3 - MEDIDAS DE SEGURIDAD

La inhalación directa de los alérgenos puede provocar reacciones alérgicas inmediatas, en el caso de estar sensibilizados a los alérgenos en cuestión; también el contacto constante con dichos alérgenos podría provocar una sensibilización a; polenes, hongos, y al polvo. Es por eso que deben tomarse precauciones para trabajar en el laboratorio con los alérgenos, al momento de pesar los alérgenos debe utilizarse un cubrebocas, para proteger la nariz y la boca. Los hongos con los cuales se trabaja en la preparación de extractos de alérgenos no son patógenos, habitualmente. La mayoría son hongos contaminantes, por lo cual no es necesaria una excesiva precaución en su manipulación.

Otra precaución que debe tomarse en cuenta es al trabajar con la solución alcohol-éter en el desengrasado, ya que esta solución es muy volátil e inflamable, por lo tanto, deberá trabajarse en un lugar donde no halla aparatos que pudiesen provocar chispas.

VALORACION DE LOS ALERGENOS

EN ANIMALES

3.1 METODO DE ALERGIZACION A CONEJOS AL POLVO CAFEERO, HONGOS, POLENES. (14)

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos de 2Kg. , un conejo por cada alergeno. Los conejos deben estar en cuarentena antes de ser utilizados para asegurarse de que no sufren ningún padecimiento.

La técnica utilizada fué la siguiente:

- Rasurar el lomo de los conejos, mojando el pelo con agua y detergente
- Limpiar perfectamente bien la zona de inoculación.
- Cargar jeringas de 5ml con agujas del No.20 , con 1.5ml de adyuvante de Freund completo y con 1.5ml del extracto del alergeno(concentrado) que se vaya a utilizar (50%-50%); homogenizar hasta obtener una emulsión espesa.
- Con el material así preparado se inyecta el lomo del conejo intradérmicamente, formando de 8 a 10 botones.
- Diez días después se aplica el extracto con el adyuvante incompleto de Freund, de la misma manera como se aplicó el completo.
- Diez días después se realizan pruebas cutáneas intradérmicas en los costados , como sigue:
Rasurar los costados del conejo, mojando el pelo con agua y detergente, y limpiar perfectamente la zona de inoculación.

- Emplear jeringas de tuberculina o insulina estériles y nuevas con agujas del No.25 por 16mm.
- Se cargan las jeringas con diferentes diluciones logarítmicas (de base 10) , desde concentrado hasta 1:1000 del extracto alérgico.
- Se inyecta 0.1ml intradermicamente, dejando un espacio de 5cm entre cada inyección.
- Si en algunas de las diluciones se obtiene reacción positiva de 3 o más cruces (3X3mm =1+; 6X6mm=2+; 10X10=3+) se considera que el conejo ya está alérgico. Y si no es así proseguiremos a hacer un refuerzo con adyuvante de Aluminio, las veces que sea necesario, dejando un intervalo de diez a catorce días entre cada refuerzo.

ADYUVANTE DE ALUMINIO

Se preparan 50ml de amortiguador salino de fosfatos (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4) pH 7.6 a 33ml de solución amortiguador se agregan - 0.2ml de NaOH 2M + 1ml del extracto de alérgeno, se mezclan - muy bien y se adicionan 2ml de AlCl_3 0.1M . Dejar precipitar durante dos horas, quitar aproximadamente 10ml del sobrenadante y adicionar 15ml del amortiguador de fosfatos. Mezclar y - dejar sedimentar por dos horas más. Se separa el sobrenadante por centrifugación y el sedimento se inyecta en el conejo intradérmicamente, en la parte superior del lomo, formando botones (14).

3.2 APLICACION DE PRUEBAS CUTANEAS INTRADERMICAS EN CONEJOS.

Una vez sensibilizado el conejo se procede a valorar el alérgeno por medio de pruebas cutáneas intradérmicas, aplicadas en la misma forma que la mencionada anteriormente.

- Se aplicará un control negativo, utilizando el amortiguador empleado en la extracción del alérgeno.
- Se aplicará un control positivo con una solución de clorhidrato de histamina al 0.01%.
- La mayor dilución que produzca una reacción de 3 cruces será la dilución utilizada como "concentrado" para preparar las diluciones que se aplicarán a los pacientes.

VALORACION DE LOS ALERGENOS

EN PACIENTES

4.1 PRUEBAS CUTANEAS INTRADERMICAS

Para el diagnóstico de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, para detectar anticuerpos IgE frente a antígenos específicos, se han empleado las pruebas cutáneas intradérmicas; en este tipo de pruebas la piel reacciona al alérgeno, en la mayoría de los casos, con reacción de tipo I aún cuando sus síntomas ocurran en otros "órganos blanco", como la nariz, la conjuntiva, los pulmones o el sistema digestivo. Estas pruebas se basan en el concepto de que en el organismo alérgico se hallan los anticuerpos no sólo fijados en las células cebadas del "órgano blanco", sino también en las células cebadas de la piel. En estas pruebas intradérmicas, minutos después de introducir el alérgeno la sustancia vasoactiva liberada por las células provoca una vaso dilatación y edema localizado, con prurito por un aumento de la permeabilidad vascular (5) (24).

Estas pruebas tienen la ventaja de que el material inyectado es fácil de medir y la irritación traumática de la piel es escasa; también resultan confiables porque la experiencia durante muchos años ha demostrado su utilidad para el diagnóstico en la mayoría de los pacientes con enfermedad alérgica probable, correlacionando con su historial clínico.

La indicación más importante para realizar pruebas cutáneas es una sospecha razonable de que un alérgeno específico o un grupo de ellos producen síntomas en un paciente alérgico

Deben observarse, sin embargo, ciertas precauciones al practicar las pruebas cutáneas: No deben practicarse durante los periodos de "broncoespasmo sintomático", para evitar el empeoramiento del estado clínico; deben tenerse a mano materiales para el tratamiento de urgencia, en caso de una posible reacción sistémica; puede realizarlas una enfermera o un técnico debidamente preparado, pero debe haber cerca un médico disponible de modo -- inmediato (31).

Las pruebas cutáneas pueden dar reacciones falsas negativas o falsas positivas. Los resultados falsos negativos se pueden deber a errores técnicos, pérdida de potencia de las soluciones alérgicas o abuso previo de fármacos que suprimen la reactividad cutánea. En algunas ocasiones, los pacientes presentan sensibilidad a un alérgeno a nivel del "órgano blanco" pero no en la piel.

Los resultados falsos positivos se pueden deber a errores en la preparación o en la administración de las soluciones alérgicas, desviaciones del pH, presencia de irritantes o de sustancias que producen liberación de histamina en forma inespecífica (2.,30,33).

4.2 TECNICA DE APLICACION DE LAS PRUEBAS CUTANEAS INTRADERMICAS

Se emplea la dilución requerida del alérgeno, una solución de clorhidrato de histamina al 0.01% como control positivo y el amortiguador utilizado en la extracción, como control negativo.

Los inóculos se aplican en la parte externa del brazo, en serie sucesiva y a una distancia entre sí de 5cm; - también pueden aplicarse en la parte interior del antebrazo y - en la espalda. En la práctica se hace lo siguiente : se llenan jeringas estériles de 1ml de plástico desechables de tipo tuberculina, con 0.1ml aproximadamente de la solución de prueba.

Se limpia la piel del paciente con alcohol al 70 % y se introduce, entre las capas de la epidermis y dermis, una cantidad de solución alérgica que produzca una pápula de 1 a 3 mm de diámetro.

La reacción inmediata se desarrolla dentro de - los primeros 15 a 30 min. , y se considera como reacción positiva la formación de una pápula central elevada y edematosa que presenta , a veces , pseudópodos de color rosa pálido, rodeado de una mácula roja , ancha y superficial.

Al medir el tamaño del eritema con una regla - milimetrada , los resultados de la reacción se expresan habitualmente por número de cruces de 1+ a 3+, según el diámetro -

de la pápula; 3X3mm(1+); 6X6mm(2+); 10X10mm(3+), estas son medidas aproximadas por lo que debe tomarse en cuenta el criterio obtenido con la experiencia.

La pápula producida por la reacción inmediata desaparece por completo entre 60 y 90 minutos después.

La reacción intradérmica retardada puede presentarse en casos de reacciones intensas, y su desaparición total se retrasa durante 6 horas después. Esta reacción se distingue de la reacción tardía porque esta última se desarrolla varias horas después bajo la forma de una pápula, como nódulo, parcialmente doloroso e infiltrado en la profundidad; tarda días en desaparecer. La "reacción tardía" va precedida ocasionalmente por una reacción inmediata (24) (30).

VALORACION FISICO - QUIMICA
DE LOS ALERGENOS

5.1 DETERMINACION DE PROTEINAS A 280nm.

La absorción a 280nm de las proteínas se debe a la presencia de residuos de tirosina y triptofano, ya que la concentración de estos aminoácidos se presentan en una proporción prácticamente constante en las proteínas(34)(31).

Procedimiento.-

Preparación de la curva patrón: En una serie de tubos preparar diluciones desde el concentrado hasta la dilución 1:16. El aparato se calibra con el amortiguador a cero de absorbancia y después se hacen las lecturas de la curva patrón y se grafican contra la concentración sobre papel milimétrico.

Posteriormente se hace la lectura de cada muestra y se interpolan las lecturas en la curva patrón para determinar la concentración de proteínas de los alérgenos.

5.2 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS POR EL METODO DE LA ANTRONA (20,36,45)

La antrona en ácido sulfúrico es un reactivo general para carbonhidratos, incluyendo azucares, polisacaridos, glucidos, ésteres. La reacción se basa en la formación de derivados del furfural por deshidratación y ciclación de las moléculas.

Preparación de la curva patrón.

A una serie de tubos de ensaye que contengan 2ml cada uno del reactivo de antrona y mantenidos en hielo, se agrega el volumen necesario de la solución patrón de glucosa para tener concentraciones de 12.5 , 25 , 50 , y 100mcg/ml y se completa el volumen a 3ml con agua destilada; los reactivos deben de quedar en capas cuidadosamente estratificadas.

Preparación de las muestras del alergeno.

-A otros tubos conteniendo 2ml del reactivo de antrona mantenidos en hielo, se agrega 0.1ml de la muestra del alergeno y se completan a 3ml con agua destilada en capas estratificadas

- Se hace un blanco con 1ml de agua destilada y 2ml del reactivo de antrona.

- Se agitan vigorosamente todos los tubos sin sacarlos del baño de hielo , para homogenizar perfectamente.
- Se colocan los tubos en un baño de agua a ebullición durante 16 minutos y después se pasan a baño de agua fría.
- Se hacen las lecturas en el espectrofotómetro a 625m μ .
- Las lecturas de la curva patrón se grafican contra la concentración sobre papel milimétrico.
- Se interpolan las lecturas de las muestras en la curva patrón y se determina la concentración de carbohidratos.

IV.-RESULTADOS

Los resultados que se obtuvieron en la alergización de los conejos fueron buenos, ya que el método utilizado fue muy efectivo. Primero se aplicó el alergeno correspondiente con el adyuvante de Freund completo e incompleto, y posteriormente se hicieron refuerzos utilizando el adyuvante de Aluminio, el cual provocó una mayor sensibilización en los conejos. Esto se realizó con los cinco diferentes alérgenos (Fresno, Helianthus, Candida, Alternaria y Polvo casero) en forma semejante.

El extracto de alergeno fue aplicado en el conejo en diluciones 1:1000, 1:100, 1:10 y el concentrado, y los resultados fueron: La dilución 1:1000 no produjo respuesta visible con ninguno de los alérgenos.

Con la dilución 1:100 hubo respuesta de 2+ (claramente positiva) en el caso del Fresno y Polvo casero, pero en Candida, Alternaria y Helianthus la mayoría de las respuestas fueron del grado 1+ (positiva débil).

En la dilución 1:10 la mayoría de las respuestas observadas fue de 2+ a 3+ con los cinco diferentes alérgenos; por lo tanto, esta dilución se tomó como la más representativa.

La solución concentrada provocó una reacción de 3+ o 4+ en algunos casos.

Sin embargo, en las pruebas repetidas que se realizaron con las diferentes diluciones hubo a veces variaciones en las reacciones, lo cual puede explicarse por la variabilidad inherente al uso de sustratos biológicos.

La dilución que produjo una respuesta de 2+ a 3+ fué tomada como el "concentrado" para la preparación de las diluciones aplicadas a los pacientes, con el fin de controlar la actividad alérgica y así no provocar reacciones indeseables en el paciente.

De cada "concentrado" se prepararon diluciones 1:1000, 1:100 y 1:10 en solución salina fisiológica las cuales fueron aplicadas a los pacientes comenzando por la dilución más alta; con esta primera dilución (1:1000) no se obtuvo reacción visible con ninguno de los alérgenos. Posteriormente se aplicó la dilución 1:100, con la cual se obtuvo respuesta de 2+ en uno o dos pacientes de cada alérgeno, de 1+ en algunos casos y en otros no fué visible una reacción. La dilución 1:10 se aplicó después y se obtuvieron respuestas de 2+ a 3+ con todos los alérgenos, y por lo tanto ésta fue la dilución que se tomó como representativa de la actividad de dichos alérgenos, capás de provocar la respuesta alérgica inmediata en la piel.

Todas estas pruebas se realizaron junto con un control positivo (histamina) y un control negativo (amortiguador).

Las pruebas fueron aplicadas a pacientes en los que previamente se había demostrado sensibilidad al alérgeno que se les aplicó.

Las figuras 1, 2, 3, 4, y 5 presentan una valoración de la respuesta a cada alérgeno, en relación a la intensidad de reacción producida en las pruebas cutáneas, contra la dilución aplicada a los pacientes.

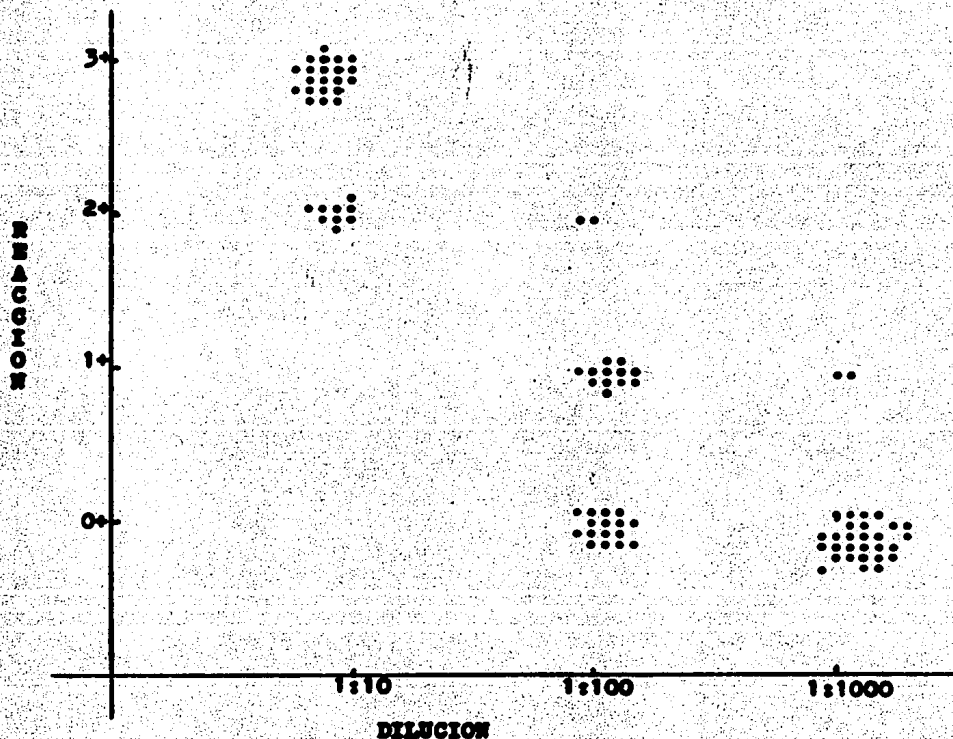
A las diluciones tomadas como representativas para determinar el diagnóstico de enfermedad alérgica, dilución 1:10 en los cinco casos, se les determinó su contenido de proteínas y de carbohidratos por métodos espectrofotométricos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Ver tabla I):

TABLA I

**CONCENTRACION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS DE LOS ALERGENOS:
HELIVANTHUS, FRESNO, CANDIDA, ALTERNARIA y POLVO CASERO**

	<u>Concentraci6n μg/ml diluci6n 1:10</u>	
	Proteinas	Carbohidratos
HELIVANTHUS	26 μ g/ml	1 μ g/ml
FRESNO	35 μ g/ml	1.5 μ g/ml
CANDIDA	13 μ g/ml	3.6 μ g/ml
ALTERNARIA	20 μ g/ml	4.5 μ g/ml
POLVO CASERO	40 μ g/ml	1 μ g/ml

FRESNO



DILUCION
FIGURA No. 1

**VALORACION DE LA RESPUESTA ALERGICA CONTRA LA
DILUCION APLICADA DEL ALERGENO DE FRESNO
(cada punto representa 1 paciente)**

CANDIDA

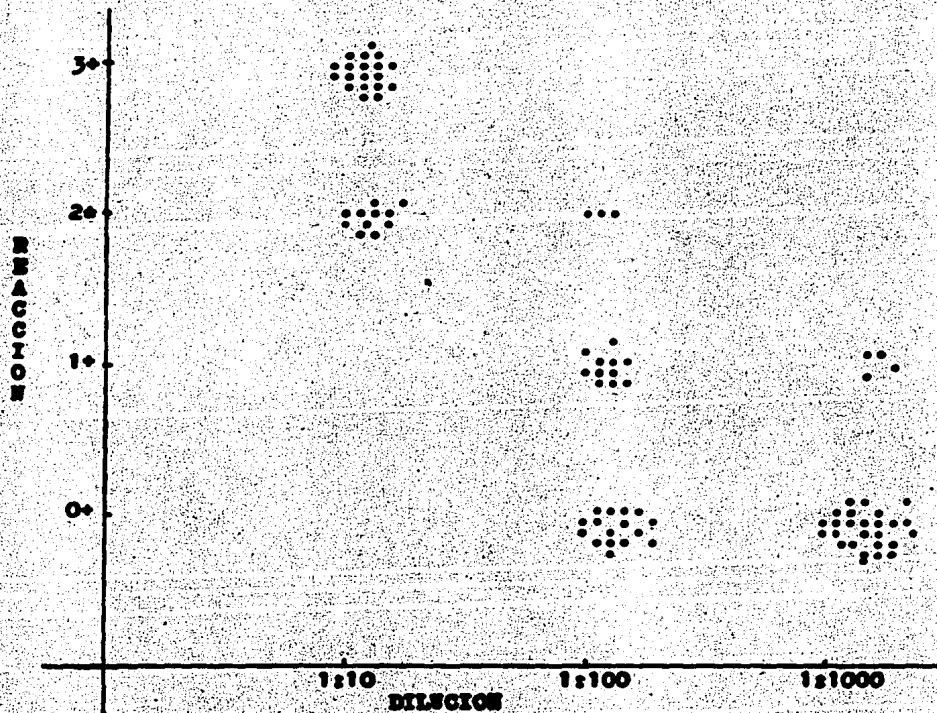


FIGURA No. 2

**VALORACION DE LA RESPUESTA ALERGICA CONTRA LA
DILUCION APLICADA DEL ALERGENO DE CANDIDA**

(cada punto representa 1 paciente)

ALTERNARIA

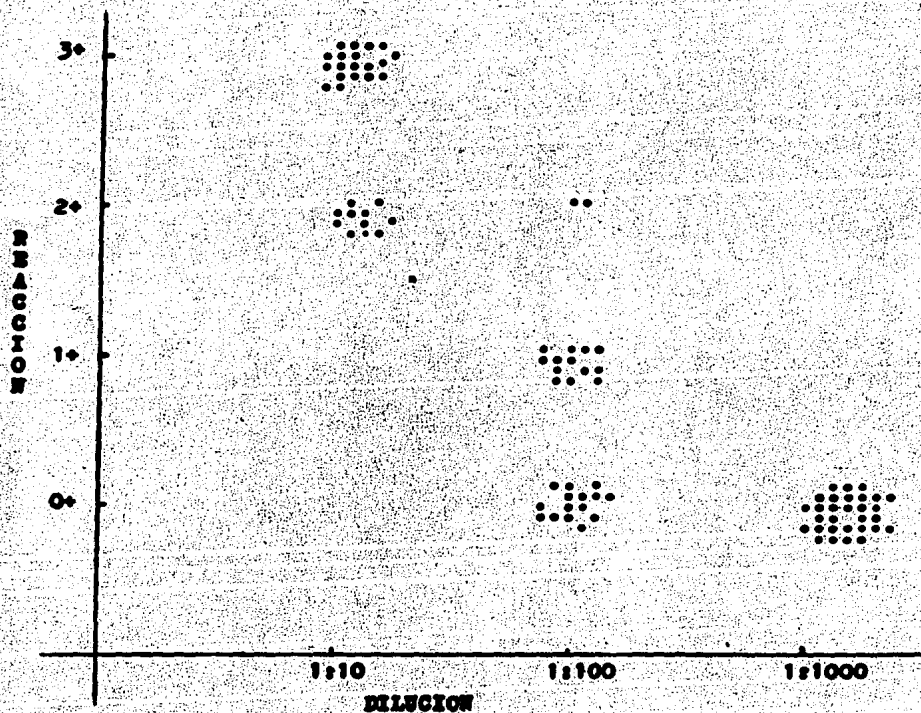


FIGURA No. 3

**VALORACION DE LA RESPUESTA ALERGICA CONTRA LA
DILUCION APLICADA DEL ALERGENO DE ALTERNARIA
(cada punto representa 1 paciente)**

POLVO CASERO

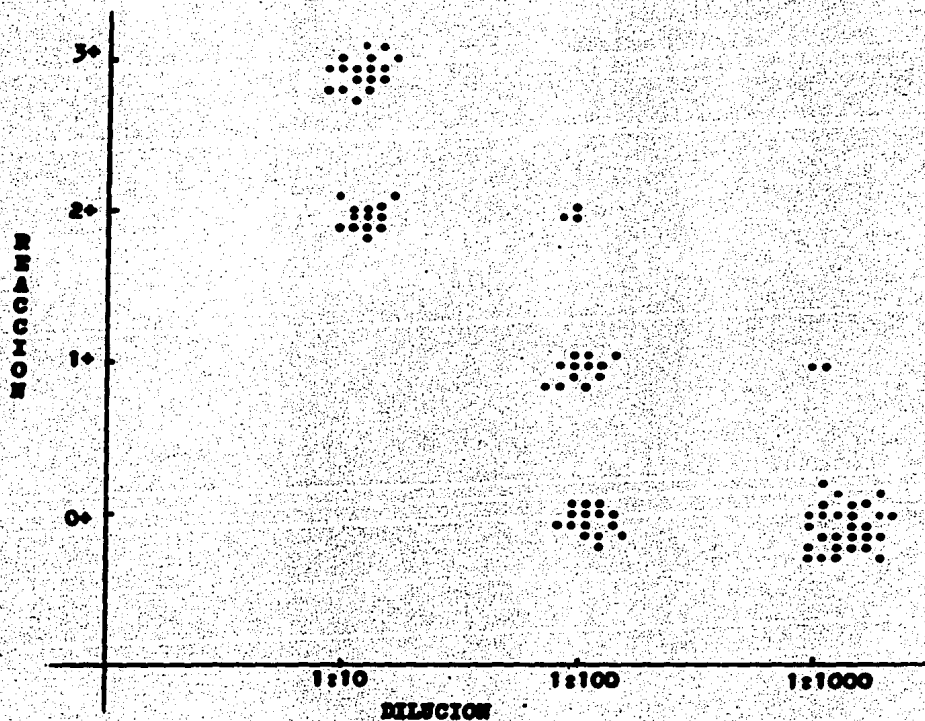


FIGURA No. 4

**VALORACION DE LA RESPUESTA ALERGICA CONTRA LA
DILUCION APLICADA DEL ALERGENO DE POLVO CASERO
(cada punto representa 1 paciente)**

HELANTHUS

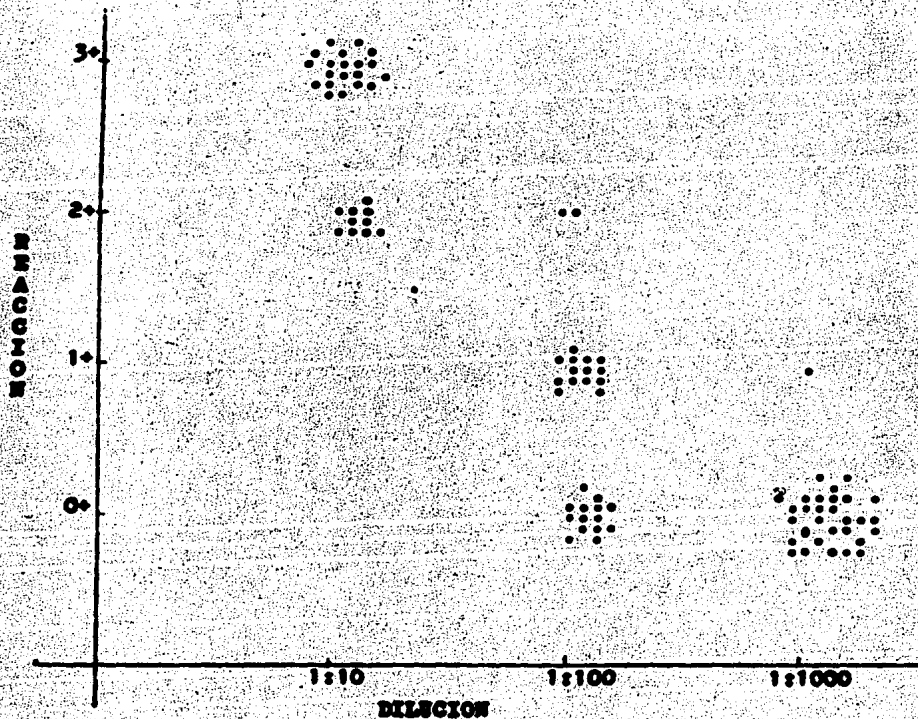


FIGURA No. 3
VALORACION DE LA RESPUESTA ALERGICA CONTRA LA
DILUCION APLICADA DEL ALERGENO DE HELIANTHUS
(cada punto representa 1 paciente)

V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

En la actualidad se buscan métodos que se puedan llevar a cabo rutinariamente para la valoración "in vitro" de los alérgenos, ya que las respuestas "in vivo" pueden variar en los pacientes dependiendo de su susceptibilidad individual, su edad, sexo, raza, etc.

En este trabajo se observaron variaciones en la respuesta de los conejos en las pruebas cutáneas, cuando estos se encontraban resfriados o embarazados, siendo las respuestas muy bajas en relación a las de los animales normales.

En las respuestas a las pruebas cutáneas se observan variaciones que dependen de su aplicación, ya sea profunda o superficial, así como del volumen de alérgeno aplicado y de la concentración del extracto; también influye la presencia de sustancias tóxicas o irritantes. La lectura de los resultados de las pruebas, debido a que pueden existir diferentes criterios para su interpretación, es a veces causa de variabilidad.

De todo ello se desprende la gran necesidad de contar con patrones valorados químicamente, que le den una base más objetiva a las pruebas y se puedan obtener valores más confiables al practicar los exámenes de diagnóstico y durante el tratamiento, ya que en la actualidad en la mayoría de los laboratorios la preparación de estos extractos es totalmente empírica. En algu

nos laboratorios se llevan a cabo en la actualidad técnicas muy sofisticadas y de alto costo, pero se trata de pruebas cuya utilización no puede generalizarse, al menos por ahora.

Sin embargo, los resultados de este trabajo nos han demostrado que sí es posible la preparación de patrones valorados químicamente para ser utilizados durante la fabricación de alérgenos. Es importante hacer notar la necesidad de métodos "oficiales" para la obtención de los productos "crudos" (pólenes, hongos, polvos, etc.), y así mismo para la elaboración de los extractos, con sus valoraciones correspondientes "in vivo" e "in vitro", a fin de obtener resultados comparables en la práctica diaria de la especialidad.

VI.- RESUMEN

El trabajo que se realizó fue la preparación de patrones de algunos alérgenos empleados para el diagnóstico de pacientes alérgicos en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital General de la Secretaría de Salud. Existe una gran necesidad de contar con materiales de referencia para poder realizar el control de calidad, de los extractos alérgicos, a fin de que su potencia y especificidad sean reproducibles y sea posible la preservación de sus características durante un tiempo razonablemente largo (6 meses a un año).

La secuencia, utilizada para dicha valoración fue primeramente la elección de la técnica de preparación de los extractos. Esta técnica fue la utilizada en el Servicio antes mencionado, con algunas modificaciones. Después se hizo la valoración de la potencia en conejos previamente alergizados, para determinar su reactividad en animales. Posteriormente, los extractos fueron inyectados a los pacientes en diferentes diluciones logarítmicas, partiendo de la máxima dilución que dió reacción claramente positiva (2+ a 3+) en los conejos. A las diluciones que en pacientes provocaron una reacción positiva (2+ a 3+) se les determinó la cantidad de proteínas espectrofotométricamente a 280m μ , y la cantidad de carbohidratos por el método de la Antrona, con el propósito de definir estas características y utilizarlas posteriormente para la estandarización de otros extractos alérgicos.

Será necesario realizar más pruebas para llegar a establecer las características que debe presentar un extracto -- alergénico satisfactorio, bien estandarizado, que nos permita obtener resultados reproducibles para mejorar la valoración diagnóstica y tener mayor seguridad en la efectividad de los tratamientos - desensibilizantes.

A P P E N D I C E

MATERIAL Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS TECNICAS DE PREPARACION DE ALERGENOS Y EN LA VALORACION FISICO-QUIMICA DE LOS ALERGENOS

Equipo.- Espectrofotometro PMQ II ZEISS

- Balanza analítica
- Centrífuga IEC 115Volts 50 ciclos
- Agitador magnético
- Microscopio

Reactivos.-

- Amortiguador de Fosfatos pH 6.2 (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4) 0.15M
- Amortiguador de Fosfatos pH 7.2 (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4) 0.15M
- Medio de cultivo Sabouraud líquido y sólido
- Agua destilada
- Almidón de algodón
- Solución salina isotónica
- Solución alcohol-éter(50%-50%)
- Fenól 0.04%
- Solución estandar de Albumina bovina 1mg/ml
- Solución de Antroon al 0.2% en ácido sulfúrico al 95% (preparar al momento de utilizarse)
- Solución patrón de glicosa con 100mg/ml

Material.-

- vaso de precipitado 250ml
- matras Erlenmeyer 200ml, 1000, y 2000ml
- probetas 100ml
- tubos de ensayo 12X75, 13X100, 16X150

- gradilla
- pipetas 0.1ml, 1ml, 5ml, 10ml
- baño de hielo
- baño maría
- portaobjetos
- cubreobjetos
- espátula
- asa micológica
- agitador de vidrio
- papel filtro de poro grueso y Wathman No.42
- bolsa para dialisis
- matras volumétrico de 100ml
- cubetas de cuarzo de 1cm de paso de luz

MATERIAL Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LA VALORACION DE LOS ALERGENOS , POR MEDIO DE PRUEBAS CUTANEAS EN CONEJOS Y EN PACIENTES

Material biológico.-

- Conejos de 2Kg de peso, blancos Nueva Zelanda.

Reactivos.-

- Clorhidrato de histamina al 0.01%
- Amortiguador pH 7.2 ($\text{KH}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) 0.15M.
- Adyuvante de Freund Completo e Incompleto.
- Adyuvante de Aluminio.
- Alcohol al 70%

Material.-

- Jeringas de 5 ml aguja No 29
- Jeringa tipo Insulina aguja No. 25 por 16mm
- Navajas de afeitar
- algodón
- detergente
- Regla milimetrada

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

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aas K. (1974)"Standardisation of allergen extracts"Int.WHO-
IABS Symp. on Standardisation and Control of Allergens Admi-
nistered to Man. Develop. Biol. Standard. 29: 341-351
- 2.- Aas,K.(1975)"Clinical and experimental aspects of Standar-
disation and purification of allergen" Int.Archs.Allergy
Appl. Immun. 49:44-54
- 3.- Aas,K. (1976)"Perspectives in allergen standardisation:sug-
gested starting requirements" Reprinted from Allergy and
Clinical Immunology. Proceedings of IX International Con-
gress of Allergology; Buenos Aires. Excerpta Medica Inter-
national Congress Series No.414 p.199-202
- 4.- Aas,K. (1978)"What makes an allergen an allergen" Allergy
33:3-14
- 5.- Arasa,F.(1960) Tratado de alergia Edit.Cientifico-Médica
Barcelona. p.10,334
- 6.- Akiyama,Miyamoto and Horiuchi.(1979) "A new method of aller-
gen standardization " J.Allergy Clin.Immunol.63:354-360
- 7.- Ayuso,R.(1984)"Stability of Lolium perenne extract" Anal.
Allergy 53:426-431
- 8.- Baer,H.(1975)"Purification and characterisation of allergens"
ALLERGOLOGY. Chapter 14,Int.Congress of Allergology Tokyo.
Edit.Committe Excerpta Medica Amsterdam. American Elsevier
Publishing Co.Inc.N.Y. p.379-380

- 9.- Baldo, B. (1983) "Standardisation of Allergens" *Allergy* 38:555-546
- 10.- Bellanti (1981) *INMUNOLOGIA* 5^a ed. Editorial Interamericana México. p.11,257-258
- 11.- Berrens, L. (1973) "Plural Actions of Allergens" *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 42:63-73
- 12.- Boyd, W.C. (1963) *Fundamentos de Inmunología* 3^a Edit. Universitaria de Buenos Aires p.77-80
- 13.- Brighton, W.D. (1974) "Profiles of allergen extract components by isoelectric focussing and radioimmunoassay" *Int. WHO-IABS Symp. on Standardization and Control of Allergens Administered to Man. Develop. Biol. Standard.* 29:362-369
- 14.- Calderon, N.S. Comunicación personal.
- 15.- Center, J.G. ET AL. (1974) "Stability of antigen E in commercially prepared ragweed pollen extracts" *Int. WHO, IABS Symp. on Standardization and Control of Allergens Administered to Man.* 29:114-122
- 16.- Cripe, L. (1960) *Essentials of Allergy* Edit. J.B. Lippincott Company. p.79,177
- 17.- Desbordes, J. (1974) "The need for standardization of allergenic extracts utilized in humans for diagnosis and therapy" *Int. WHO-IABS Symp. on Standardization and control of Allergens administered to Man.* 29:267-275
- 18.- Desbordes, J. (1974) "Problème raised by potency evaluation of allergen preparations" *Int. WHO-IABS Symp. on Standardization and Control of Allergens Administered to Man.* 29:219

- 19.- Ereborg, S.M.D. (1987) "The precision of intracutaneous skin test with Timothy pollen allergen" *Anal. Allergy* 58:33
- 20.- Dreywood, R. (1946) "Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal.* 18:449
- 21.- Franklin, V.A. (1980) *Alergenes Editorial Mir. Moscú.* p203
- 22.- Frankland, A.W. (1980) "Standardization of allergen preparation" *Allergy* 35:216-218
- 23.- Fuchs, A.M. and Strauss, M.B. (1959) "The clinical evaluation and the preparation and standardization of suspensions. *J. Allergy* 10:66
- 24.- Fudenberg, H.H. (1980) *Manual de Inmunología Clínica 5ª Ed. Edit. El Manual Moderno S.A. México.*
- 25.- Gaillard, G.E.; Schellin, B. and Mayers, R.A. (1963) *Anal. Allergy* 21:210
- 26.- Gell, P.G.H. and Coombs, R.R.A. (1976) "Clasificación of Allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity - and disease" *Clinical Aspect of Immunology. Edit. F.A. Davis Company Philadelphia.* p.575-596
- 27.- Gleich, J. (1974) "Measurement of the potency of allergy - extracts by their inhibitory capacities in the radiallergen-sorbent test" *J. Allergy Clin. Immunol.* 53:158-169
- 28.- Gleich, J. and Yunginger, J.W. (1976) "Standardization of Allergens" *Manual of Clinical Immunology. Chapter 77 Ed. Noel R. Rose . American Society for Microbiology. Washington* p.575

- 29.- Gutman, A. (1980) "Allergens and other factors important in atopic disease" Chapter 5. Allergic Disease Edit. by Roy - Patterson M.D. Diagnosis and Management. Second edition. J.B. Lippincott Company Philadelphia and Toronto. p.100-102
- 30.- Hansen, K. and Werner, M. (1970) Alergia Clinica Ed. Salvat España . p.566
- 31.- Kabat, E.A. (1964) Inmunoquímica Experimental 2ª Ed. Edit. La Prensa Médica Mexicana. México p.667-671
- 32.- Kwong, F.K. (1981) "Allergen extracts and purified allergen in immunotherapy". Anal. Allergy ..42:162-165
- 33.- Lawlor Jr. G.J. Fischer, J. (1985) Manual de Alergia e Inmunología. Salvat Editores S.A. Mallorca -Barcelona. España . p.27-35, 37-42, 88-89, 449.
- 34.- Layne, E. (1966) Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for measuring Proteins. Methods Enzymol. Vol. III 4ª reimpresión.
- 35.- May. et al. (1979) "Optimization of parameters in protein nitrogen unit precipitation procedure for allergenic extracts" J. Allergy Clin. Immunol. 63:219-122
- 36.- Morris D.L. (1948) "Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent" Science 102:254
- 37.- Norman (1985) "Allergic Rhinitis" J. Allergy Clin. Immunol. 75:540
- 38.- Norman (1986) "Why Standardized extracts?" J. Allergy Clin. Immunol. 77:405

- 39.- Peypys, J.(1974)"Extracts by skin prick test in man RAST based allergen assay and protein content" Int.WHO-IABS Symp. on Standardization and control of Allergens Administered to Man. Develop.Biol.Standar. 29:284-294
- 40.- Relyveld, E.H. and Hemoq, E.(1980)"Analysis and standardization of allergen extracts intended for Therapeutic use" Allergy 35:218-220
- 41.- Ricci, M. M.D.(1986) "Advances in understanding of mechanisms of IgE dysregulation in atopy by the application of in vitro methods" J. Allergy Clin. Immunol. 78:988
- 42.- Salazar, M.M. (1958) La Alergia en la Teoria y en la Practica . Ed.Mendes Oteo, México p.52-54
- 43.- Sattler, L. and Zarban (1948)"The Dreywood anthrone reaction as affected by carbohydrate structure" Science 108: 207
- 44.- Srprigal, Samuel.M.D. (1960) Fundamentals of Modern Allergy. Mc.Graw-Hill Company Inc.p.18-21
- 45.- Tuller, E.F. and Keiding(1954)"Determination of protein bound carbohydrates by the anthrone reaction. Anal.Chem. 26:875
- 46.- Voorhorst, R.(1974)"Standardization of allergens by an improved skin-testing technique".Int.WHO-IABS Symp.on Standardization and Control of Allergens Administered to Man. Develop. Biol. Standard 29:352-361
- 47.- Week, S.(1983)"Allergen Standardization : Motive and Method Allergy 38:529-533

- 48.-Week, B. and Löwenstein, H. (1975) "Quantitative Immunoelectrophoresis. Used in analysis of allergen extracts and diagnosis of allergy" Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 49:74-78
- 49.-Yuan, L. (1975) "Allergen assay and extract potency estimation". Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 44:55-62
- 50.-Yunginger, J.W. (1984) "Allergen Standardization" J. Allergy Clin. Immunol. 23:316-317