



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"Zaragoza"

HIPERREACTIVIDAD CUTANEA Y SU CORRELACION CON LOS
NIVELES SERICOS DE IgE TOTAL E IgE ALERGENO-ESPECIFICA
EN NIÑOS CON ASMA EXTRINSECA.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

MARTHA LEGORRETA HERRERA



1 9 8 5



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

	pág
<u>RESUMEN</u>	I
<u>CAPITULO 1.- INTRODUCCION</u>	
1.1 .- Antecedentes Científicos	1
1.2 .- El Asma	5
1.3 .- Desencadenantes Específicos	8
1.4 .- Desencadenantes Inespecíficos	14
1.5 .- Propiedades Físico-Químicas de la IgE	16
1.6 .- Fundamento del Método Inmunoenzimático PRIST.	18
1.7 .- Fundamento del Método Inmunoenzimático RAST..	19
<u>CAPITULO 2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	20
<u>CAPITULO 3.- OBJETIVOS</u>	21
<u>CAPITULO 4.- HIPOTESIS DE TRABAJO</u>	22
<u>CAPITULO 5.- MATERIAL Y METODOS</u>	23
5.1 .- Material biológico	23
5.2 .- Material de laboratorio	25
5.3 .- Reactivos	28
5.4 .- Métodos	31
5.4.1.- Toma de muestras y conservación	32
5.4.2.- Método de la prueba Phadezym IgE PRIST para- la determinación de IgE total	33
5.4.3.- Método de la prueba Phadezym IgE RAST para - la determinación de IgE alérgeno-específica.	36
5.4.4.- Método para las pruebas cutáneas por escari-	

ficación con antígenos glicerinados	40
5.4.5.- Método para la determinación de eosinófilos en moco nasal	42
5.4.6.- Métodos estadísticos	43
CAPITULO 6.- <u>RESULTADOS</u>	
6.1.- Precisión del Método Phadezym IgE PRIST	52
6.2.- Exactitud y sensibilidad de los métodos PRIST y RAST	53
6.3.- Análisis de frecuencias e histogramas para de- terminar el alérgeno más frecuente	55
6.4.- Diferencias entre los grupos sanos y asmáti- cos en la determinación de pruebas cutáneas..	57
6.5.- Correlación entre pruebas cutáneas y RAST ...	58
6.6.- Niveles séricos de IgE total en ambos grupos.	59
6.7.- Regresión múltiple	60
6.8.- Análisis discriminante	61
CAPITULO 7.- <u>DISCUSION DE RESULTADOS</u>	63
CAPITULO 8.- <u>CONCLUSIONES</u>	66
CAPITULO 9.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	68

RESUMEN

Desde que los Ishizaka y Johansson, independientemente descubrieron la inmunoglobulina E, se desató una intensa investigación para definir su relación con la alergia y la hipersensibilidad inmediata.

El desarrollo de técnicas con mayor sensibilidad para determinar IgE, permitió a los clínicos ayudarse en el diagnóstico de enfermedades alérgicas. En este trabajo, se pretende establecer la relación entre reactividad cutánea y los niveles séricos de IgE total y de IgE alérgeno-específica, así como determinar cual es el alérgeno que con mayor frecuencia produce hipersensibilidad inmediata en pacientes asmáticos de edad pediátrica. Para lo cual se realizaron pruebas cutáneas, cuantificación de IgE total por el método PRIST y de IgE específica por el método RAST, a un grupo de 30 niños asmáticos y otro de 30 niños sanos.

No se encontró correlación entre reactividad cutánea y la prueba RAST en el grupo de asmáticos, el alérgeno más frecuente en ambos grupos es el Dermatophagoides. Existen niños sanos, que presentan hiperreactividad cutánea con niveles séricos de IgE total y de IgE-específica elevados. Los niveles de IgE total en ambos grupos, resultaron más elevados en México que en otros países y la prueba con mayor potencia para diferenciar a un sano de un asmático es la cuantificación de IgE específica a D. pteronyssinus y D. farinae.

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes Científicos

1.2. El Asma

1.3. Desencadenantes Específicos

1.4. Desencadenantes Inespecíficos

1.5. Propiedades Fisico-Químicas de la IgE

1.6. Fundamento del método enzimático PRIST

1.6. Fundamento del método enzimático RAST

1.1 ANTECEDENTES CIENTIFICOS

El faraón Menes de Menphis, después de unificar el reino de Egipto hace 5000 años, tuvo en la historia un honor especial: fué el primer faraón de la primera dinastía. Las circunstancias que rodean la muerte del faraón son muy controvertidas. Se ha dicho que fué muerto por un "Kneb" el cual ha sido interpretado durante muchos años como hipopótamo. Sin embargo, "Kneb" puede también significar avispa. Egiptólogos actuales, que pueden leer mejor los jeroglíficos que los alergólogos, interpretan estos jeroglíficos diciendo que Menes fué muerto por una avispa grande. Las inscripciones concernientes a la muerte de Menes terminan con un pictógrafo que se parece ciertamente mucho al avispon y no a un hipopótamo. Fué el primer caso conocido de choque-anafiláctico (1).

Si no es por Menes, la historia de la alergia empezaría mucho más tarde, cuando en el año de 1906, Von Pirquet propuso el término de alegia, del griego "allos" que significa diferente y "ergos" que significa acción, para designar una desviación inmunitaria del estado original o una reactividad cambiada de algún individuo. Un sujeto alérgico era aquel que se desviaba de la respuesta inmunitaria esperada (2). Coca en 1923, acuñó la palabra atopia (del griego atopos, no común), para denotar un estado de hipersensibilidad diferente a las respuestas de hipersensibilidad en individuos normales; por ejemplo asma, anafilaxis y dermatitis por contacto.

La observación de que las reacciones cutáneas de enrojecimiento y abultamiento se pueden producir aplicando pequeñas cantidades de polenes a la piel de pacientes sensibles, se realizó por primera vez hace 100 años. El amplio desarrollo y uso de las pruebas cutáneas se estableció gradualmente a principios de los años 1900 y persistió prácticamente sin cambio; en ese tiempo era la mejor prueba de diagnóstico para la alergia por inhalantes en los Estados Unidos (3).

En la década de los veinte. Prausnitz y Kustner establecieron -- que el factor responsable de la reacción cutánea alérgica puede ser -- transferido pasivamente por el suero de un paciente sensible (con atopía) a la piel de individuos normales (2). Este factor fué llamado reagina o anticuerpo sensibilizante de piel, pero no se tenía conocimiento específico concerniente a sus propiedades inmuoquímicas y biológicas (4).

Fuó cuatro décadas después cuando Ishizaka y su grupo obtuvieron la evidencia que indicaba que las reaginas representaban una única clase de inmunoglobulina, asociada con la γ E-globulina (5). Simultánea e independientemente, Bennich y Johansson descubrieron una proteína de mieloma que representaba una nueva clase de inmunoglobulina, la cual -- fué tentativamente designada IgND que correspondía a las iniciales -- del paciente (6). Muy pocas cantidades aisladas de la proteína de mieloma ND bloqueaban específicamente las pruebas de P-K por lo tanto enlazaron la proteína a hipersensibilidad inmediata. Posteriores estudios comparativos revelaron que la γ E-globulina de Ishizaka et al, -- era idéntica a la IgND y la nueva clase de inmunoglobulina fué llamada

oficialmente IgE (3). Los resultados obtenidos por los dos grupos definieron la estructura y la función de la nueva inmunoglobulina. De esta manera dicho descubrimiento y su relación con la hipersensibilidad inmediata en la mitad de los sesentas, produjo una intensa investigación del mecanismo inmunológico de la alergia y por tanto del asma alérgica.

Ishizaka y colaboradores trabajaron con cantidades del orden de 10^{-6} g que aislaban de personas alérgicas (5). Johansson y Bennich fueron más afortunados, pues ellos trabajaron con cantidades de gramos, de la proteína IgE tomada de un paciente con mieloma IgE (6). Estos dos grupos se ayudaron grandemente en sus estudios por el posterior descubrimiento de un segundo paciente con mieloma IgE en 1968 (7). -- Las grandes cantidades de IgE obtenidas de esos pacientes permitieron la subsecuente producción de grandes cantidades de anti IgE humana.

Dichos antisueros son empleados en los métodos de laboratorio sofisticados que se requieren para cuantificar IgE, ya que debido a la mínima cantidad en que se encuentra en el organismo (10^{-9} g) se requieren métodos extremadamente sensibles (8). Así pues, Ishizaka et al. emplearon radioinmunodifusión (5). El radioinmunoensayo empleado inicialmente fué la prueba radioinmunoabsorbente (RIST) de Johansson et al (6). El RIA (radioinmuno análisis) más sensible y satisfactorio para la determinación de IgE fué el de doble anticuerpo PRIST (papel-radioinmunoabsorbente), por poseer mayor sensibilidad que el ya mencionado RIST (8,9), especialmente para concentraciones abajo de 50 -

KU/1 como es el caso de suero de cordón umbilical (10). Dichas técnicas cuantifican IgE total; sin embargo más tarde se hizo necesario de terminar contra que alergeno va dirigida esa IgE del suero y de esa forma reconocer al alergeno en cuestión que causa los síntomas en los pacientes atópicos. Fué entonces cuando se desarrollo la técnica-RAST (prueba de radioalergoabsorción) que valora los anticuerpos IgE-alergeno-específicos (11).

Posteriormente se desarrollaron sistemas inmunoenzimáticos con la misma sensibilidad pero con la ventaja de emplear reactivos con mayor tiempo de vida media y menor costo en cuanto a los instrumentos de trabajo, es el caso de los sistemas ELISA (inmunoabsorción enzimática) (12).

En los últimos años las determinaciones de IgE alergeno específica en niños asmáticos se han relacionado en forma estrecha con los resultados de las pruebas cutáneas, pruebas de provocación nasal y bronquial; es así como en la actualidad pueden emplearse pruebas cutáneas y cuantificación de IgE total para predecir hiperreactividad tanto a nivel cutáneo como bronquial en pacientes asmáticos con componente alérgico (13,14,15).

1.2 EL ASMA

Gel y Coombs en 1964 clasificaron las reacciones de hipersensibilidad en cuatro tipos: tipo I o inmediata, tipo II o citotóxica, tipo III o enfermedad de complejos inmunes, tipo IV o retardada, mediada por células. Algunos estados de hipersensibilidad involucran más de un tipo de respuesta inmunológica de los mecanismos mencionados anteriormente (16).

El asma es una hipersensibilidad bronquial que corresponde al tipo I de Gell y Coombs, se inicia en la mayoría de los casos en la infancia: un 65% de las asmas infantiles aparecen antes de los 5 años de edad. La etiología es habitualmente multifactorial (17), por lo que se dice que en esta reacción intervienen en estrecha correlación factores genéticos y factores exógenos (17,18). Se caracteriza por una obstrucción reversible de las vías aéreas producidas por una combinación de edema de la mucosa, constricción de la musculatura bronquial y una excesiva secreción viscosa que provoca la obstrucción. El asma alérgica o extrínseca es el resultado de la sensibilización de la mucosa bronquial por anticuerpos específicos del tejido, los anticuerpos producidos son inmunoglobulinas específicas de la clase IgE, la cual esta usualmente elevada (2,16).

La exposición a los alergenos apropiados por inhalación da como resultado una reacción antígeno-anticuerpo sobre la célula cebada y el basofilo, esta reacción desestabiliza la membrana y provoca la liberación de mediadores químicos vasoactivos y broncoconstrictores como

lo son la histamina, serotonina, sustancia de reacción lenta de la -- anafilaxis (SRS-A), factor quimiotáctico de los eosinófilos (ECF-A) y bradicinina; causantes del cambio característico en el tejido (5,21,-18).

Existe otro tipo de asma la no atópica en la que la reacción -- ocurre en respuesta a estímulos no alérgicos como son la infección, - inhalantes irritantes, aire frío, ejercicio y estado emocional, esos - pacientes no muestran elevación de anticuerpos IgE en su suero y la - historia clínica no sugiere hipersensibilidad a alérgenos específicos (17,5).

El asma es causa común de ausentismo escolar, de hospitalizaciones repetidas y ocasionalmente es motivo de muerte en los niños (19). La frecuencia de este padecimiento es variable y los reportes en la - literatura fluctúan entre el 3 y el 15% dependiendo del lugar geográfico, autor y condiciones en que se halla realizado el estudio (20).

El diagnóstico de asma alérgica se basa en varios componentes, a menudo, particularmente en niños, el diagnóstico se basa en el historial clínico. Sin embargo, un historial clínico aparentemente claro puede ocasionalmente ser engañoso. De este modo, en el niño con infecciones recurrentes, los resfriados pueden representar alergias riníticas y las bronquitis pueden ser ataques asmáticos. Continua tosseca por la noche, puede preceder algunas veces al silbido en varios meses en niños con asma. Las pruebas cutáneas intradérmicas , de rasguño y por escarificación, emplean alérgenos adecuados, siendo la --

prueba por rasguño menos sensible que la intradérmica, pero esto se compensa empleando una mayor concentración de solución de alérgeno. La elección de estos alérgenos depende del historial clínico. Normalmente se emplean extractos de epitelios de animales y pólenes de hierba y arbustos.

En las pruebas de provocación se emplean extractos de alérgenos bien definidos, ya que es la única manera para demostrar concluyentemente la presencia de una alergia específica; no pueden aplicarse a niños menores de 5 o 6 años, puesto que no hay buena cooperación al procedimiento, requieren tiempo y son potencialmente peligrosos.

El diagnóstico del asma alérgica, incluye la determinación de IgE total y RAST para la identificación de anticuerpos IgE para los alérgenos específicos, ambas pruebas se realizan in vitro (1).

1.3 DESENCADENANTES ESPECIFICOS.

Se entiende por desencadenantes específicos a los antígenos que dan lugar a la sensibilización alérgica con producción de anticuerpos de la clase IgE al penetrar en el sujeto predispuesto, es decir los alérgenos. La mayor parte de los alérgenos naturales son un tanto peculiares porque su peso molecular parece estar restringido a los límites de 15 - 40 mil daltones. Son compuestos muy polares, inducen la sensibilización en cantidades muy pequeñas (de nanogramos a microgramos) y tienen grupos sulfhidrilo, lo cual indica enlaces cruzados. Muchas sustancias pueden comportarse como alérgenos, pero, en la práctica, cierto número de ellas son las más frecuentes. La vía de penetración de los alérgenos causantes del asma, suele ser directa, es decir el propio árbol traqueobronquial y la mucosa faríngea; pero los alérgenos pueden llegar por otras vías, como son la digestiva o la parenteral, dando lugar a manifestaciones respiratorias (18).

Alérgenos inhalantes: también llamados **neumoalérgenos**, alcanzan la mucosa respiratoria directamente; son alérgenos ambientales que penetran en el acto respiratorio y causan la sensibilización a través del propio órgano de choque, donde se desarrollarán los síntomas clínicos.

Polvo de casa.- Cualquier polvo, como el de la calle o de los caminos, compuesto por partículas relativamente grandes, no causa alergizaciones, sino que es el polvo de casa el que es capaz de provocar la formación de reagentes de un modo muy destacado. El polvo de casa

es el alergeno que como se encuentra flotando en el aire, esta en continuo contacto con el aparato respiratorio, por lo que en los niños - predispuestos, es el primer alergeno que produce un estímulo antigénico de forma continuada (21,22).

El polvo de casa está compuesto no sólo de sustancias minerales, como son el cemento, plomo, cuarzo, iodo, etc., sino fundamentalmente por componentes orgánicos, como las caspas y pelos humanos y de animales, restos corporales y excretas de insectos, vegetales, celulosas - mohos, levaduras, etc. Estas sustancias proteicas son las responsables de la sensibilización. En determinados casos, como zonas rurales o en domicilios con determinadas industrias caseras o familiares, puede predominar alguno de los componentes que desempeñan un papel fundamental, pero aparte de esto, parece que la composición proteica del polvo de casa de muy distintas procedencias (ciudad, zonas rurales y países diversos) es bastante similar; de ahí la efectividad de las pruebas realizadas con extractos de polvos estandar, recogidos a veces de lugares que pueden parecer muy distintos al que vive el enfermo (18).

Acaros.- Desde hace algunos años se había observado la capacidad antigénica del polvo y que esta variaba en distintas épocas del año y en distintos lugares, determinandose que en otoño la antigenicidad era superior, así como en zonas húmedas y pantanosas, y el polvo procedente de altas montañas o de clima seco se mostraba con menor poder antigénico. De ahí que se hubiera sospechado de un componente biológico como responsable en muchos casos de la actividad antigénica del

polvo. Algunos investigadores estudiaron detenidamente el problema, y pudieron destacar la influencia de componentes orgánicos con carácter estacional o regional (21,22).

En 1964, Voorhorst y Spieksma publicaron el primer trabajo sobre la fuente alergénica en el polvo de casa, ellos identificaron el enlace entre alergia al polvo casero y alergia al acaro - - - - - Dermatophagoides pteronyssinus en pacientes asmáticos, también demostraron que es un alérgeno muy potente, cantidades mínimas de 0.05 a - - - - - se requieren para producir una reacción alérgica en sujetos asmáticos, se encuentra esparcido en todo el planeta, hallándose en los más diversos ambientes y predominando en las ropas de cama, alfombras, colchones de lana o fibras, pues el ácaro se alimenta de las descamaciones dérmicas humanas, abundantes en esos lugares, además del pteronyssinus, otras especies parecen ser responsables asimismo de la sensibilización alérgica. El Dermatophagoides farinae, que se nutre de restos de alimentos, se encuentra con gran frecuencia, considerándosele responsable de muchos cuadros de asma; como al mismo tiempo es más fácil de cultivar, gracias al tipo de alimento que requiere, de hecho es este ácaro el que suele usarse para hacer pruebas cutáneas e hiposensibilizaciones, pues al parecer, antigénicamente, los dos ácaros - - - - - son muy similares (22,23).

Polenes.- Tienen un gran poder alergenizante, siendo característica su influencia estacional. Los polenes sensibilizan lentamente, de forma que es raro encontrar niños menores de tres o cuatro años - - - - - que padezcan una polinosis, salvo en aquellos en que por el lugar de

residencia haya una gran exposición. En virtud de su peso ligero y pequeño volumen, se desplazan fácilmente con el viento, pudiendo encontrarse a varios kilómetros de su lugar de emplazamiento, así como los polenes más pesados sensibilizan en menos ocasiones. Las condiciones para que los polenes causen sensibilizaciones alérgicas son por una parte, el factor individual y la abundancia y proximidad del polen en cuestión. Entre los polenes de árboles, se encuentran: el olivo, fresno, sauce, olmo, Alnus incana, Quercus alba, nogal y abedul, los polenes de herbáceas más importantes son: Cynodon dactylon, Lolium perenne (cesped inglés), Holcus lanatus, que polinizan en verano-otoño son -- las quenopodiáceas, como Chenopodium album; compuestas como Artemisia vulgaris, Ambrosia elatior (18).

Otros neumoalergenos.- La lana ocupa un lugar destacado entre -- los factores causantes de alergia respiratoria, también pueden ser importantes el algodón, fibras vegetales diversas (lino, miraguano o -- kapok, fibras acrílicas, etc.). También son muy importantes los neumoalergenos de origen animal, en este caso, los pelos, caspas, y epitelios, en el caso del perro y gato (24), aunque se ha demostrado que los antígenos en la orina son más específicos, que los epitelios o -- descamaciones (25). Es importante mencionar que aunque en menor grado también las plumas llegan a sensibilizar al niño, sobre todo si su almohada esta rellena de ellas (18).

Hongos.- Existe una verdadera hipersensibilidad a hongos. La alergia fúngica, con manifestaciones en el aparato respiratorio (asma),-

puede estar causada por las esporas de los hongos o por los propios micelios. Lo habitual es que estos elementos penetren en el organismo a través del propio aparato respiratorio, en otras ocasiones contaminan alimentos y dan lugar a sensibilizaciones clínicamente manifestadas en el árbol traqueobronquial. Algunos hongos manifiestan dos tipos de patologías, la infectiva y la alérgica como es el caso de Candida albicans o de Aspergillus. Son pocas las especies conocidas que tienen poder sensibilizante entre las más importantes encontramos a: Alternaria tenuis, Cladosporium herbarum, Penicillium notatum, Aspergillus niger, Mucor mucedo y Rhizopus nigricans entre otros (26).

Alimentos.- Las pruebas de que se dispone para poner de manifiesto la alergia alimentaria no ofrecen el grado de fiabilidad suficiente. El único criterio seguro para el diagnóstico es el que relaciona de forma absolutamente cierta la ingestión de determinado alimento y el comienzo de la crisis de asma, teniendo lugar cada vez que se ingiere el mismo alimento, por lo que se infiere cuidar la dieta del niño con asma (27,28).

Como sustancias que llegan por ingestión, algunos medicamentos pueden desencadenar crisis de asma, la aspirina es el más importante de este grupo, pudiendo ser responsables la penicilina, quinina y excepcionalmente otros medicamentos (18).

También se ha culpado a los parásitos intestinales de causar asma en los niños, si bien es un hecho discutible por la amplia difu-

sión que tiene estos en la infancia, pero igual que los alimentos pueden influir en la aparición de sintomatología alérgica general inespecífica. (1).

Bacterias.- Las bacterias dan lugar a asma en individuos predispuestos, actuando desde un foco latente. No es fácil, demostrar la --responsabilidad de la alergia bacteriana en el asma, pero pueden emplearse pruebas de provocación por aerosol con las bacterias sospechosas que dan origen a la crisis de asma. Los gérmenes más usuales son estreptococos, neumococos, Neisseria catarrhalis, estafilococos, pero pueden igualmente intervenir otras bacterias de flora faríngea saprófita (18).

1.4 DESENCADENANTES INESPECIFICOS.

En variadas circunstancias, sin que el niño se haya puesto en contacto con el alérgeno a que es sensible, es posible que se desencadene una crisis de asma típica por haber intervenido algún factor inespecífico que provoca el broncoespasmo en los niños predispuestos. En términos generales se reconocen factores físicos y psíquicos.

Factores físicos.- Predominan los climáticos: el frío excesivo, los cambios de temperatura bruscos, las corrientes de aire y la humedad pueden poner en marcha la crisis de asma. Lo mismo ocurre con otros agentes ambientales, como el humo (tabaco, automóviles, cocinas, industrias), olores intensos como son los de pinturas, productos químicos diversos, puede decirse que todos los elementos que contribuyen a la contaminación atmosférica actúan como estimulantes del broncoespasmo en niños predispuestos, lo cual justifica muchas crisis de disnea esporádicas, que no se deben al contacto con alérgenos específicos.

El sobreesfuerzo físico.- También da lugar a la aparición de crisis, en determinados niños habitualmente y esporádicamente en otros.

Psiquismo.- Como consecuencia de la intervención exclusiva de factores psicológicos y ambientales se desencadenan repetidamente o de forma aislada crisis disneizantes (seudoasma) en niños que por su desarrollo psíquico especialmente moldeado por el ambiente familiar o conflictivo muestran esta especial predisposición. En el caso del as-

ma verdadero, o asma alérgico, el factor psíquico desempeña un papel-- muy variable de unas familias a otras, puede pasar totalmente inadvertido, por ser muy leve su participación, o puede dominar el cuadro, -- que simula un problema puramente psicológico, cuando realmente, como - causa primera, existe el factor alérgico. (1,17,18).

1.5 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA IgE.

La IgE tiene un peso molecular de 196 000 daltones y un coeficiente de sedimentación de 8S; es una γ -globulina electroforéticamente rápida, tiene un contenido de carbohidratos elevado del 12% y consta de dos cadenas ligeras de tipo κ o λ y dos cadenas pesadas del tipo ϵ .

La cadena pesada consiste en una región V y 4 dominios C, C ϵ 1, C ϵ 2, C ϵ 3 y C ϵ 4. Hay 15 medias cisteínas 10 de las cuales forman un enlace disulfuro intercadena en cada uno de los 5 dominios.

Se liga con gran afinidad a la célula cebada a través de un sitio de la región Fc. La actividad citotrópica fijadora a la piel o de la célula cebada reside en los dominios C ϵ 3 o C ϵ 4 y la bien conocida labilidad de la fijación cutánea de las reagentas involucra estas dos regiones. La reducción de los enlaces disulfuro altera también la actividad citotrópica. El sitio de reconocimiento primario para los receptores de la superficie de las células cebadas parece estar localizado en la región C ϵ 4. La propiedad biológica primaria de las IgE es la fijación a la células cebada y los basófilos, IgE no fija el complemento por vía clásica sólo en cantidades muy grandes puede fijar C3 por vía alterna (2,5).

IgE no atraviesa la placenta (5). Las células plasmáticas que sintetizan IgE han sido encontradas abundantemente en las superficies secretorias en el interior del cuerpo como en los bronquios y bronquio--

los del sistema respiratorio; en la mucosa del sistema digestivo y en la vejiga urinaria. Las amígdalas y los adenoides son especialmente ricos en células plasmáticas formadoras de IgE, las concentraciones más altas se encuentran en los polipos nasales, particularmente en la de los individuos alérgicos (29).

Los anticuerpos IgE fijan el alérgeno mediante la porción Fab -
(29).

1.6 FUNDAMENTO DEL METODO INMUNOENZIMATICO PRIST

PRIST es un ensayo inmunoenzimático que emplea discos de celulosa como fase sólida con una modificación denominada ELISA (Enzyme Linked - Immunosorbent Assay) en un sistema heterogéneo no competitivo(3).

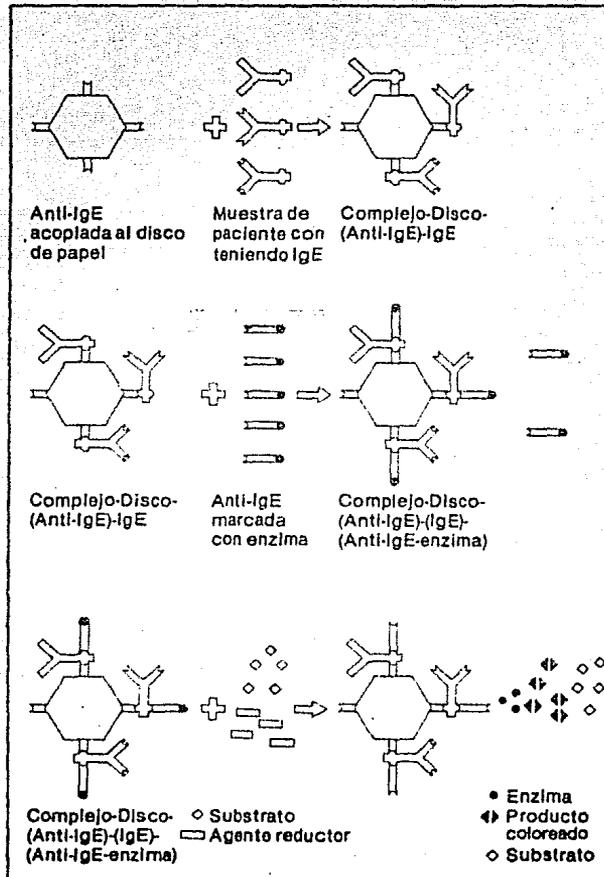
La anti-IgE unida covalentemente a un disco de celulosa activado con bromuro de cianógeno reacciona durante las primeras horas de incubación con la IgE de la muestra, formando un complejo anti-IgE/IgE.

Después de eliminar el suero y las otras inmunoglobulinas, se agrega otra anti-IgE conjugada con una enzima (B-galactosidasa de E.coli), la anti-IgE es específica para el determinante D_{G1} de la cadena pesada Fc de la IgE. En una segunda incubación durante la noche se forma el nuevo complejo anti-IgE/IgE/anti-IgE-enzima.

Después de eliminar el conjugado que no reaccionó se agrega una mezcla de substrato y agente reductor (O-nitrofenil-B-galactosido). La enzima es liberada por el rompimiento de los enlaces S-S. La hidrólisis enzimática del sustrato da como resultado un producto de color amarillo (orto-fenilato) estable por 24 horas, que tiene un máximo de absorbancia a 420 nm.

La reacción enzimática es interrumpida por la adición de carbonato de sodio. La absorbancia es proporcional a la cantidad de IgE presente en la muestra.

Fig. 1 Fundamento del Método Phadezym IgE PRIST.



λ
405

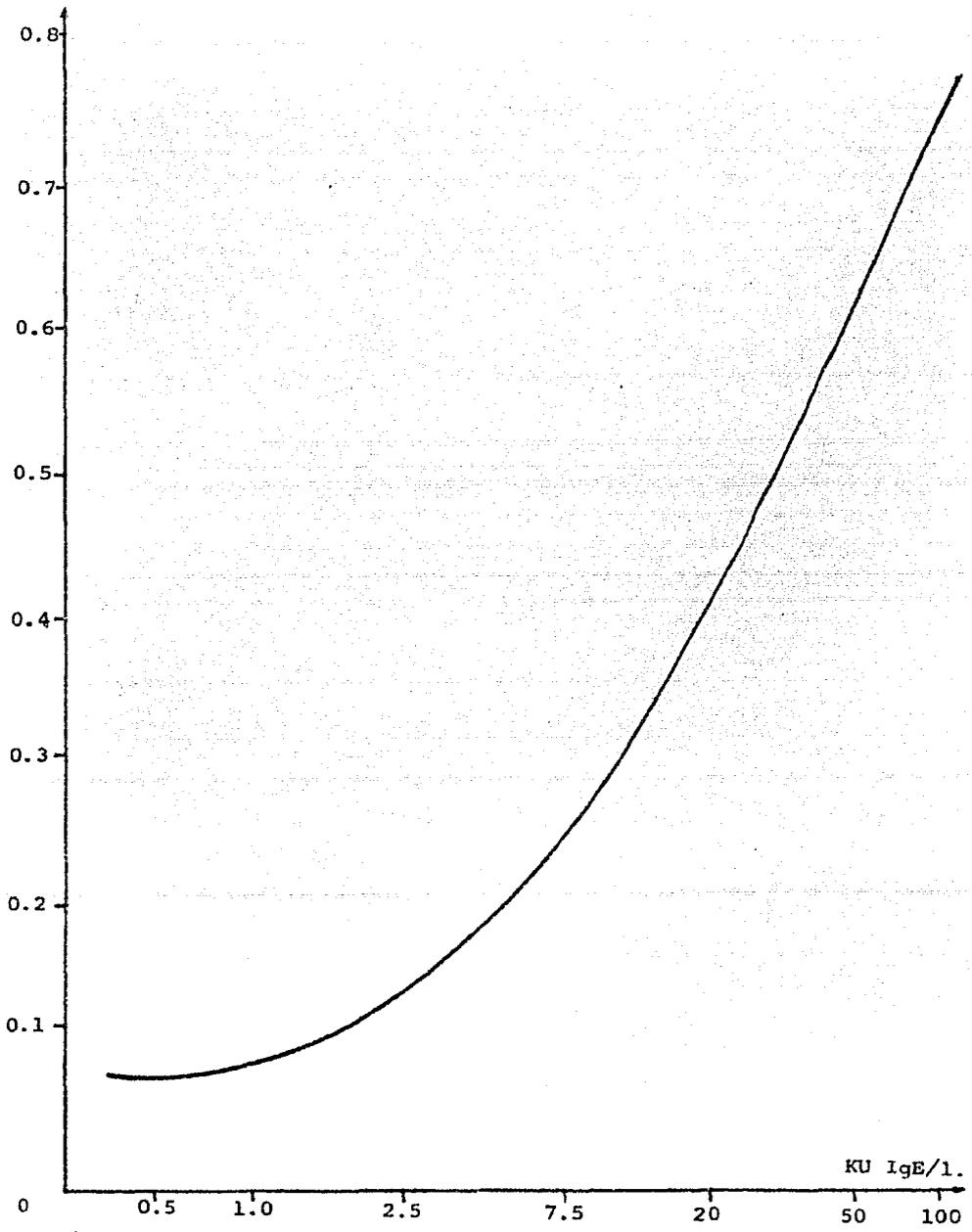


Fig. 2 Aspecto de la curva estandar para el ensayo inmunoenzimático Phadezym IgE PRIST de IgE total.

1.7 FUNDAMENTO DEL METODO INMUNOENZIMATICO RAST

El método RAST(Radioalergosorbent Test) es un ensayo inmunoenzimático que determina los niveles de IgE alérgeno-específica circulante, que utiliza como fase sólida discos de papel (celulosa) y está basada en la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en un sistema heterogéneo no competitivo (11).

El alérgeno de interés se encuentra unido covalentemente al disco y reacciona con la IgE específica contenida en la muestra de suero.

Después de la eliminación de la IgE no específica mediante lavados, se añade una anti-IgE marcada con una enzima (B-galactosidasa de E. coli). Esta anti-IgE marcada reacciona con la IgE enlazada por el disco. Posteriormente se efectúan lavados permaneciendo el inmunocomplejo disco-alérgeno/IgE específica/anti-IgE-enzima.

La enzima es liberada por la acción de un agente reductor (glutathiona) que rompe los enlaces S-S, entonces reacciona con el sustrato - (O-nitrofenil-Beta-galactósido) para formar un compuesto coloreado amarillo. La hidrólisis enzimática es inhibida por la adición de carbonato de sodio. La absorbancia media a 420 nm es directamente proporcional a los niveles de IgE específica al alérgeno que tiene en circulación el paciente por ml. de suero.

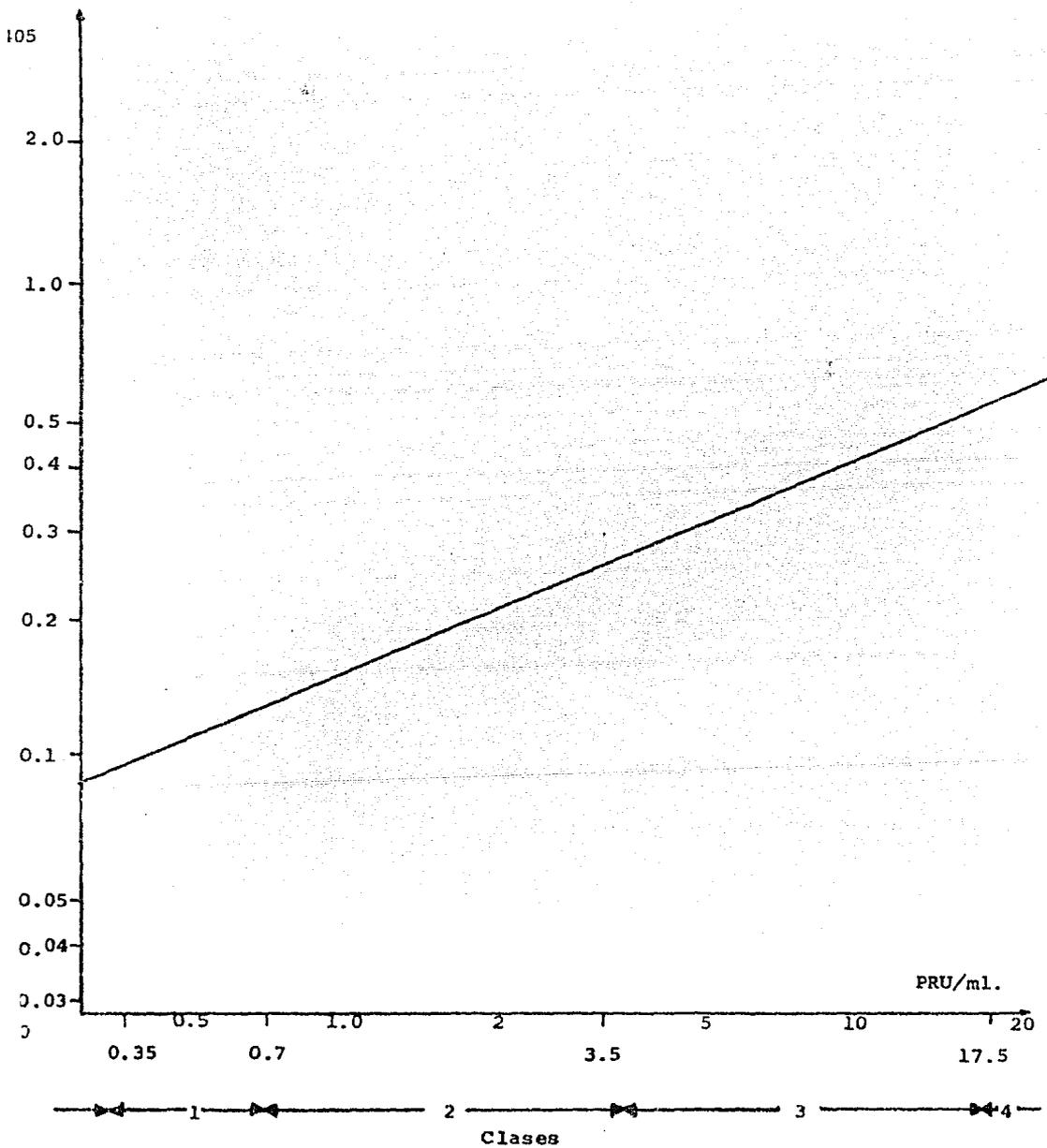
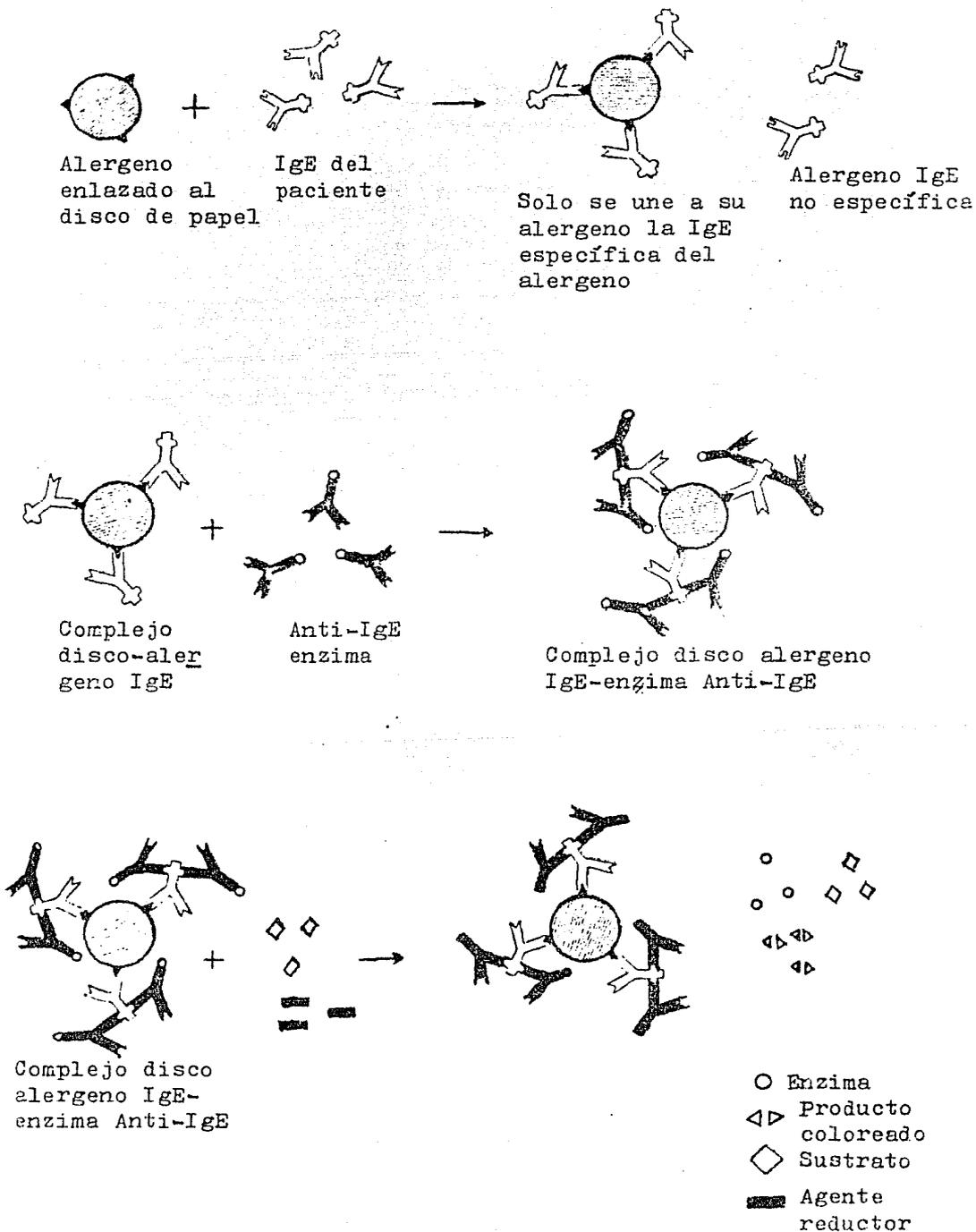


Fig. 3 Aspecto de la curva estandar para el ensayo inmunoenzimático Phadezym IgE RAST de IgE alergeno-específica.

Fig. 4 Fundamento del Método RAST.



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Durante el estudio del niño asmático se considera de primordial importancia; la identificación de los factores etiopatogénicos; en el caso particular de este estudio, la investigación del factor alérgico se ha venido haciendo fundamentalmente con la historia clínica y las pruebas intradérmicas, pruebas que tienen la desventaja de aplicar -- alergenos poco purificados y tienen limitaciones en niños menores de -- cuatro años de edad, por la falta de cooperación al procedimiento. En nuestro medio no existen actualmente estudios publicados acerca de los alergenos que con mayor frecuencia causan hiperreactividad cutánea y -- bronquial en pacientes asmáticos de edad pediátrica, así mismo se desconoce la relación que guarda con los niveles séricos de inmunoglobulina E total y alérgico-específica. Por lo que consideramos conveniente realizar un estudio para determinar los alergenos que con mayor frecuencia provocan hipersensibilidad inmediata y su correlación con los niveles sericos de IgE total y de IgE alérgico-específica en niños con asma extrínseca.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS.

- 3.1 Valorar el grado de reactividad cutánea a algunos alérgenos inhalables frecuentes en nuestro medio, empleando pruebas de escarificación.
- 3.2 Determinar la frecuencia de reactividad cutánea a los siguientes alérgenos: D. pteronyssinus, D. farinae, Alternaria tenuis, Lolium perenne, epitelio de perro, epitelio de gato, Quercus alba Alnus incana y Cladosporium herbarum; en niños con asma alérgica.
- 3.3 Cuantificar los niveles de IgE total en pacientes con asma extrínseca de edad pediátrica, utilizando el ensayo inmunoenzimático PRIST (Prueba inmunoabsorbente en papel), con la modificación denominada ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).
- 3.4 Valorar los niveles de inmunoglobulina E alérgeno-específica en pacientes asmáticos alérgicos utilizando el ensayo inmunoenzimático RAST (prueba de radioalergoabsorbente en papel), con la modificación llamada ELISA.
- 3.5 Determinar la correlación entre pruebas de escarificación cutáneas y los niveles de IgE total y de IgE alérgeno-específica.

4. HIPOTESIS DE TRABAJO

4. HIPOTESIS DE TRABAJO

- 4.1 Existe una mayor frecuencia de hiperreactividad cutánea y niveles elevados de IgE total y específica al alérgeno Dermatophagoides, que a los alérgenos de polenes de pasto, hongos y epitelios animales en los pacientes con asma extrínseca de edad pediátrica.

- 4.2 Existe una buena correlación entre el grado de hipersensibilidad cutánea y los niveles séricos de inmunoglobulina E total y alérgeno-específica en niños con asma alérgica.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Material biológico

5.2. Material de laboratorio

5.3. Reactivos

5.4. Métodos

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se estudiaron 30 pacientes de ambos sexos, con diagnóstico establecido de asma, cuyas edades estuvieron comprendidas entre los cuatro y catorce años; dichos pacientes fueron seleccionados de la consulta externa de neumología, Hospital de Pediatría, C.M.N. IMSS. A este grupo se le denominó grupo problema.

También se estudiaron 30 niños sanos de ambos sexos, cuyas edades estuvieron comprendidas entre los cuatro y catorce años, dichos niños fueron seleccionados de los que asistieron a las clínicas multidisciplinarias de la ENEP Zaragoza, previa autorización de los padres de familia, cuyas características se detallarán posteriormente, a este grupo se le denominó testigo.

En el grupo problema se incluyeron aquellos pacientes que por sus características clínicas y de laboratorio tenían fondo alérgico como factor desencadenante del asma, para lo que se tomaron los siguientes datos:

- a) historia clínica detallada
- b) antecedentes de atopia familiar
- c) eosinofilia en moco nasal
- d) eosinofilia periférica
- e) IgE total elevada (en análisis previos).

En el grupo testigo se incluyeron aquellos niños en quienes no se determinó participación alérgica con los datos anteriores y que - además cumplieron con las siguientes características:

- a) ningún síntoma de alergia a alimentos
- b) ninguna reacción anormal motivada por picadura de insectos
- c) ningún síntoma o signo de alergia por contacto.
- d) ninguna tendencia a tener infecciones frecuentes
- e) ninguna infección durante los últimos 15 días, previos a la toma de la muestra
- f) exámen coproparasitoscópico en serie de tres negativo.
- g) que no existieran transfusiones sanguíneas previas
- h) niños con desarrollo anatómico y fisiológico normal.

5.2 MATERIAL DE LABORATORIO

200 tubos de vidrio de 13 X 100 mm fondo redondo

100 tubos de vidrio de 10 X 75 mm fondo redondo

50 tubos de centrifuga de poliestireno de 12 X 55 mm con fondo redondo

100 tubos capilares de 10 X 70 mm

50 pipetas pasteur

5 pipetas graduadas de 1 ml.

5 pipetas graduadas de 5 ml.

5 pipetas graduadas de 10 ml.

5 pipetas graduadas de 20 ml.

1 pipeta volumétrica de 5 ml.

3 pipetas para cuenta de globulos blancos.

1 pipeta repetidora de 2.5 ml.

1 matraz kitazato de 100 ml.

1 matraz kitazato de 500 ml.

1 matraz erlenmeyer de 200 ml.

1 matraz erlenmeyer de 500 ml.

1 matraz aforado de 1 lt.

1 matraz aforado de 2 lts.

1 probeta de 500 ml.

1 probeta de 200 ml.

1 probeta de 100 ml.

1 termometro de 0-50°C.

200 cubreobjetos

300 portaobjetos

- 6 gradillas para 50 tubos
- 1 perilla de succión
- 300 puntas de plástico desechables de 50 ul
- 400 puntas de plástico desechables de 100 ul.
- 100 puntas de plástico desechables de 500 ul.
- 100 puntas de plástico desechables de 1000 ul.
- 2 pinzas estériles de metal.
- 2 barras magnéticas de 3 X 5 mm.
- 2 tapones de hule oradados
- 3 tapones de hule sin oradar
- 2 pisetas de 200 ml.
- 1 boquilla
- 3 mangueras para conexiones de vacío
- 1 rollo de papel parafilm.
- 1 pliego de papel absorbente.
- 1 asa de plástico
- 1 cámara de Newbauer
- 200 gasas
- 3 paquetes de algodón
- 1 caja de aplicadores de madera
- 1 ligadura
- 4 marcadores de diferentes colores
- 5 frascos goteros.

5.2.1. APARATOS DE LABORATORIO.

Agitador magnético Magne 4, Mo. 4820-40

Multiaspirador Pharmacia diagnostics

Bomba de vacío, Gelman Instruments Co.

Micropipetas de 50, 100, 200, 500 y 1000 ul Mo. 1071

Centrifuga International

Fotocolorímetro, Titertek-Multiskan

Filtro 405 nm para fotocolorímetro

Refrigerador, American Mo. 191724

Congelador, American Mo. 191734

Agitador de tubos Vortex, Super mixer Mo. 1290

Estufa, Mapsa, Mo. toeec55524

Microcentrifuga, Solvat. Mo. H07

Balanza analítica, Metler Mo. Ch 8606

Fotocolorímetro Bauch & Lomb Mo. 134

Agitador de tubos Solvat Mo. 238

Agitador de pipetas Yankee Mo. F 36481.

5.3 REACTIVOS

- Equipo de Phadezym IgE PRIST que contiene:
 - diluyente libre de IgE (suero de caballo) liofilizado
 - estandares para IgE en suero de caballo liofilizaos:
 - 0.5 KU/l después de reconstitución
 - 1.0 KU/l después de reconstitución
 - 2.5 KU/l después de reconstitucion
 - 7.5 KU/l después de reconstitución
 - 20.0 KU/l después de reconstitución
 - 50.0 KU/l después de reconstitución
 - 100.0 KU/l después de reconstitución
 - suero control liofilizado 100KU/l
 - en cassets discos anti-IgE producidos en oveja
 - aditivo para la solución lavadora
 - sustancia de desarrollo (O- nitrofenil- B- galactosido y - glutatona (agente reductor) liofilizada)
 - amortiguador para la sustancia de desarrollo
 - solución anti-IgE enzima (anticuerpos producidos en conejo)- liofilizados
 - solución inhibidora (carbonato de sodio)
- Equipo Phadezym IgE RAST que contien:
 - sustancia anti-IgE enzima liofilizada (anticuerpos producidos en conejo, la enzima se obtiene de E. coli)
 - amortiguador para la enzima-anti-IgE.

- sustancia inhibidora (carbonato de sodio)
- amortiguador en polvo
- aditivo para la solución de amortiguador
- sueros de referencia liofilizados, obtenidos en humano
 - A que contiene altas concentraciones de anticuerpos específicos contra abedul
 - B es la dilución 1:5 de A
 - C es la dilución 1:25 de A
 - D es la dilución 1:125 de A

Calibrados contra el 1st British standard 75/505 - para suero de inmunoglobulina E .

- en cassetts discos de alergenos:

- Dermatophagoides pteronyssinus

- Dermatophagoides farinae

- Alternaria tenuis

- Lolium perenne

- epitelio de perro

- epitelio de gato

- Quercus alba

- Alnus incana

- Cladosporium herbarum

- Colorante de Wright Sigma de México

- Sulfato de zinc Baker analyzed

- lugol

- alcohol etílico

- EDTA reactivo analítico Monterrey

- Solución salina isotónica Lab. pisa
- agua bidestilada Electropura
- agua destilada
- agua desionizada
- en frascos: alergenos glicerinados diluïdos 1: 10 000
 - Dermatophagoides pteronyssinus
 - Dermatophagoides farinae
 - Alternaria tenuis
 - Lolium perenne
 - Epitelio de perro
 - Epitelio de gato
 - Querkus alba
 - Alnus incana
 - Cladosporium herbarum

5.4. METODOS

A cada uno de los pacientes del grupo problema se les realizó un registro clínico que contenía:

- Los datos de la historia clínica especial para niño asmático
- Examen coproparasitoscópico en serie de tres
- Eosinófilos en moco nasal
- Se les efectuaron pruebas cutáneas con alérgenos glicerizados.
- Se les tomó muestra de sangre venosa (4-5 ml) para realizarles las determinaciones de IgE total por la técnica de Phadezym PRIST y de IgE alérgeno-específica por la técnica de Phadezym RAST.

A cada uno de los niños del grupo testigo, se les practicó un registro clínico conteniendo los datos de historia clínica especial para niño asmático.

- Examen coproparasitoscópico en serie de tres, por el método de Faust (30).
- Biometría, para determinar eosinofilia periférica, parásitos en sangre y posibles anemias.
- Se les tomó una muestra de sangre venosa (4-5 ml) para determinaciones de IgE total y de IgE alérgeno-específica, por las técnicas de Phadezym PRIST y Phadezym RAST respectivamente.
- Además se determinó la precisión de los métodos inmunoenzimáticos Phadezym IgE PRIST y Phadezym IgE RAST.

5.4.1. TOMA DE MUESTRAS Y CONSERVACION

Las muestras para las determinaciones de IgE total y de IgE alergeno-específica se tomaron de sangre venosa (4-5 ml) en tubos de vidro estériles, se dejaron reposar durante 1 hora y posteriormente se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 minutos, para la separación del suero, el cual se almacenó en tubos de vidrio estériles y perfectamente cerrados con papel parafilm y se colocaron a una temperatura de - 20°C hasta que fueron analizados.

Las muestras para las biometrías, se tomaron por punción venosa- de 2 a 3 ml. en tubos de vidrio con EDTA como anticoagulante y se procesaron el mismo día.

Las muestras para el examen coproparasitoscópico, se recogieron- en frascos bien tapados, procesándose el mismo día y repitiendo el examen por tres días seguidos.

5.4.2. METODO DE LA PRUEBA PHADEZYM IgE PRIST (PRUEBA DE INMUNOABSOR--
CION ENZIMATICA EN PAPEL) PARA LA DETERMINACION DE INMUNOGLOBU-
LINA E TOTAL (3).

Cada determinación se realizó por duplicado tanto para los están-
dares como para las muestras problema. Se corrió una curva estandarar
para cada ensayo, evitando el escurrimiento de los reactivos por las -
paredes de los tubos. .

- Se etiquetan los tubos, colocando los estándares por duplicado hasta
el tubo No. 14 y las muestras problema a partir del tubo No. 15 en-
adelante.
- Se remueve el excedente de amortiguador presente en los discos anti-
IgE presionando contra un papel absorbente el disco en la parte supe-
rior de la tapa.
- Con una pinzas limpias adicionar un disco al fondo de cada tubo.
- Se pipetea 100 ul de cada suero problema previamente diluido (50 ul
de suero problema con 950 ul de diluyente libre de IgE) sobre los --
discos de los tubos etiquetados como problemas.
- Se rompen las burbujas que se encuentren abajo de los discos utili-
zando un asa de plástico.
- Se cubren los tubos con papel parafilm para evitar la evaporación y-
se incuban tres horas a temperatura ambiente.
- Se adicionan 2.5 ml. de solución de lavado (Solución salina con adi-
tivo de lavado) a todos los tubos, se deja reposar cada tubo por lo-
menos diez minutos.

- Se remueve el líquido de cada tubo utilizando un multiaspirador -- acoplado a una bomba de vacío, este lavado se hace dos veces más.
- Se aspira completamente la solución de lavado antes del siguiente paso.
- Se adicionan 100 ul de la solución enzima-anti-IgE sobre los discos en todos los tubos.
- Se cubren los tubos con una hoja de papel parafilm, se evita que -- hayan quedado burbujas abajo del disco y se incuba durante toda la noche (16-20 hrs) a temperatura ambiente.
- Se lavan tres veces los discos de igual manera como se describió -- anteriormente.
- Se aspira completamente la solución de lavado antes del siguiente paso.
- Se pipetea 200 ul de solución reveladora sobre los discos en todos los tubos.
- Se rompen las burbujas que esten presentes abajo del disco con una asa de plástico.
- Se cubren los tubos con papel parafilm, se incuba durante 60 min.- exactamente a una temperatura de 37°C.
- Se pipetea 1 ml. de solución inhibidora (carbonato de sodio) en todos los tubos, adicionándose en el mismo orden y a la misma velocidad en la que se agregó el sustrato.
- Se mezcla bien el contenido de cada tubo empleando un agitador de tubos vortex.
- Se colocan 200 ul del contenido de cada tubo en una placa de poliestireno de fondo plano en el mismo orden en el que van colocados

das las muestras.

- Se coloca la placa en el fotolorímetro Titertek-Multiskan y se mide la absorbancia de cada una de las muestras utilizando el filtro 405 nm, se emplea la solución inhibidora como blanco.

Con las absorbancias de cada uno de los estándares se construye una curva estandar en papel lin-log y se extrapolan los valores de - absorbancia de cada una de las muestras problema en la curva estandar y se obtiene el valor de la concentración de IgE para cada muestra.

5.4.3. METODO DE LA PRUEBA PHADEZYM IgE RAST (PRUEBA DE INMUNOALERGO
ABSORCION ENZIMATICA EN PAPEL) PARA LA DETERMINACION DE INMU-
NOGLOBULINA E ALERGENO ESPECIFICA.

Cada determinación de los estándares se realizó por duplicado. -
Se corrió una curva estándar para cada ensayo y se evitó el escurri-
miento de los reactivos por las paredes de los tubos.

- Se etiquetan los tubos, colocando los estándares por duplicado has-
ta el tubo No. 8 y las muestras problema a partir del tubo No. 9 -
en adelante.
- Se remueve el exceso de amortiguador presente en los discos de los
alergenos presionando los discos con un papel absorbente seco.
- Con unas pinzas limpias se adiciona un disco de referencia en el -
fondo de los tubos etiquetados del 1 al 8.
- Se adiciona un disco de alergeno problema en los tubos iniciando en
con el No. 9.
- Se pipetea 50 μ l de cada uno de los sueros de referencia por dupli-
cado dentro de los tubos 1 - 8.
- Se pipetea 50 μ l de los sueros problema directamente sobre los dis-
cos de alergenos.
- Se rompen las burbujas que se encuentren abajo de los discos utili-
zando un asa de plástico.
- Se cubren los tubos con papel parafilm para evitar la evaporación -
del suero y se incuban durante tres horas a temperatura ambiente.
- Se adicionan 2.5 ml. de solución de lavado (solución salina isotóni-
ca con aditivo de lavado) a todos los tubos, se deja reposar cada -
tubo por lo menos diez minutos.

- Se remueve el líquido de cada tubo utilizando un multi-aspirador -- acoplado a una bomba de vacío, este lavado se repite en dos ocasiones más.
- Antes del siguiente paso se aspira completamente la solución de lavado.
- Se pipetea 50 ul de enzima-anti-IgE directamente sobre los discos en todos los tubos excepto en los blancos.
- Se rompen las burbujas que estén presentes abajo del disco empleando una asa de plástico.
- Se cubren los tubos con papel parafilm, se incuba durante 16 - 20 - horas a temperatura ambiente.
- Se adicionan 2.5 ml. de solución lavadora a cada uno de los tubos, dejando reposar cada tubo durante 10 minutos.
- Se remueve el líquido de todos los tubos empleando un multiaspirador y se repite este lavado 2 veces más.
- Se aspira la solución de lavado completamente antes del siguiente paso .
- Se adicionan 200 ul de la solución de desarrollo directamente sobre los discos en todos los tubos.
- Se rompen las burbujas de aire que se encuentren abajo del disco empleando una asa de plástico.
- Se cubren los tubos con papel parafilm y se incuban en un baño de agua a 37°C durante 120 minutos.
- Se remueven los tubos del baño de agua y se adiciona 1 ml. de solución inhibidora (carbonato de sodio) en cada tubo.
- Se mezcla el contenido de cada tubo empleando un agitador de tubos-vortex.

- Se transfieren 200 μ l del contenido de cada tubo en una placa de poliestireno de fondo plano, en el mismo orden en que van colocadas las muestras.
- Se coloca la placa en el fotolorímetro Titertek-Multiskan y se mide la absorbancia de cada una de las muestras y los estándares, empleando un filtro de 405 nm, utilizando la solución inhibidora como blanco.
- Con las absorbancias de cada uno de los estándares se construye una curva estándar en papel log-log, se calculan los valores promedio de absorbancia de la curva de referencia y se escriben en la hoja de resultados.
- Se clasifica la respuesta alérgica para cada problema comparando la lectura de absorbancia con los límites superior e inferior de alguna de las categorías de respuesta obtenidas con los sueros de referencia.

Las clases se determinan de la siguiente manera:

- Una muestra cuyos valores de absorbancia son superiores a aquel del suero A, es clase 4, que corresponde a una cantidad elevada de anticuerpos específicos de IgE para el alérgeno probado.
- Una muestra cuyos valores de absorbancia están comprendidos entre A y B se clasifican como 3 que corresponde a un nivel elevado de anticuerpos específicos de IgE.
- La muestra cuyos valores de absorbancia estén comprendidos entre B y C se clasifica como 2, que corresponde a una cantidad moderada de anticuerpos IgE alérgeno-específicos.
- Si la muestra presenta valores comprendidos entre C y D se clasifica como 1, que corresponde a una pequeña cantidad de anti-

cuerpos IgE alergen- específicos.

- Una muestra cuyos valores de absorbancia son inferiores a aquellos del suero D se clasifican como 0, que corresponden a una - ausencia o una cantidad no detectable de anticuerpos IgE alergeno-específicos.

5.4.4. METODO PARA LAS PRUEBAS CUTANEAS POR ESCARIFICACION CON ANTIGENOS GLICERINADOS (18).

- Se limpia cuidadosamente la parte posterior de los brazos del niño, con una torunda impregnada con alcohol etílico al 70%.
- Se trazan un total de 11 círculos de aproximadamente 15 mm de diámetro, repartidos en ambos brazos y etiquetados del 1 al 11.
- Se realiza una escarificación en el centro de cada uno de los círculos empleando un escarificador HS.
- Se coloca una gota de cada uno de los alérgenos previamente diluidos 1 a 10 000 U con glicerol y fenol como desinfectante, justo sobre la escarificación en el siguiente orden: en el círculo etiquetado como No. 1 se coloca el alérgeno D. pteronyssinus; en el No. 2 D. farinae; en el No. 3 A. tenuis; en el No. 4 se colocó a Lolium perenne; en el No. 5 epitelio de perro; en el No. 6 epitelio de gato; en el No. 7 Q. alba; en el No. 8 A. incana; en el No. 9 C. herbarum; en el No. 10 histamina como control positivo; en el No. 11 agua destilada como control negativo.
- Esta prueba se mide transcurridos 20 minutos después de aplicada; se toma en cuenta el diámetro de la pápula y el diámetro del eritema en un ángulo de 90°, ambos diámetros se suman y se dividen entre dos y el resultado obtenido se relaciona con el tamaño de la pápula formada por la histamina; que es el control positivo. La pápula con un tamaño igual o menor que 2 mm se considera negativa (-), (+) cuando el tamaño de la pápula es mayor que la reacción negativa pero menor que la de (++) , (++) cuando la pápula es

la mitad del tamaño de la reacción de la histamina, (+++) cuando la púpula formada es igual al tamaño de la histamina, (++++) --- cuando es el doble del tamaño de la reacción de la histamina.

5.4.5. METODO PARA LA DETERMINACION DE EOSINOFILOS EN MOCO NASAL -
(30).

Se preparan hisopos estériles y se inclina la cabeza del niño hacia atrás entonces, se introduce el hisopo en las fosas nasales -- del niño y se le da de una a dos vueltas, tratando de tomar la muestra lo más profunda que se pueda sin lastimar al niño, la muestra se coloca en un portaobjetos limpio y desengrasado. El cual se fija al aire a temperatura ambiente durante por lo menos 60 minutos.

Se cubre el portaobjetos completamente con el colorante eosina alcohólica durante 8 minutos y se lava al chorro del agua.

Se cubre la laminilla con alcohol-acetona (1:1 v/v) y se lava inmediatamente al chorro del agua.

Se adicionan 10 gotas de agua con 15 gotas de azul de metileno directamente a la laminilla, se deja en contacto por 8 minutos y se lava al chorro del agua.

Se deja secar a temperatura ambiente durante 60 minutos y se observa al microscopio con lente de inmersión.

5.4.6. METODOS ESTADISTICOS

5.4.6.1. ESTUDIO DE PRECISION INTRA E INTERENSAYO DEL METODO INMUNOENZIMATICO PHADEZYM IgE PRIST (31).

La determinación de la precisión del método para IgE total Phadezym IgE PRIST, se calculó mediante el valor de coeficiente de variación, para el suero control a una concentración fisiológicamente normal, obtenido a partir de los análisis intraensayo e interensayo que consisten en lo siguiente: para el análisis intraensayo se emplea el método anteriormente descrito de Phadezym IgE PRIST. Se efectúan 10 ensayos del suero control por duplicado en un solo día y a los datos de absorbancia obtenidos, se les determina la media aritmética (\bar{X}) y la desviación estandar (S), con ambos valores obtenemos el coeficiente de variación empleando la fórmula:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

El análisis interensayo se realiza utilizando la técnica anteriormente descrita de Phadezym IgE PRIST. Se efectúa una determinación por duplicado del suero control día a día hasta completar 10 días. Se tabulan los datos de absorbancia, se determina la media aritmética, la desviación estandar y el coeficiente de variación.

5.4.6.2. ESTUDIO DE EXACTITUD INTRA E INTERENSAYO DE LOS METODOS -
PHADEZYM IgE PRIST Y PHADEZYM IgE RAST (31).

Este análisis se realizó efectuando 10 ensayos por duplicado - de los sueros estandar para cada una de las concentraciones de la - curva patrón, empleando los métodos Phadezym IgE PRIST y Phadezym - IgE RAST.

De la misma forma que para el estudio de precisión, se realizó un análisis intraensayo y un interensayo. Se tabularon las absorban- cias así obtenidas y se determinó la media aritmética (\bar{X}), la des- viación estandar (S) y el coeficiente de variación (CV), para cada- uno de los sueros estandares de ambos métodos.

5.4.6.3. ANALISIS DE FRECUENCIAS E HISTOGRAMAS PARA DETERMINAR EL- ALERGENO MAS FRECUENTE EN NUESTRO ESTUDIO (32).

En este estudio, se empleo el histograma para representar una distribución de frecuencias en donde las variables a considerar, en este caso los alergen^os, se disponen en el eje horizontal y las frecuencias con que ocurren los valores de la variable se representa--ron en el eje vertical.

Cada barra del histograma representa un alergen^o diferente y - la altura de una barra dada, corresponde a la frecuencia con que - ocurren los valores en el correspondiente alergen^o.

5.4.6.4. PRUEBA U DE MANN-WHITNEY PARA ESTABLECER DIFERENCIAS ENTRE LOS GRUPOS SANOS Y ASMATICOS EN LA DETERMINACION DE PRUEBAS CUTANEAS (33).

Para probar si hay diferencias significativas entre los grupos de sanos y asmáticos en la determinación de pruebas cutáneas, se eligió la prueba de Mann-Whitney, que es una técnica no paramétrica; ya que los datos obtenidos de las mediciones arrojaron resultados en la escala ordinal.

La prueba de Mann-Whitney se utiliza para verificar la hipótesis nula de que las medias de dos poblaciones son iguales. Por lo tanto la prueba nos proporciona una alternativa no paramétrica para la prueba T de dos muestras cuando no se hacen las suposiciones de esta última. La U de Mann-Whitney se obtiene con la fórmula:

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

n_1 y n_2 es el número de elementos en cada uno de los grupos, R_1 es la suma de los rangos asignados al grupo cuyo muestral en n_1 .

Cuando $n_2 \geq 20$ se puede determinar la significación de un valor observado de u por medio de:

$$Z = \frac{U - uU}{\sigma_U}$$

u es la media
es la desv estandar.

Z esta prácticamente distribuída en forma normal con media cero y varianza 1. Si el valor observado de U tiene una probabilidad asociada igual o menor que α , se rechaza H_0 y se acepta H_1 .

5.4.6.5. ESTUDIO DE LA CORRELACION ENTRE PRUEBAS CUTANEAS Y RAST
(33, 34).

Para evaluar la correlación entre pruebas cutáneas y la prueba RAST, en ambos grupos: sanos y asmáticos, se utilizó la prueba no paramétrica denominada coeficiente de correlación de rango de Spearman, ya que en los resultados se empleó una escala ordinal para ambas determinaciones y dicho coeficiente, es una medida de asociación que requiere que ambas variables sean medidas en una escala ordinal. La fórmula empleada es:

$$r_s = \frac{1 - 6 \sum_{i=1}^N d_i^2}{N^3 - N}$$

Donde r_s es el coeficiente de correlación de Spearman. N = número de sujetos, d_i^2 la diferencia entre los dos rangos elevada al cuadrado.

Para calcular r_s , se hace una lista de los N sujetos. Después se registra cada sujeto, se anota su rango en la variable X y en la variable Y . Se determinan a continuación los distintos valores de d_i , y se suman todos los valores de d_i^2 para obtener la sumatoria de d_i^2 . Se substituye este valor y el de N (número de sujetos) directamente de la fórmula.

5.4.6.6. ANALISIS DE REGRESION MULTIPLE (35).

El análisis de regresión es de gran utilidad, en el estudio de las relaciones entre grupos de variables, el cual es probablemente, uno de los métodos estadísticos más usados en la práctica.

En el análisis de regresión se tienen dos grupos de variables - explicativas y variable de respuesta. Como su nombre lo indica, las primeras se usan para tratar de explicar el comportamiento de la segunda. Esta explicación se efectúa mediante un modelo lineal.

En nuestro estudio utilizamos un modelo de regresión múltiple, tomando como variable dependiente a la IgE total y como variables independientes a las IgE alergeno-específicas. El objeto de este análisis es describir qué porcentaje de variación con respecto a la IgE total, aporta cada IgE alergeno-específica determinada y conocer así cual de todas estas, contribuye más a elevar los niveles de IgE total.

Tanto para este estudio como para el análisis discriminante, se trabajó únicamente con los valores obtenidos en las determinaciones de IgE total y alergeno-específica, los de ésta última se convirtieron en PRU/ml. (Phadebas RAST Unit), para lo cual se procedió de la siguiente forma: los valores de absorbancia y los de la concentración correspondiente en la curva estandar, se les calculó el logaritmo base 10 y estos valores se sometieron a un análisis de regresión-

lineal, para de esa forma al conocer el logaritmo de la absorbancia se obtenga directamente la concentración de las muestras problema.

Para éste análisis y para el análisis discriminante, los cálculos se realizaron empleando una computadora modelo B7800 y el paquete de programas: SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

5.4.6.7. ANALISIS DISCRIMINANTE (36).

Utilizando el análisis discriminante, es posible establecer cuales son las variables que determinan las diferencias entre los grupos y finalmente describir cuales son los valores que toman estas variables, en cada uno de los grupos. Los objetivos de un estudio de discriminación pueden ser diferentes y es en función de esto que vamos a describir dos caminos a seguir:

1. Fase descriptiva. Se tienen "n" individuos que pertenecen a "g" poblaciones distintas, se quiere establecer el poder discriminatorio de una serie de variables: X_1, X_2, \dots, X_p tomadas de ellos, es decir, se quiere saber que tan bien esas variables pueden usarse para establecer diferencias entre las poblaciones y por consiguiente determinar su eficacia para identificar a cual de las poblaciones pertenece un nuevo individuo.

En un principio se desea probar si las variables toman valores significativamente distintos en cada uno de los grupos o poblaciones una vez probado el valor discriminativo de todas las variables en conjunto; interesa por otro lado, el poder discriminativo de cada una de las variables para, de ese conjunto escoger un subconjunto de éstas, que permita la mejor diferenciación entre los grupos. Así se excluyen variables con bajo poder discriminatorio y se facilita la interpretación de los resultados.

2. Fase decisional o de identificación. En esta fase el problema

consiste en elaborar una regla de asignación, que nos permita predecir a que población pertenecen individuos cuya población de orígenes desconocida.

a) en resumen se puede decir que el análisis discriminante nos da pruebas de significancia para establecer la diferencia de los valores de las variables registradas entre los grupos.

b) las reglas de asignación para identificar subsecuentes individuos como pertenecientes a uno de los grupos en base a los valores de las variables. Estas reglas, están frecuentemente expresadas en términos de funciones discriminantes.

c) estimadores de la probabilidad de asignación correcta si se utilizan las reglas propuestas.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. PRECISION DEL METODO PHADEZYM IgE PRIST PARA EL ENSAYO DE IgE -
TOTAL.

Tabla No. 1

Concentración	Intraensayo	Interensayo
110 KU/l	$\bar{X} = 104.05$	$\bar{X} = 104.40$
	SD = 7.75	SD = 7.53
	CV = 7.45	CV = 7.21

\bar{X} = media aritmética
SD = desviación estandar
CV = coeficiente de variación.

La tabla No. 1 muestra los resultados del estudio de precisión para el ensayo inmunoenzimático de IgE total, se reportan los valores del coeficiente de variación para la determinación del suero control, - obtenidos como un cociente entre la desviación estandar y la media -- aritmética X 100.

6.2 EXACTITUD Y SENSIBILIDAD DE LOS METODOS PRIST Y RAST.

Tabla No. 2

METODO	Concentración (KU/l)	COEFICIENTE DE VARIACION %	
		Intraensayo	Interensayo
PRIST	* 0.35	8.50	21.48
	1.5	9.41	17.71
	4.0	6.05	13.64
	10.0	6.20	13.30
	25.0	6.29	12.95
	60.0	7.37	12.88

Tabla No. 3

METODO	Concentración (PRU/ml)	COEFICIENTE DE VARIACION %	
		Intraensayo	Interensayo
RAST	* 0.35	12.66	13.53
	0.70	5.47	12.47
	3.50	4.24	13.22
	17.50	7.40	22.75

Las tablas 2 y 3 muestran los coeficientes de variación intra e interensayo del estudio de exactitud y sensibilidad para las cuantifi-

caciones de IgE total y de IgE alérgeno-específica por métodos inmuno
enzimáticos.

La sensibilidad se da con el valor de la concentración más baja-
(*), verificada por el coeficiente de variación correspondiente.

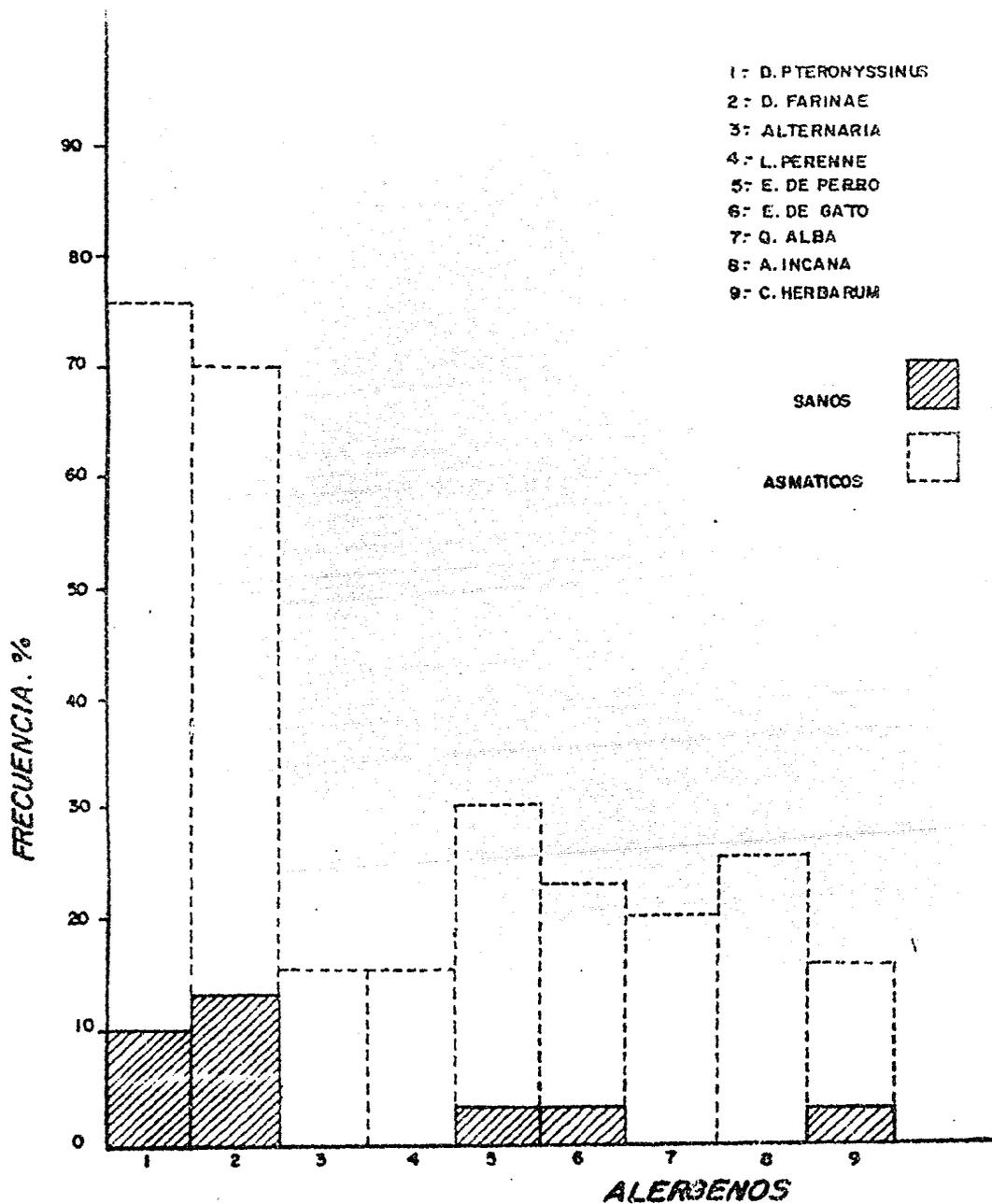


Fig.5 REACTIVIDAD CUTANEA EN PACIENTES ASMATICOS Y NIÑOS SANOS, PARA 9 ALERGENOS DIFERENTES.

Tabla No. 5

Alergeno	Sanos (%)	Asmáticos (%)
<u>Dermatophagoides pteronyssinus</u>	10.00	96.66
<u>Dermatophagoides farinae</u>	13.33	83.33
<u>Alternaria tenuis</u>	0.00	16.66
<u>Lolium perenne</u>	3.33	10.00
epitelio de perro	0.00	16.66
epitelio de gato	10.00	30.00
<u>Quercus alba</u>	0.00	13.33
<u>Alnus incana</u>	0.00	3.33
<u>Cladosporium herbarum</u>	0.00	26.66

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos apartir de tabular las frecuencias y determinarles el porcentaje correspondiente, para los niveles mayores o iguales que 0.7 PRU/ ml de IgE alergen-específica, en el suero de pacientes asmáticos y de niños sanos; para nueve alergen diferentes.

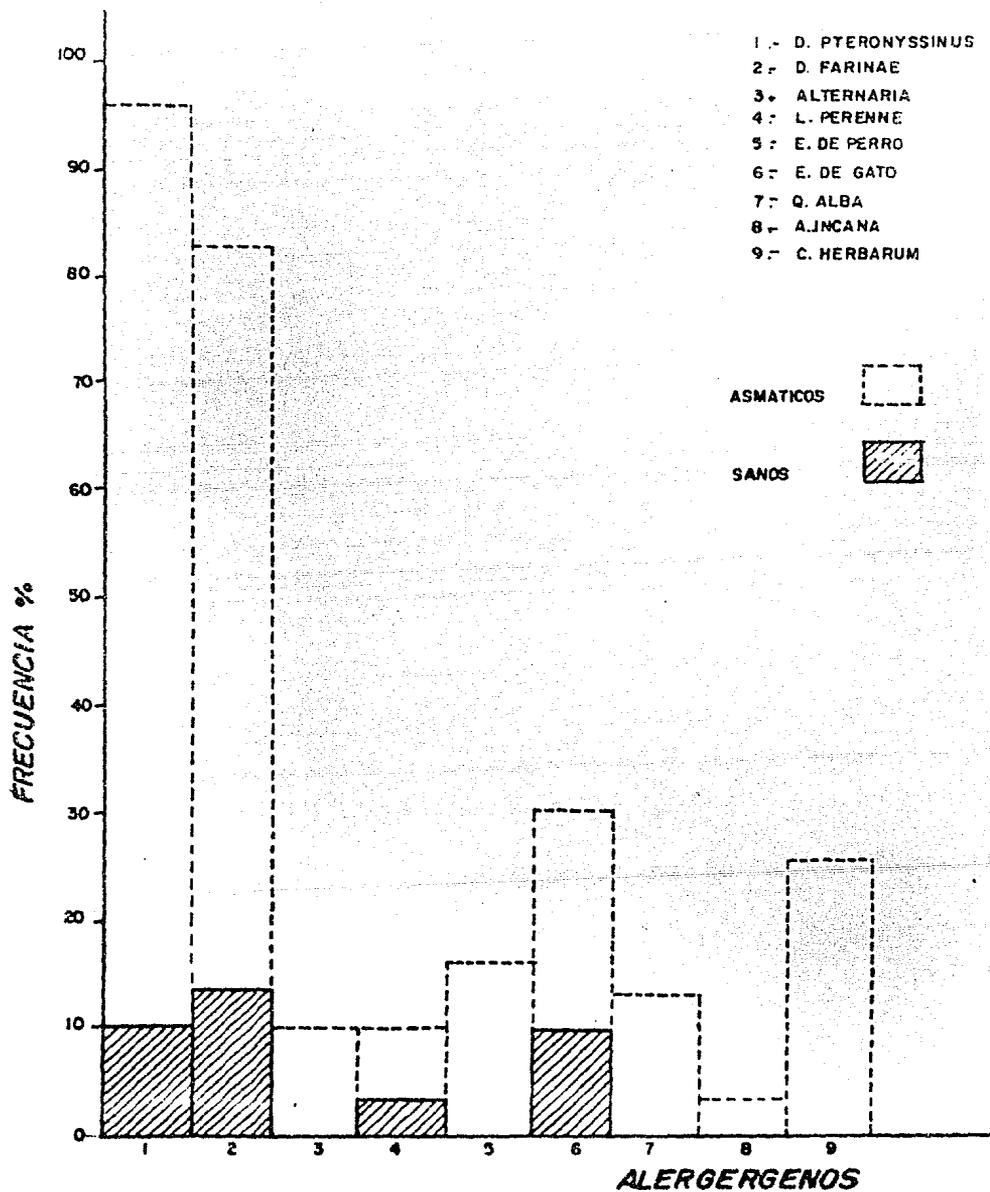


Fig. 6 NIVELES MAYORES O IGUALES QUE 0.7 PRU/ml. DE IgE ALERGENO-ESPECÍFICA, EN EL SUERO DE PACIENTES ASMATICOS Y DE NIÑOS SANOS; PARA 9 ALERGENOS DIFERENTES

6.4 DIFERENCIAS ENTRE LOS GRUPOS SANOS Y ASMATICOS EN LA DETERMINACION DE PRUEBAS CUTANEAS.

Tabla No. 6

Variablen	Z observada	P	Decisi6n
<u>D. pteronyssinus</u>	- 4.90	≤ 0.00003	Se rechaza H_0
<u>D. farinae</u>	- 4.79	≤ 0.00003	Se rechaza H_0
<u>Alternaria tenuis</u>	- 2.20	≤ 0.0139	Se rechaza H_0
<u>Lolium perenne</u>	- 2.61	≤ 0.0045	Se rechaza H_0
epitelio de perro	- 3.44	≤ 0.0003	Se rechaza H_0
epitelio de gato	- 2.97	≤ 0.0015	Se rechaza H_0
<u>Querkus alba</u>	- 2.82	≤ 0.0024	Se rechaza H_0
<u>Alnus incana</u>	- 2.67	≤ 0.0038	Se rechaza H_0
<u>C. herbarum</u>	- 1.92	≤ 0.0274	Se rechaza H_0

H_0 La respuesta a pruebas cut6neas es igual en los dos grupos

H_a La respuesta del grupo de los normales es menor que el grupo de los asm6ticos.

La tabla 6 muestra la probabilidad (P) asociada al valor observado de U (U de Mann-Whitney) la cual se acerca a una distribuci6n normal, por lo que se emplea el valor de Z con un nivel de significancia del 0.05.

Se observa que las respuestas a las pruebas cut6neas en los nueve alergenos son menores en los sanos que en los asm6ticos con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

6.5 CORRELACION ENTRE PRUEBAS CUTANEAS Y RAST.

Tabla No. 7

Alergeno	rs Sanos	rs Asmáticos
<u>D. pteronyssinus</u>	0.81	0.61
<u>D. farinae</u>	0.75	0.47
<u>Alternaria tenuis</u>	0.76	0.41
<u>Lolium perenne</u>	0.76	0.09
epitelio de perro	0.60	0.28
epitelio de gato	0.80	- 0.08
<u>Querkus alba</u>	0.77	- 0.07
<u>Alnus incana</u>	0.79	0.45
<u>C. herbarum</u>	0.73	0.07

rs = coeficiente de correlación de Spearman.

La tabla 7 muestra los valores obtenidos de coeficientes de correlación (rs), determinados por una prueba no paramétrica de rangos de Spearman. Se procesaron los datos obtenidos en las pruebas cutáneas y en el ensayo de IgE alergeno-específica, para ambos grupos: sanos y asmáticos.

6.6 Niveles séricos de IgE total en ambos grupos

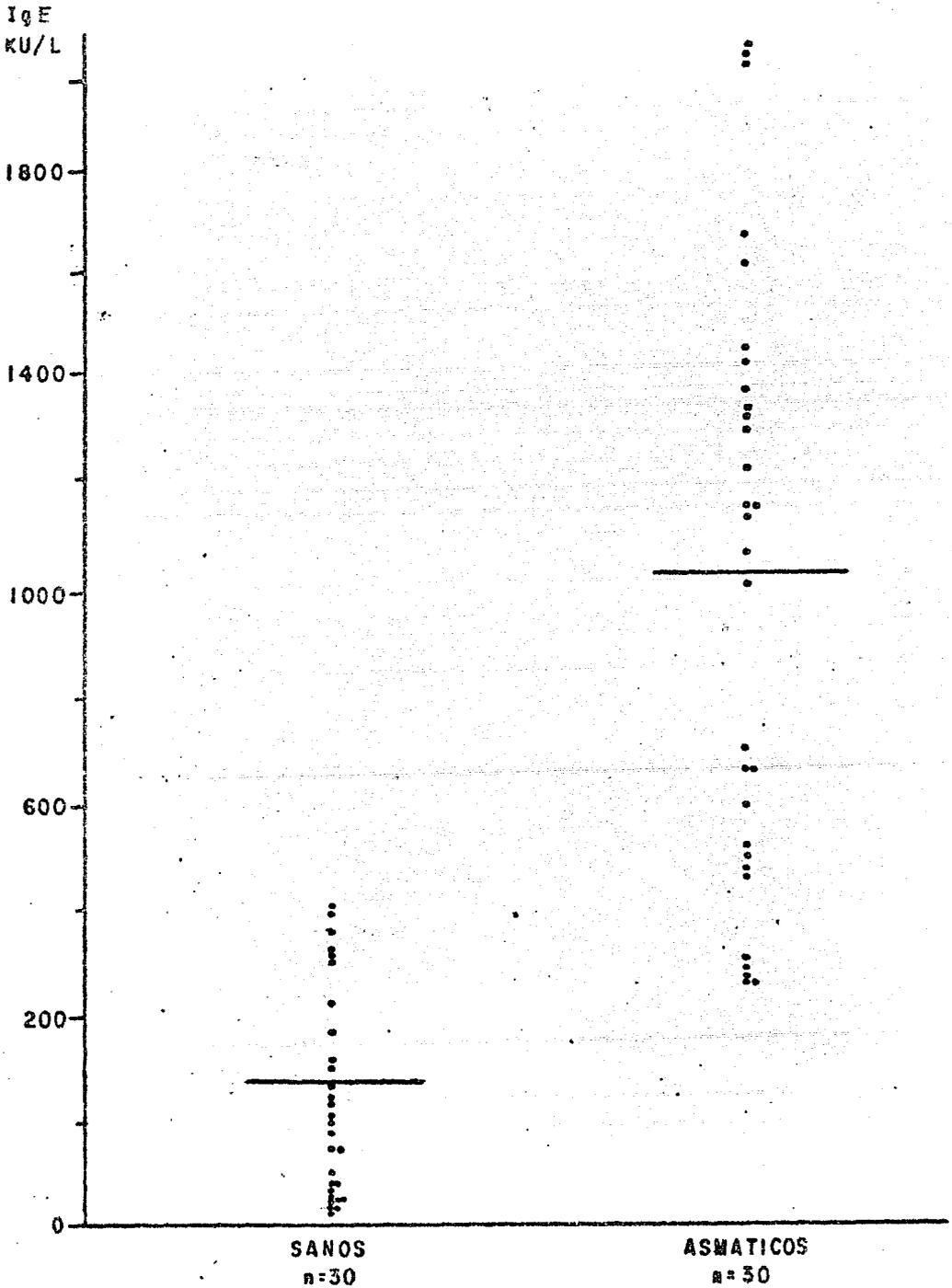


Fig. 7.

La figura 7 es una representación gráfica de las diferencias encontradas en los niveles séricos de IgE total en los pacientes asmáticos y en los niños sanos. La línea horizontal muestra la concentración promedio que, para los asmáticos fué de 1054,00KU/l y para los niños sanos de 137.73 KU/l. Cada punto representa el valor obtenido de IgE en cada uno de los individuos de ambos grupos.

Tabla No. 8

Población	No. de casos	\bar{X}	SD	Intervalo de confianza 95%
Sanos	30	137.73	127.03	92.23 - 183.19
Asmáticos	30	1054.00	577.41	847.38 - 1260.60

\bar{X} = media aritmética
SD = desviación estandar

La tabla 8 muestra los valores de intervalo de confianza, para la concentración de IgE total en ambos grupos, obtenidos a partir de la fórmula:

$$\bar{X} \pm 1.96 \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

Donde \bar{X} es la media aritmética

SD es la desviación estandar

N es el No. de casos.

6.7 REGRESION MULTIPLE.

Tabla No. 9

Variables incluidas en el modelo	% de variabilidad explicada por el modelo	SANOS
X ₁ <u>D. pteronyssinus</u>		22.76
X ₂ <u>D. farinae</u>		25.48
X ₃ <u>Q. alba</u>		26.54
X ₆ epitelio de perro		29.98
X ₅ <u>A. tenuis</u>		31.04
X ₄ <u>A. incana</u>		31.28

Tabla No. 10

Variables incluidas en el modelo	% de variabilidad explicada por el modelo	ASMATICOS
X ₁ <u>D. pteronyssinus</u>		21.79
X ₂ <u>D. farinae</u>		37.04
X ₃ <u>Q. alba</u>		42.28
X ₄ <u>A. incana</u>		56.52
X ₅ <u>A. tenuis</u>		57.76
X ₆ epitelio de perro		58.74

En las tablas 9 y 10 para niños sanos y pacientes asmáticos respectivamente, se reportan los porcentajes de variabilidad explicada, por la regresión cuando se incluye en el modelo la variable independiente indicada.

6.8. ANALISIS DISCRIMINANTE.

Para seleccionar las variables que determinan las diferencias entre los dos grupos en las determinaciones de IgE total y alérgico específica, se decidió llevar a cabo un análisis de discriminantes por pasos, utilizando el criterio de Wilks, para la selección de las variables (36).

El procedimiento para la selección de variables, se determinó -- después de incluir: X_1 , X_2 , X_3 , X_6 y Y, que corresponden a: --- - D. pteronyssinus, D. farinae, Q. alba, epitelio de perro e IgE total respectivamente. Por lo tanto, las diferencias entre los grupos sanos y asmáticos están determinados por las diferencias de sus valores en relación a estas 5 variables.

Del análisis discriminante se obtuvo una función discriminante -- mediante la cual vamos a conocer la influencia que tiene cada variable en la diferenciación entre grupos (tabla 11).

De acuerdo a los coeficientes asociados a las variables se observa que la variable que más contribuye a diferenciar entre grupos son: D. pteronyssinus, D. farinae e IgE total; cuyos coeficientes son: - 0.82055, 0.82055 y 0.62970 respectivamente. Al multiplicar estos coeficientes por los valores de cada variable asociada obtenemos una función que es una combinación lineal de las cinco características mencionadas anteriormente.

Tabla No. 11

Variables	FUNCION
X_1 <u>D. pteronyssinus</u>	0.82055
X_2 <u>D. farinae</u>	0.82055
Y IgE total	0.62970
X_3 <u>Querkus alba</u>	- 0.38357
X_6 epitelio de perro	0.43949

La combinación lineal de las 5 variables mencionadas anteriormente es:

$$D = 0.62970Y + 0.82055X_2 - 0.38357X_3 + 0.43949X_6$$

El objeto de tal función es que exista una máxima separación entre los grupos, observando la figura (8) vemos que el grupo de los sanos tiene valores de D 0 y el grupo de los asmáticos valores mayores que cero.

De lo que se concluye que ambos grupos son diferentes y que las máximas diferencias están dadas por las variables que presentan el coeficiente más alto.

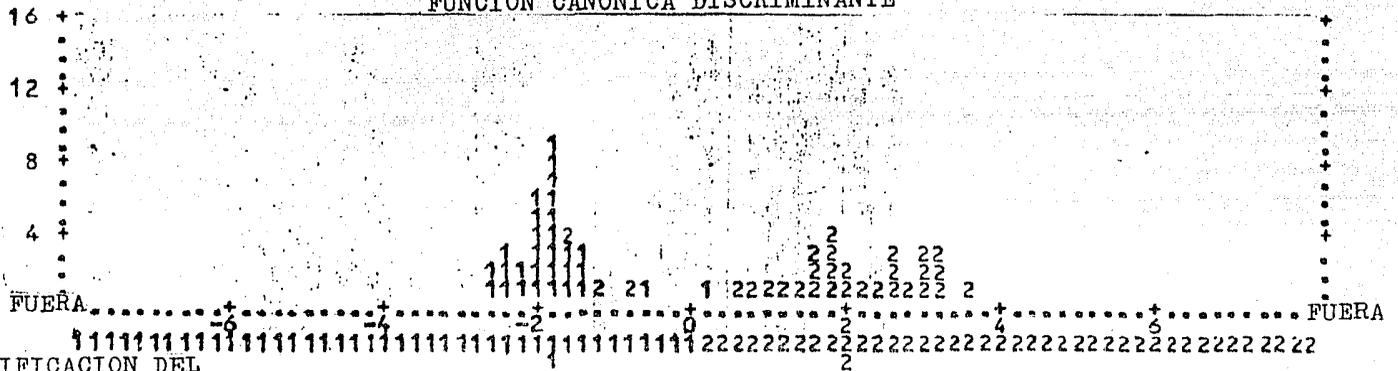
Con objeto de validar nuestra función discriminante se procedió a calcular los valores de D para nuestros individuos de estudio clasificando correctamente el 93.33% de los casos.

Fig. 8.

HISTOGRAMA DE TODOS LOS GRUPOS DE INTERES

FUNCIÓN CANÓNICA DISCRIMINANTE

F
R
E
C
U
E
N
C
I
A



CLASIFICACION DEL
GRUPO POR CENTROIDES

7. DISCUSION DE RESULTADOS

7. DISCUSION DE RESULTADOS.

Se observó que para el método enzimático PRIST, la mayor exactitud se encontró en las concentraciones de la curva estandar: 4, 10 y 25 KU/l que corresponden a las concentraciones de 80, 200 y 500 KU/l si se realiza una dilución 1:20 de las muestras problema. Mientras que para el método RAST la mayor exactitud se encontró en las concentraciones de 0.7, 3.5 y 17.5 PRU/ml.

Si se considera como sensibilidad, el valor mínimo que puede ser detectado confiablemente, los valores más bajos de concentración nos indican la sensibilidad para ellas, ya que a mayores diluciones la variación es cada vez más alta, en las condiciones metodológicas trabajadas, en ambos casos se obtuvieron valores aceptables para concentraciones clínicamente importantes.

El coeficiente de variación interensayo para ambos métodos resultó ser muy alto, por lo tanto debe prepararse una curva estandar cada vez que se efectuen las determinaciones para cuantificar IgE total e IgE alérgeno-específica.

Sin embargo, los coeficientes de variación intra e interensayo que se reportan en el presente trabajo como una medida de precisión, exactitud y sensibilidad de los métodos inmunoenzimáticos PRIST y RAST, son satisfactorios para hacer uso de ellos rutinariamente, considerando las reglas de Tonk y la del Colegio de Patólogos Americanos (31), empleadas para evaluar los coeficientes de variación de una de-

terminación en particular en la práctica clínica.

De acuerdo a la tabla 4, el alérgeno que con mayor frecuencia -- produce hiperreactividad cutánea en pacientes asmáticos es el -- Dermatophagoides pteronyssinus, casi con la misma frecuencia el -- Dermatophagoides farinae, siguiendo en orden decreciente el epitelio- de perro, Alnus incana, epitelio de gato, C. herbarum, Q. alba , -- A. tenuis y por último L. perenne. La misma tabla muestra que inclu- so en niños sanos el alérgeno que causa reactividad cutánea con mayor frecuencia es el Dermatophagoides, solo que en este caso la especie - farinae, seguida de la pteronyssinus.

La tabla 5 muestra que, de los alérgenos probados, el que con -- mayor frecuencia en nuestro medio, induce la producción de anticuer- -- pos IgE específicos en pacientes asmáticos; es el Dermatophagoides -- especie pteronyssinus, casi con igual frecuencia la farinae, y con -- frecuencias notablemente menores el epitelio de gato, C. herbarum, -- epitelio de perro, Q. alba, Lolium perenne, A. tenuis y por último -- Alnus incana. En cuanto a los niños sanos, se observó que aun en fre- cuencias muy bajas, también se encuentran niveles elevados de IgE -- alérgeno-específica, en particular dirigida a los Dermatophagoides -- de ambas especies.

Empleando la prueba U de Mann-Whitney, se demostró que las res- -- puestas a las pruebas cutáneas en los nueve alérgenos probados son me- nores en el grupo de los sanos que en el de los asmáticos con un ni- vel de significancia del 0.05.

En cuanto a la correlación entre pruebas cutáneas y el ensayo - inmunoenzimático RAST, determinado por el método de Spearman, la tabla 6 muestra una buena correlación entre hiperreactividad cutánea y niveles elevados de IgE alérgeno-específica en los niños sanos, mientras que la misma prueba para los pacientes asmáticos no muestra correlación alguna.

Los niveles séricos de IgE resultaron notablemente más elevados en pacientes asmáticos que en los niños sanos. Este hallazgo no es sorprendente, puesto que ya se conocía en la literatura. Sin embargo al comparar dichos resultados con los de otros países, se observa -- que tanto para los niños sanos como para los pacientes asmáticos, -- existen niveles más elevados de IgE total en niños mexicanos que los obtenidos en otros países (Suecia, Francia, Estados Unidos y Argentina), reportados empleando la misma técnica de PRIST (1, 9,38).

El análisis discriminante, demostró que en las determinaciones - de IgE total e IgE alérgeno-específica las variables que más diferencian entre los dos grupos son: D. pteronyssinus, D. farinae e IgE -- total.

En el estudio de regresión múltiple, se demostró que cuando se - incluyen todas las variables en la regresión, en los niños sanos, se explica el 31.28% de la variación en la concentración de la IgE total. Mientras que en los pacientes asmáticos se explica el 58.73% de la variación de la IgE total.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES.

- 8.1 Los coeficientes de variación, mostraron que existe una buena - precisión, exactitud y sensibilidad en los métodos inmunoenzi- máticos PRIST y RAST y que por tanto, se puede hacer uso de am- bos rutinariamente.
- 8.2 De los alergenos probados, el que con mayor frecuencia produce- hiperreactividad cutánea, en los pacientes asmáticos en nuestro medio, son los Dermatophagoides pteronyssinus y farinae.
- 8.3 Las respuestas a las pruebas cutáneas son significativamente me- nores entre los sanos que entre los asmáticos.
- 8.4 Existen niños sanos que sin presentar ningún síntoma de asma, - muestran hiperreactividad cutánea a los alergenos, principalmen- te a los Dermatophagoides farinae y pteronyssinus.
- 8.5 En el grupo de los niños sanos se detectaron niveles elevados - de IgE alergeno-específica, sobre todo dirigida contra el - Dermatophagoides farinae y pteronyssinus.
- 8.6 No se encontró correlación entre pruebas cutáneas e IgE alerge- no- específica en pacientes asmáticos de edad pediátrica, mien- tras que para los niños sanos sí existió correlación. Por lo - que se concluye que para determinar el alergeno que induce los- síntomas en estos pacientes se requiere de ambas pruebas simul- taneámente

8.7 Los niveles séricos de IgE total, tanto en niños sanos como en pacientes asmáticos están más elevados en México que en otros países.

8.8 De las IgE específicas cuantificadas, las que más diferencian entre ambos grupos son las que van dirigidas contra los alérgenos Dermatophagoides pteronyssinus y farinae, las cuales son capaces de diferenciar entre los grupos sanos y asmáticos mejor que la determinación de IgE total.

8.9 En los pacientes asmáticos los anticuerpos IgE alérgeno-específicos estudiados contribuyen más a elevar el valor de IgE total, que en los niños sanos.

9. BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Bjorksten, B.: Significado clínico de la prueba IgE y RAST. Archivos Argentinos de Alergia e Inmunología. 1982: 5-22.
2. Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L., Wells, J.V.: Inmunología Clínica. Asma. 2a. ed. México: El Manual Moderno, 1980: - 274-297.
3. Yunginger, J.W. and Gleich, J.: The impact of the discovery of - IgE on the practice of allergy. Symposium on Pediatric Allergy.- Pediatric Clinics of North America, 1975; 22: 3-15.
4. Johansson, S.G.O.: The clinical significance of IgE. Clinical - Immunology, 1981; 2: 124-145.
5. Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M.M.: Physico-chemical - properties of human reaginic activity. IV. Presence of a Unique - immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. The Journal of Immunology, 1966; 97(1): 75-85.
6. Johansson, S.G.O., Bennich, H. and Wide, L.: A new class of immu-
noglobulin in human serum. Immunology, 1968; 14: 265-272.
7. Johansson, S.G.O., : Serum IgND levels in healthy children and -
adults. Int. Arch. Allergy, 1968; 34: 1-8.

8. Kjellman, N.I.M., Hansson, L.O. & Ludvigsson, J.: Atopic allergy- and serum IgE in randomly selected eight year- old children. *Acta Allergologica*. 1977; 32: 91-108.

9. Bousquet, J., Coulomb, Y., Arrendal, H., Robinet-Levy, M. and Michel, F.B.: Total serum IgE concentrations in adolescents and -- adults using the Phadebas IgE PRIST Technique. *Allergy*, 1982; 37: 397-406.

10. Michel, F.B., Bousquet, J., Greillier, P., Robinet-Levy, M., Coulomb Y.: Comparison of cord blood immunoglobulin E concentrations and maternal allergy for the prediction of atopic diseases in infancy. *J. Allergy Clin. Immunol*, 1980; 65(6): 422-430.

11. Johansson, S.G.O.: Radioimmunoassay of IgE antibody by RAST and - its clinical application. *Acta Paediatrica Belgica, Supplement - VII*, 1976; 30: 9-14.

12. Kenneth, G.P.: A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for human immunoglobulin E: Comparison of microtiter plate - and disk methodologies. *Analytical Biochemistry*, 1981; 117: 53-60.

13. Price, J.F., Hey, E.N. and Soothill, J.F.: Antigen provocation to the skin, nose and lung, in children with asthma, immediate and - dual hypersensitivity reactions. *Clin. Exp. Immunol.*, 1982; 47: - 587-594.

14. Croner, S., Kjellman, M.N., Eriksoon, B. and Roth, A.: IgE screening in 1701 newborn infants and the development of atopic disease during infancy. Arch. Dis. Child., 1982; 57: 364-368.
15. Bryant, D.H., Buns, M.W. and Lazarus, D.: The correlation between skin test, bronchial provocation test and the serum level of IgE-specific for common allergens in patients with asthma. Clinical - Allergy, 1975; 5: 145-157.
16. Krupp, M.A., Chatton, M.J.: Current Medical Diagnosis & Treatment 1981: Lung diseases due to immunologic reactions. Los Altos Ca lifornia, USA: Lange Medical Publications, 1981: 114-117.
17. Sokol, N.W. y Beall, N.G.: Asma. Tribuna Médica, 1983, 1 (519): - 9-18.
18. Muñoz, L.F.: Asma bronquial infantil, Barcelona, España.: publicaciones médicas, ESPAXS., 1974; 6-115.
19. Landau, L.I.: Valoración y asistencia del asma en pacientes exter nos: Clínicas Pediátricas de Norte America, México: Interamericana, S.A., 1979: 580-597.
20. Jones, R.S.: Asma Infantil: Aspectos inmunológicos del asma en el niño. México: Interamericana, S.A., 1978: 40-45.

21. Aalberse, R.C.: Allergens in house dust. *Acta Oto-Rhino-Laryngologica Belgica*, 1978; 32:25-31.
22. Warner, J.O.: Mites and asthma in children. *Br. J. Dis. Chest*, -- 1978; 72: 79-87.
23. Cetner, J.: RAST in the current pneumological practice. *Acta Paediatrica Belgica*, Supplement VII, 1977; 30 25-27.
24. Brandt, R. and Yman, L.: Dog dander Allergens. *Int Archs. Allergy appl. Immun.*, 1980; 61: 361-370.
25. Hoffman, D.R.: Dog and Cat allergens: Urinary proteins or dander-proteins?, *Annals of Allergy*; 1980; 45: 205-206.
26. Prince, H.E. and Meyer, G.H.: An Up-to-date look at mold allergy. *Annals of Allergy*, 1976; 1980; 45: 205-206.
27. Per Juto and Bjoresten, B.: Serum IgE in infants and influence of type of feeding. *Clinical Allergy*, 1980; 10: 493-500.
28. Haddad, Z.H.: Clinical and immunological aspects of food hypersensitivity. *Annals of Allergy*, 1982; 49: 29-34.

29. Kulczycki, A.: Role of Immunoglobulin E and Immunoglobulin E receptors in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1981; 61- (1): 5-14.
30. Davidsohn, I., Henry, B.J. and Allen, D.L.: *Diagnóstico Clínico por el Laboratorio*. 6a. ed. Barcelona, España: Salvat editores - S.A., 1981: 144-145.
31. Tietz, N.W.: *Química Clínica Moderna: Control de Calidad*, México, Interamericana, 1972: 15-19.
32. Mendenhall, W. y Beaver, R.: *Introducción a la probabilidad y la estadística*. México: Centro Regional de ayuda técnica, 1971: 15-99.
33. Siegel, S.: *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. México: Trillas, 1982: 143-155.
34. Wayne, W.D.: *Estadística con aplicaciones a las ciencias sociales y a la educación*. México: Mc Graw Hill, 1981: 387-396.
35. Aranda, O.F. y Velazco, A.S.: SAREG, Un programa interactivo para simulación y análisis de problemas de regresión. *Comunicaciones - Técnicas*. Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas. UNAM. México, 1984. (79): 4-130.

36. Méndez, I. y Rodríguez, S.: Dos ejemplos de aplicación de análisis discriminante en Medicina. Comunicaciones Técnicas. Instituto de Investigaciones en Matemáticas aplicadas y en Sistemas, -- UNAM. México, 1978: 9(179): 1-42.
37. Ochoa, A. P. M.: Una aplicación de análisis discriminante a problemas de Biología. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM. México, 1981: 1-57.
38. Crisci, H.O.D. y Crisci, C.: Valor pronóstico y diagnóstico del estudio de la IgE en las diversas alergosis en los niños. III - Jornadas Interprovinciales de Inmunoalergia, Monte Hermoso, Argentina, Abril 1982.