

11226

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

PRUEBA DE SHELLEY MODIFICADA. EXPERIENCIA DE 214 CASOS
SOSPECHOSOS DE ALERGIA A MEDICAMENTOS.

TESIS DE POSGRADO

QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALIDAD EN MEDICINA FAMILIAR

DRA. MARÍA TERESA DÍAZ TORRES

ASESOR

DRA. NORA HILDA SEGURA MÉNDEZ

MÉXICO D.F. AGOSTO, 2008/



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**PRUEBA DE SHELLEY MODIFICADA. EXPERIENCIA DE 214 CASOS
SOSPECHOSOS DE ALERGIA A MEDICAMENTOS.**

TESIS DE POSGRADO

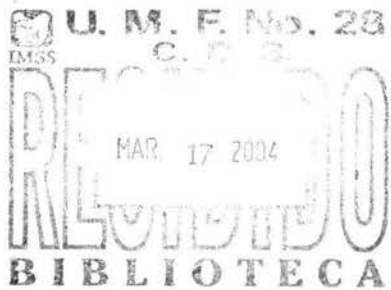
QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALIDAD EN MEDICINA FAMILIAR

DRA. MARÍA TERESA DÍAZ TORRES

ASESOR
DRA. NORA HILDA SEGURA MÉNDEZ

COASESORES

DR. BERNARDO TORRES SALAZAR.
QFB. MARÍA TERESA MARTÍNEZ PÉREZ.



[Handwritten signature]

DR. JOSÉ ANTONIO RODRIGUEZ COVARRUBIAS
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR No. 28
"GABRIEL MANCERA"

[Handwritten signature]



DR. BERNARDO AUGUSTO TORRES SALAZAR
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION
DE LA UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR No. 28
"GABRIEL MANCERA"

[Handwritten signature]
Dra. Dulce María Rodríguez Vivas
Médico Adjunto del Curso de la Especialidad en Medicina Familiar
de la Unidad de Medicina Familiar No. 28
"Gabriel Mancera"

DRA. DULCE MARÍA RODRIGUEZ VIVAS
MÉDICO ADJUNTO DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD EN MEDICINA FAMILIAR
DE LA UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR No. 28
"GABRIEL MANCERA"

[Handwritten signature]

DELEGACION No. 3 S. O. DEL D. F.
H. E. C. M. N SXXI LAB DE ALERGI A E I. C.
" DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ "
AV. CUAUHEMOC 330 CGL. DOCTORES C.P. 06720

DRA. NORA HILDA SEGURA MÉNDEZ
ESPECIALISTA EN ALERGI A E INMUNOLOGÍA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI IMSS



AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por darme la fortaleza y la entereza.

A mi madre:

Por todo su amor y
apoyo.

Al Dr. Bernardo Torres:

Por que con sus consejos y
paciencia orientaron mi vida.

A la Dra. Nora H. Segura:

Por compartir sus conocimientos y
tiempo.

A mis maestros:

Por el cúmulo de
conocimientos
compartidos.

A mis amigos:

Por su cariño incondicional

INDICE

1. ANTECEDENTES	7
1.1. PRUEBA DE SHELLEY	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. OBJETIVOS	31
5. ASPECTOS METODOLÓGICOS	32
6. ASPECTOS ÉTICOS	42
7. ASPECTOS ORGANIZATIVOS	43
8. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	44
9. RESULTADOS	45
10. ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
11. CONCLUSIONES	49
12. FIGURAS	53
13. ANEXOS	65
14. BIBLIOGRAFÍA	70

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

PRUEBA DE SHELLEY MODIFICADA. EXPERIENCIA DE 214 CASOS SOSPECHOSOS DE ALERGIA A MEDICAMENTOS.

TESISTA: Dra. María Teresa Díaz Torres
Residente de la Especialidad de Medicina Familiar

ASESOR: Dra. Nora Hilda Segura Méndez
Médico Adscrito del Departamento de Alergología e Inmunología del
Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del
IMSS.

COASESOR: Dr. Bernardo Augusto Torres Salazar
Jefe de Enseñanza e Investigación de la U.F.M 28 IMSS
Q.F.B. Ma. Teresa Martínez Pérez
Laboratorio de Alergia e Inmunología

Departamento de Alergología e Inmunología del CMNSXXI del IMSS
Unidad Médica Familiar No. 28 IMSS

PRUEBA DE SHELLEY MODIFICADA. EXPERIENCIA CON 214 CASOS SOSPECHOSOS DE ALERGIA A MEDICAMENTOS

1. ANTECEDENTES

La complicación inmediata de una reacción alérgica a medicamentos, es una reacción anafiláctica grave, que pone en riesgo la vida del paciente, existen pocos datos estadísticos que permitan conocer su prevalencia y mortalidad (1)

Sólo entre un 5 a 10% de los casos atendidos por reacciones a medicamentos corresponden a reacciones alérgicas. (2)

Las penicilinas son la causa más frecuente de alergia medicamentosa, en EUA causan anualmente más de 400-800 muertes, que representa el 75% de las muertes asociadas a anafilaxia, es más común entre los 20-49 años, y principalmente después de la administración parenteral del fármaco (3)

La manifestación más común de alérgica a fármacos se presenta en piel como urticaria, angioedema, dermatitis de contacto y dermatosis exantemáticas. (4)

La reacción alérgica a medicamentos ocurre en el 3% de todos los pacientes hospitalizados. Los pacientes adultos hospitalizados reciben en promedio 10 medicamentos

diferentes durante su estancia, presentando reacciones adversas en uno de cada 20 tratamientos instituido, el 10% de los casos ponen en riesgo la vida del paciente. (5).

La reacción alérgica a medicamentos es una reacción de hipersensibilidad inmediata por IgE que se encuentra en los basófilos polimorfonucleares. Cuando estas células ya sensibilizadas se exponen a determinado tipo de alérgenos, se generan señales intracelulares que inducen su degranulación. (6,7)

Los factores de riesgo para una reacción alérgica a los fármacos son:

- a) Factores propios del paciente.
 - 1) Edad del paciente.
 - 2) Factor genético/constitucional.
- b) Factores propios del tratamiento.
 - 1) Propiedades químicas del fármaco.
 - 2) Dosis y duración del tratamiento.
 - 3) Vía de administración del fármaco. (8)

Los diagnósticos diferenciales para realizar el diagnóstico de alergia a medicamentos incluyen:

- 1) Toxicidad.
- 2) Sobredosis.
- 3) Interacción medicamentosa
- 4) Reacciones debido a factores del hospedero.

- 4.1. Deficiencias en la excreción de metabolitos.
- 4.2. Deficiencias enzimáticas.
- 4.3. Interferencia con actividad enzimática.
- 4.4. Interferencia con la desnutrición.
- 4.5. Reacciones de Jarisch-Herxheimer.
- 4.6. Idiosincrasia.

- 5. Reacciones pseudoalérgicas.
- 6. Reacciones alérgicas. (9)

Las manifestaciones clínicas de la alergia a medicamentos incluyen principalmente la clasificación del mecanismo de daño inmunológico tipo I de la clasificación de Gell y Coombs, y esta mediado principalmente por anticuerpos IgE.

Los antecedentes personales y familiares de atopia no constituyen un factor de riesgo para alergia a medicamentos (9 y 10).

La manifestación clásica y más grave de la hipersensibilidad a fármacos es la anafilaxia posterior a la aplicación de medicamentos como penicilina, productos sanguíneos, hormonas polipeptídicas y vacunas. (11)

Los medicamentos son la causa más común de urticaria, los antibióticos aparecen en primer lugar hasta con un 50%, seguidos por los analgésicos y antipiréticos en un 35% y en un 16% la combinación de ambos. (12).

Los antibióticos que generan alergia con más frecuencia son: la penicilina G, la Penicilina V y la Ampicilina en un 88%

Los analgésicos que causan alergia de forma más común son: el ácido acetilsalicílico en un 53%, seguido por el paracetamol.

Otros estudios refieren una alta reactividad cruzada entre penicilina G y ampicilina, menor con meticilina y dicloxacilina; un 50% de los alérgicos a penicilina presentan pruebas positivas a cefalosporinas.

Un 10-15% de los pacientes presentan reacción alérgica a cefalosporinas. Las dermatosis alérgicas inducidas por antibióticos suman un 45% de todas las reacciones medicamentosas. (13)

Además de la historia clínica se emplean diferentes pruebas de laboratorio para el diagnóstico de alergia a medicamentos, entre ellas la determinación de IgE específica, pruebas cutáneas, y radioinmunoabsorbencia entre otras.

Aunque la Prueba de provocación es el estándar de oro para alergia a medicamentos, pero, dado que pone en riesgo la vida del paciente, no se utiliza de forma habitual en la práctica clínica diaria.

Así las pruebas cutáneas son las más utilizadas, pero son muy problemáticas ya que solamente el 50% de los positivos, son realmente alérgicos, por lo que tienen un alto grado de falsos positivos; además que solamente muestran que la piel del paciente es

hipersensible al fármaco, pero no indican que esta sea capaz de producir una reacción generalizada, por otra parte las dosis requeridas para su realización podrían poner en peligro la vida del paciente, si este es susceptible a desarrollar shock anafiláctico. (14)

Las pruebas in vivo, por método de Prick (rasguño o punción), para el diagnóstico de alergia a medicamentos como la penicilina no debe aplicarse cuando exista historia clínica compatible con esta condición, y se requiera el uso de betalactámicos como tratamiento. Cuando la prueba es positiva, indica que cerca del 80% de los casos existe mediación por IgE y que existe un mayor riesgo de presentar reacción anafiláctica grave. (15,16)

La prueba de sangre RAST (radioalergoabsorbente), se realiza in vitro y permite la detección de IgE en el plasma, pero se considera como la prueba alternativa a la prueba de Prick, tanto por su costo como por la tardanza en los resultados. Su indicación es cuando exista la posibilidad de un mayor riesgo de presentar anafilaxia con la prueba de Prick, el costo de esta prueba(RAST) en 1988 fue de \$25,492.66 por muestra procesada; por otra parte Aas y Johansson mencionan una especificidad del 93% con extractos de alimentos, mientras Y. Mumcuoglu refiere que solo es del 60% a medicamentos. (23)

Por su parte, la prueba de Shelley o degranulación de basófilos (HBDT) es útil para establecer el diagnóstico de hipersensibilidad a medicamentos, es una prueba in vitro, de fácil realización, de costo bajo(\$8,486.49 por muestra procesada en 1988) (25) y que no pone en peligro la vida del paciente. En cuanto a su efectividad en contra de las pruebas ya mencionadas, existen una serie de estudios desde 1961 a la fecha que avalan la efectividad de la misma incluso contra las pruebas de Prick y RAST.

La prueba de Shelley se basa en las propiedades que poseen los basófilos, que son células especialmente útiles para realizar el diagnóstico de alergia a medicamentos (15, 16). La biología del basófilo es útil para realizar estudios in vitro, son pequeños, miden 0.3 a 0.8 micrómetros tienen una coloración azul intenso con numerosos gránulos púrpura (sí solo se usa azul de toluidina) o de color rojo ladrillo (sí se agrega otro paso de tinción con rojo neutro) (17).

Los basófilos de un individuo sensibilizado, al ser expuestos de nuevo al antígeno muestran hinchazón, oscilación de gránulos, formación de pseudópodos y finalmente la salida de los gránulos (18).

Las características de los basófilos sensibilizados son útiles para realizar la prueba de degranulación, en la que por medio de observación microscópica se determina el porcentaje de basófilos degranulados después de su exposición causal in vitro. (19,20).

Para ello, el procedimiento descrito en la literatura indica recolectar 20 ml. de sangre heparinizada por paciente, se centrifuga y se obtiene el paquete celular, se prepara el medicamento a diluciones de 1:100, 1:1000 y 1:2000 con solución fisiológica al 0.9%, posteriormente se pone en contacto con alicuotas de células blancas con el medicamento, se incuba a 37°C por 20 minutos, se realiza el frotis de células teñidas previamente con rojo neutro, se fijan y se tiñen con azul de toluidina. Se toma como control células blancas del mismo paciente sin administración del medicamento, se leen al microscopio óptico contando 1000 células y los basófilos que en ellas se encuentran, se compara el número de basófilos con el control y se calcula el porcentaje de basófilos degranulados. Se toma como positiva, con una degranulación mayor del 20% respecto al control.

Por todo lo anterior, la degranulación de basófilos es considerada una alternativa al problema de diagnóstico de alergia a fármacos.

La degranulación de basófilos después de la administración de un antígeno específico es útil para valorar la hipersensibilidad a dicho antígeno, en un sistema in vitro (18).

1.1. PRUEBA DE SHELLEY

La prueba tiene sus inicios en 1958 cuando el Dr. Shelley observa un shock anafiláctico en un paciente posterior a la aplicación intramuscular de penicilina, encontrando que los basófilos pueden constituir un índice citológico útil para realizar el diagnóstico de anafilaxia (26).

Así en 1961, Shelley propone una nueva prueba in vitro con intención diagnóstica: la degranulación de basófilos.

Hasta entonces la degranulación de basófilos había sido utilizada para el diagnóstico de la esquistomiasis, alérgenos ambientales y alimentos únicamente..

La técnica descrita por el Dr. Shelley fue la siguiente:

TECNICA

Se empleaba 1 ml sangre venosa fresca tomada en una jeringa de insulina, sin heparina realizándolo en menos de 5 minutos para evitar cambios morfológicos de la

muestra. Inmediatamente se agregaba el fijador a la muestra . Esto permitía conservar por un periodo de dos horas al menos, la muestra de sangre coagulada. Los tubos eran de poliestireno de 1 ml para centrifugado. Las muestras utilizadas eran de 0.1 ml de sangre venosa, pudiéndose usar muestra de sangre capilar pequeña, empleando volúmenes proporcionales del fijador.

LA FIJACIÓN LÍQUIDA

El fijador (alcohol etílico a 60% + ácido acético a 20%+ cloroformo al 20%) fue diseñado para arreglar al basófilo. El alcohol actuaba destruyendo los eritrocitos, el ácido acético evitando la precipitación de las proteínas de la sangre u otros elementos, y el cloroformo previniendo la precipitación gruesa.

Se inyectaba 0.1ml de sangre en 10 ml de fijador frío agitando con vigor para dispersar la sangre. La sangre no debía inyectarse rápido cerca de la pared de vaso, solo dejarle caer suavemente el fijador. Este se guardaba en vaso con tapa en el refrigerador previniendo la evaporación.

Al momento del experimento, a la sangre se le añadían 10 ml del fijador en 20 ml de suero. Se agitaba y la mezcla se guardaba en baño frío (4°C) y más tarde se transfería al refrigerador a una temperatura de -5°C por 30 minutos..

Durante la fijación, todas las células van al fondo de la botella. Regularmente, 8 ml de fijador queda suspendida, logrando una concentración 5 veces mayor. Para la sangre normal esta concentración es satisfactoria.

LA FILTRACIÓN

La resuspensión de células, fueron filtradas con alícuotas de 1 ml al fijador en frío a través de filtros de celulosa. Se usó un aparato de microfiltrado con un frasco de succión. El aparato con una capacidad de 2ml y un área de filtrado ajustable. El diámetro del filtro de 2 cm, regularmente 8 mm.. Se emplearon filtros de membrana de celulosa pura de tamaño de poro de 0.4 a 1 micra, resistentes a la acción del fijador(solvente orgánico).

Estos se cargaban en alcohol al 20% y se guardaban en refrigerador. Antes de filtrarse, se pasaban 1ml de etanol puro frío a través del filtro para quitar toda el agua. No podían usarse filtros de Millipore, nitrocelulosa, o filtros de la acetilcelulosa porque ellos se disolvían en el fijador. La filtración era en menos de un minuto con la succión ordinaria.

El filtro seco conteniendo todos los leucocitos en su superficie era removido con cuidado para su procedimiento de teñido.

TINCIÓN Y MONTAJE

El filtro de membrana (el lado celular hacia arriba) se sumerge por 30 segundos en la toluidina (colorante azul). Esta tinción se prepara disolviendo 100 mg de azul de toluidina en 30 c.c. de agua destilada. A esta solución se le agrega 0.3 gr de sodio y fosfato de potasio esta mezcla tiene un pH de 5. La tinción se filtra a través del filtro Millipore (el tamaño del poro 0.45 micras) para quitar todas las partículas extrañas. Debe estar el cuarto y los equipos libres de partículas de polvo, para que no interfieran con la identificación celular. Se deshidrata con alcohol etílico absoluto (dos cambios de dos minutos cada uno).

Inmediatamente después se aclara con xileno (dos cambios de cinco minutos cada uno). Todos estos pasos se llevan a cabo en los cristales de reloj especiales (27 x 8 mm).

El papel de filtro teñido y aclarado se monta permanentemente en el microscopio HSR, con una solución de resina neutra de xileno, o en un portaobjeto ordinario y se cubre con un cubreobjeto (tamaño 0). Es entonces posible ver y fotografiar las células bajo la inmersión de aceite. Debe tenerse cuidado para permitir al xileno excesivo evaporarse antes de la inmersión; por otra parte las áreas opacas blancas se desarrollarán como resultado de burbujas de aire.

OBSERVACION Y CLASIFICACION

Usando un aumento de 645x y un Corning CSI-60 de filtro azul, se examina el papel entero sistemáticamente. Los basófilos aparecen claros y distintos ya que los gránulos se tiñen de oscuro con el metachromatic específico. En contraste, los otros leucocitos son de azul pálido, como las células en los especímenes propiamente teñidos. Debe evitarse el sobre teñido para evitar el enmascaramiento del basófilo. Los eosinófilos muestra un halo verdoso débil de sus gránulos, difícil de reconocer. Las plaquetas pueden aparecer como numerosas manchadas grandes, pero generalmente no interfieren. El conteo absoluto es posible, este método se emplea para estudiar la morfología dinámica del basófilo.

Con la experiencia es posible clasificar con exactitud 20 basófilos consecutivos en 15 a 30 minutos. Esta es la rutina y debe correrse o realizarse por duplicado para tener una buena concordancia bajo circunstancias ordinarias. Esto no es posible cuando se describe un campo por debajo de 20 basófilos. Se ha encontrado eso trabajando con un mínimo de 40

basófilos, el porcentaje de células disparadas en el conteo repetido varía dentro de un rango de $\pm 5\%$.

La lectura de las laminas debe aprenderse, solo la práctica y experiencia lo logra sin demasiada dificultad. La metachromasia es el sello del basófilo, pero existen ciertas trampas para el observador principiante que se deben identificar:

- 1.El sobreteñido debe ser evitado.
- 2.Deben distinguirse las plaquetas
- 3.Cada célula debe verse individualmente, ya que exploraciones rápidas no pueden descubrir los gránulos débiles del basófilo disparado.
- 4.Deben leerse usando un patrón regular para que se vean todas las células en un sitio dado.
- 5.Cada basófilo deben estudiarse bajo el enfoque variado para dar la mejor caracterización.
- 6.El reconocimiento de basófilos Jegrnulados en sus formas variadas. No solo es el reconocer el basófilo clásico.
- 7.No se cuentan los gránulos libres extracelularmente.

SIGNIFICADO

Los basófilos de la sangre contienen histamina y heparina. Dos agentes farmacodinámicos poderosos que se liberan cuando la célula sufre la degranulación. Los

estudios tempranos han revelado la participación de estas células en la reacción anafiláctica y lipemia que aclaran la reacción.

Las observaciones hechas en el hombre, indican que los datos preliminares, que resultados igualmente satisfactorios pueden ser obtenidos con este método en el estudio del basófilo en sangre animal.

Muestras de basófilos se han vistos en algunos animales de laboratorio. El empleo de esta técnica en animales debe dar más evidencia directa del papel del basófilo en la anafilaxia experimental, así como en otros experimentos que no pueden dirigirse en el hombre. El conejo tiene aproximadamente 10 veces más basófilos que el hombre, su sangre proporciona un substrato para usarse con la técnica citológica descrita.

RESUMEN

1. Se describe un método simple para la rápida fijación líquida, concentración y teñido de basófilos sanguíneos en hombre y en animales experimentales.
2. Se han mostrado alteraciones morfológicas en los basófilos y una técnica de clasificación .

En 1962 se encontraron dificultades para observar la anafilaxia in vivo, lo que originó la primera modificación, que consistió en utilizar 26 conejos albinos de Nueva Zelanda, sensibilizados con albúmina de huevo (solución fisiológica y albúmina 3%) administrada por inyección intraperitoneal de 2 ml diarios, hasta un total de 5 dosis, recibiendo igual número de animales para el control, solamente inyecciones de solución salina a las mismas dosis.

Animales de 1 mes de edad y un peso de 0.91 kg, (los conejos jóvenes presentan mayor sensibilidad).

Las muestras de sangre se tomaron de una vena marginal de la oreja con aguja y jeringa heperinizada (1/100, 0.5 ml por mililitro); realizando punción cardiaca cuando los animales presentaron shock anafiláctico y fue imposible obtener la muestra de la oreja.

La sangre se expuso a temperatura ambiente por 15 minutos a diferentes concentraciones del antígeno, y centrifugándose en micro tubos de poli estireno (0.25 ml de sangre, mezclada con 0.025 ml de antígeno diluido en solución salina). Posteriormente 0.1 ml de la muestra se fijó con alcohol etílico (60%), ácido acético (20%) y cloroformo (20%). Destruyéndose los eritrocitos y facilitando la separación de los leucocitos mediante filtro de celulosa. Posteriormente se tiñeron los basófilos con azul de toloudina, permitiendo identificar 50 tipos de basófilos, los cuales fueron clasificados en 18 grupos, dependiendo del tamaño, número, localización y grado de coloración de los gránulos.

El porcentaje de basófilos se determinó por el conteo del número de basófilos en 2000 células blancas en el papel filtro .Permitiendo observar la morfología de los basófilos sin necesidad de incubación.

Con los resultados se determinó y calculó el porcentaje total de células presentes, siendo positiva cuando el porcentaje es igual o superior al 20% de células degranuladas. Esto establece la posibilidad de detectar regularmente la sensibilidad anafiláctica al inducirse in vitro. Además que la prueba obtiene mejores resultados, cuando la concentración de antígeno expuesto es de 1:100.

A finales de 1962 se realiza una nueva modificación, la cual incluye los siguientes cambios sobre la técnica ya mencionada. La muestra de sangre se deja coagular, y el suero separado se refrigera a -4°C , lo que permite su utilización posterior. Aclarando que el plasma no es adecuada para la prueba.

Los antígenos se diluyen en solución fisiológica al 0.9% y a una concentración de 1:100. Si un antígeno no es soluble en solución salina, se pueden disolver en alcohol, éter o acetona, lavándose antes de su utilización.

La muestra sanguínea del conejo se refrigerará inmediatamente permitiendo la conservación adecuada de la fisiología y anatomía del basófilo por 2 hrs. Para cada prueba se coloca una gota de la muestra en un tubo de poliestireno, centrifugándose por 30 segundos a 11,500 rpm. Se tiñe con rojo neutro (5ml de alcohol puro y 0.6 ml del colorante). Posteriormente se mezclan éste preparado con 0.005 ml del suero del paciente, junto con 0.005 ml del antígeno, se realiza el frotis y se cubre con vaselina No. 1, esperando 5 minutos para que los gránulos de los basófilos se tiñan.

Pasado éste tiempo se realiza la primera observación, permitiendo observar si existen cambios, después de 10 minutos se realiza el conteo rutinario, y en su caso, posterior a 20-30 minutos se pueden observar cambios tardíos.

En el caso de una prueba positiva la mayoría de los basófilos muestran poca esfericidad, distorsión celular, granulosis, hinchazón de los gránulos, baja coloración, oscilación de gránulos, apariencia de gránulos claros, formación de paredes celulares

ampulosas, y flujo de gránulos desde las células. Se observa una degranulación explosiva, en individuos altamente sensibles.

Para 1963 se observó que el 10% de pacientes presentaron reacción a la penicilina, lo que mostró la oportunidad de un estudio comparativo entre la prueba de Shelley y la Técnica de Filtración y Fijación Directa. Éste estudio demostró algunas variantes sobre la técnica ya establecida para la prueba de degranulación de basófilos.

La muestra de sangre de conejo, se centrifugó por 20 segundos a 11,500 rpm, y posteriormente se congeló a -20°C por meses para reducir los anticuerpos circulantes. A continuación se incubó la muestra, calentando primero a 56°C por 30 minutos y después a 36.6°C por 4 días, eliminándose así la reactividad de la misma.

Durante este estudio se observó que estas modificaciones alteran las estructuras de los anticuerpos y permiten la presencia de oxalatos, los cuales alteraron significativamente los resultados.

En 1965, Shelley observó que los anticuerpos inducían cambios citológicos en los basófilos, lo que provocaba alteraciones en la prueba. Publicando un nuevo trabajo donde expuso una serie de observaciones sobre los detalles ha tomarse en cuenta, para que la prueba fuera correcta, desprendiéndose lo siguiente:

Se requiere un laboratorista bien entrenado en citología, con buena memoria visual, y que preste atención a los detalles que puedan alterar la prueba.

Las muestras de suero se deben procesar en un hora, utilizándose suero con títulos altos de anticuerpo, para que los cambios no afecten. Las muestras con títulos bajos, debe refrigerarse primero y después calentarse por 10 minutos a 60°C. Se debe manejar adecuadamente la muestra para evitar la hemolización lo más posible. Puede existir la posibilidad de que el conejo sea alérgico a la heparina.

Las diluciones en soluciones salinas diferentes al 0.9% pueden producir cambios en la unión antígeno-anticuerpo y en la membrana celular alterando la prueba.

En los conejos se encontró que presentaron 150 basófilos por mm, otros de 150-400 (que son lo que se usan para la prueba), y otros más de 1200. Teniendo que ser protegidos contra humo o vapores, por ser sensibles a éstos, reflejándose una alteración de los basófilos. El rango adecuado de la heparina es de 1/50,000. Como máximo la prueba debe realizarse dentro de los primeros 90 minutos.

El microscopio utilizado fue el modelo Corning CS 160.

Shelley realizó posteriormente diversos cambios a su método. La modificación más importante fue la reportada en 1977, usando la propiedad de los basófilos para teñirse con el colorante azul de toluidina, cuando se encuentran intactos, propiedad que se pierde después de haberse degranulado. Benveniste empleó sangre natural para su investigación y los basófilos se contaron en un Nageotte o cámara Fuchs-Rosenthal. Leynadier usó una suspensión enriquecida de células seguida de incubación con el antígeno específico, también la muestra ya fijada con glutaraldehído, la tiñeron con azul de toluidina. (27)

A través de los años, se han realizado una serie de estudios de valoración de la prueba para compararla con otras técnicas serológicas como la inmunfluorescencia indirecta, hemaglutinación pasiva, electroforesis y la prueba de Vogel y Minining, demostrándose que la HBDT (prueba de degranulación de basófilos humanos) es un 88% más sensible que cada una de las otras técnicas; además de presentar una excelente especificidad. (28)

La HBDT se ha comparado contra las pruebas SKIN (rascado) y RAST (radioalergoabsorbente), mostrando los resultados con una correlación de hasta un 80% entre la HBDT y la RAST siendo también positivo para las pruebas SKIN, en un 90%. (30)

Al comparar sensibilidad y especificidad de la prueba del Factor de Inhibición de la Migración de Leucocitos (FIML), contra la HBDT, con el propósito de descartar alergias verdaderas en pacientes con historia médica de reacción adversa a fármacos, los resultados mostraron que la prueba de FIML tiene poca sensibilidad y especificidad para determinar alergia a medicamentos (referencia Rangel).

Otros estudios apoyan la utilización de un Citómetro de Flujo con activación de los basófilos y leucocitos como marcadores de membrana, citando al sistema hematológico Technicon H6000 para comprobación de alergias inducida por degranulación de basófilos en muestra de sangre completa, en pacientes con alergia tipo I. Las ventajas incluyen facilidad en el procedimiento y conteo de un número amplio de células de manera rápida al deslizarse de un campo a otro (menos de 5 minutos), ello es cómodo para el técnico que solo trabaja con el control de video. Las desventajas del citómetro, es que las partículas de polvo sobre el cursor o funda tienen el mismo color grisáceo como los basófilos, y se obtiene un conteo falso por la computadora, además el número de basófilos no degranulados es más bajo con

el analizador de imagen que con el ojo humano, debido a que el área del campo visual es más pequeño, lo que ofrece mayor ventaja con un microscopio óptico, pero con este se emplean alrededor de 10 minutos, pero se logra captar el verdadero color de los basófilos, lo que no hace el analizador automático. La precisión de los resultados depende del número de basófilos contados tanto por el ojo humano (control), como por el citómetro de flujo. Pero a pesar de todo se sigue empleando este método como rutina para la prueba de degranulación de basófilos humanos, con perspectiva para futuros estudios en este campo, y como auxiliar diagnóstico específicamente para alergia a medicamentos. (*)

Esto explica que otros investigadores apoyen la realización de la técnica de la prueba de Shelley por un alergólogo-inmunólogo experimentado, ya que se necesita de un ojo entrenado para hacer la diferenciación y conteo celular correcto. (31,32)

En el servicio de Alergia del CMNSXXI del IMSS, el procedimiento utilizado es una modificación de las técnicas descritas por Hirsch y Zastrow, y por Shelley y Juhlin con observación por medio de microscopio óptico. En cuanto a la técnica se toman 20 ml de sangre venosa heparinizada, se sedimenta la sangre en la jeringa por una hora a 37°C, se separa el plasma en un tubo de vidrio, se centrifuga a 4 °C a 1000 rpm, se decanta y agrega buffer tris suficiente según el número de medicamentos (0.5 ml para cada uno y 0.5 ml para el control). Se pone 0.1 ml del medicamento en un tubo, 0.1 ml de solución salina en tubo control, 0.5 ml de células del paciente, se incuba de 30 a 37°C en baño María, se saca y se agrega una gota de rojo neutro, se agita y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. Se pone una gota de cada uno de los tubos en porta objetos por duplicado, se deja secar a temperatura ambiente, se fija al calor por 1 segundo, se tiñe con azul de toluidina, y se lava por 5 minutos con agua por inmersión, se lava con alcohol absoluto al 70% por 30 segundos,

se escurre, se deja secar, se pone una gota de aceite para inmersión y se lee. Se cuentan 1000 células y se cuenta el porcentaje de degranulación. Esta técnica se encuentra más detallada en el Anexo 1.

Los beneficios de esta técnica son la facilidad en la preparación, adecuada sensibilidad de un 90 a 95% especialmente para antibióticos y analgésicos, rapidez en los resultados, bajo costo y sin riesgo para los pacientes

A partir de esta fecha se han presentado nuevos trabajos sobre todo comparativos entre HBDT y otras pruebas, encontrando entre las más relevantes:

Aoki en 1986, evaluó clínicamente HBDT en pacientes alérgicos al polen de césped, comparando la sensibilidad entre las pruebas SKIN y RAST, observando buena correlación de la HBDT y la RAST (80%); y HBDT y la SKIN (90%).

Benveniste J. 1981 reporta para el diagnóstico de enfermedades alérgicas el diseño de una prueba con basófilos humanos (conteo y degranulación in vitro) , basado en un método sobre un compás binario que tiñe después de la exposición a un alérgeno específico usando para ello pruebas manuales y automatizadas. Esta prueba explora la sensibilidad alérgica a escala celular a través de la sensibilización de IgE dependiente del basófilo, exponiendo una correlación positiva con descarga de histamina y la prueba de RAST, mostrando la sensibilidad a los alérgenos comunes, alimentos, químicos y medicamentos; Menciona que es una prueba que proporciona un medio simple, barato y confiable para diagnosticar las enfermedades in vitro.

Shelley W. B. 1987, describe un caso de una presentación de bula secundaria a AINES, ante el dilema diagnóstico realizó la prueba de HBDT resultando positiva a naproxeno, comprobando que al eliminar el medicamento desaparece la erupción dérmica,; al repetir el tratamiento con naproxeno la lesión aparecía de nuevo en el mismo sitio.(Pseudoporfiria).

Novikov DK. 1990, en su artículo de la "Prueba Directa de Degranulación de Basófilos para el Diagnóstico de Alergia", empleó la HBDT para examinar pacientes con sospecha de alergia a medicamentos. La técnica modificada consistió en emplear la tinción con azul de toluidina y una cámara que contó los basófilos centellantes, los pacientes se dividieron en tres grupos: el grupo uno con 34, lo formaron pacientes con asma bronquial atópica con sospecha de alergia a polvo del hogar; el grupo dos con 118 que tenían una historia de alergia a penicilina, y el grupo tres con 51 con alergia a medicamentos (estreptomicina, vitamina B1, procaína e intolerancia a analgésicos). En todos los casos se confirmaron con prueba de SKIN y prueba de provocación. Los resultados fueron 71.4% de los pacientes con alergia a polvo de hogar positivos con HBDT y 68.6% del grupo tres. De los casos de alergia a penicilina se confirmó por la HBDT un 91.7% de positividad. Con estos resultados mostró la HBDT como una técnica simple e informativa recomendándola ampliamente para su práctica en el diagnóstico de alergia.

Hadjaj B. 1992, presentó un modelo de simulación global que describía la inhibición de la degranulación de basófilos, por medio de altas diluciones, estudiándose un problema de control óptimo de la degranulación de basófilos asociado a un modelo de comportamiento no lineal, este control se asoció a una concentración de antígeno, para resolver este problema se usó un método de programación dinámico.

Milavec-Puretic 1994, realizó un estudio con pacientes con diferentes características clínicas de alergia a medicamentos durante dos años, la búsqueda incluyó a pacientes con historia positiva de alergia a medicamentos y síntomas clínicos típicos, el objetivo del estudio fue para correlacionar la historia de diagnóstico clínico con el resultado de pruebas diagnósticas in vitro y en algunos casos in vivo. La historia positiva y el diagnóstico fueron confirmados en 475 pacientes (24.6%) por una prueba indirecta de degranulación de basófilos (Shelley test), y en 59 de los 345 (17.1%) por una prueba de transformación de linfoblastos (TTL). De los pacientes positivos de estas pruebas in vitro se seleccionaron 56 para realizar la prueba SKIN, mostrando 100% de resultados positivos.

Zhonghua Jie 1995, en su estudio de HBDT en pacientes asmáticos alérgicos a hongos, refirió esta prueba como una buena opción para realizar diagnóstico de alergia cuando no fuese posible llevar a cabo las pruebas in vivo, por presentar alto riesgo para la vida del paciente, lográndose una sensibilidad del 85%.

Sabbah A. 1996, mencionó en su artículo sobre alergias a fármacos, que el diagnóstico inmunobiológico de alergias a medicamentos se pudo llevar a cabo, usando un citómetro de flujo, activando células basófilos y linfocitos como marcadores de membrana, describió dos casos de pacientes alérgicos a rocuronium (miorelajante), que mostraron una correlación entre la historia clínica y las pruebas de SKIN y la HBDT, comparándose con 6 controles.

Veniere A. 2000, realizó un estudio a 22 expedientes de personas que presentaron señales clínicas posterior a la toma de medicamentos. El estudio se confinó a pacientes en quienes los síntomas tenían como origen una hipersensibilidad verdadera o no a

medicamentos. Este estudio permitió el análisis de varias pruebas serológicas (la medida de leucotrienos, degranulación de basófilos, linfocitos T específicos), para el diagnóstico y para definir el mejor tratamiento adaptado a cada caso y concluyó que se presentaba un buen resultado entre la sospecha diagnóstica, y la HBDT.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La reacción alérgica a medicamentos es una patología importante, en su expresión más grave puede conducir a la muerte por anafilaxia, siendo necesario contar con pruebas de laboratorio para realizar un diagnóstico oportuno.

Para este fin la prueba de degranulación de basófilos (prueba de Shelley modificada), permite confirmar el diagnóstico de una reacción alérgica a medicamentos de manera rápida, fácil, eficiente y eficaz.

Con frecuencia carecemos de estudios que permitan establecer la prevalencia, incidencia y mortalidad asociada a alergias a medicamentos en la población que acude a la consulta médica, así que contar con una prueba que nos permita confirmar su diagnóstico nos permitirá realizar diagnósticos más certeros, oportunos y evitar incluso reacciones de cruce antigénicos entre fármacos.

¿Es la prueba de Shelley un estudio que permite establecer la prevalencia e incidencia, asociada a alergias a medicamentos en la población que acude a la consulta médica?

¿Es la prueba de Shelley un método de estudio con sensibilidad y especificidad adecuada que permite ayudar a establecer un diagnóstico certero de alergia a medicamentos?

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que éste es un estudio de tipo observacional, retrospectivo, descriptivo y transversal de una serie de casos clínicos con revisión de literatura, no presenta hipótesis.

La Prueba de Shelley modificada es útil para confirmar el diagnóstico de alergia por medicamentos, lo cual permite establecer el número de casos confirmados de entre una población sospechosa de reacción alérgica a medicamentos, no se han realizado estudios en nuestro medio que nos permitan:

4. OBJETIVOS.

1. Conocer la prevalencia e incidencia de la alergia a medicamentos en la población que acude al servicio de Alergología e Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI durante el año 2002, que incluye las delegaciones 3 suroeste, 4 sureste, y la región Siglo XXI del IMSS.
2. Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba de Shelley modificada en el servicio de Alergología e Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.
3. Determinar cuales son los fármacos que con mayor frecuencia causan alergia a medicamentos.
4. Conocer el cuadro clínico más común asociado a la alergia a medicamentos en nuestro medio.

5. ASPECTOS METODOLÓGICOS.

5.1. Diseño de estudio.

Para alcanzar las metas propuestas, planteamos realizar un estudio observacional, retrospectivo, descriptivo y transversal de casos clínicos, asociados a la reacción alérgica a medicamentos procedentes del archivo que se encuentra en el Laboratorio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

5.2. Universo de trabajo.

Se recabará la información de los expedientes clínicos de todos los pacientes que fueron atendidos en el Servicio de Alergología e Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, comprendidos entre el 01 de Enero al 31 de Diciembre de 2002.

5.3. Ubicación.

Se realizará este estudio en el servicio de Alergología e Inmunología, así como del Laboratorio del mismo servicio, del Hospital de Especialidades del CMNSXXI del IMSS.

5.4. Espacio y tiempo.

Se llevará a cabo entre los meses de marzo a junio de 2003, en el servicio anteriormente mencionado.

5.5. Variables.

Para este estudio se definirá como variables operacionales:

- a) Prueba de Shelley. Se define como una prueba in vitro basada en la degranulación de basófilos con intención diagnóstica, específicamente como auxiliar diagnóstica; y permite identificar a la inmunoglobulina E (IgE) causante de la reacción alérgica, que solo requiere una muestra de sangre venosa del paciente por lo que no lo expone a una posible reacción anafiláctica no deseable. Siendo el criterio de positividad: degranulación de basófilos mayor del 20%.

- b) Reacción a medicamentos. Reacción inmunológica de hipersensibilidad exagerada inesperada con manifestaciones clínicas que pueden incluir urticaria, angioedema, síntomas respiratorios y anafilaxia.

Variable Independiente.

1. Shock anafiláctico. Es la consecuencia de la aplicación de sustancias extrañas. Puede presentarse tras aplicación o ingesta de fármacos terapéuticos o con uso de medios de contraste. Se define como la falla circulatoria que se presenta abruptamente después de la penetración, por vía oral o parenteral de un alérgeno al cual el sujeto está

previamente sensibilizado. Manifestaciones clínicas típicas : malestar intenso, ansiedad, disnea, hipotensión, taquicardia, piel fría, prurito generalizado de inicio palmo-plantar, palidez de tegumentos, diaforesis, pérdida de conciencia, y en ocasiones convulsiones. Puede comprometer un sistema o un órgano: aparato respiratorio (edema glosofaríngeo, disnea asmátiforme), digestivo (vómitos, diarrea), en piel (urticaria, edema de Quinke). EKG: signos de trastornos de la excitabilidad, de conducción y de repolarización., lesión isquémica del miocardio.

2. Angioedema. Asociada a liberación de histamina. Se define como una reacción vascular localizada, no pruriginosa, que afecta a piel, a tejido celular subcutáneo y mucosas. Manifestándose como una tumefacción simple o múltiple, indolora, circunscrita y transitoria, Cuadro clínico: desarrollo repentino de ronchas (pápulas) en la superficie cutánea (pero cuyo origen está por debajo de ésta), de presentación palpebral, peribucal, manos, pies y glotis; eritematosas, no pruriginosas e indoloras, se tornan blancas y profundas. Dolor abdominal. Sensación de cuerpo extraño en garganta, disnea y

estridor laríngeo. Quemosis. El diagnóstico se basa en la apariencia de la piel y en antecedentes de exposición a un irritante/alergeno. Suele ser potencialmente mortal (cuando se afecta garganta).

3. La urticaria. Dermatitis reaccional de la piel caracterizada por ronchas de tamaño y localización variables, de apariencia como verdugones de diversos tamaños, eritematosos y elevados casi siempre pruriginosas. La urticaria es uno de los cuadros que se presenta con mayor frecuencia. Clínicamente se caracteriza por lesiones papuloedematosas, eritematosas y pruriginosas, que aparecen y desaparecen solos, de localización variable, se acompañan de dermatografismo eritematoso positivo. El cuadro puede tener diversos estados, desde una simple lesión hasta ocupar toda la superficie corporal y a veces acompañarse de cefalea, estreñimiento, náuseas o vómito. Se acompaña de prurito intenso, aumenta con la respuesta mecánica del rascado; puede comprometer otros órganos y sistemas además de la piel, lo que ocasiona rinitis, asma o dolor abdominal; en las formas graves aparece edema laríngeo. Complicaciones principales son: anafilaxia

y obstrucción de las vías respiratorias. La urticaria aguda involuciona en 24 – 48 horas. Brotes persistentes de más de 6 semanas se denominan urticaria crónica. Es común en personas que han experimentado otras reacciones alérgicas o angioedema. La roncha dura hasta 3 o 4 horas desapareciendo sin dejar rastro, si la roncha persiste más de 24 horas se debe considerar en el diferencial un eritema polimorfo.

4. El eczema o dermatitis atópica. Problema crónico de la piel caracterizado por erupciones pruriginosas y escamativas. En adultos es de presentación recurrente o crónica. En la piel se presenta una reacción por hipersensibilidad la cual produce una inflamación crónica que ocasiona prurito y descamación. El rascado y la irritación crónica hacen que la piel se torne gruesa y de textura áspera. Factores ambientales irritantes, la resequedad, agua caliente o fría, Cambios climáticos y estrés agravan los síntomas. El cuadro clínico presenta: prurito intenso, ámpulas que supuran y forman costras, eritema o inflamación de la piel alrededor de las ámpulas, la erupción compromete con más frecuencia las superficies flexoras (internas) de las

rodillas y los codos, áreas de piel seca y curtidas con pigmentación en la piel inferior o superior al tono normal, o se pueden propagar al cuello, las manos, los pies y los párpados, excoriación secundaria al rascado crónico. El diagnóstico se basa principalmente en el aspecto de la piel y en los antecedentes personales y familiares. Puede dejar cicatrización permanente.

Variable dependiente.

- Medicamentos: Causa más común del proceso. La aspirina y los salicilatos ocupan el primer lugar pero, la penicilina, las sulfas, los esteroides, los narcóticos, los AINES y los medios de contraste son igualmente importantes.

5.4. Tamaño de muestra.

La población total atendida durante el año de 2002 en el servicio de Alergología e Inmunología fue de 5100 consultas. De esta población tomaremos los casos de aquellos que fueron enviados por sospecha de presentar reacción alérgica a medicamentos, los cuales fueron 214 casos.

5.5 Criterios de inclusión.

1. Pacientes debidamente registrados en la bitácora de resultados de prueba de degranulación de basófilos, del laboratorio de Alergología e Inmunología.
2. Que acudieron al servicio de Alergología e Inmunología con diagnóstico de alergia a medicamentos.
3. Hombre o mujer de cualquier edad que haya acudido durante el año 2002.
4. Que cuenten con prueba de degranulación de basófilos realizado durante el año 2002.

5.5.1 Criterios de exclusión.

1. Todos aquellos que no cumplan con los criterios de inclusión.

5.5.2. Criterios de eliminación.

1. Pacientes registrados en la bitácora, pero que sus expedientes clínicos no se encuentren en el archivo, al momento de la revisión.

2. Expedientes con notas medicas incompletas o ausentes, que justifiquen el envío al servicio de Alergología e Inmunología por reacción adversa a fármaco.
3. Pacientes que no hayan acudido a su cita para realización de prueba.
4. Pacientes que no hayan aceptado realizarse la prueba.

5.6. Tipo de muestreo.

Se incluyeron a todos los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.

5.7. Métodos.

Previa autorización del personal encargado del laboratorio de alergia:

- a) Se observó la forma de realización de la prueba de Shelley modificada, llevada a cabo en muestras previamente recolectadas.
- b) Se revisó la literatura referente a dicha prueba.
- c) Se revisó la libreta de citas, para ubicar a los pacientes que acudieron durante los meses de enero a diciembre de 2002, para la realizarse la prueba de degranulación de basófilos, por tener diagnóstico de alergia a medicamentos.

- d) Se tomaron los siguientes datos de los pacientes: nombre completo, número de afiliación y medicamentos a los que se debía realizar el estudio.
- e) Con esos datos se revisó la libreta de resultados de degranulación.
- f) Por método de paloteo se ubicaron los medicamentos que dieron positivo en la prueba, y de estos, cuales fueron los más frecuentes.
- g) Con la identificación de pacientes y con oficio de solicitud de expedientes, se procedió a solicitar los mismos al archivo clínico del Hospital de Especialidades del CMNSXXI.
- h) Se recabó información detallada en el formato que conforma el Anexo 2.
- i) Con estos datos, se procedió a identificar los cuadros clínicos que motivaron la consulta al servicio de alergología, por relacionarse con reacción a medicamentos.
- j) Se corroboraron cuáles son los medicamentos más frecuentes, que se asociaron a reacción a medicamentos, en estos casos.
- k) Se identificaron cuantos diagnósticos presuncionales de alergia a medicamentos son positivos, por contar con la prueba de degranulación de basófilos positivo.

l) Con la información, se procedió a alcanzar las metas establecidas por los objetivos de este trabajo.

5.8. Plan de análisis estadístico.

Se utilizó estadística descriptiva con SSP10 para el procesamiento de los datos recabados.

6. ASPECTOS ÉTICOS.

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, expedida por la Secretaría de Salud en el año de 1987, en su Título 2º; Capítulo 1; Artículo 17; Categoría 1; se considera INVESTIGACIÓN SIN RIESGO, ya que son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y observacionales en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de expedientes clínicos, cuestionarios, entrevistas y otros, en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

7. ASPECTOS ORGANIZATIVOS.

7.1. Personal.

- Asesora de Tesis
- Residente de tercer año de la especialidad de Medicina Familiar.
- Química del Departamento de Alergia e inmunología CMNS XXI.

7.2. Recursos humanos.

Se cuenta con los recursos humanos suficientes y adecuados para realizar el estudio.

7.3. Recursos materiales.

Se cuenta con el material necesario. El formato propio diseñado, concentrado de resultados de formato recolección de datos de expedientes., bolígrafos, lapiceros, gomas, sacapuntas, hojas blancas tamaño carta, fólderres, marcadores, engrapadora estándar y lo que se requiera para poder llevarlo a cabo.

7.4. Recursos tecnológicos.

Computadora Pentium IV, Impresora Canon BJC-3000, programa Microsoft Word 2000, paquete estadístico SPSS Ver. 10, versión para Windows 98. Internet Explorer 6.0
Disco flexible 3.5 (1.44MB)

7.5. Financiamiento.

No requiere financiamiento externo

8. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES DURANTE EL 2003.

ACTIVIDADES	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO
Delimitación del problema de estudio	X					
Búsqueda de información	X					
Diseño de protocolo de estudio	X					
Revisión de protocolo		X				
Modificaciones al protocolo		X				
Aprobación del protocolo		X				
Observación de la prueba de Shelley		X				
Revisión de libreta de citas de laboratorio		X				
Obtención de datos de pacientes		X	X			
Revisión de libreta de resultados		X	X			
Solicitud de expedientes			X			
Revisión de expedientes			X	X		
Captura de datos			X	X		
Procesamiento de datos				X		
Análisis de datos					X	
Graficación de datos					X	
Análisis de resultados					X	
Conclusiones						X
Revisión final de Tesis						X
Aprobación de Tesis						X
Presentación final de Tesis						X

9. RESULTADOS

De un total de 5 100 consultas atendidas por el Departamento de Alergología e Inmunología del CMN Siglo XXI, de Enero a Diciembre del año 2002, se encontró a 214 (4.19%) sospechosos de alergia a medicamentos. Quienes fueron enviados para realización de prueba de degranulación de basófilos, por sus unidades médicas respectivas. Se estudió finalmente un total de 165 expedientes de pacientes, debido a que el resto de la muestra determinada previamente no cumplió con los criterios de inclusión.

En cuanto al sexo, el 62% (102 pacientes) fueron mujeres, y 38% restante (63 pacientes) fueron hombres. La edad promedio fue de 42 años para hombres y 45 para mujeres; con un rango de edad para ambos sexos de 16 a 81 años. Fig. 1a.

Se encontró que un 88% (145 pacientes) había resultado positivos a la Prueba de Shelley realizada por el departamento de Alergología e Inmunología; y un 12% (20 pacientes) resultó negativo a dicha prueba. Siendo un total de 165 pacientes estudiados. Una sola paciente resultó con prueba falsa a Shelley por haber tomado prednisona antes de realizarle el estudio, considerándola falso negativo. Fig.1b.

Del total de la muestra masculina se encontró 58 (35%) positivos y 5 (3%) negativos. Mientras que para mujeres se reportaron 87 (53%) positivas y 15 (9%) negativas (Fig. 2 a y b). La ocupación de estas personas se dividió en: hogar con 67 (41%), trabajador activo 65 (39%), pensionado con 27 (16%) y estudiante con 6 (4%). Fig. 3 a y b.

La nota de envío por sospecha de alergia a medicamentos incluyen antibióticos, analgésicos, antihipertensivos, retrovirales, anticonvulsivos, vitamínicos, etc. De los cuales resultaron positivos con la prueba de Shelley (degranulación de basófilos $\geq 20\%$), 12 tipos de antibióticos, 12 de analgésicos, 9 de antihipertensivos y 14 medicamentos diversos.

Los medicamentos que reportaron como positivos con la prueba fueron 510, los cuales se clasificaron en 4 grupos, quedando de la siguiente forma: Antibióticos con 195 casos, Analgésicos con 170, Antihipertensivos 48 y Otros con 97. Lo que implica que varios pacientes presentaron alergia positiva a más de dos medicamentos. Fig. 4 a y b. Fig. 5 a y b.

Los medicamentos que presentaron prueba positiva dentro del grupo de los antibióticos los más representativos fueron 12, los cuales son: TMP/SMZ 45.15%, Penicilina 25.17%, Ampicilina 15.38%, Ciprofloxacina 15.38%, Eritromicina 12.58%, Amoxicilina 4.89%, Dicloxacilina 4.89%, Metronidazol 2.79%, Cloramfenicol 2.79%, Clindamicina 2.79%, Rifampicina 2.08% y Claritomicina 1.39%. Fig. 6 a y b.

Los analgésicos más representativos reportados con prueba positiva fueron 12, y que son los siguientes: ASA 33.56%, Naproxén 23.07%, Diclofenaco 18.18%, Paracetamol 12.58%, Metamizol 10.48%, Piroxicam 6.99%, Butilioscina 4.89%, COX II 2.79%, Indometacina 2.08%, Dextropropoxifeno 1.39%, Ibuprofeno 1.39% y Ketorolaco 1.39%. Fig. 7 a y b.

Los antihipertensivos más representativos reportados con prueba positiva fueron 9, y son los siguientes: Enalapril 13.98%, Captopril 6.99%, Verapamilo 5.59%, Metoprolol 3.49%,

Amiodarona 0.69%, Propanolol 0.69%, Atenolol 0.69%, Metildopa 0.69% e Isosorbide 0.69%.

Fig. 8 a y b.

Existieron también una serie de 14 medicamentos variados los cuales resultaron con prueba positiva y que son los siguientes: Carbamacepina 10.48%, Omeprazol 8.39%, Estavudina 5.59%, Ranitidina 5.59%, DFH 4.89%, Alopurinol 4.89%, Bezafibrato 4.89%, Xilocaina 4.19%, Pentoxifilina 4.19%, Complejo B 3.49%, Didadocina 3.49%, Ácido Fólico 2.79%, Lamivudina 2.79% y Pravastatina 2.08%. Fig. 9 a y b.

Dentro de la sintomatología clínica más frecuente reportada aparecen: Urticaria 48.25%, Angioedema 39.16%, Habones 29.37%, Eritema 20.97%, Shock Anafiláctico 13.98%, Rash Purpúrico 9.79%, Vértigo Intenso 6.29%, Cefalea Única 4.19%, Eritema Fijo Pigmentado 4.19%, Asma 3.49%, Rinitis 2.09%, Eczema 1.39%, Paro Respiratorio 0.69%, Síndrome de Steven Jonson 0.69% e Ictericia 0.69%. Lo que indica que varios pacientes presentaron al mismo tiempo algunas de estas sintomatologías. Fig. 10 a y b.

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Con los datos anteriores se obtiene, que la prevalencia encontrada durante el año de 2002 fue de 28.23. con una incidencia del 87.27 (Fig. 11 a y b). La sensibilidad para esta prueba de Shelley Modificada por el servicio de Alergología e Inmunología del CMNSXXI, fue de 99.31%. con una especificidad del 95.23%. Fig. 12 a y b.

La población que más acudió a consulta fue la femenina, siendo además, la que de manera corroborada presentó alergia a medicamentos; siendo su promedio de edad de 45 años

La ocupación más importante encontrada fue en primer lugar el hogar, en segundo lugar los trabajadores en activo, y en tercer lugar los pensionados.

Los medicamentos más frecuentemente involucrados en las reacciones alérgicas se dividieron en 4 grupos, siendo dentro de los antibióticos el TMP/SMZ, la Ampicilina, la Ciprofloxacina y la Eritromicina. En el grupo de analgésicos encontramos el Ácido Acetilsalicílico, el Naproxeno, el Diclofenaco, el Paracetamol y el Metamizol. En el grupo de antihipertensivos fueron el Enalapril, el Captopril, el Verapamilo y el Metoprolol. En el grupo de otros medicamentos se encontró la Carbamacepina, el Omeprazol, la Estavudina, la Ranitidina y el DFH.

En cuanto las manifestaciones clínicas más frecuentes se presentaron la Urticaria, el Angiodema, los Habones, el Eritema y el Shock Anafiláctico.

11. CONCLUSIONES

Quizás el paso más importante de todo trabajo de investigación sea la observación fortuita, pero a la vez afortunada, de un evento clínico durante la práctica diaria de la medicina a nivel hospitalario, la cual como muchas veces, debido a la cierta cotidianidad de los casos, éste pasa desapercibido hasta el momento cuando se coloca en riesgo la vida del paciente, y pone de manifiesta la habilidad y capacidad del médico tratante.

En el caso de la alergia a medicamentos, existen muchas veces diagnósticos mal fundamentados debido a la falta de una prueba rápida, efectiva y económica; que nos permita establecer de manera irrefutable la verdadera naturaleza del problema. Ya que esto conlleva una serie de dilemas, a saber, el no poder establecer si la crisis es parte de una sobre dosificación, interacción, sinergia de los medicamentos o a una verdadera reacción alérgica. Lo cual confunde al paciente y limita la acción del médico.

En el caso del servicio de Alergología e inmunología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, una parte de la población que acude, es enviada de las diversas Clínicas de Adscripción o de otros servicios del mismo centro, debido principalmente a que los tratamientos estándares usados en estos casos no han dado resultados, o que las manifestaciones clínicas sobrepasan la capacidad de respuesta de dichos centros, además de que no cuentan con la prueba de laboratorio para establecer el diagnóstico.

Estas observaciones preliminares fueron el resultado de la estancia como parte rotatoria del entrenamiento como Residente de la Especialidad de Medicina Familiar, y una

serie de observaciones a las actividades que se realizan en ése departamento dedicado al estudio de este fenómeno de las alergias, con lo cual se llegó a establecer una serie de modificaciones a la llamada Prueba de Degranulación de Basófilos Humanos (también conocida como Prueba de Shelley), logrando simplificar de manera importante el proceso, reduciendo el tiempo, costo y manteniendo una alta calidad de resultados. Así la Prueba de Shelley modificada muestra una sensibilidad y especificidad alta para apoyar el diagnóstico de alergia medicamentosa, sin poner en riesgo la vida del paciente. Esto plantea que en un futuro, pueda ser establecida en los diversos niveles de atención médica esta prueba, como parte importante dentro de los análisis de laboratorio.

Una de las partes importantes de este estudio se encaminó en el establecimiento de la prevalencia e incidencia de la alergia a medicamentos, debido principalmente a que en México no se cuenta con esta clase de registros, ya que dentro de la literatura revisada solo se encontró un trabajo del año de 1989 que hace referencia a estos datos. De tal manera que en este caso se confirma que para el año de 2002 en el servicio de Alergología e Inmunología del CMNSXXI se reporta una prevalencia del 28.23, mientras que la incidencia es del 87.27.

Por otra parte se ha cuestionado la certeza de resultado de la prueba de Shelley, pero en este caso no solamente se demostró estadísticamente que presenta una sensibilidad del 91.31%, y que cuenta con una especificidad del 95.23% para los casos revisados. Si no que, además el día de hoy el servicio de Alergología e Inmunología cuenta con una prueba modificada de manera simple, económica y altamente confiable.

Con respecto a los medicamentos, en concordancia a lo establecido por la literatura revisada, encontramos que efectivamente los grupos de fármacos que presentan mayor asociación a alergias son los antibióticos seguidos de los analgésicos y antipiréticos; pero además se encontró que para la población estudiada se agregan los antihipertensivos.

Dentro de los antibióticos se encontró que el Trimetoprim con Sulfametoxazol desplaza a la Penicilina como la más importante, según lo referido por la literatura; agregándose además la Ciprofloxacina. Cabe señalar que estos fármacos actualmente son los más prescritos en las unidades médicas; lo que podría suponer un factor importante dentro de la dinámica de las alergias por antibióticos.

Por su parte los analgésicos más frecuentemente asociados son el Ácido Acetilsalicílico, seguido por el Naproxeno, Diclofenaco y Paracetamol. El ASA continua siendo el principal analgésico productor de alergias, pero se relega al Paracetamol, ya que el Naproxeno y el Diclofenaco actualmente son los más ordenados por el médico.

Dentro de la población estudiada se encontró una variedad de medicamentos no reportados por la literatura, los cuales son los antihipertensivos; siendo el Enalapril, Captopril y Verapamilo los más importantes, tomando en cuenta que estos fármacos se asocian a tratamientos prolongados, y que la Hipertensión Arterial va en aumento en nuestra población.

También se reportaron una serie de medicamentos que se asocian a tratamientos de padecimientos de tipo crónico, dentro de los cuales sobresalen la Carbamazepina, Omeprazol y Retrovirales; los cuales no se encuentran reportados en la literatura.

En lo referente a las manifestaciones clínicas, se observa que es congruente con la literatura, ya que se reportó a la Urticaria, Angioedema y Eritema como las más frecuentes.

Una de las cuestiones que no se verificaron en este estudio es el antecedente de atopia, lo que presenta la dificultad de establecer cual es la relación con este factor, o si la alergia se presenta como una entidad independiente. Otro punto que llamó la atención fueron, que varios pacientes reportan enfermedades crónico degenerativas o de tratamiento prolongado, siendo muchas veces multitratado con varios fármacos a la vez, lo que presenta la posibilidad de sobre dosificación, intoxicación, sinergia o reacción cruzada, lo que encubre las manifestaciones clínicas. Por lo tanto, se sugiere tomar en cuenta estos parámetros para futuros estudios.

Con esto se concluye que la prueba de degranulación de basófilos humanos, conocida como la prueba de Shelley Modificada en el CMNSXXI, es útil, rápida, efectiva y de bajo costo, para confirmar el diagnóstico de alergia a los medicamentos más comúnmente asociados, sino que además abre la posibilidad de su uso en otros fármacos. Pero, hay que tomar en cuenta que la negatividad de la prueba no descarta el diagnóstico de alergia a medicamentos, ya que hay factores como la lipemia post prandial, la fiebre, antihistamínicos y esteroides que pueden afectar la prueba.

13. ANEXOS.

ANEXO 2. FORMULARIO DE DATOS

NOMBRE: _____ SEXO: _____
AFILIACIÓN: _____ EDAD: _____
CLÍNICA ADSCRIPCIÓN: _____
OCUPACIÓN: _____

FECHA DE INICIO DE PADECIMIENTO ACTUAL (Relacionado a alergia)

MEDICAMENTO RELACIONADO:

MANIFESTACIONES CLÍNICAS:

NOTAS MÉDICAS:

PRUEBA DE DEGRANULACIÓN:

ANEXO 2

Determinación de la degranulación de basófilos, por la técnica de Shelley Modificada

Descripción de la técnica empleada en el Departamento de Alergología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. El procedimiento utilizado es una modificación de las técnicas descritas por Shelley y Juhlin y por Hirsch y Zastrow

La técnica aquí descrita tiene la modificación del empleo de:

- a) Toma de 20 ml de muestra de sangre venosa con jeringa de plástico que contenga 1 ml de heparina 1000 U/ml.
- b) Se coloca la jeringa con la muestra en la incubadora a 37° C durante una hora, en posición vertical para dejar sedimentar la sangre.
- c) Se extrae el plasma completo en un tubo de ensaye de vidrio de 13 por 100.
- d) Centrifugar en centrífuga fría a 4° C durante 10 minutos a 1000 RPM (centrífuga con cabeza de 14 cm de radio).
- e) Decantar y agregar buffer Tris en suficiente cantidad según el número de medicamentos a probar, 0.5 ml para cada tubo problema y 0.5 ml para el tubo control.

- f) Poner 0.1 ml del medicamento (*) o alimento en un tubo de ensaye.
- g) Poner 0.1 ml de solución salina al 0.85% en el tubo de ensaye control.
- h) Si se trata de alimentos 0.1 ml de solución de Evans.
- i) Poner 0.5 ml de células del paciente en cada tubo.
- j) Incubar en baño María a 37° C por 30 minutos.
- k) Sacar los tubos y agregar una gota de colorante rojo neutro a cada uno y agitar.
- l) Incubar a medio ambiente durante 10 minutos.
- m) Poner una gota de la muestra de cada tubo, en porta objetos por duplicado.
- n) Dejar secar a temperatura ambiente.
- o) Fijar con calor por 2 segundos.
- p) Teñir cada porta objetos con solución de azul de Toluidina (inmersión).???
- q) Lavar con agua por 5 segundos (inmersión).

r)Se saca cada porta objeto y se lava con alcohol absoluto al 70% por 30 segundos (inmersión).

s)Se escurre cada porta objeto brevemente y se deja secar.

t)Se coloca encima de cada porta objeto aceite de inmersión.

u)Se lee al microscopio de luz.

v)Se cuentan 1000 células y se saca el porcentaje de basófilos degranulados, tomando el número de basófilos del control como el 100%.

w)Los resultados se consideran como:

➤ 0 a 20% Negativo.

➤ 21 a 25% Dudoso.

➤ 26 a 50% Positivo +

➤ 51 a 75% Positivo ++

➤ Más del 75% Positivo +++

* Los medicamentos se preparan en una dilución de 1:2000 con solución salina al 0.85% y buffer Tris.

Al tomar la muestra de sangre se deben tomar en cuenta los siguientes criterios para determinar cuando una muestra no es satisfactoria:

Muestra lipémica.

- a) Si el paciente presentó reacción anafiláctica severa dentro de las semanas anteriores a la toma de la muestra, o se encuentra con un cuadro agudo de reacción.
- b) Si al paciente se le administró esteroides dentro de las 48 horas previas a la toma de la muestra.
- c) Paciente con enfermedad de base que requiera tratamiento con esteroides, corticoesteroides, cortisona, prednisona, cloroquina, cromoglicato disódico, teofilina, antihistamínicos.

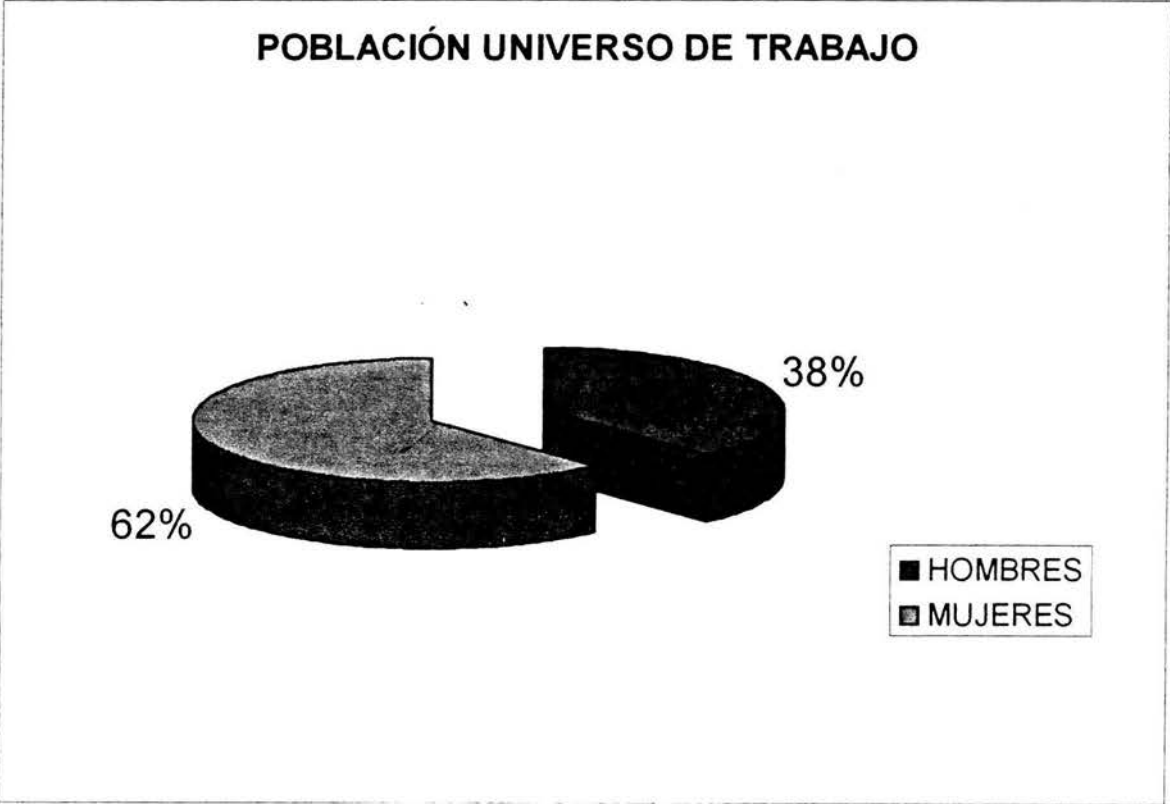
Muestra de sangre sin heparina.

- a) Si ha transcurrido más de una hora entre la toma de muestra y su procesamiento.
- b) Ayuno menor de 12 horas.

ANEXO 3

Figuras

Figura 1 a



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Figura 1b

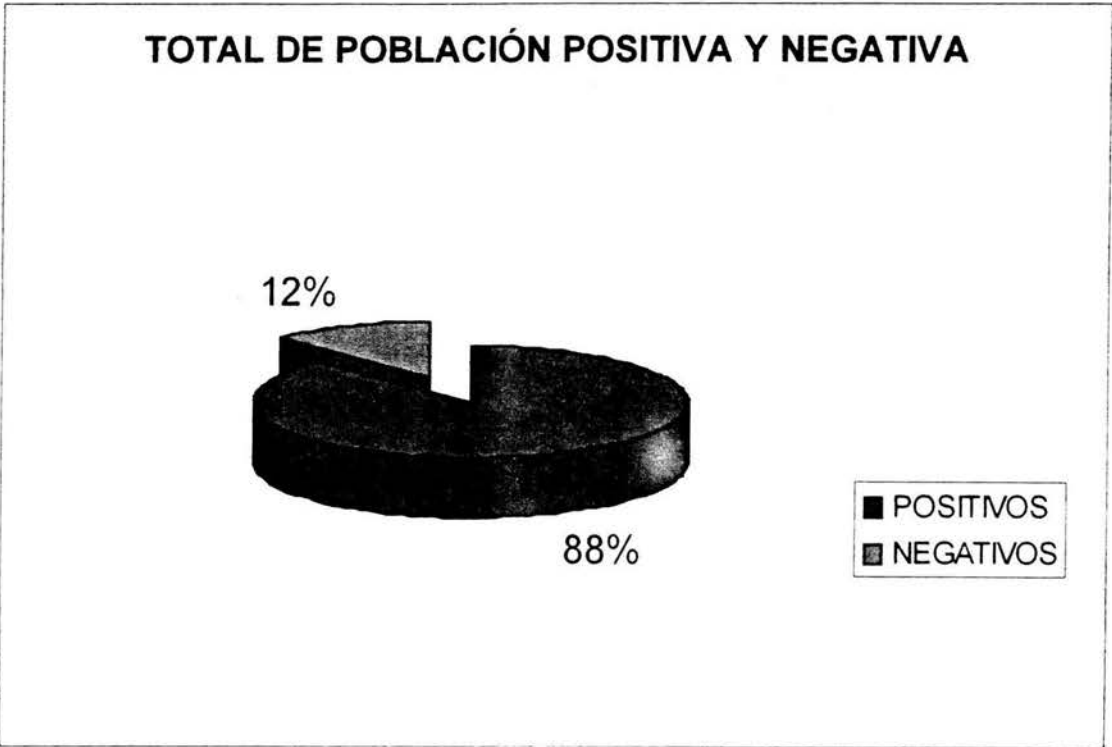


Figura 2 a

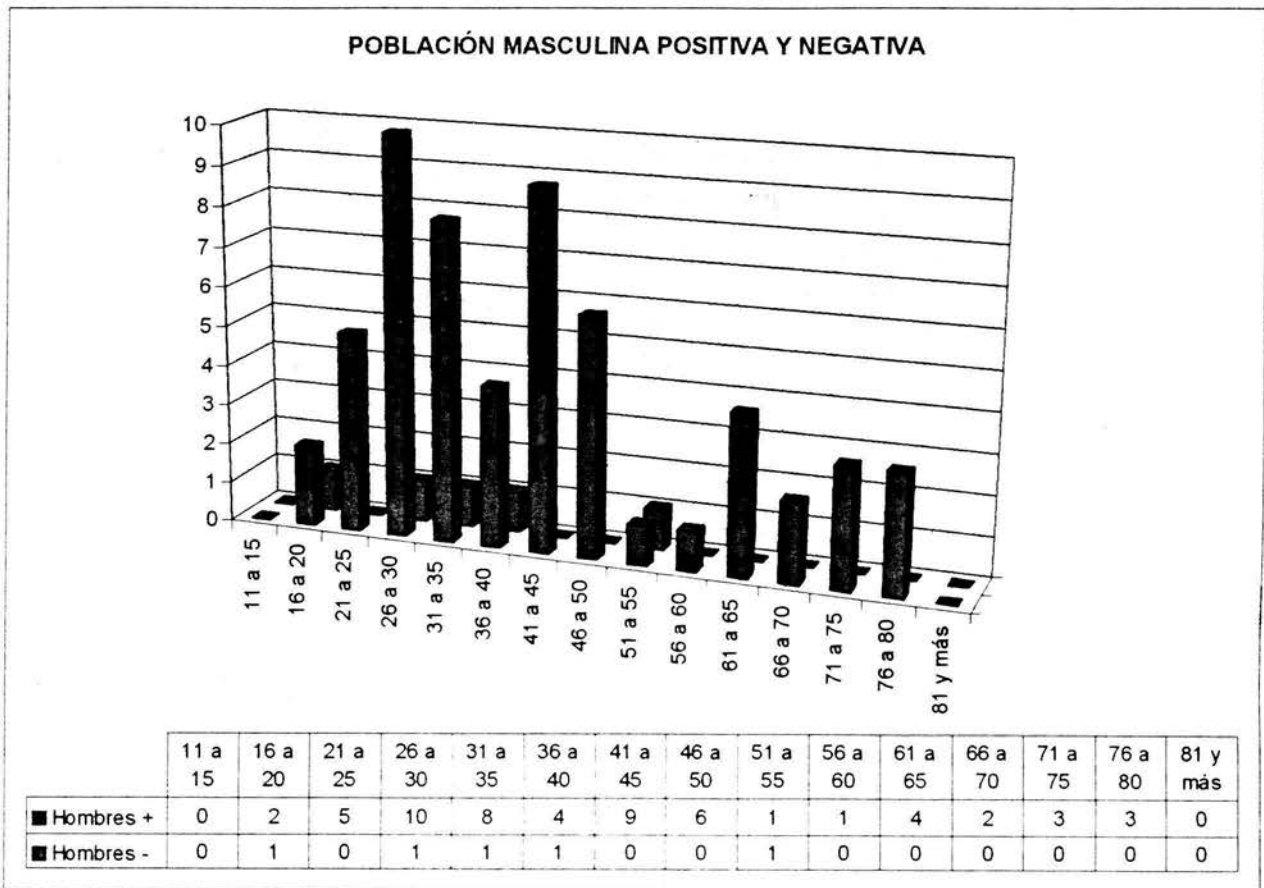


Figura 2 b

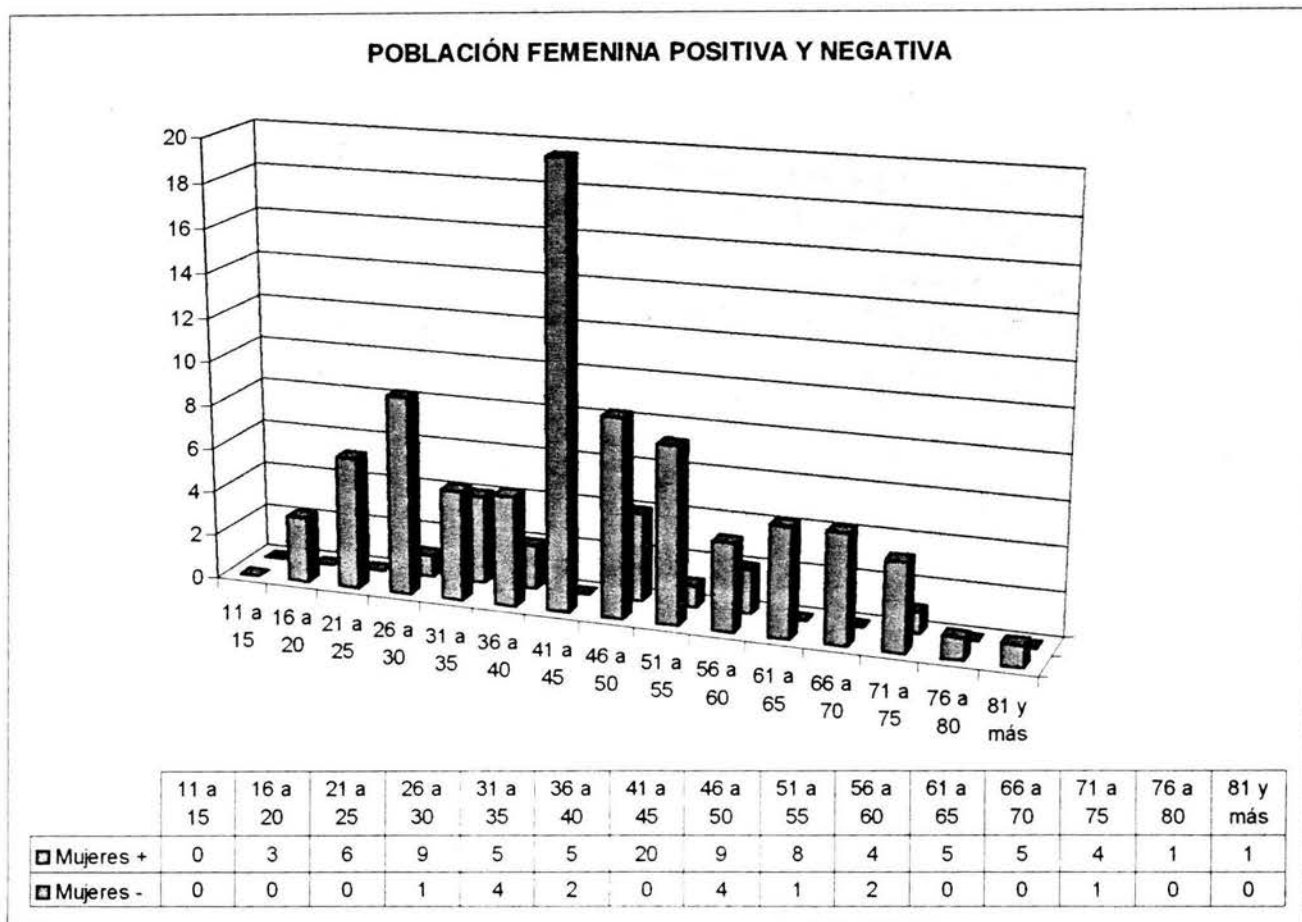


Figura 3 a y b

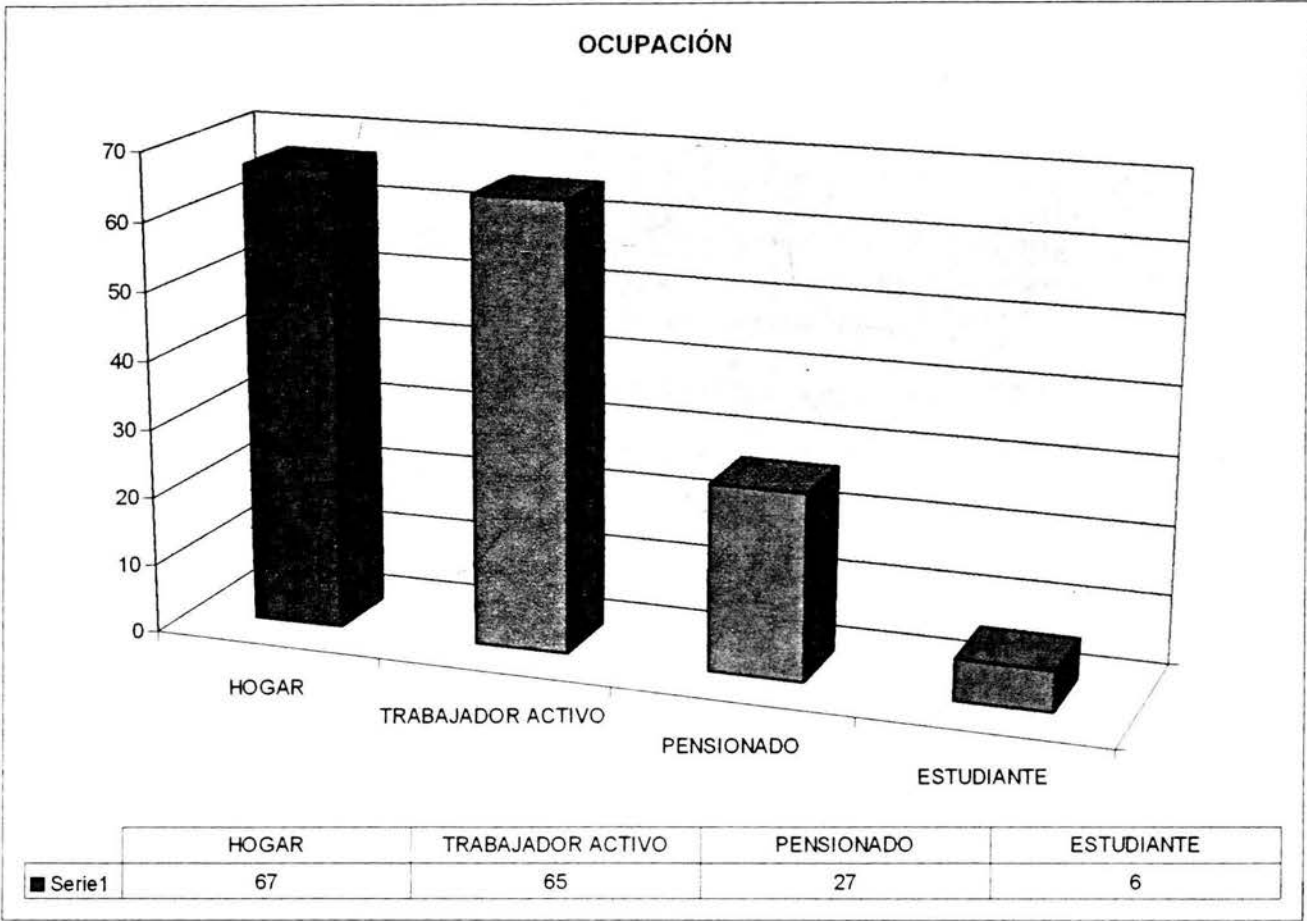


Figura 4 a y b

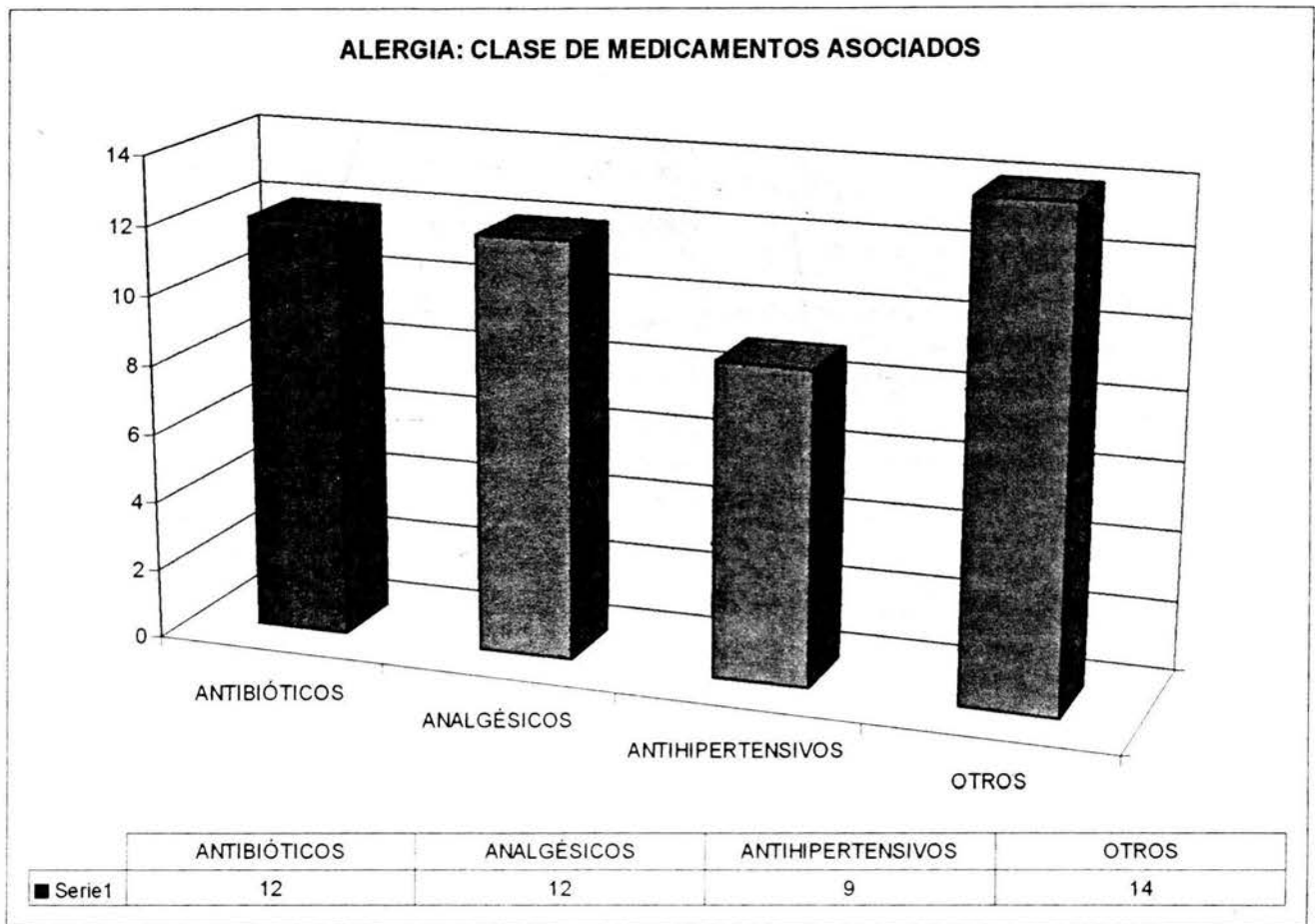


Figura 5 a y b

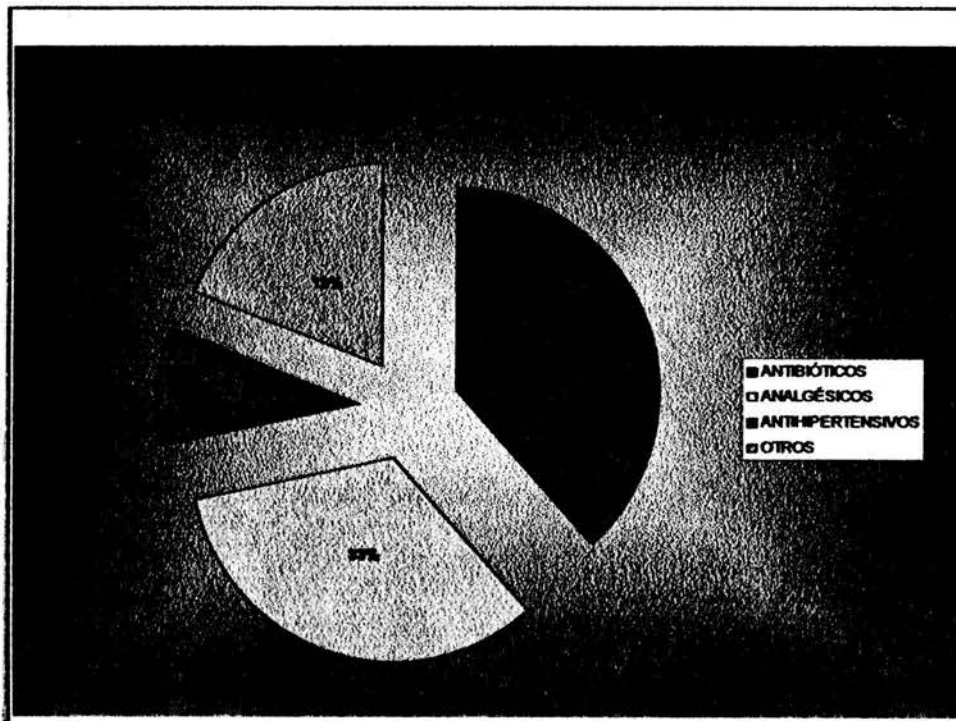
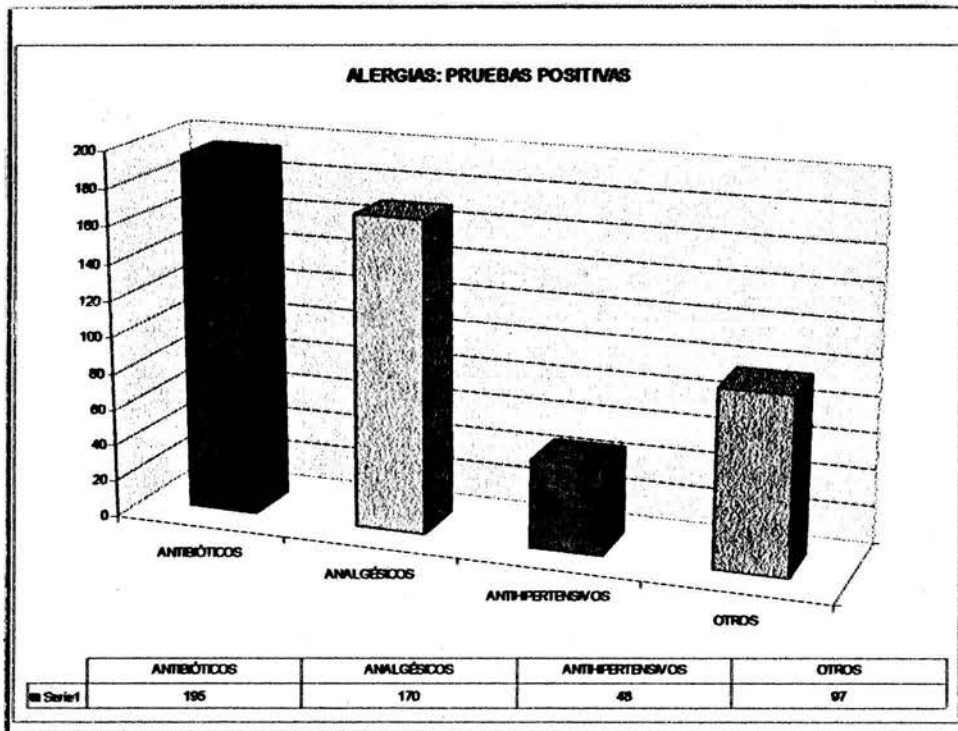


Figura 6a y b

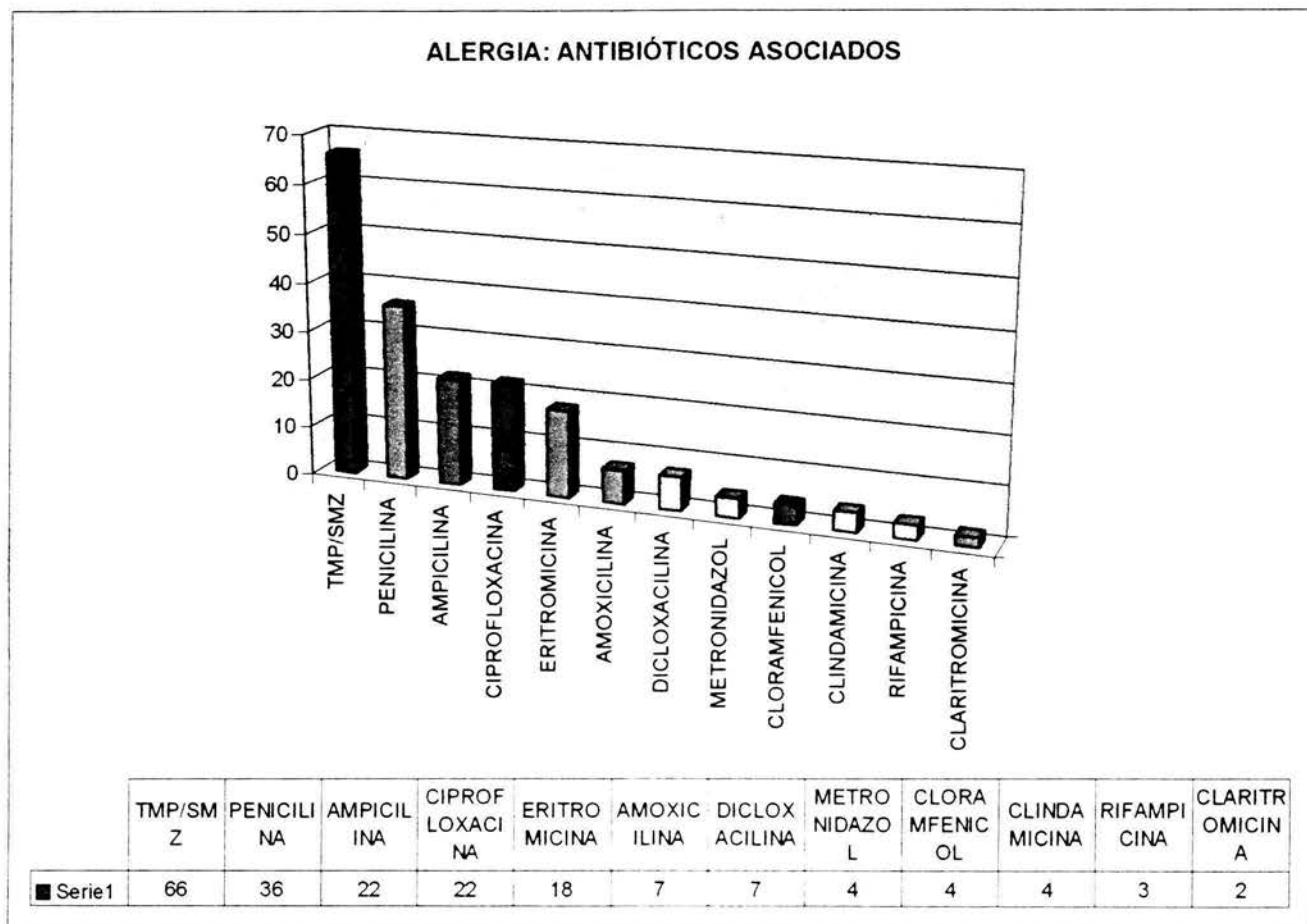
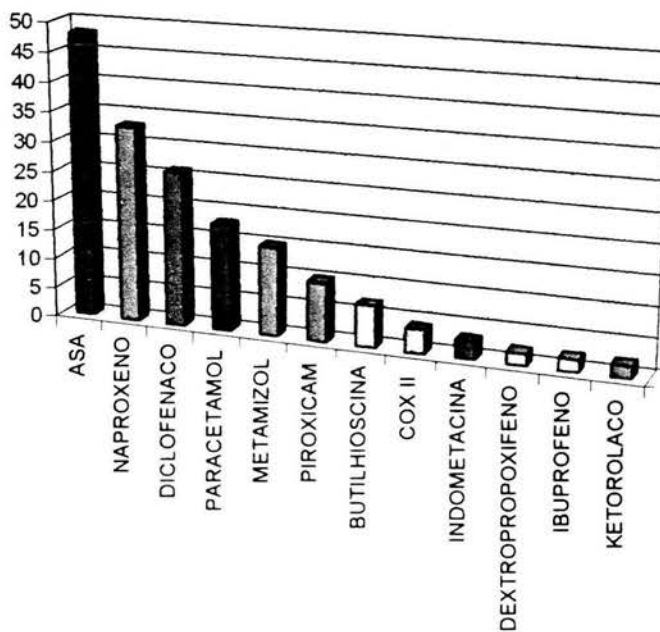


Figura 7 a y b

ALERGIA: ANALGÉSICOS ASOCIADOS



	ASA	NAPROXENO	DICLOFENACO	PARACETAMOL	METAMIZOL	PIROXICAM	BUTILHIOSCINA	COX II	INDOMETACINA	DEXTROPROXIFENO	IBUPROFENO	KETOROLACO
■ Serie1	48	33	26	18	15	10	7	4	3	2	2	2

Figura 8 a y b

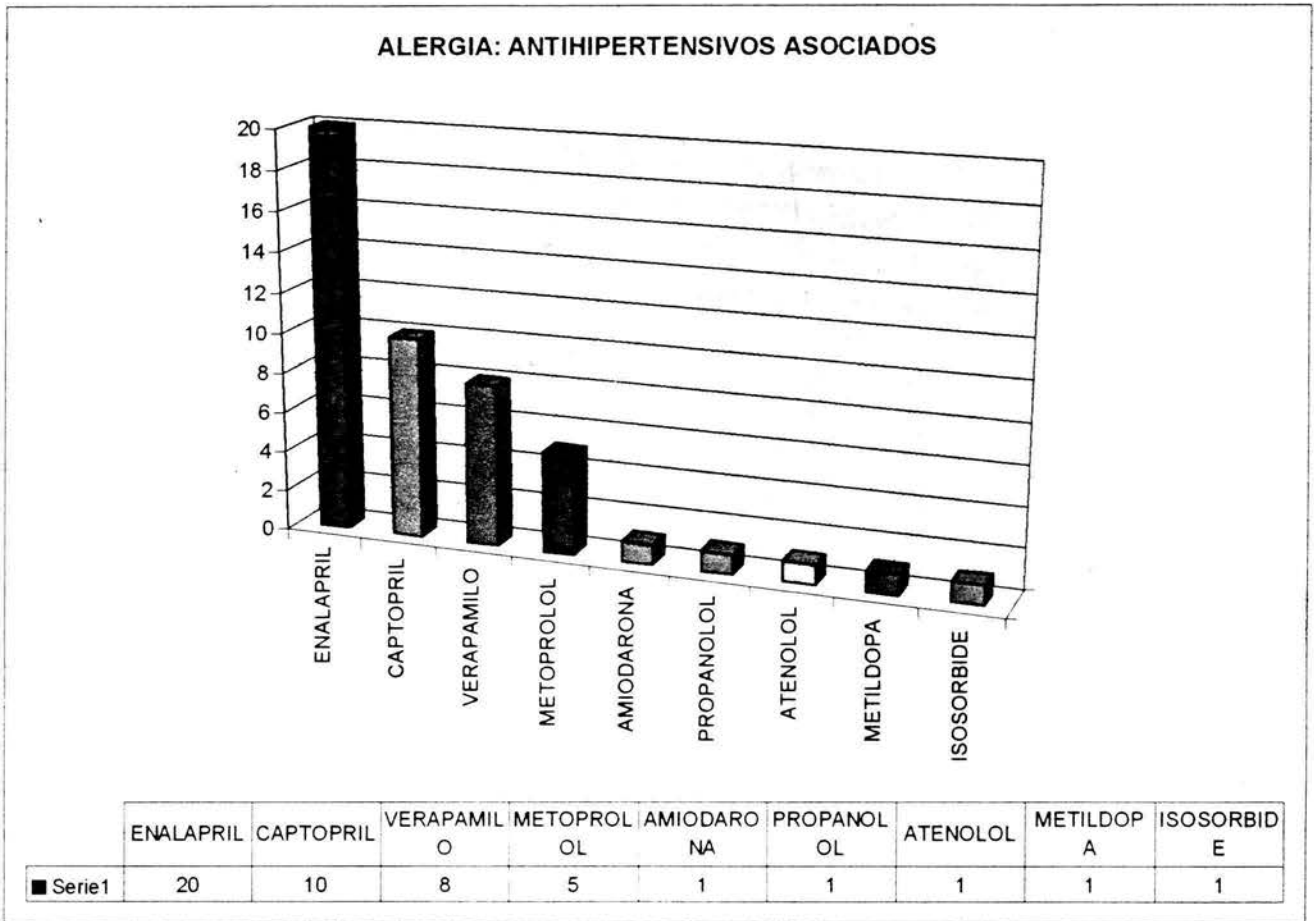
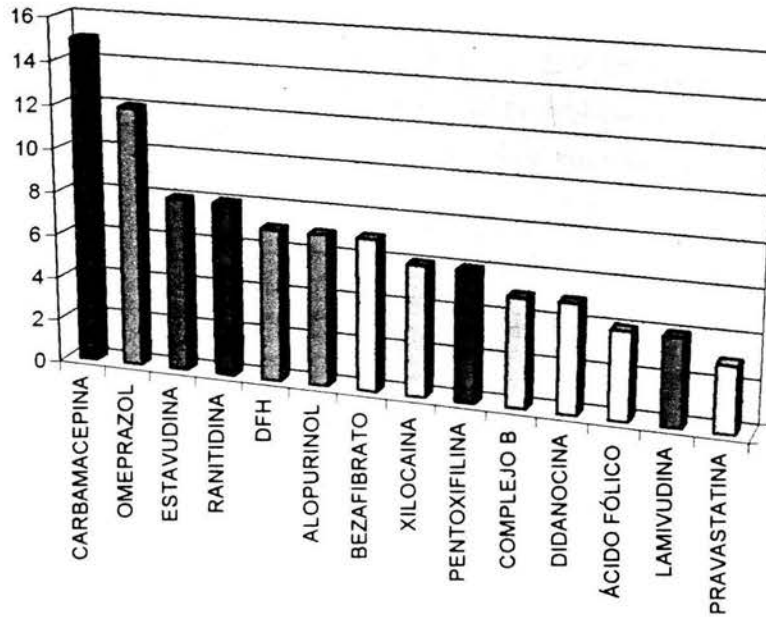


Figura 9 a y b

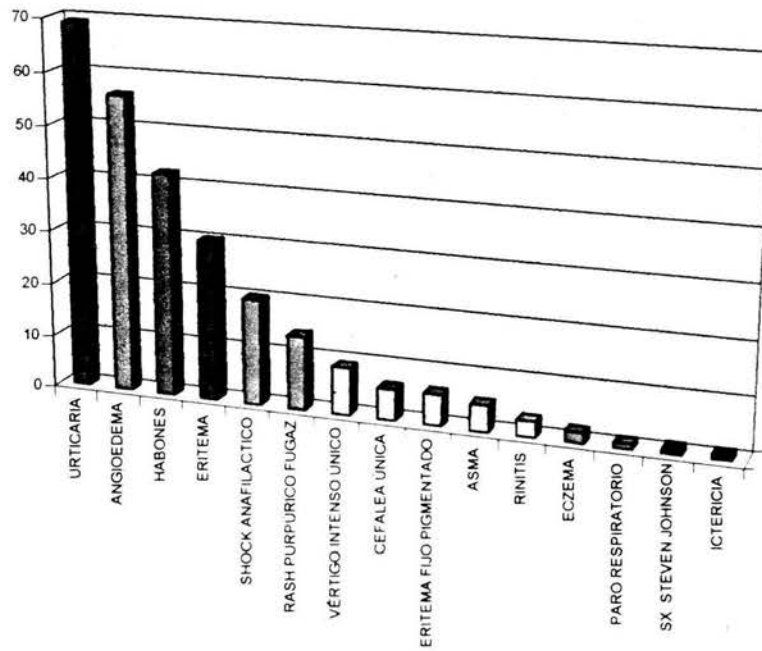
ALERGIA: OTROS MEDICAMENTOS ASOCIADOS



	CARBA MACEP INA	OMEP RAZOL	ESTAV UDINA	RANITI DINA	DFH	ALOPU RINOL	BEZAFI BRATO	XILOCA INA	PENTO XIFILIN A	COMPL EJO B	DIDAN OCINA	ÁCIDO FÓLICO	LAMIV UDINA	PRAVA STATIN A
■ Serie1	15	12	8	8	7	7	7	6	6	5	5	4	4	3.

Figura 10 a

MANIFESTACIONES CLÍNICAS MÁS FRECUENTES



	URTICARIA	ANGIOEDEMA	HABONES	ERITEMA	SHOCK ANAFILACTICO	RASH PURPURICO FUGAZ	VERTIGO INTENSO UNICO	CEFALEA UNICA	ERITEMA FIJO PIGMENTADO	ASMA	RINITIS	ECZEMA	PARO RESPIRATORIO	SX STEVEN JOHNSON	ICTERICIA
■ Serie1	69	56	42	30	20	14	9	6	6	5	3	2	1	1	1

Figura 10 b

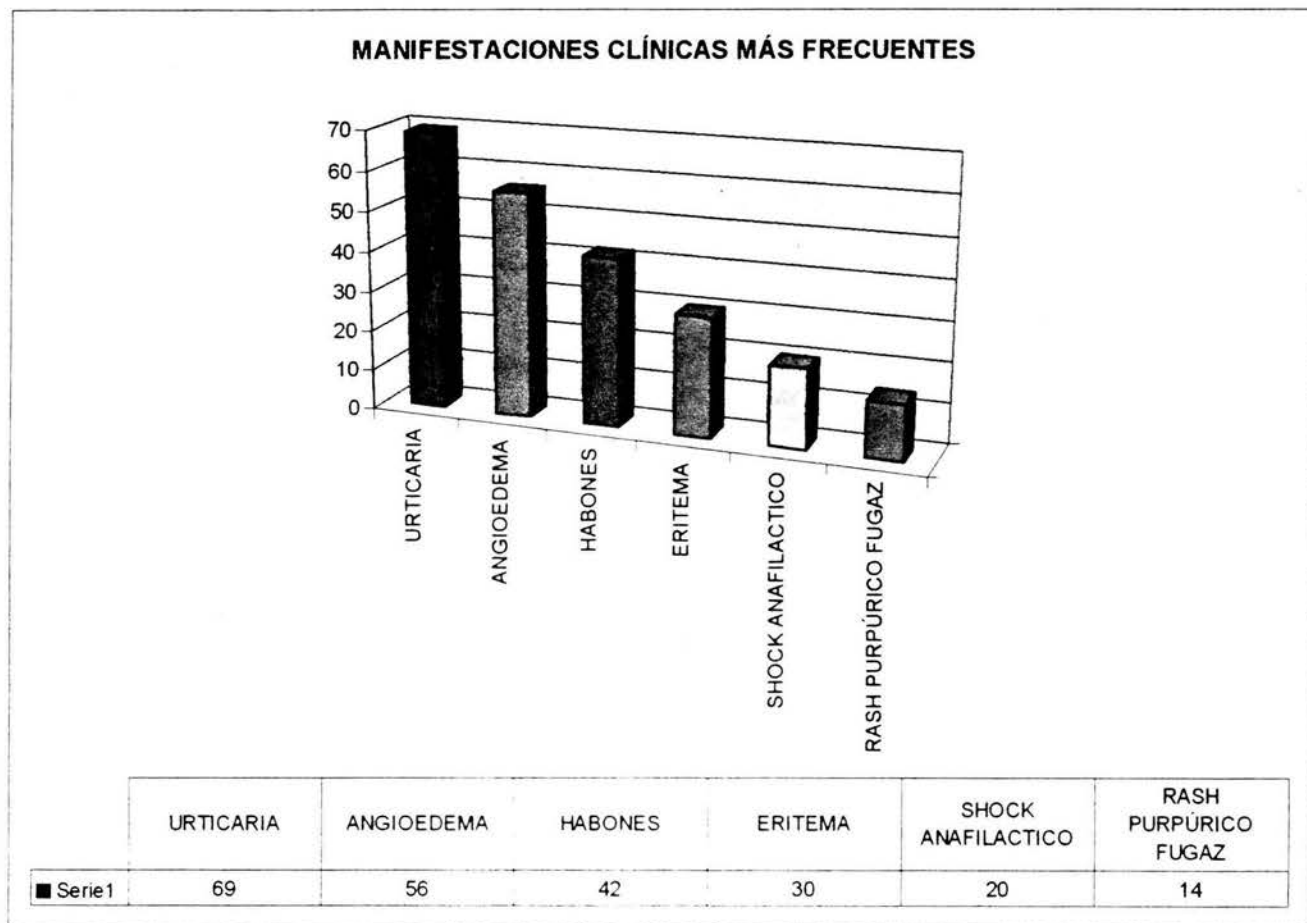


Figura 11 a

PREVALENCIA

No. DE CASOS DE ALERGIA POSITIVOS 2002

X 1000

No. DE PACIENTES QUE ACUDIERON AL CMNSXXI EN 2002

$$\begin{array}{r} \text{TOTAL AÑO} \\ \text{2002} \end{array} \quad \frac{5144}{5100} \times 1000 = 28.23$$

$$\begin{array}{r} \text{HOMBRES} \\ \text{AÑO 2002} \end{array} \quad \frac{59}{5100} \times 1000 = 11.56$$

$$\begin{array}{r} \text{MUJERE} \\ \text{S} \\ \text{AÑO 2002} \end{array} \quad \frac{85}{5100} \times 1000 = 16.66$$

Figura 11 b

INCIDENCIA

$$\frac{\text{No. DE CASOS NUEVOS EN 2002}}{\text{No. DE CASOS SOSPECHOSOS EN 2002}} \times 1000$$

$$\frac{144}{165} \times 1000 = 87.27$$

Figura 12 a

SENSIBILIDAD

$$\frac{\text{No. DE CASOS POSITIVOS}}{\text{No. DE CASOS POSITIVOS + NEGATIVOS FALSOS}} \times 100$$

$$\frac{144}{145} \times 100 = 99.31$$

14. BIBLIOGRAFÍA.

1. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. The Allergy Report. Conditions that may have an allergic component. Vol. 3. 2001
2. J. Allergy Clinical Immunology. Clinical Immunology. Vol. 74. No.4 Part 2. October 1984.
3. Van Arsdel PP. Drug allergy, an update. Med. Clin. North. Am. 65: 1089, 1981.
4. AAA
5. AAA
6. Benveniste. J. Desgranulación de basófilos. Revista Nature. 30 de junio de 1988.
7. Immunology. Roit, Brostoff and Male. The C. V. Mosby Company, 1989.
8. N. Franklin Adkinson. Risk Factor for Drug Allergy. J. Allergy Clinical Immunology. 74; 567, 1984.
9. Kenneth P. Mathews. Clinical Spectrum of Allergic and Pseudoallergic Drug Reaction. J. Allergy Clinical Immunology. 74: 558, 1984.
10. De Shazo RD, Kemp SF. Allergic Reactions to Drugs and Biologic Agents. J. Am. Med. Assoc. 1997; 278:1895-1906.
11. Balaban J. Medicaments as the possible cause of urticaria in children. Acta Dermatovenerol Croat 2002. September; 10 (3): 155-9
12. Sheffer A. y col. Management of adverse drugs reactions. J. Allergy Clin. Immunol. 74: 580, 1984.
13. Soloshenko EN. Modern Problems of Drug Allergy to Antibiotics in the Clinical Aspects of Skin and Venereal Diseases. Antibiotiki. 22 (9): 804-7, 1977 September.
14. Segura NH. Desgranulación de Basófilos: Usos Clínicos. Tesis recepsional para obtener el título de la especialidad en alergia e inmunología clínica-1989.
15. Kaiser HK. Who needs allergy testing? Patient Care 1997: 31; 169-183

- 16.
17. D. Vorak AM. Cell Biology of the Basophil. *International Review of Cytology*. 180:87-236-1998.
18. Shelley WB. Basophil Degranulation Induced by Oral Poisson Ivy Antigen. *Arch Dermat*. 92: 147-150. 1965.
19. Shelley WB. A New Serological Test for Allergy in Man. *Nature*. Vol. 195: 1181-183. 1962.
20. Sainte-Laudy J. Standardization of basophil Degranulation for Pharmacological Studies. *Journal of Immunological Method*. Vol. 98: 279-282- 1987.
21. Ishizaka. Degranulation of Human Basophil Leukocytes by Anti-gE Antibody. *The Journal of Immunology*. Vol.106 No. 3: 705-710, 1971.
22. Bruce H. Using Algorithms to Diagnose and Treat Allergic Disease. *J. Respir. Dis*. 1992; 13: S4-6.
22. Theobald-Segalen C. Value of Basophil Studies in the Diagnosis of Drug Allergies. *Ann Med Interne* .1978 Apr; 129 (4):265-8
23. Kaiser HK. Who needs allergy testing? *Patient Care* 1997: 31; 169-183.
24. Joint task force on practice parameters. Practice parameters for allergy diagnostic testing. *Ann Allergic Asthma Immunol*. 1995; 75 (6): 543-625.
24. Overview of allergic diseases: diagnosis, management and barriers to care. *American Academy of Allergy Asthma and Immunology*. Vol. 1. 2002.
25. González A. Técnicas de valoración inmunológicas, análisis de costos y principales indicaciones clínicas en el laboratorio de inmunología. Tesis recepsional para obtener el título de la especialidad en alergia e inmunología clínica-1989.
26. Shelley WB. Juhlin, L. A new test for detecting anaphylactic sensitivity. The basophil reaction. *Nature* 191, 1056, 1961.

27. Mumcuoglu Y. Modified basophil degranulation test in diagnosis of bee and wasp sting allergies. *Allergy*. 1980, 35, 335-340.
28. Benveniste J y col. Detection of immediate hypersensitivity in rabbits by direct basophil degranulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 59, 271, 1977.
29. Leynadier F. y col. Une technique simple de isolement et de fixation des polinucleaires basophiles humains. *Rev. Fr. Allergol.* 17, 215. 1977.
30. Aoki H. y col. Evaluación clínica de la prueba de degranulación de basófilos humanos en pacientes alérgicos al polen de césped. *Annals of Allergy*. 57 (5): 319-20, 1986 November. *
31. Rangel H. y col. La migración del leucocito el factor inhibitorio y la degranulación del basófilo, en las reacciones a fármacos. *Revista Alergia*. 38 (4): 105-9, 1991 julio-agosto. *
32. Hadjaj B. y col. Basophil degranulation control. *International Journal of Bio-Medical Computing*. 31(2): 89-97, 1992 Aug.
33. Sabbah A. Apropos of drug allergy. *Allergie et Immunologie*. 28(7): 230,233,1996 Sep.
34. Veniere A. y col. Importance of blood tests for the diagnosis of drug allergies. *Allergie et Immunologie*. 32(6): 226-30, 2000 junio.