



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO

SERVICIO DE MEDICINA INTERNA

**EVALUACION DE PRUEBAS IN VITRO: ACTIVACION DE BASOFILOS (TAB CD63) Y
DEGRANULACION DE BASOFILOS MODIFICADA (TDB MOD), EN EL DIAGNOSTICO DE
ALERGIA A PENICILINA, ESTUDIO PIVOTE EN 25 PACIENTES**

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA DE

ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA

DR. MARIN SILVA CARLOS IGNACIO

PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR CONDE MERCADO JOSE MANUEL

ASESOR DE TESIS

DRA ROJO GUTIERRES MARIA ISABEL



MEXICO D.F.

MAYO 2012



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.

FIRMAS DE AUTORIZACION

DR. CARLOS VIVEROS CONTRERAS
JEFE DE ENSEÑANZA

DR. JOSE MANUEL CONDE MERCADO
TITULAR DEL CURSO DE POSGRADO DE MEDICINA INTERNA UNAM

DRA. ROJO GUTIERRES MARIA ISABEL
ASESORA DE TESIS

TITULO

**EVALUACION DE PRUEBAS IN VITRO: ACTIVACION DE BASOFILOS (TAB CD63) Y
DEGRANULACION DE BASOFILOS MODIFICADA (TDB MOD), EN EL DIAGNOSTICO DE
ALERGIA A PENICILINA, ESTUDIO PIVOTE EN 25 PACIENTES**

Padres gracias por ser el pilar que me ha permitido desarrollar todos los aspectos de la vida, su ejemplo es reflejo en mi pasado, presente y futuro.

Bb este será el primer libro en nuestra casa, gracias por tu amor y apoyo incondicional.

Dra. Rojo, por su tiempo y apoyo en esta encomienda mi respeto y admiración.

Dr. Conde, honor y orgullo permanente haberle conocido y formar parte de su curso.

A todos ustedes gracias... TOTALES

Contenido

Índice de figuras	6
Índice de tablas	6
INTRODUCCION	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
PREGUNTA DE INVESTIGACION	14
OBJETIVOS	15
GENERAL:.....	15
ESPECÍFICOS.....	15
HIPOTESIS	16
METODOLOGIA.....	17
METODO DE MUESTREO	17
DISEÑO.....	18
TDB mod.:.....	18
TAB-CD63:	18
VARIABLES	20
CONSIDERACIONES ETICAS	22
RESULTADOS.....	23
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	28
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA:	36
ANEXOS	38

Índice de figuras

Figura 1	Distribución de la población estudiada por Sexo.....	24
Figura 2	Distribución de la población estudiada por edad.....	25
Figura 3.	Degranulación de Basófilos modificada TBD mod.	26
Figura 4	Activación de Basófilos por CD63.	27
Figura 5	TAB y TDB	33

Índice de tablas

Tabla 1	Resultados de DC63 y TDB	23
Tabla 2	Activación de Basófilos por CD63 Vs Diagnóstico Clínico:.....	28
.Tabla 3	Degranulación de Basófilos Modificada Vs Diagnóstico Clínico:	29
Tabla 4	Sensibilidad TAB CD63:.....	30
Tabla 5	Correlación por Método de Pearson.....	31
Tabla 6	Correlación por Método de Kendall.	32
Tabla 7	Correlación por Spearman.	32

INTRODUCCION

Las Reacciones Adversas a Medicamentos son los efectos perjudiciales e inesperados que presenta el paciente cuando se le administran a dosis habituales con fines terapéuticos.¹ Todo medicamento supone un compromiso entre los beneficios y los posibles perjuicios, no hay medicamentos exentos de riesgos y todos tienen efectos secundarios los cuales se encuentran entre las diez causas principales de defunción en todo el mundo.² En algunos casos los costos asociados a dichos efectos, por ejemplo, en relación con la hospitalización, la cirugía y la pérdida de productividad, sobrepasan el costo de los medicamentos.³ Cuando las Reacciones Adversas a Medicamentos se identifican por el personal médico, se documenta dicha reacción en el expediente, se clasifica al paciente como “alérgico” al medicamento en cuestión, se suspende la administración del mismo e incluso se le pide al paciente que a partir de este momento refiera al personal médico que es “alérgico” al medicamento administrado. Los pacientes cargan con este estigma durante toda su vida y el medicamento deja de ser útil para ellos. Esto cobra una importancia vital cuando las opciones terapéuticas son escasas.^{1,3}

Alergia a Medicamentos (AM) es cuando una Reacción Adversa a Medicamentos es desencadenada por un mecanismo relacionado a la Hipersensibilidad Tipo I, es decir con participación de IgE. La mayoría de los fármacos tienen pesos moleculares menores de 1000δ (HAPTENOS), que requieren de la unión de moléculas proteicas, séricas o de la membrana celular para inducir una respuesta del sistema inmunológico.⁴ Cuando esta es humoral, es decir, con síntesis de inmunoglobulinas isotipo IgE o hipersensibilidad Tipo I, se desencadena una respuesta efectuada por basófilos, mastocitos y eosinófilos, solo en este caso podemos hablar de un mecanismo alérgico. Estas se presentan de manera inmediata a la administración de el medicamento y debe haber sensibilidad o exposición previa; son mediadas por IgE

el cual ese encuentra adherido a los receptores Fc de alta afinidad (FCεRI) de células cebadas y a los basófilos circulantes; al encontrarse dos IgE en la membrana de esas células el desenlace es la liberación de potentes mediadores inflamatorios que pueden afectar a un órgano en concreto (piel, conjuntiva, vía respiratoria, otros) o más órganos diferentes como una enfermedad sistémica generalizada es decir Anafilaxia.^{4,5}

Las reacciones alérgicas a medicamentos representan en numerosas ocasiones, un grave problema diagnóstico; esto se debe, al riesgo potencial de los métodos in vivo y a la falta de uso de pruebas in vitro en el laboratorio clínico por falta de estrategias adecuadas de diagnóstico. En los últimos años la Alérgica a medicamentos en hospitalización y la anafilaxia peri operatoria han aumentado, además son una causa común de morbilidad en nuestro país. Con el fin de conocer la frecuencia de alergia a medicamentos se han realizado estudios en población abierta del Distrito Federal y en otros estados de la república en centros de atención hospitalaria con especialidad de alergia; en todas las edades, el más significativo en el servicio de alergia e inmunología clínica del Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda del Centro Médico Nacional Siglo XXI, de enero a diciembre del 2002, se encontró una prevalencia del 28.23%, con incidencia del 87.27%.el 62% eran mujeres y 38% hombres. Con edad promedio de 45 y 42 años, respectivamente, con rango de edad para ambos de 16 a 81 años.^{1,6}

Por todo esto la Alergia a Medicamentos en nuestro país puede considerarse como un problema de salud pública sobre todo en aquellos padecimientos cuyo tratamiento es único y necesario como: la Tuberculosis, Diabetes mellitus, Hipertensión, Asma Bronquial, Cáncer, SIDA y además incide el ausentismo laboral, escolar, baja productividad, baja calidad de vida y alto costo en la atención médica pública y privada. ^{1,2}

Los medicamentos que con mayor frecuencia provocan alergia son: antibióticos 50%, principalmente penicilinas (Betalactámicos: Benzilpenicilinas, Aminopenicilinas), Cefalosporinas, Carbapenems, Monolactámicos, Macrólidos y Sulfas), analgésicos, látex antiinflamatorios no esteroideos (AINES) 35%, y otros medicamentos: antitusivos, dentales, anestésicos, antihipertensivos, antifúngicos.^{2.4.}

El laboratorio clínico de alergia e inmunología sirve de apoyo para confirmar, descartar la hipótesis o diagnóstico y seguimiento del tratamiento por cambio de fármaco o desensibilización e inmunoterapia; realizando diversas pruebas in vivo e in vitro.^{7.}

Las pruebas in vivo o pruebas cutáneas resultan positivas en un 80 a 85% se usan ocasionalmente para inducir dermatitis local de 48 a 72 hrs pero pueden poner en riesgo la vida del paciente, no se recomiendan, al igual que las pruebas orales y/o parenterales.^{7.8.}

En la actualidad debido al avance de la metodología inmuno-histoquímica y molecular, es posible la producción de anticuerpos monoclonales, fluorocromos y el uso de equipos de citometría de flujo de este modo, es posible tener más pruebas in vitro de mayor especificidad y sensibilidad como: Determinación de IgE Total y Específica por: Inmuno ensayo (RAST), Enzimo-fluoro-inmuno ensayos (CAP-IgE específica) y otros de inhibición RAST. Pruebas de activación de basófilos por: Degranulación de basófilos (TDB mod) (mediada por IgE por tinción azul toluidina enriquecida en población de basófilos, curva dosis respuesta y tinción modificada), Prueba de Activación de basófilos mediada por IgE con expresión de CD63 (TAB-CD63), (método por citometría de flujo con curva dosis respuesta, control negativo de PBS y control positivo de la fMPL). Estas técnicas tienen ventajas sobre las in vivo ya que evitan el riesgo de una reacción de hipersensibilidad y permiten identificar y cuantificar la respuesta del alérgeno (medicamentos) con una mayor sensibilidad y especificidad dependiendo del mecanismo de la reacción adversa a los medicamentos.⁹ La

Reproducibilidad de los métodos es mejor para los betalactámicos que para AINES y otros medicamentos.^{6,10.}

Las pruebas de laboratorio in vitro basadas en la Degranulación de Basófilos (TDBH-Shelly-Morton & Soifer) tienen como principal limitación el número bajo de basófilos en sangre periférica, que puede ser superada por enriquecimiento por concentración y por uso de gradientes de concentración además de mejoramiento en las técnicas de tinción de los gránulos meta cromáticos de los basófilos.^{6.}

La prueba de laboratorio Degranulación de Basófilos modificada Irigoyen-García (TDB mod), es un método in vitro confiable y eficaz para sustentar el diagnóstico de alergia a medicamentos; la modificación de la prueba permite enriquecer por concentración la cantidad de basófilos en la muestra de sangre periférica de 3 a 4 veces, además la modificación a la tinción original con azul de toluidina al 0.1% permite visualizar, mas fácilmente las granulaciones de histamina meta cromáticas y la curva dosis respuesta monitorea la respuesta de activación y liberación de histamina provocando la disminución de los basófilos con respecto a un basal (control negativo).

Los basófilos son capaces de liberar el contenido de sus gránulos tras un proceso de activación dependiente del estímulo antigénico. La degranulación que ocurre tras el puenteo divalente de receptores IgE por acción de un alérgeno, en este caso un medicamento, provoca la fusión intracitoplasmática de los gránulos y la fusión de la membrana de estos con la membrana plasmática, con lo que moléculas presentes en la membrana de los gránulos, tales como la molécula CD 63, se expresarán en la membrana del basófilo, cuando éste se encuentre activado.^{11.}

El CD63 es un tetraspano, proteína granular de 53 kDa que se expresa no sólo en los gránulos del basófilo y en la superficie de éste cuando se activa, sino también en monocitos, macrófagos y plaquetas. Esta proteína es el único marcador conocido que aparece en la superficie del basófilo cuando se activa. La expresión de este marcador

se correlaciona con la degranulación, lo que hace que esta molécula sea un marcador ideal de activación del basófilo.^{10,11.}

En la técnica de estimulación *in vitro* con el alérgeno, las células de sangre periférica son incubadas con el alérgeno sospechoso durante un periodo de 15–40 minutos y a 37°C. Tras parar la reacción, se procede a la tinción con anticuerpos marcados con fluorocromos: Anti-CD63-PE y anti-IgE-FITC. Se utilizan dos controles, el negativo, en el que las células se incuban con el buffer utilizado en el ensayo, que contiene IL3 (control negativo o estimulación basal) y como control positivo se puede utilizar una anti-IgE. La evaluación de la positividad de los resultados se realiza en base a la estimación de los puntos de corte para cada alérgeno, tras realización de curvas ROC.^{12.}

La técnica ha sido considerada como válida para el diagnóstico alergológico *in vitro*, donde ha sido validada para diferentes alérgenos: inhalantes, venenos de himenópteros, látex, relajantes musculares, antibióticos betalactámicos, pirazonas, AINES.^{13.}

Mediante esta técnica es posible obtener resultados clínicos reproducibles y significativos, incluso utilizando diferentes protocolos.^{14.} La citometría de flujo TAB representa un gran avance en el campo del diagnóstico de la patología alérgica *in vitro*, no existen justificaciones técnicas importantes para privar a los pacientes alérgicos de la práctica de pruebas TAB indicadas clínicamente y que se pueden realizar de un modo fiable por cualquier laboratorio con una experiencia adecuada en el diagnóstico de alergia y en citometría de flujo.^{15.}

Sin embargo un resultado negativo a un medicamento por metodologías que evalúan hipersensibilidad tipo I no descarta el diagnóstico alérgico por los diferentes mecanismos de hipersensibilidad y de degranulación de basófilos, por lo que resulta

una buena estrategia solicitar de 1 a 2 pruebas in vitro combinando TDB y TAB CD63 y, en algunos casos.¹⁶

En el Hospital Juárez de México el diagnóstico de AM se realiza en base al antecedente del mismo, lo que provoca evitar dicho medicamento sin haber hecho las pruebas de laboratorio necesarias para identificar la fisiopatología de la misma, la causa de esto es que las pruebas no han sido evaluadas en nuestra población y por lo tanto no han sido difundidas entre el personal por lo que evaluar estas pruebas en nuestros pacientes es de gran importancia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico de Alergia a Medicamentos es una directriz en la atención médica, tan importante que incluso marca el expediente físico de un paciente desde su portada, dicho diagnóstico se adjudica a todos los pacientes que presentan una Reacción Adversa a Medicamento, con las consecuencias que esto conlleva, sin embargo no todos presentan el mecanismo de Hipersensibilidad Tipo I. Actualmente, en los casos necesarios, el diagnóstico de Alergia a Medicamentos puede ser realizado a través de pruebas de Reto a Medicamentos, sin embargo dichas pruebas conllevan el riesgo de una Reacción Alérgica que puede ocasionar la muerte por Anafilaxia. El Mecanismo de Hipersensibilidad tipo I puede ser demostrado a nivel celular a través de las pruebas in vitro: Degranulación de Basófilos (TDB mod.) y Prueba de Activación de basófilos por CD63 (TAB CD63). Al realizar dichas pruebas es posible identificar y por lo tanto Diagnosticar con certeza a todos los pacientes que realmente presentan una Alergia a Medicamentos permitiéndonos en este caso realizar terapias encaminadas a corregir la presentación del antígeno ante el sistema inmunológico con la finalidad de poder seguir utilizando dicho medicamento, lo cual en muchas ocasiones es de vital importancia terapéutica, y en el caso contrario descartar dicho Diagnóstico lo cual nos permite evaluar la probabilidad de que, en caso necesario, es posible usar el medicamento en cuestión bajo ciertas precauciones ya que la Reacción Adversa previa pudo ser consecuencia de una variante pasajera.

Sin embargo dichas pruebas no han sido evaluadas en nuestra población y por lo tanto no se realizan de manera rutinaria.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Las pruebas in vitro Degranulación de Basófilos (TDB mod.) y Activación de Basófilos por CD63 (TAB CD63), solas y en conjunto, pueden descartar o confirmar la Alergia a Penicilina en los pacientes del Hospital Juárez de México que presentan dicho diagnóstico documentado en el Expediente?

OBJETIVOS

GENERAL:

Descartar o confirmar la Alergia a Penicilina en los pacientes del Hospital Juárez de México que presentan dicho diagnóstico documentado en el Expediente a través de las pruebas in vitro Degranulación de Basófilos (TDB mod.) y Activación de Basófilos por CD63 (TAB CD63).

ESPECÍFICOS

1. Diagnosticar a los pacientes que presentan Alergia a Penicilina a través de la demostración del mecanismo de Hipersensibilidad Tipo I por cualquiera de los dos pruebas in vitro: Degranulación de basófilos (TDB mod.) y Prueba de Activación de basófilos por CD63 (TAB CD63)
2. Comparar los resultados obtenidos por cada una de las pruebas contra el Diagnóstico Clínico el cual es el estándar de oro, con la finalidad de reconocer a los pacientes que presentan Alergia a Medicamentos demostrable por cualquiera de los dos métodos.
3. Evaluar la especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada prueba comparando el resultado de cada una contra el “estándar de oro” es decir el Diagnóstico Clínico.
4. Evaluar la correlación de las pruebas por Pearson, Kendall y Spearman.

HIPOTESIS

Las pruebas in vitro Degranulación de Basófilos (TDB mod.) y Activación de Basófilos por CD63 (TAB CD63), solas y en conjunto, nos permiten descartar o confirmar el diagnóstico de Alergia a Penicilina en los pacientes del Hospital Juárez de México que presentan dicho diagnóstico documentado en el Expediente.

METODOLOGIA

Población Objetivo.

Pacientes del Hospital Juárez de México que presentan Diagnóstico de Alergia a Penicilina Documentado en el Expediente Físico.

METODO DE MUESTREO

Criterios de Inclusión:

1. Edad mayor o igual a 18 años.
2. Cualquier Género.
3. Antecedente y diagnóstico de Alergia a Penicilina documentados en el Expediente del Hospital.
4. Diagnóstico de Alergia a Penicilina confirmado a través de la Historia Clínica del servicio de Alergología del Hospital Juárez de México.
5. Consentimiento Informado por escrito

Criterios de No Inclusión:

1. Pacientes que usen drogas antihistamínicas o esteroides en el momento del estudio.
2. Pacientes con inmunosupresión por cualquier causa.
3. Pacientes sin confirmación del diagnóstico a través de la Historia clínica del Servicio de Alergología del Hospital Juárez de México.
4. Pacientes con que no firmen consentimiento para el estudio.

Criterios de Salida

1. Muestra inadecuada

DISEÑO

Se realizó estudio Comparativo, Experimental, Transversal, Abierto y Controlado de Septiembre del 2011 a Noviembre del 2011, a un total de 26 pacientes con antecedente y diagnóstico de Alergia a Penicilina documentados en el expediente, a quienes se les realizaron las pruebas in vitro de TDB mod. y TAB CD63 con penicilina y con solución salina isotónica como control negativo, tomando a cada paciente una muestra de 20ml de Sangre total en dos tubos de 10ml con Heparina como anticoagulante, para realizar las dos pruebas las cuales fueron realizadas de la siguiente manera:

TDB mod.:

Con 10 ml de sangre total la muestra fue dividida en dos partes iguales, a través de la técnica de Schiller modificada por Irigoyen-García se realiza la exposición a solución salina y a penicilina previa verificación del pH y la temperatura con la finalidad de que estos factores no intervengan en el resultado. Se expuso la muestra por 15-40min a 37°C, posteriormente se mide el porcentaje de degranulación por citometría directa. El resultado se expresa en Porcentaje de Degranulación en una escala de 0 a 100 considerando positivo mayor o igual al 30%.

TAB-CD63:

En un tubo de sangre total de 10ml la muestra es dividida en dos partes, la primera es expuesta a penicilina y la segunda a solución salina isotónica, posteriormente usando un Kit de marcadores monoclonales de CD63 en la muestra se marcan las células para posteriormente realizar la medición en el citómetro de flujo. La variación en las propiedades de la muestra permite calcular en porcentaje la cantidad de células que presentan la expresión de CD63. Se realizara control negativo con

Solución Salina isotónica. El Porcentaje de Expresión de CD63: Se expresa en una escala de 0 a 100. Se considera positivo al encontrar un porcentaje mayor o igual a 15%.

Actualmente no se cuenta con una prueba de laboratorio como Estándar de Oro en el diagnóstico de Alergia a Medicamentos por lo que el Diagnóstico Clínico será nuestro punto de diferencia para realizar los cálculos de Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de cada prueba. Considerando la confirmación del Diagnóstico de Alergia a Penicilina a los pacientes que presenten positividad en cualquiera de las dos pruebas siempre y cuando el control negativo sea congruente. Realizaremos correlación paramétrica de ambas pruebas a través del método de Pearson, y relación no paramétrica a través de los métodos de Kendall y Spearman.

VARIABLES

Independientes.

TDB mod.

Categoría: Cuantitativa.

Escala: Nominal Porcentual; 0% a 100%

Descripción Operativa:

Positiva: al presentar un porcentaje mayor o igual al 30%

Negativa: al presentar un porcentaje menor de 30%

TAB CD63.

Categoría: Cuantitativa

Escala: Nominal Porcentual 0% a 100%

Descripción Operativa:

Positiva: al presentar un porcentaje mayor o igual al 15%

Negativa: al presentar un porcentaje menor de 15%

Dependiente

Diagnóstico de Alergia a Penicilina.

Categoría: Cualitativa

Escala. Positivo / Negativo

Descripción Operativa:

POSITIVO. Al presentar resultado positivo en cualquiera de las pruebas, es decir: Degranulación de Basófilos TBD mod: Porcentaje mayor o igual a 30% ó Activación de Basófilos TAB CD63: Porcentaje mayor o igual a 15%

NEGATIVA. Al presentar resultado negativo en Ambas pruebas, es decir: Degranulación de Basófilos TBD mod: Porcentaje menor a 30% y Activación de Basófilos TAB CD63: Porcentaje mayor a 15%

CONSIDERACIONES ETICAS

Riesgo:

MINIMO

Procedimiento que condiciona el riesgo:

Toma de muestra de sangre total por punción Venosa.

Propuesta de Control de Riesgo:

Prevención: Uso de técnica estandarizada de punción venosa braquial.

Minimización del Riesgo: Toma de muestra por médico con punzocat desechable.

Identificación Temprana de Evento Adverso: Vigilancia en el consultorio por 10min posterior a la punción. Orientación al paciente y cita abierta a Urgencias en caso de anormalidades en la región.

Todos los pacientes firmaron Consentimiento Informado como requisito para ingresar al estudio.

RESULTADOS.

Se captaron un total de 26 pacientes, 1 fue excluido ya que no se realizó TDB mod. ya que la muestra fue inadecuada debido a la escasa cantidad de basófilos en la misma (menos de 10). Por lo que se realizaron un total de 25.

TABLA 1.

No	S	TAB CD 63 C.N.	TAB CD63 con Penicilina	TDB mod C.N.	TDB mod con Penicilina
1	F	3.04%	2.67%	0%	28.57%
2	M	7.92%	9.43%	0%	15%
3	F	15.90%	25.65%	0%	33.33%
4	F	11.27%	11.58%	0%	25%
5	F	4.85%	7.12%	0%	26.6%
6	F	0.80%	2.03%	0%	12.5%
7	M	1.88%	1.16%	0%	12.5%
8	F	0.44%	5.94%	0%	28.6%
9	F	2.57%	18.75%	0%	32%
10	F	6.42%	6.97%	0%	23.1%
11	F	4.43%	4.94%	0%	28%
12	M	0.93%	1.27%	0%	44.0%
13	F	7.66%	18.30%	0%	35.7%
14	F	0.0%	7.71%	0%	14.28%
15	F	0.44%	3.26%	0%	3.22%
16	F	1.15%	16.94%	0%	15.6%
17	M	4.98%	9.78%	0%	41.66%
18	M	4.23%	54.33%	0%	37.5%
19	M	9.57%	16.11%	0%	26.3%
20	F	10.02%	33.76%	0%	40%
21	F	9.99%	18.63%	0%	53.8%
22	F	7.18%	11.60%	0%	20%
23	M	4.00%	4.17%	0%	0%
24	M	3.26%	6.40%	0%	0%
25	F	0%	82.00%	0%	57.1%

Tabla 1 Resultados de DC63 y TDB

(C.N.: Control Negativo, M: Masculino, F: Femenino.) Tabla de resultados donde se muestran en porcentaje lo obtenido en ambas pruebas con control negativo a Solución Salina. Se encuentran sombreados en azul los pacientes positivos a TAB CD63 mayor o igual a 15%. Se encuentran sombreados en amarillo los pacientes positivos a TDB mod es decir con porcentaje mayor o igual a 30%.

El grupo de estudio está conformado por 8 hombres y 17 mujeres, 32% y 68% respectivamente, con una importante inclinación hacia el sexo femenino estableciendo una relación aproximada de 2:1. Los grupos etarios fueron divididos en los siguientes grupos: 18-30 4% es decir 1 paciente, 31-50 40% es decir 10 pacientes, 51-70 52% es decir 13 pacientes y >70 4% es decir 1 paciente, con predominio del 92% en las edades comprendidas entre los 31 y 70 años.

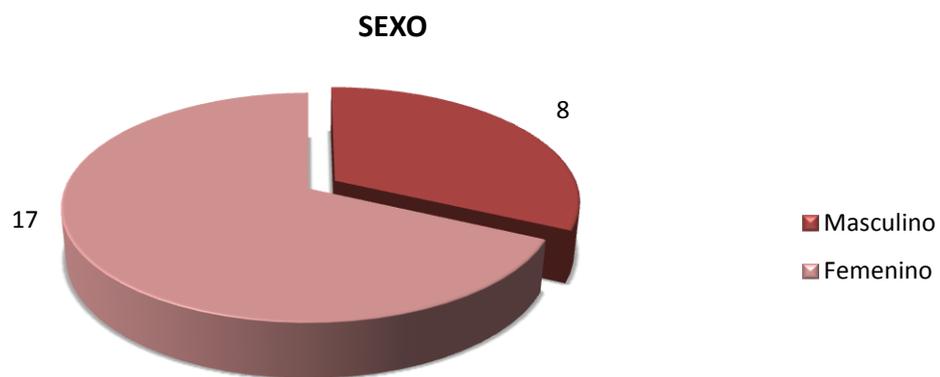


Figura 1 Distribución de la población estudiada por Sexo.

Grupos por sexo: la primera porción corresponde a las mujeres representando el 68%, la segunda porción corresponde a los hombres y representa el 32%.

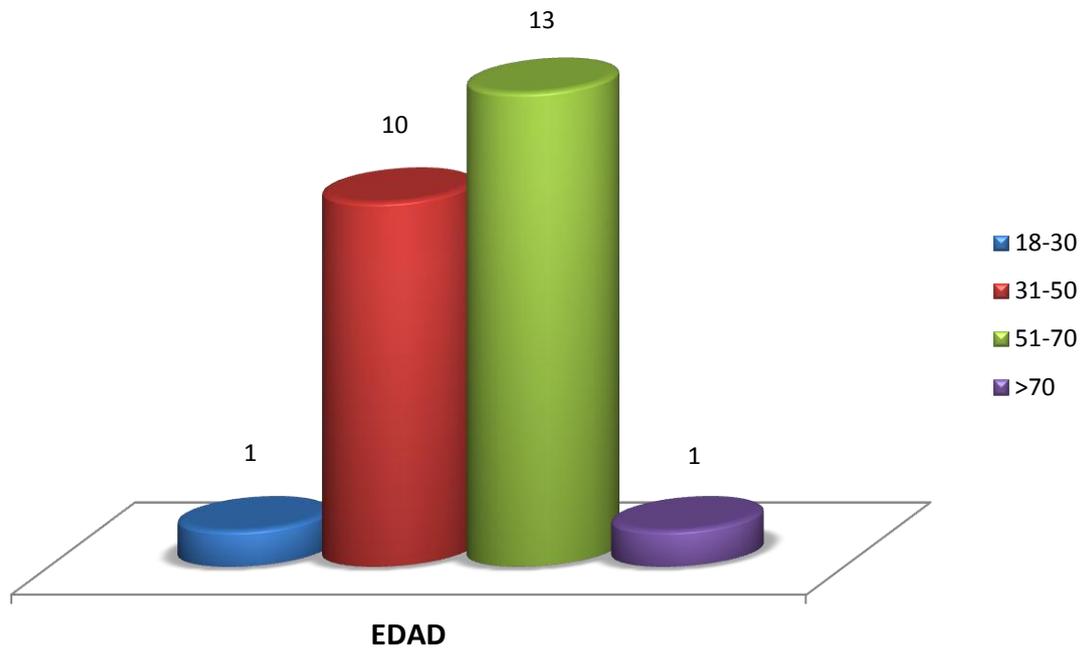


Figura 2 Distribución de la población estudiada por edad.

Los grupos etarios se representan la figura encontrando la primera barra que corresponde a 18-30 años(4%),segunda barra 31-50 (40%),tercera barra 51-70 (52%) y >70 (4%) , con predominio del 92% en las edades comprendidas entre los 31 y 70 años.

En la prueba de TDB mod. de un total de 25 pacientes 9 pacientes presentaron una degranulación mayor o igual al 30% al exponerse a penicilina, es decir el 36% de las muestras. La exposición a solución salina fue 0% en las 25 muestras.

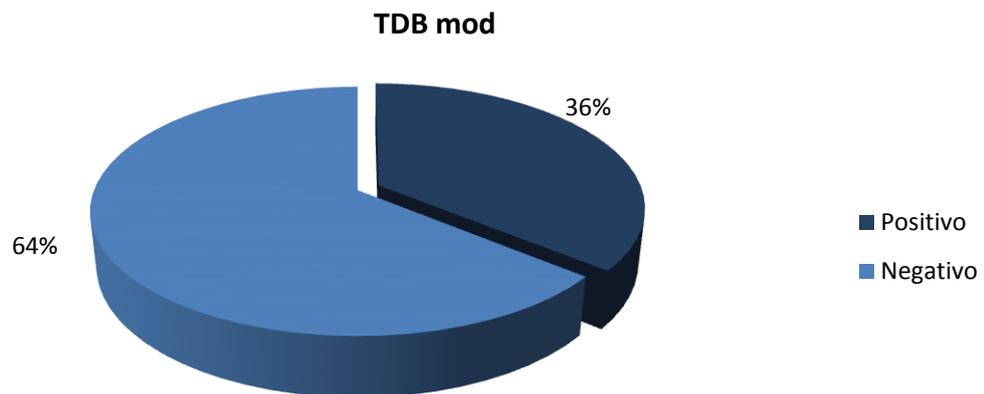


Figura 3 Degranulación de Basófilos modificada TBD mod.

La primera porción representa los pacientes negativos a la prueba TDB mod, un total de 16 pacientes, la segunda porción representa los pacientes positivos a TBD mod. un total de 9 pacientes.

En TAB-CD63 de las 25 muestras expuestas a penicilina 9 resultaron positivas ya que presentaron un porcentaje de expresión mayor al 15%, es decir un 36% de las muestras. 24 muestras expuestas a solución salina fueron negativas con un porcentaje menor a 15, una presento un 15.90% por lo que se considero positiva, dicha muestra presento 25.65% al exponerse a penicilina.

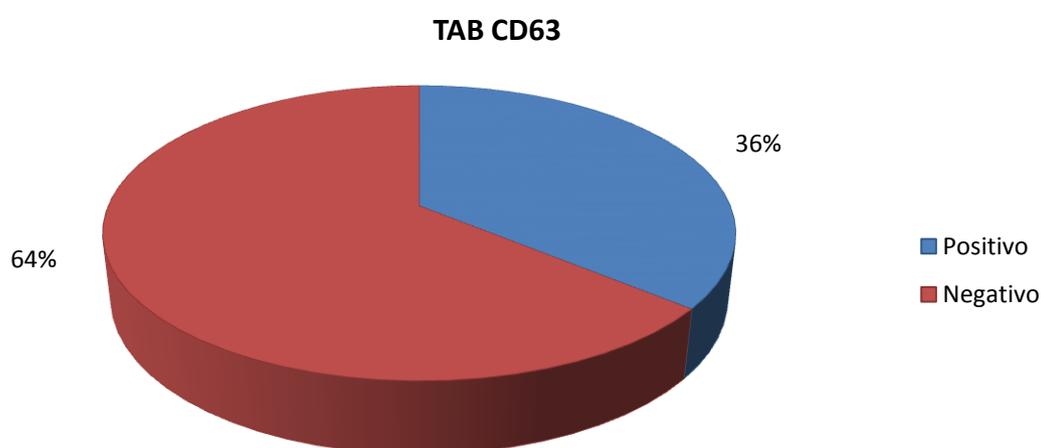


Figura 4 Activación de Basófilos por CD63.

La primera porción representa los pacientes negativos a TAB CD63 16 pacientes, la segunda porción representa los pacientes positivos a TAB CD63 9 pacientes.

Los pacientes positivos en cualquiera de las pruebas fueron 11, es decir el 44%, sin embargo los positivos a TAB CD63 y TDB mod. 7 pacientes es decir 28%.

ANALISIS DE RESULTADOS.

Comparando las pruebas en solitario contra el “estándar de oro” es decir el Diagnóstico Clínico a través de tablas de dos por dos encontramos los siguientes resultados.

TAB-CD63: Presentó 9 Verdaderos positivos, un Falso Positivo, 24 Verdaderos negativos y 16 falsos negativos. Un total de 50 pruebas. Al hacer los cálculos en la tabla de 2x2 encontramos que la prueba nos da un Diagnóstico correcto en el 66% de los casos, presenta una Sensibilidad del 36%, Especificidad de 96%, Valor Predictivo Positivo de 0.9 y Valor Predictivo Negativo de 0.6, con un intervalo de confianza de 95%.

		Diagnóstico Clínico		Total
		Positivo	Negativo	
TAB-CD63	Positivo	9	1	10
	Negativo	16	24	40
Total		25	25	50

Diagnóstico correcto 66%

Sensibilidad 36%

Especificidad 96%

Valor predictivo positivo 0.9

Valor predictivo negativo 0.6

Tabla 2 Activación de Basófilos por CD63 Vs Diagnóstico Clínico:

Tabla de 2 por 2, Se muestran los valores de Sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo y Negativo, además de Diagnóstico correcto.

TDB mod.: Presentó 9 Verdaderos positivos, 16 falsos Negativos, 0 Falsos Positivos y 25 Verdaderos negativos. Un total de 50 pruebas. Al hacer los cálculos en la tabla de 2x2 encontramos que la prueba nos da un Diagnóstico correcto en el 68% de los casos, presenta una Sensibilidad del 36%, Especificidad de 100%, Valor Predictivo Positivo de 1 y Valor Predictivo Negativo de 0.61, con un intervalo de confianza de 95%.

		Diagnóstico Clínico		Total
		Positivo	Negativo	
TDB mod	Positivo	9	0	9
	Negativo	16	25	41
	Total	25	25	50

Diagnóstico correcto **68%**

Sensibilidad **36%**

Especificidad **100%**

Valor predictivo positivo **1**

Valor predictivo negativo **0.61**

.Tabla 3 Degranulación de Basófilos Modificada Vs Diagnóstico Clínico:

Tabla de 2 por 2. Se muestran los valores de Sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo y Negativo, además de Diagnóstico correcto.

Ambas pruebas muestran una Sensibilidad semejante 36% dentro de las muestras con antecedente clínico, sin embargo esta misma varía al considerar que 7 muestras fueron positivas a ambas pruebas, 11 fueron positivas a al menos una de las pruebas, de esta manera aplicando la fórmula de sensibilidad: Verdaderos positivos entre los pacientes con antecedente clínico obtenemos los siguientes resultados.

PRUEBAS	SENSIBILIDAD	
	%	Pacientes
TAB CD63	36%	9
TDB mod	36%	9
TAB CD63 y TDB mod	28%	7
TAB CD63 o TDB mod	44%	11

Tabla 4 Sensibilidad TAB CD63:

Activación de Basófilos por CD63, TDB mod: Degranulación de Basófilos modificada, p: pacientes.

La correlación de las pruebas se llevo realizó con los métodos de Pearson, Kendall y Spearman con los siguientes resultados. (tabla 5)

		TAB CD63	TDB mod
TAB CD63	Correlación de Pearson	1	0.653
	Nivel Significativo 0.01		0.0001
	N	50	50
TDB mod	Correlación de Pearson	0.666	1
	Nivel Significativo 0.01	0.0001	
	N	50	50

Tabla 5 Correlación por Método de Pearson.

La correlación por Pearson entre las pruebas es de 0.0001, se considera significativo un nivel desde 0.01. por lo que presentan un alta correlación paramétrica.

Correlación no Paramétrica

La correlación por Kendall se considera positiva con un nivel de 0.01, el coeficiente de correlación por Kendall fue de 0.0001. Por lo que las pruebas presentan una alta correlación no paramétrica.

Kendall's tau_b		CD	DEG
CD	Coeficiente de Correlación	1.000	0.641
	Nivel significativo 0.01		0.0001
	N	50	50
DEG	Coeficiente de Correlación	0.641	1.000
	Nivel Significativo 0.01	0.0001	
	N	50	50

Tabla 6 Correlación por Método de Kendall.

La correlación por Spearman se considera significativa con un nivel de 0.01, el coeficiente de correlación por Spearman obtenido fue de 0.0001. Por lo que las pruebas presentan una alta relación No Paramétrica.

Sperman's rho		CD	DEG
CD	Coeficiente de Correlación	1.000	0.647
	Nivel Significativo 0.01		0.0001
	N	50	50
DEG	Coeficiente de Correlación	0.647	1.000
	Nivel Significativo 0.01	0.0001	
	N	50	50

Tabla 7 Correlación por Spearman.

Graficando los resultados obtenidos en la exposición a penicilina de ambas pruebas en forma lineal, con los pacientes en el eje "x" y el porcentaje obtenido a la exposición con penicilina en el eje "y" observamos una tendencia similar en la mayoría del trazo.

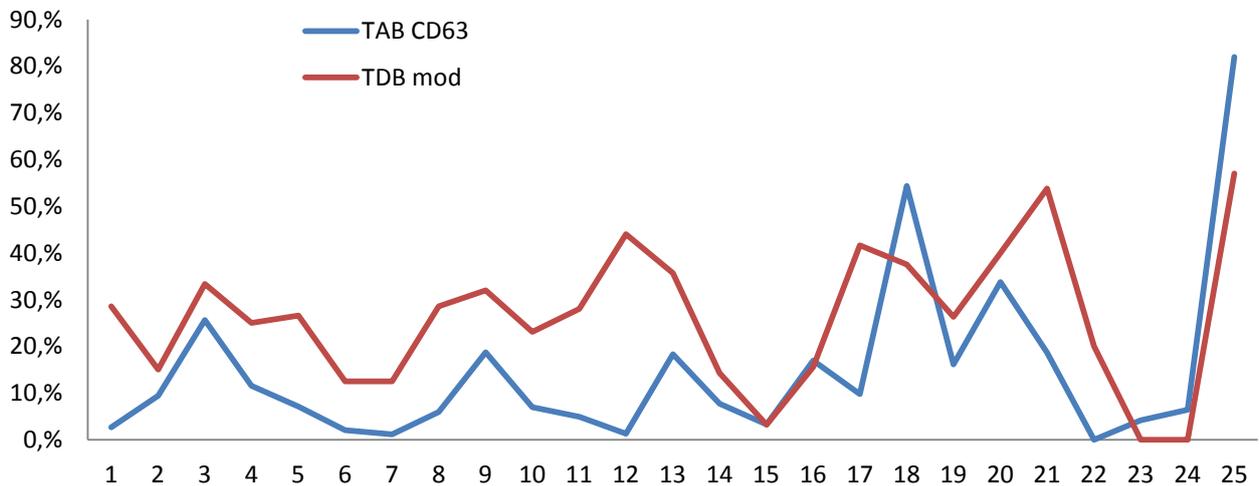


Figura 5 TAB y TDB

Tendencia. Los trazos corresponden a los resultados obtenidos ante la exposición a penicilina de ambas pruebas.

CONCLUSIONES

La prueba diagnóstica in vitro: Degranulación de Basófilos TBD mod presenta una sensibilidad de 36% y especificidad 100%, con un valor predictivo positivo de 1 y valor predictivo negativo de 0.61, al ser comparada con el “estándar de oro” por lo que es una prueba fiable para identificar a los pacientes que no presentan Alergia a Penicilina.

La prueba diagnóstica in vitro: Activación Basófilos por CD63 TAB CD63 presenta una sensibilidad de 36% y especificidad 96%, con un valor predictivo positivo de 0.9 y valor predictivo negativo de 0.6. al ser comparada con el “estándar de oro” por lo que es una prueba fiable para identificar a los pacientes que no presentan Alergia a Penicilina sin embargo no es superior que la Degranulación de Basófilos para dicho fin.

Al realizar las pruebas in vitro Degranulación de Basófilos (TDB mod.) y Activación de Basófilos por CD63 (TAB CD63) encontramos que solo es posible confirmar el diagnóstico en el 36% de los mismos tomando en cuenta un solo método y en 44% tomando en cuenta los dos, solo en estos pacientes es posible identificar un mecanismo fisiopatológico desencadenado por Hipersensibilidad tipo I, por lo que el resto de los pacientes expresan la Reacción adversa por mecanismos diferentes. Por lo que dichas pruebas solas y en conjunto no nos permiten identificar de manera fiable a los pacientes que presentan Alergia a Penicilina pero si a los que No presentan esta reacción alérgica.

Las pruebas in vitro: Degranulación de Basófilos TBD mod y Activación Basófilos por CD63 TAB CD63, demostraron tener una correlación paramétrica y no paramétrica altamente significativas lo que se traduce en que ambas pruebas tienen el mismo comportamiento, esto aumenta la certeza al ser utilizadas de forma simultánea

El diagnóstico de Alergia a Penicilina puede realizarse mediante el uso de cualquiera de estas dos técnicas con alta especificidad, sin embargo, su sensibilidad es muy baja por lo que puede haber una gran cantidad de pacientes que presentan Alergia a Penicilina mediada por mecanismos fisiopatológicos no relacionados con la Hipersensibilidad Tipo I.

Es necesario seguir usando estas pruebas con la finalidad de obtener más datos sobre su desempeño en nuestra población.

BIBLIOGRAFÍA:

1. López P.G y cols., *Prevalencia de las enfermedades alérgicas en la Ciudad de México. Rev. Alergia Mex* 2009 56(3):72 - 79
2. Padilla S. y cols. Prevalencia de alergia a medicamentos en un grupo de niños y adolescentes asmáticos del noreste de México *Rev Alergia Mex* 2006; 53(5):179-182
3. Goldman L. y cols. CECIL. Tratado de Medicina Interna, 23ª edición, ELSEVIER, 2009. Capítulo 262,1638-1640.
4. Sanz M.L. y cols. Test de activación de basófilos en el diagnóstico de alergia a medicamentos. *ANALES* 2003, 26(2):1 – 11
5. Fauci y cols, *Harrison Principios de Medicina Interna*, 17a ED McGraw-Hill, 2009. Capítulo 311, 2061-2070.
6. Mora N.A y cols. Alergia a medicamentos evaluada con la prueba de Shelley modificada. Serie de casos *Rev Alergia Méx* 2006;53(3):89-93
7. De Weck y cols. Diagnostic Tests Based on Human Basophils: More Potentials and Perspectives Than Pitfalls. II. Technical Issues *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008; Vol. 18(3): 143-155
8. M.L.Sanz. y cols. Activación de basófilos en la evaluación de hipersensibilidad inmediata por medicamentos. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol* 2009; 9: 298-304.
9. Boumiza R. y cols. Prueba de activación de basófilos por citometría de flujo. *Clinical and molecular allergy*:2005 3 : 9 -9

10. Sanz M.L. y cols. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD 63 Expression in patients with immediate.type reactions to Beta-Lactam antibiotics. Clin Exp Allergy 2002.,32: 1-10.
11. Morton M y cols, Degranulación de Basófilos y pruebas cutáneas. Allergy and Clinic Immunology 1975, 56(2) 127-132
12. Sanz M.L. y cols. Activación de basófilos en la evaluación de hipersensibilidad inmediata por medicamentos. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol 2009; 9: 298-304.
13. De Wick A. y cols. Cellular Allergen Stimulation Test (FAST/Fow CAST). Technical and clinical evaluation of a new diagnostic test in allefgy and pseudoallergy. ACI Internacional 2002; 14(5):204-215
14. Sans M.L. y cols. Test de activación de basófilos TAB-CD63 en el Diagnóstico in vitro de las enfermedades alérgicas. Reuniones Anuales. Ponencias editoriales alergoaragon.or/2000/tercera 2html .
15. Fernández P. y cols. Expresión de CD-63 en basófilos como indicador de degranulación inducida por látex, diclofenaco sódico o ácido acetilsalicílico. Revista Latinoamericana de Actualidades Médicas 2008/Volumen 2/N-1 issn0718-4743
16. Malbran A.y cols. Basophil degranulation in diclofenac reactive patients is not associated with CD63 expresión. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2005 36(1) 3-8

ANEXOS

1. CONSENTIMIENTO INFORMADO
2. CRONOGRAMA
3. HOJA DE RECOLECCION DE DATOS
4. DIAGRAMA DE FLUJO



HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN



Consentimiento Informado para Participantes de Investigación

“Evaluación de Pruebas in vitro: Activación de Basófilos (TAB-CD63) y Degranulación de Basófilos modificada (TDB mod) en el diagnóstico de alergia a medicamentos, estudio pivote en 30 pacientes”

El propósito de esta ficha de consentimiento es proveer a los participantes en esta investigación con una clara explicación de la naturaleza de la misma, así como de su rol en ella como participantes.

La presente investigación es conducida por el Dr. Carlos Ignacio Marín Silva, Residente del Hospital Juárez de México. La meta de este estudio es Evaluar las pruebas de Activación de Basófilos (TAB-CD63) y Degranulación de Basófilos modificada (TDB mod). en el diagnóstico de Alergia a Medicamentos.

Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá responder preguntas en una entrevista y la donación de una muestra de sangres de 20ml. Esto tomará aproximadamente 30minutos de su tiempo. Lo que conversemos durante esta sesión será transcrito a su expediente clínico del Hospital Juárez de México.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Quedarán registrados en el expediente clínico de él hospital por lo que solo podrán ser revisados por personal médico. La muestra será utilizada exclusivamente para la realización de las pruebas realizadas, los residuos serán procesados de acuerdo a los estándares internacionales manejados en el hospital.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma. Si alguna de las preguntas durante la entrevista le parecen incómodas, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no responderlas.

Desde ya le agradecemos su participación.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación. He sido informado (a) de que la meta de este estudio es

Me han indicado también que tendré que dar información sobre mis antecedentes médicos lo cual se registrara en mi expediente y donar una muestra de 15ml de sangre lo cual tomará aproximadamente 30 minutos.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona.

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando éste haya concluido. Para esto, puedo contactar al Dr. Carlos Ignacio Marín Silva al teléfono 55 40 84 39 62.

Nombre del Participante	Firma del Participante	Fecha	Teléfono	Expediente
-------------------------	------------------------	-------	----------	------------

DIAGRAMA DE FLUJO

